

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Κλωνοποίηση, έκφραση, καθαρισμός και μελέτες πρόσδεσης αναστολέων στην ανθρώπινη κυτοσολική καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK)



Cloning, expression, purification and inhibition studies of inhibitors of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)

Διπλωματική Εργασία

Εξάρχου Αγγελική

2019

~ 1 ~

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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

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

- **Δρ. Λεωνίδας Δ.Δημήτριος**

Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

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

*Αφιερώνεται στον παππού μου,
Εξάρχου Βασίλειο*

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας – Μεταβολισμού, Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη. Χαίρομαι διότι το θέμα το οποίο μου υπέδειξε ήταν ιδιαίτερα απαιτητικό και επέδειξε κατανόηση σε κάθε μου βήμα, με στήριξε στις δυσκολίες της διπλωματικής εργασίας και αφιέρωσε πολύτιμο προσωπικό χρόνο για τη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα και την Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, για την συνεργασία τους και την συνεισφορά τους στην ομαλή διεξαγωγή της παρούσας εργασίας. Ακόμη θα ήταν 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 τους, καθώς ήταν συχνές οι φορές που προσέτρεχα στα συγκεκριμένα εργαστήρια για τη χρήση οργάνων.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Δράκου Χριστίνα και τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο για τις υποδείξεις, την υπομονή, την αμέριστη βοήθειά και την ηθική υποστήριξη σε κάθε λογής πρόβλημα που είχα να αντιμετωπίσω κατά την διάρκεια αυτού του ταξιδιού. Επιπλέον δεν θα μπορούσα να παραλείψω την πολύτιμη προσφορά της υποψήφιας διδάκτορα Σολοβού Θεοδώρας καθώς και της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Γκούσκου Αναστασίας που ήταν δίπλα μου σε κάθε απορία που τους υπέβαλα με πολύτιμες συμβουλές και για το χρόνο που μου αφιέρωσαν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κυριάκη Ευθύμιο για τον άψογο χαρακτήρα, τις πολύτιμες συμβουλές και τον χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Παπαιωάννου Όλγα και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Κούλα Συμεών και Τσαγκαράκου Αναστασία για το όμορφο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο όλο αυτό τον καιρό. Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω τη βαθύτατη εκτίμησή μου για όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής & Λειτουργικής Βιοχημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καλούς μου φίλους και συνοδοιπόρους σε αυτό το ταξίδι Σταμάτη Ευγενία, Μπάρκα Θωμά, Κευσενίδου Παρασκευή και Λέκα Τζούλια για τις ατέλειωτες ώρες γέλιου και για την ηρεμία που μου προσέφεραν όλους αυτούς τους μήνες στο εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την ανιδιοτελή αγάπη, για την στήριξη, οικονομική και ηθική, όλα αυτά τα χρόνια και την πίστη τους σε εμένα.

Περίληψη

Η πρώτη δημοσιευμένη αναφορά για την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) έγινε το 1953 από τους Utter και Kurahashi με τον τίτλο «Μηχανισμός δράσης της καρβοξυλάσης του οξαλικού οξέος από το ήπαρ». Αργότερα το ένζυμο έλαβε το όνομα καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η πρώτη απομονωμένη ισομορφή του ενζύμου ήταν η μιτοχονδριακή από το συκώτι του κοτόπουλου αλλά οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κυτοσολική ισομορφή τα τελευταία χρόνια. Αποτελεί το ένζυμο κλειδί στην γλυκονεογένεση καθώς και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν νέες ιδέες για την αξιοποίηση της PEPCK ως φαρμακευτικό στόχο για την αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού των υδατανθράκων ή ακόμα και του καρκίνου.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η κλωνοποίηση, η έκφραση, η απομόνωση και η ανάπτυξη ενός κινητικού πρωτοκόλλου για την μελέτη πρόσδεσης αναστολέων στην κυτοσολική ισομορφή της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (cPEPCK). Πραγματοποιήθηκε κατασκευή φορέα έκφρασης του pGEX-6p-1-PCK1 με την μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού. Για την βέλτιστη βιολογική μελέτη του ενζύμου απαιτείται η έκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα και υψηλή καθαρότητα. Γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκαν πολλές κυτταρικές σειρές και διαφορετικές συνθήκες επαγωγής, συγκέντρώσεις επαγωγέα και θερμοκρασίες. Ακολούθησε χρωματογραφικός καθαρισμός της PEPCK σε υψηλή καθαρότητα και ποσότητα και πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός κινητικών πρωτοκόλλων για την μελέτη σύνδεσης αναστολέων υψηλης απόδοσης.

Abstract

The first published report on phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was made in 1953 by Utter and Kurahashi with the title «Mechanism of Action Oxalacetate Carboxylase from Liver». The enzyme was named phosphoenolpyruvate carboxykinase later. Interestingly, the first and only isolated isoform of PEPCK was mitochondrial PEPCK from chicken liver but later most studies had been focused upon cytosolic PEPCK. It is a key enzyme in gluconeogenesis as well as in other metabolic pathways. In recent years, new ideas have been developed for the utilization of PEPCK as a drug target for the treatment of metabolic disorders or even cancer.

The aim of this study is cloning, expression, purification and the development of a kinetic assay of a study of inhibitors to human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (cPEPCK). A vector named pGEX-6p-1-PCK1 was constructed with the method of homologous recombination. To achieve the full biological study of the enzyme, a great amount and a high purification of the protein is required. For this reason many induction conditions and different cell strains were used. Finally, a chromatographic cleaning of the PEPCK was followed in high purity and quantity and the kinetic protocols were designed for the study of the connection of higher performance inhibitors.

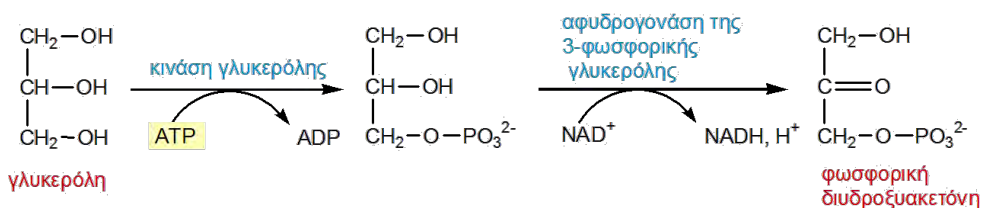
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Αναβολισμός υδατανθράκων- Γλυκονεογένεση

Η γλυκόζη αποτελεί τον κύριο υδατάνθρακα, που χρησιμοποιείται από τους ζωντανούς οργανισμούς για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών τους γι'αυτο τον λόγο ο οργανισμός έχει αναπτύξει έναν μηχανισμό βιοσύνθεσης της γλυκόζης από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ενώσεις, μια διεργασία που ονομάζεται γλυκονεογένεση. Η γλυκονεογένεση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, ενώ μικρές ποσότητες γλυκόζης συντίθενται και στους νεφρούς ενώ σε ακόμα μικρότερη έκταση λαμβάνει χώρα στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μυς ή στον καρδιακό μυ. [1]

Οι πρόδρομες ενώσεις από τις οποίες συντίθεται η γλυκόζη στους ζωικούς οργανισμούς είναι το γαλακτικό οξύ, που παράγεται στους μυς κατά την έντονη άσκηση, η γλυκερόλη που προκύπτει από τον καταβολισμό των τριγλυκεριδίων και τα αμινοξέα. Τα πρόδρομα μόρια μετατρέπονται πρώτα σε πυροσταφυλικό ή εισέρχονται στην γλυκονεογενετική πορεία ως ενδιάμεσα όπως είναι το οξαλικό και η φωσφορική διυδροξυακετόνη. [2]

Συγκεκριμένα η γλυκερόλη που προέρχεται από τα τριγλυκερίδια μετατρέπεται μέσω δύο σταδίων σε φωσφορική διυδροξυακετόνη ένα ενδιάμεσο της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Μετατροπή της γλυκερόλης [1]

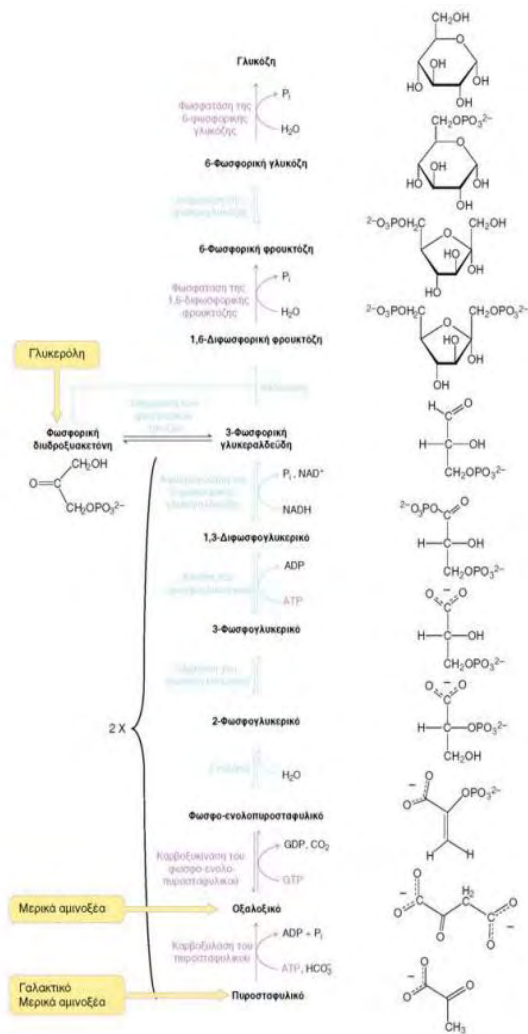
Το γαλακτικό που παράγεται στους ενεργούς σκελετικούς μυς κατά την έντονη μυϊκή άσκηση με την δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό, μέσω μίας κυκλικής μεταβολικής οδού που ονομάζεται κύκλος Cori, το οποίο εισέρχεται στην γλυκονεογένεση. Η γλυκόζη μετατρέπεται στους μυς σε γαλακτικό οξύ, το οποίο μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο ήπαρ, όπου μέσω του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό. Το πυροσταφυλικό μέσω της γλυκονεογένεσης μετατρέπεται σε γλυκόζη, η οποία με την κυκλοφορία του αίματος επιστρέφει ξανά στους μυς. [1]

Τέλος κάποια αμινοξέα καταλήγουν μέσω αποικοδόμησης να μετατραπούν σε πυροσταφυλικό ή ενδιάμεσα του κύκλου Krebs. Τετοια αμινοξέα ονομάζονται γλυκογενετικά. Από όλα τα αμινοξέα που ονομάζονται γλυκογενετικά η αλανίνη είναι ίσως το πιο σημαντικό. Όταν οι σκελετικοί μυς βρισκονται σε έντονη άσκηση παράγουν μεγάλα ποσά πυροσταφυλικού τα οποία μετατρέπονται σε αλανίνη μέσω μίας αντίδρασης τρανσαμίνωσης που περιλαμβάνει γλουταμικό. Αφού μεταφερθεί στο ήπαρ η αλανίνη

μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και με αυτόν τον τρόπο εισέρχεται στον κύκλο της γλυκονεογένεσης. [2]

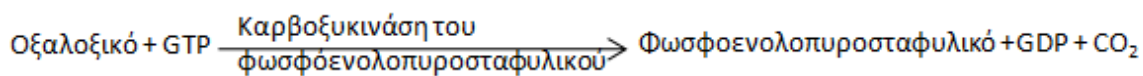
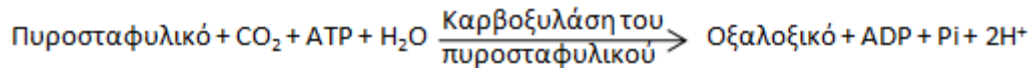
Η γλυκονεογένεση έχει ως τελικό προϊόν την 6-φωσφορική γλυκόζη η οποία ανάλογα με τον οργανισμό μπορεί είτε να παραχθεί ελεύθερη γλυκόζη με αποφωσφορυλίωση είτε 1-φωσφορική γλυκόζη για να σχηματιστεί γλυκογόνο (στα ζώα) ή σουκρόζη και άμυλο (στα φυτά). Επίσης μπορεί να δώσει και άλλα προϊόντα όπως γλυκοπρωτεΐνες και δισακχαρίτες. [2]

Όπως προαναφέρθηκε κατά την γλυκόλυση η γλυκόζη μετατρέπεται σε πυροσταφύλιο ενώ κατά την γλυκονεογένεση το πυροσταφύλιο μετατρέπεται σε γλυκόζη παρ'όλα αυτά η γλυκονεογένεση δεν εποτελεί μία αντιστροφή της γλυκόλυσης καθώς τρεις γλυκολυτικές αντιδράσεις, όπως και στην γλυκονεογένεση, είναι μη αντιστρεπτές. Συγκεκριμένα αυτές είναι η μετατροπή του φωσφοενολοπυροσταφυλικού σε πυροσταφυλικό οξύ, η μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και η μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη οι οποίες πρέπει να παρακαμφθούν κατά τη γλυκονεογένεση. Στη γλυκονεογένεση δεν χρησιμοποιείται μοριακό οξυγόνο, δηλαδή είναι αναερόβια μεταβολική οδός οι αντιδράσεις της οποίας παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 2). [1]

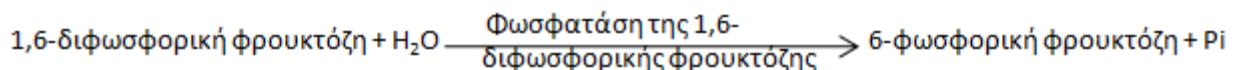


Εικόνα 2: Η πορεία της γλυκονεογένεσης [1]

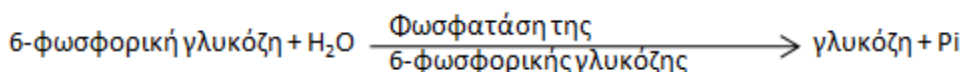
Το πρώτο βήμα στην γλυκονεογένεση είναι η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό. Αρχικά κατά τη γλυκονεογένεση το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε οξαλοξικό και στη συνέχεια σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό, αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από την καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού αντίστοιχα. Τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, εκτός από την καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού που βρίσκεται εντός της μήτρας του μιτοχονδρίου. [1] Οι αντιδράσεις αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:



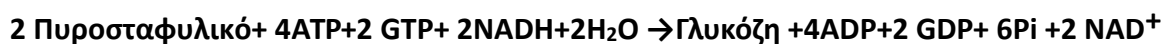
Η δεύτερη παράκαμψη είναι η μετατροπή της 6-φωσφορικής φρουκτόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη η οποία καταλύεται από την φωσφατάση της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης και προκύπτει από υδρόλυση του φωσφορικού εστέρα στον άνθρακα 1 της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης. [1] Η αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω:



Η τρίτη παράκαμψη είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Η αντιστροφή στην γλυκονεογένεση καταλύεται από την φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. [1] Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται παρακάτω:



Η συνολική αντίδραση της γλυκονεογένεσης είναι:



2

Ρύθμιση γλυκονεογένεσης

Όπως με όλες τις μεταβολικές διεργασίες η γλυκονεογένεση επηρεάζεται από την διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων, από αλλοστερικούς τροποποιητές και ορμόνες. Διεγείρεται από υψηλές συγκεντρώσεις γαλακτικού, γλυκερόλης και συγκεκριμένων αμινοξέων. Η αλλοστερική ρύθμιση των ενζύμων της γλυκονεογένεσης και της γλυκόλυσης αντίστοιχα συμβαίνουν ώστε όταν η μία πορεία είναι ανενεργός η άλλη να είναι ενεργός. [1]

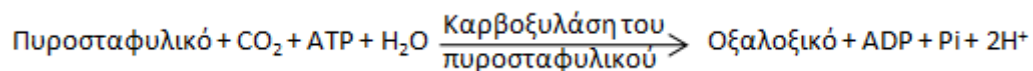
Ρύθμιση της γλυκονεογένεσης γίνεται στις τρεις μη αντιστρεπτές αντιδράσεις. Αρχικά στην μετατροπή της 1,6-Διφωσφορικής φρουκτόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη όπου δρα η φωσφατάση

της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης η οποία αναστέλλεται απο υψηλές συγκεντρώσεις 2,6-διφωσφορικής φρουκτοζης και AMP ενω διεγείρεται σε υψηλές συγκεντρωσεις κιτρικού. Επίσης η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό ρυθμίζεται επακριβώς καθώς η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού η οποία καταλύει το πρώτο βήμα της γλυκονεογένεσης ενεργοποιείται από το ακέτυλο-CoA και αναστέλλεται απο το ADP. Παρομοίως το ADP αναστέλλει την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού. Επομένως η γλυκονεογένεση ευνοείται όταν το κύτταρο είναι πλούσιο σε βιοσυνθετικά πρόδρομα και ATP. [1]

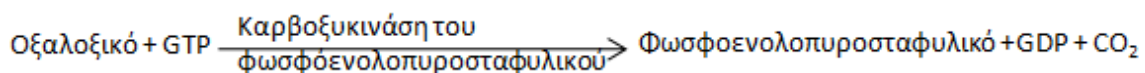
1.2 Ο ρόλος της PEPCK στην γλυκονεογένεση

Η σύνθεση φωσφοενολοπυροσταφυλικού από πυροσταφυλικό, όπως προαναφέρθηκε, απαιτεί δύο ένζυμα, την καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού και την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού. [1]

Η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού η οποία βρίσκεται εντός των μιτοχονδρίων μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε οξαλικό σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



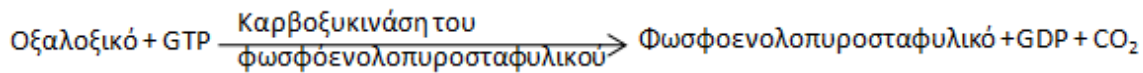
Το οξαλικό εν συνεχεία αποκαρβοξυλιώνεται και φωσφορυλιώνεται από την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, με την ανάλωση ενός υψηλού δυναμικού μεταφοράς φωσφορικής ομάδας της GTP.



Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού σε κάποια είδη βρίσκεται εντός των μιτοχονδρίων ενώ σε άλλα στο κυτοσόλιο και στον άνθρωπο βρίσκεται και στα δύο υποκυτταρικά διαμερίσματα. Επειδή η εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι αδιαπέραστη από το οξαλικό, κύτταρα που έχουν έλλειψη μιτοχονδριακής καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού μεταφέρουν το οξαλικό στο κυτοσόλιο με ένα ειδικό σύστημα μεταφοράς με την μορφή μηλικού. Το οξαλικό ανάγεται μέσα στο μιτοχόνδριο σε μηλικό από μία μηλική αφυδρογονάση του μιτοχονδρίου συνδεδεμένη με NADH και σε αυτήν την μορφή μεταφέρεται διαμέσου της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επανοξειδώνεται σε οξαλικό από μία μηλική αφυδρογονάση του κυτοσολίου συνδεδεμένη με NAD⁺.

1.3 Καρβοξυκινάση του φωσφοενολόπυροσταφυλικού (PEPCK)

Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του οξαλικού δημιουργώντας ένα ασταθές ενολικό ισομερές του πυροσταφυλικού το οποίο ακολούθως φωσφορυλιώνεται προς σχηματισμό φωσφοενολοπυροσταφυλικού σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



In vitro η αντίδραση είναι αντιστρεπτή όμως στους περισσότερους οργανισμούς η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού λειτουργεί κυρίως στην κατεύθυνση της σύνθεσης φωσφοενολοπυροσταφυλικού. Στα ζώα για την παραπάνω αντίδραση γίνεται ανάλωση ενός υψηλού δυναμικού μεταφοράς φωσφορικής ομάδας του GTP ενώ στην αντίδραση σε βακτήρια, μύκητες και φυτά ως δότης χρησιμοποιείται το ATP. [3]

Η PEPCK είναι ένα ένζυμο που απαιτεί δισθενή κατιόντα για να δραστηριοποιηθεί. Απουσία υποστρώματος, ένα μεταλλικό ιόν προσδένεται στο ένζυμο λειτουργώντας ως συμπαραγοντας. Στις GTP-εξαρτώμενες ισομορφές του ενζύμου το δισθενές κατιόν που βρίσκεται σε αυτήν την θέση είναι το Mn^{2+} . Επιπλέον ένα δεύτερο κατιόν απαιτείται για την αντίδραση. Αυτό τον ρόλο μπορούν να έχουν είτε το Mg^{2+} είτε το Mn^{2+} . [3] [4]

1.3.1 Γονίδια και ισομορφές

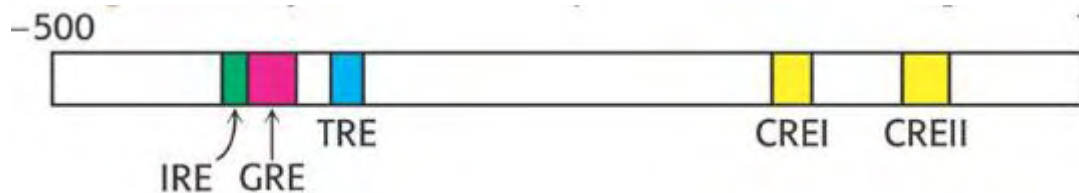
Σε όλα τα σπονδυλωτά υπάρχουν δύο ισομορφές της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια. Η κυτοσολική ισομορφή, PEPCK-C, κωδικοποιείται από το γονίδιο PCK1 το οποίο στα ανθρώπινα χρωμοσώματα βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20q13.31. [5] [6] Η μιτοχονδριακή ισομορφή, PEPCK-M, κωδικοποιείται από το γονίδιο PCK2 που χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 14q11.2. [5] [6] Τα ανθρώπινα γονίδια παρουσιάζουν όμοια οργάνωση καθώς αποτελούνται από δέκα εξόνια και εννιά ιντρόνια όμως το μήκος του γονιδίου που κωδικοποιεί για την κυτοσολική ισομορφή (5345bp) είναι αρκετά μικρότερο από αυτό που κωδικοποιεί για την μιτοχονδριακή ισομορφή (9839bp) εξαιτίας του διαφορετικού μήκους των ιντρονίων. Επίσης η cPEPCK και mPEPCK έχουν μοριακό βάρος 69,289 και 69,522 αντίστοιχα. Είναι πρωτεΐνες με 622 και 640 αμινοξέα αντίστοιχα και μοιράζονται 68% ταυτοσημία/ 82% ομοιότητα στις αλληλουχίες τους. [5] Οι άνθρωποι εκφράζουν την mPEPCK στους περισσότερους ιστούς αλλά κυρίως στο ήπαρ και στα νεφρά ενώ εκφράζεται και στο πάγκρεας, σε αντίθεση με την cPEPCK η οποία περιορίζεται στο ήπαρ, στα νεφρά, στο λεπτό έντερο και στον λιπώδη ιστό. [7]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι οι δύο ισομορφές έχουν διαφορετικά προφίλ έκφρασης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης [8]. Η γλυκονεογένεση απουσιάζει πριν την γέννηση καθώς η γλυκόζη παρέχεται από την μητέρα ως αποτέλεσμα της μείωσης των επιπέδων γλυκόζης, της μείωσης της ινσουλίνης, καθώς και της αύξησης του cAMP, της γλυκαγόνης και της επινεφρίνης. [11] Το προγεννητικό ήπαρ δεν εκφράζει την cPEPCK, επομένως η mPEPCK είναι η μόνη ισομορφή που υπάρχει πριν την γέννηση. Μετά την γέννηση το ήπαρ υφίστανται πολλές μεταβολικές αλλαγές, οι οποίες αυξάνουν την μεταγραφή της cPEPCK και την ωρίμανση της πρωτεΐνης. [9] Σε αντίθεση με το ήπαρ, ο εμβρυϊκός νεφρός εκφράζει την cPEPCK η οποία αυξάνεται μετά την γέννηση. [10]

1.3.2 Ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου

Πρόσφατα, η κυτοσολική PEPCK αποδείχθηκε ότι είναι ευαίσθητη σε μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση μέσω ακετυλίωσης λυσίνης. Η αυξημένη ακετυλίωση προκαλεί αλληλεπίδραση με την UBR5 λιγάση της ουβικουΐτινης οδηγώντας την σε ουβικουΐτινίωση και επακόλουθη ανακύκλωση του ενζύμου από το πρωτεόσωμα. [12] Επίσης, η μειωμένη μεθυλίωση της PEPCK οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων μεταγραφής. [13] Οι ιστόνες που σχετίζονται με την χρωματίνη του γονιδίου PCK1 ρυθμίζονται μέσω μεθυλίωσης αργινίνης. Η ισουλίνη διεγείρει την αύξηση της μεθυλίωσης της ιστόνης H3 οδηγώντας σε μείωση της μεταγραφής του γονιδίου PCK1. [14]

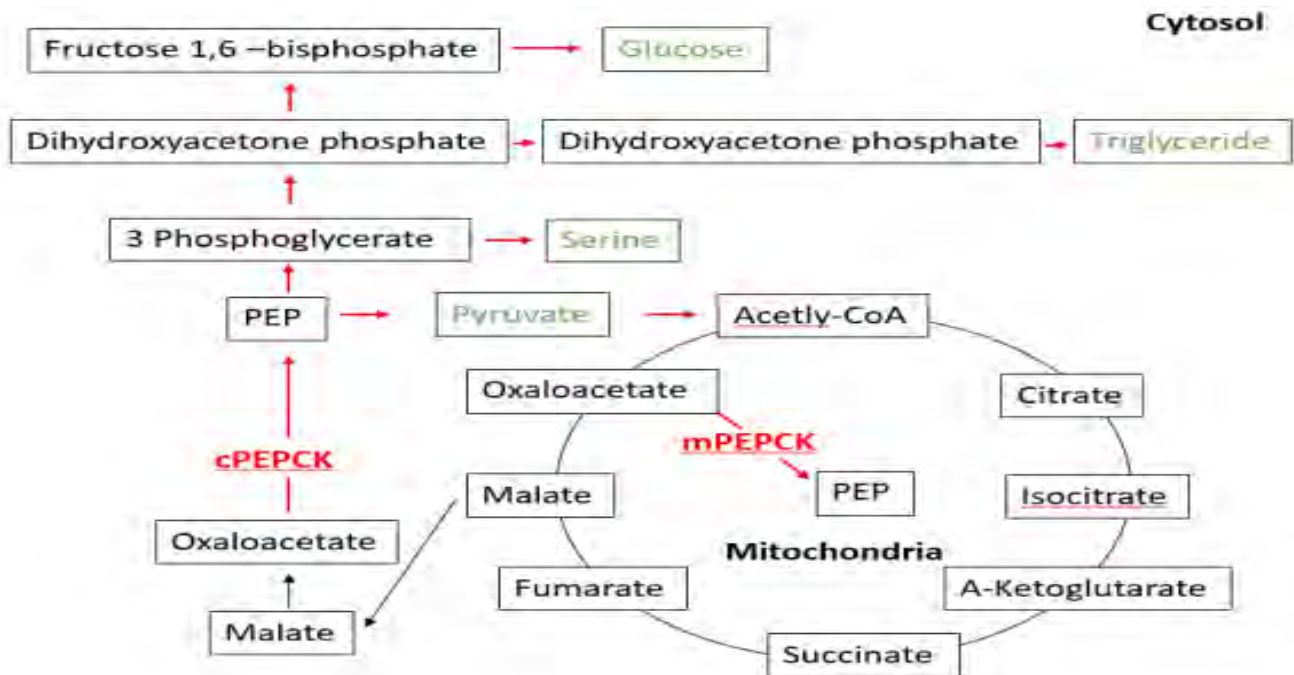
Ωστόσο, η ρύθμιση της καρβοξυκινάσης γίνεται κυρίως μέσω ορμονών οι οποίες επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου, αλλάζοντας τον ρυθμό της μεταγραφής, καθώς και ρυθμίζοντας την αποικοδόμηση του mRNA. Η γλυκαγόνη, η οποία δρα μέσω του cAMP [15], διεγείρεται κατά την διάρκεια της αιτίας οδηγώντας στην αύξηση της παραγωγής του ενζύμου. Τα γλυκοκορτικοειδή και η θυροειδής ορμόνη αυξάνουν την σύνθεση του ενζύμου μέσω στοιχείων απόκρισης στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου. Τελος, η ινσουλίνη, η οποία αυξάνεται ως επακόλουθο του γεύματος, μειώνει έντονα την παραγωγή του ενζύμου. [16] (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Ο προαγωγέας του γονιδίου της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολπυροσταφυλικού. IRE στοιχείο απόκρισης στην ινσουλίνη, GRE στοιχείο απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή, TRE στοιχείο απόκρισης στις ορμόνες του θυροειδούς, CREI και CREII στοιχεία απόκρισης στο cAMP [1]

1.3.3 Ο ρόλος της PEPCK σε διάφορες μεταβολικές οδούς

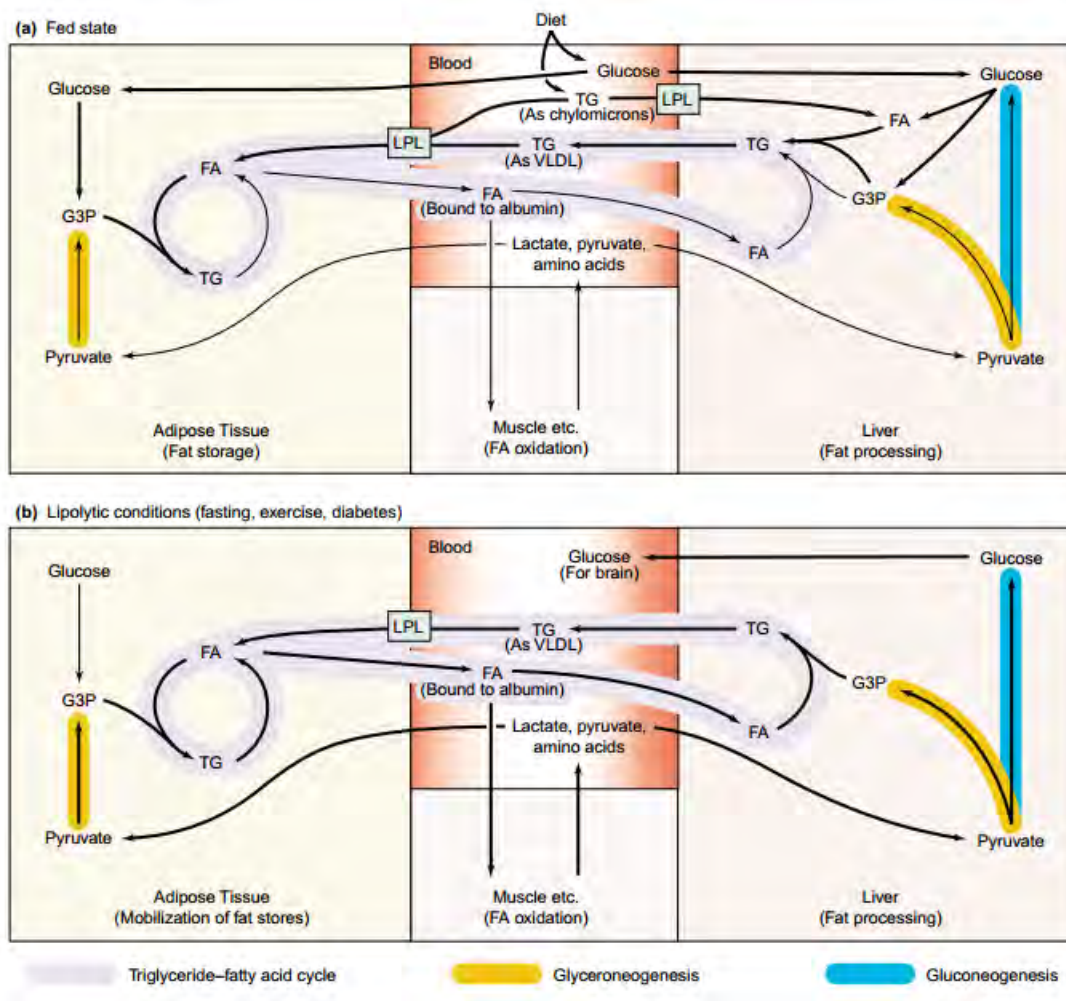
Αν και η PEPCK θεωρείται ότι σηματοδοτεί το πρώτο βήμα για την αναγέννηση της γλυκόζης μέσω της γλυκονεογένεσης, αυτός δεν είναι ο μόνος ρόλος του ενζύμου, αφού έχει μια καταπληρωτική λειτουργία για τον κύκλο του κιτρικού οξέος αφαιρώντας τα ενδιάμεσα μόρια. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος είναι μια αερόβια μεταβολική διεργασία στα μιτοχόνδρια που ανακυκλώνει το ακετυλ-CoA μέσω μετατροπής σε διάφορα ενδιάμεσα του κύκλου. Κάθε περιστροφή του κύκλου αποδίδει 3 μόρια $NADH_2$ 1 μόριο $FADH_2$ και 1 μόριο GTP. Η PEPCK δρα απομακρύνοντας τα ανιόντα του κύκλου, ως οξαλοξικό, για την μετατροπή σε φωσφοενολπυροσταφυλικό, επομένως δρα ως συντονιστής του κύκλου διατηρώντας τον σε σταθερή ροή. Το PEP μπορεί στην συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για πολλές μεταβολικές διεργασίες, όπως η βιοσύνθεση της σερίνης και των μικρών αμινοξέων την παραγωγή γλυκερόλης μέσω της γλυκερονεογένεσης και τέλος στην ανατροφοδότηση του κύκλου με την δημιουργία ακετυλ-CoA μέσω της σύνθεσης του πυροσταφυλικού και την μετέπειτα οξείδωση του. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Μεταβολικές οδοί [17]

Γλυκερονεογένεση

Κατά την τροφοδοτούμενη περίοδο, η γλυκόζη και τα τριγλυκερίδια (TGs) χρησιμοποιούνται ως πηγές ενέργειας ενώ η περίσσεια τριγλυκεριδίων αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό.[18] Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, το ήπαρ συνθέτει δεπονοτριγλυκερίδια τα οποία εξάγονται στο αίμα. Στην συνέχεια η LPLελευθερώνει τα FAs, τα οποία εισέρχονται στον λιπώδη ιστό και αποθηκεύονται ως τριγλυκερίδια. Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου, η γλυκόζη παρέχει τον άνθρακα για την σύνθεση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης τόσο στο ήπαρ όσο και στον λιπώδη ιστό. Κατά την περίοδο λιπολυτικών καταστάσεων η παροχή ενέργειας γίνεται από τα τριγλυκερίδια που είναι αποθηκευμένα στον λιπώδη ιστό, τα οποία απελευθερώνονται ως ελεύθερα λιπαρά οξέα (FAs).[18] Ωστόσο τα FAs απελευθερώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό που χρειάζονται οι ιστοί. Γι'αυτό τον λόγο, το ήπαρ ανακυκλώνει την περίσσεια FAs. Η γλυκερονεογένεση, τόσο στο ήπαρ όσο και στον λιπώδη ιστό, παρέχει 3-φωσφορική γλυκερόλη από μη υδατανθρακικές πρόδρομες ενώσεις όπως το πυροσταφυλικό. (Εικόνα 5)

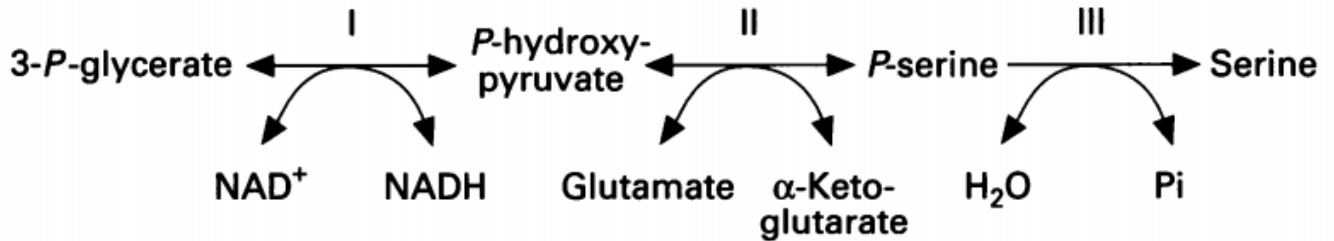


Εικόνα 5 : TGs και FAs μεταξύ του ήπατος και του λιπώδους ιστού στον κύκλο FA-TG για τη διατήρηση υψηλού ποσοστού ανακύκλωσης λιπιδίων στο αίμα [18]

Η γλυκερονεογένεση είναι η δενοσύνθεση 3-φωσφορικής γλυκερόλης. Κάθε μόριο χρησιμοποιείται για την εστερεποίηση τριών μορίων λιπαρών ακυλ-CoA για να σχηματιστεί ένα μόριο τριγλυκεριδίων. [18] Η γλυκερονεογένεση είναι μία συντομευμένη εκδοχή της γλυκονεογένεσης. Αυτό το μονοπάτι βρίσκεται στα λιποκύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν φωσφατάση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης και φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Επομένως, η σύνθεση των τριγλυκεριδίων στον λιπώδη ιστό κατά την διάρκεια της πείνας αποτελεί ένα άλλο παράδειγμα όπου η PEPCK διαδραματίζει βασικό ρόλο. Όταν οι ρυθμοί λιπόλυσης είναι υψηλότεροι κατά την διάρκεια της νηστείας, ένα σημαντικό ποσοστό των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται από την διάσπαση των τριγλυκεριδίων επανεστεροποιείται σε τριγλυκερίδια στον λιπώδη ιστό. Η κύρια πηγή για την σύνθεση τριγλυκεριδίων είναι η 3-φωσφορική γλυκερόλη, η οποία παρέχεται από την γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης (Εικόνα 6 (a)). Ωστόσο, σε περιόδους νηστείας η χρήση γλυκόζης στον λιπώδη ιστό περιορίζεται, διότι η γλυκόζη αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τον εγκέφαλο (Εικόνα (b)). Γι' αυτό τον λόγο, η αναγέννηση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης γίνεται με την χρήση ενδιάμεσων του κύκλου του κιτρικού οξέος καθώς η PEPCK μετατρέπει το οξαλοξικό σε φωσφοενολπυροσταφυλικό και όχι μέσω γλυκόλυσης. [19] [20]

Σύνθεση της σερίνης

Η σερίνη συντίθεται από το 3-φωσφογλυκερικό, ένα εδιάμεσο της γλυκόλυσης. Το πρώτο βήμα είναι η οξείδωση σε 3-φωσφοδροξυπυροσταφυλικό. Αυτό το α -κετοξύ μετατρέπεται με τρανσαμίνωση σε 3-φωσφοσερίνη, η οποία στην συνέχεια υδρολύεται σε σερίνη. Είναι αξιοσημείωτο ότι η οδός της γλυκερονεογένεσης μπορεί επίσης να παράγει 3-φωσφογλυκερικό, οπότε είναι πιθανό η σερίνη να μπορεί να συντεθεί στο ήπαρ χρησιμοποιώντας άνθρακα προερχόμενο από το φωσφοενολπυροσταφυλικό που δημιουργήθηκε από την PEPCK. [21] [1] (Εικόνα 6)

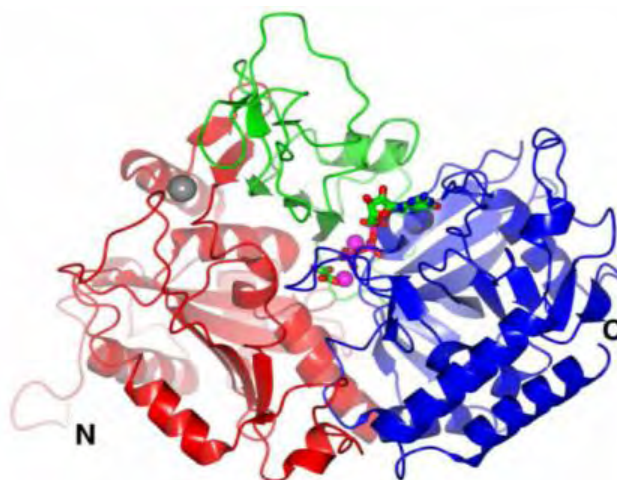


Εικόνα 6: Σύνθεση της σερίνης [7]

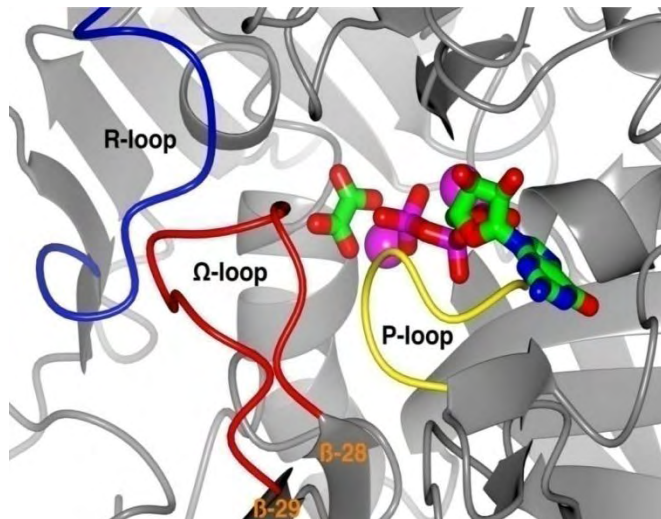
1.3.4 Δομή

Οι δομικές μελέτες επικεντρώθηκαν κατά κύριο λόγο στην κυτοσολική PEPCK και αποκάλυψαν πολλές δομικές και λειτουργικές αλλαγές του ενζύμου, καθώς κινείται μέσω του καταλυτικού κύκλου. Τα δομικά δεδομένα δείχνουν ότι η PEPCK είναι ένα μονομερές ένζυμο που διαιρείται σε δύο επικράτειες: μία N-τελική περιοχή (κατάλοιπα 1-259) και μια C-τερματική περιοχή (κατάλοιπα 260-622). (Εικόνα 7) Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται σε μια σχισμή που βρίσκεται στη διεπαφή που σχηματίζεται μεταξύ των δύο αυτών περιοχών και είναι κατιονικής φύσης, που αποτελείται από δύο ιόντα δισθενούς μετάλλου. Στις ισομορφές που εξαρτώνται από GTP που βρίσκονται σε ανθρώπους και άλλα σπονδυλωτά, ένα κατιόν (M1), κατά προτίμηση Mn^{2+} , συνδέεται με το ένζυμο απουσία υποστρωμάτων, ενώ το επιπρόσθετο μεταλλικό ιόν (M2), τυπικά Mg^{2+} δεσμεύεται ως υπόστρωμα μεταλλικού νουκλεοτιδίου[22].

Η C-τελική περιοχή μπορεί να υποδιαιρεθεί περαιτέρω σε δύο επικράτειες, την επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων (κατάλοιπα 260-325 και 426-622), η οποία έχει περιορισμένη ομολογία με άλλες πρωτεΐνες και ένζυμα που δεσμεύουν νουκλεοτίδια, και την PEPCK-ειδική περιοχή (κατάλοιπα 326-425), η οποία ονομάζεται έτσι υποδηλώνοντας ότι αυτή η επικράτεια υπάρχει μόνο εντός της οικογένειας PEPCK. (Εικόνα 8) Τα δομικά δεδομένα αποκαλύπτουν αρκετούς κινητούς βρόχους των οποίων η διαμόρφωση και κινητικότητα επηρεάζεται από την κατάσταση σύνδεσης του ενζύμου κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Τα πιο αξιοσημείωτα στοιχεία είναι ο βρόχος R (κατάλοιπα 85-92), ο βρόχος P (κατάλοιπα 284-292) και ο βρόχος Ω (κατάλοιπα 464-474). (Εικόνα 8). [23] Λόγω της θέσης τους στο ενεργό κέντρο, ο βρόχος R και ο βρόχος P πιστεύεται ότι εμπλέκονται άμεσα στη δέσμευση του υποστρώματος και στην κατάλυση. Εκτός από τους κινητούς βρόχους που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο, η δομή περιλαμβάνει το άνοιγμα και κλείσιμο των N- και C-τελικών περιοχών του ενζύμου. Το κλείσιμο των N- και C-τελικών περιοχών μειώνει τον όγκο του θύλακα της δραστικής θέσης και ως εκ τούτου έχει σαν αποτέλεσμα ο δότης και δέκτης φωσφορυλίου να είναι τοποθετημένοι πλησιέστεροι μεταξύ τους και επομένως διευκολύνεται η αποτελεσματική κατάλυση.



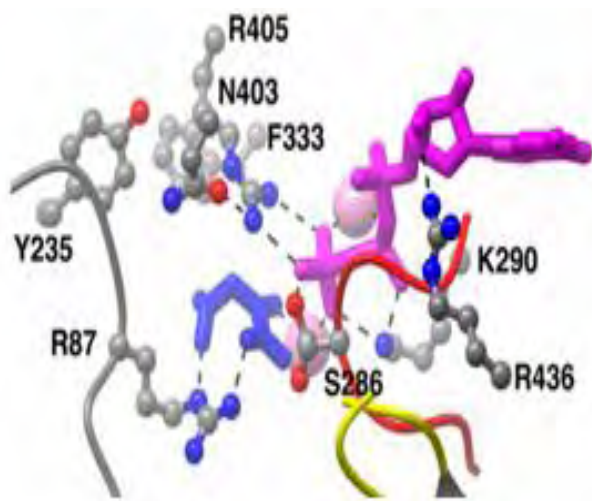
Εικόνα 7: Η δομή της cPEPCK. Ο N-τελική περιοχή (κατάλοιπα 1-259), επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων (κατάλοιπα 260-325 και 426-622) και η PEPCK-ειδική περιοχή (κατάλοιπα 326-425), αποδίδονται με κόκκινο, μπλε και πράσινο, αντίστοιχα.[24]



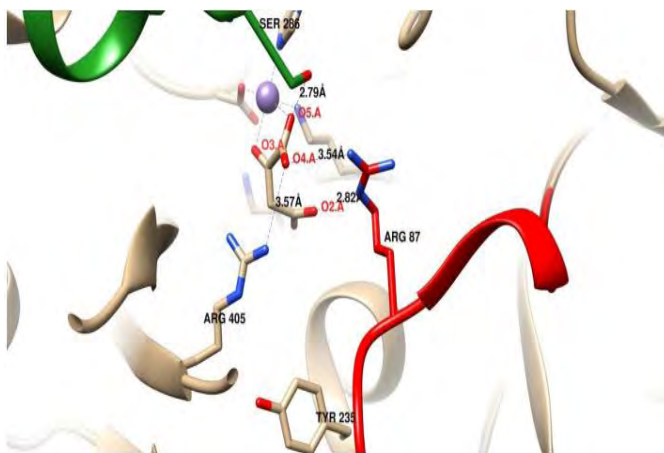
Εικόνα 8: Οι κινητοί βρόχοι στο ενεργό κέντρο της PEPCK, ο βρόχος R (85-92), ο βρόχος P (284-292) και ο βρόχος Ω (464-474) φαίνονται στην εικόνα με τα χρώματα μπλε, κίτρινο και κόκκινο, αντίστοιχα. Τα ιόντα M1 και M2 εμφανίζονται ως ροζ σφαίρες.[24]

Πρόσδεση υποστρωμάτων

Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα της PEPCK σε σύμπλοκο με το ΟΑΑ υποδεικνύουν ότι το ΟΑΑ συνδέεται με το ένζυμο απευθείας με συντονισμό προς το M1 κατιόν με τα C3 και C4 άτομα του ΟΑΑ εκτοπίζοντας τα μόρια νερού που βρίσκονται στην δομή PEPCK-Mn²⁺. Εκτός από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ΟΑΑ με την θέση M1, η σύνδεση του ΟΑΑ διευκολύνεται μέσω της αλληλεπίδρασης με τα κατάλοιπα Arg87 και Ser286.[25] (Εικόνα 10) Το GTP συνδέεται με την PEPCK μέσα στην θέση πρόσδεσης του νουκλεοτιδίου M2 με την β- και γ- φωσφορική ομάδα να συντονίζεται στην θέση M2. (Εικόνα 9) Αυτά τα δύο άτομα από το GTP και την πλευρική αλυσίδα της Thr291 του P βρόχου και τρία μόρια νερού ολοκληρώνουν την οκταεδρική γεωμετρία του M2. Η πρόσδεση του ΟΑΑ και του GTP στις θέσεις M1 και M2 τοποθετεί το οξυγόνο του καρβονυλίου του C3 του ΟΑΑ και την γ-φωσφορική ομάδα του GTP σε τέλει προσανατολισμό για την μεταφορά του φωσφορυλίου[23]. Στην δεσμευμένη κατάσταση του ενζύμου ο συντονισμός της M1 θέσης πραγματοποιείται από τρία κατάλοιπα τα Lys244, His264 και Asp311 και τρία άτομα οξυγόνου από το ΟΑΑ και το GTP. Η αλληλεπίδραση της Arg405 με την γ-φωσφορική ομάδα του GTP σταθεροποιεί την μεταφορά αυτής της ομάδας σε μία υψηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση.

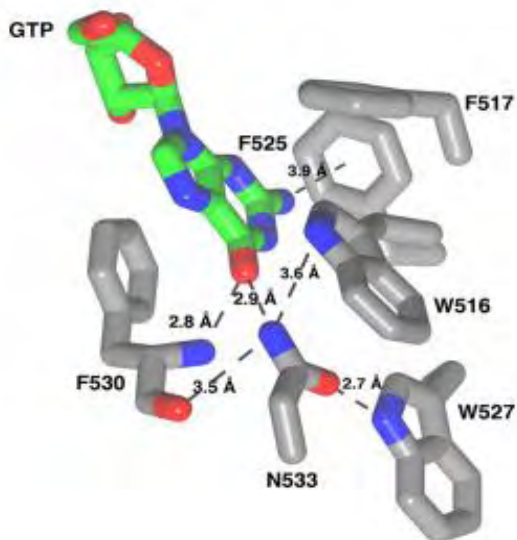


Εικόνα 9: Τα υποστρώματα GTP και OAA εμφανίζονται με ροζ και μπλε χρώμα αντίστοιχα. Οι βρόχοι Ω και Ραποδίδονται σε κίτρινο και κόκκινο, αντίστοιχα. [25]

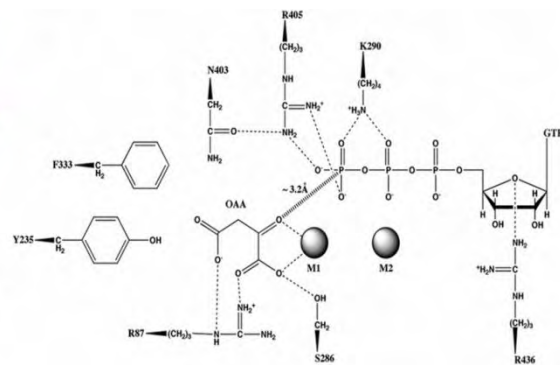
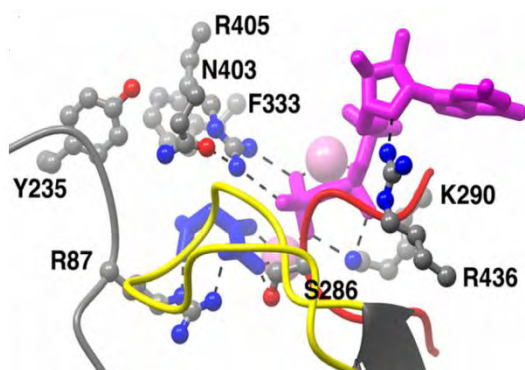


Εικόνα 10: Η προσδέση του OAA στην M1 θέση, Ρβροχος (πράσινο) και Rβροχος (κόκκινο) PDB ID#2QF2.

Το GTP προσδέεται στον θύλακα δέσμευσης νουκλεοτιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης με την Phe530 και 517 και ένα δεσμό υδρογόνου με την Asn533. (Εικόνα 11) Τα υποστρώματα OAA και GTP προσδέονται στην ανοιχτή μορφή του ενζύμου όμως μόνο όταν κλείνει η δομή τα υποστρώματα τοποθετούνται σωστά ώστε να γίνει η κατάλυση.[26] Ο δακτύλιος ριβόζης και η φωσφορική αλυσίδα του GTP τοποθετούνται στην κανονική θέση για κατάλυση με μετατόπιση της αλληλεπίδρασης της Arg436 και του δακτυλίου ριβόζης. Αυτή η μετατόπιση έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του GTP προς την M1 θέση ελατώνοντας την απόσταση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας. Ο σχηματισμός της κλειστής διαμόρφωσης πραγματοποιείται με την προσαρμογή του Ρ-βρόχου στην κλειστή διαμόρφωση μέσω ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Ser286 και του οξυγόνου του C4 του OAA (Εικόνα 12) και μια μεταβολή στην διαμόρφωση της Arg436.[27]

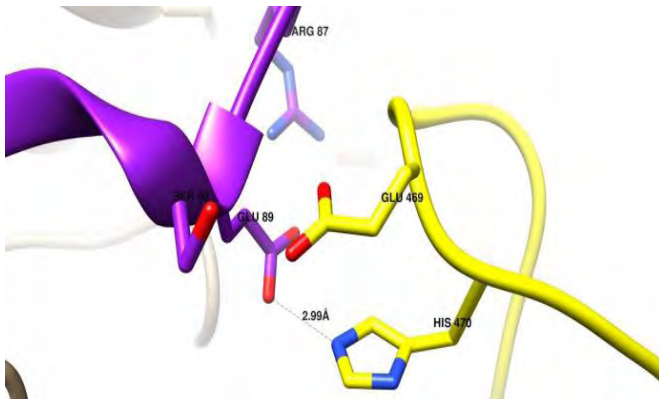


Εικόνα 11: Το GTP και η αλληλεπίδραση του με συγκεκριμένα κατάλοιπα του ενζύμου [25]



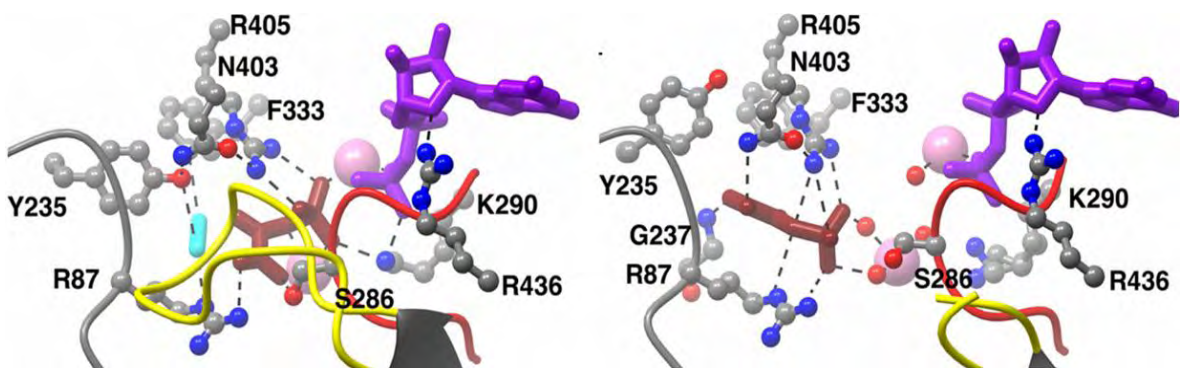
Εικόνα 12: . Ο σχηματισμός της κλειστής διαμόρφωσης με την προσαρμογή του P-βρόχου (κίτρινο) και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της Ser-286 και του οξυγόνου του C4 του OAA. [25]

Μόλις όλα τα υποστρώματα συνδεθούν με το τελικό κινητό στοιχείο, ο βρόχος Ω πρέπει να κλείσει πάνω από το ενεργό κέντρο. Οι βρόχοι P και R έχουν ήδη έρθει σε επαφή με τα υποστρώματα και έχουν υιοθετήσει ένα κλειστό σχηματισμό. Όταν το OAA δεσμευτεί με το κατάλοιπο R87 στον R-βρόχο χρησιμοποιείται αυτή η ενέργεια για την περιστροφή του βρόχου Ω κατά $\sim 10 \text{ \AA}$ προς το ενεργό κέντρο. Το R87 αλληλεπιδρά με το κατάλοιπο R89 για να το σταθεροποιήσει την διαμόρφωση που επιτρέπει στην H470 του βρόχου Ω να "κλειδώνει" τον βρόχο Ω σε μία κλειστή διαμόρφωση. Τα κατάλοιπα S90, R483, E469 σταθεροποιούν επίσης την κλειστή διαμόρφωση. (Εικόνα 13) [25]



Εικόνα 13: Ο βρόχος Ω (κίτρινο) ο οποίος αλληλεπιδρά με τον βρόχο (μωβ) PDB ID#2OF2

Η αποκαρβοξυλίωση του ΟΑΑ για τον σχηματισμό του ενολικού ενδιάμεσου διευκολύνεται μέσω της πόλωσης του καρβοξυλικού μεταξύ Asp403 και Arg87. Η φωσφορυλίωση του ενολικού λαμβάνει χώρα με σταθεροποίηση της μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων της Arg405, Lys290 και δυο μεταλλικών ιόντων.[23]Ο μετασχηματισμός της ενόλης σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του ΡΕΡ από την θέση M1 και M2. Μετά την κατάλυση, η ενέργεια από τη σύνδεση του υποστρώματος έχει πλέον μεταφερθεί. Αυτό οδηγεί τον βρόχο Ω πίσω στην ανοικτή διαμόρφωση. Η Tyr-235 μετατοπίζεται με αποτέλεσμα την μείωση της αλληλεπίδρασης ενζύμου/CO₂ και την απελευθέρωση του CO₂. [25] Η αλληλεπίδραση με την Ser286 στον Ρ-βρόχο χάνεται καθώς η ΡΕΡ μετακινείται επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο το άνοιγμα του βρόχου Ρ. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του GDP και της Lys290 στον Ρ-βρόχο ελαχιστοποιούνται οδηγώντας στο άνοιγμα του Ρ-βρόχου με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού και του GDP. [25](Εικόνα 14)

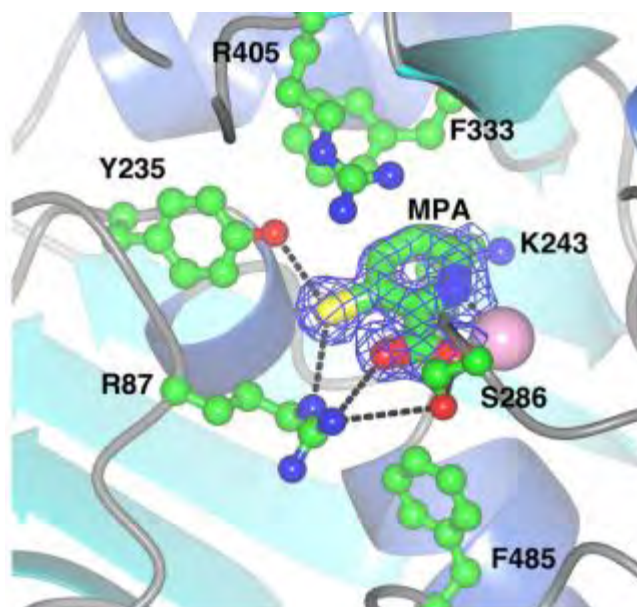


Εικόνα 14: Το GDP και το ΡΕΡ εμφανίζονται μπορντο και μωβ αντίστοιχά ενώ ο βρόχος Ω και ο βρόχος Ρ κίτρινο και κόκκινο αντίστοιχα

1.3.5 Φαρμακευτικός στοχος

Το γονίδιο PCK1 που κωδικοποιεί την κυτοσολική ισομορφή του ενζύμου έχει συσχετιστεί με τον σακχαρώδη διαβήτη τυπου 2 καθώς αποτελεί ένα ένζυμο κλειδί για την γλυκονεογένεση στο ήπαρ. Ο σακχαρώδης διαβήτης τυπου 2 χαρακτηρίζεται από ελαττωμένη ευαισθησία των ιστών-στόχων στην ινσουλίνη. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PCK1 οδηγουν σε υπερβολική παραγωγή γλυκόζης μέσω της γλυκονεογένεσης. Επίσης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της PCK1 στον λιπώδη ιστό γεγονός που θα είχε επιπτώσεις στην γλυκερονεογένεση και επομένως στην αποθήκευση και την απελευθέρωση των λιπαρών οξέων. Γι' αυτό τον λόγο αναστολείς της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολπυροσταφυλικου μπορεί να έχουν ρόλο στην θεραπεία τους σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. [5]

Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει στον σχεδιασμό φαρμάκων τα οποία θα αναμένουμε να έχουν σημαντική δράση έναντι συγκεκριμένων κέντρων του ενζύμου. Απο τους πρώτους αναστολείς της PEPCKήταν το 3-μερκαπτοπικολινικό οξύ το οποίο δεσμεύεται σε δυο διαφορετικές θέσεις, μία στο ενεργό κέντρο και σε μία δεύτερη πίσω απο τον P-βρογχο. (Εικόνα 15) [28] [29]



Εικόνα 15: Πρόσδεση του 3-μερκαπτοπικολινικού οξέος στην θέση πρόσδεσης του υποστρώματος OAA στην cPEPCK

2. Αντικείμενο της πτυχιακής εργασίας

Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) ανακαλύφθηκε το 1953 από τους Utter και Kurahashi. Για δεκαετίες αποτελεί αντικείμενο επιστημονικής έρευνας λόγω της σπουδαιότητας του ρόλου της στο μεταβολισμό των υδατανθράκων καθώς αποτελεί το ένζυμο κλειδί στην γλυκονεογένεση καθώς και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. 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 και ο ρόλος της σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια αποτέλεσε τροχοπέδη στις μελέτες με αποτέλεσμα οι μέχρι σήμερα γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης του ενζύμου να μην είναι ολοκληρωμένες. Γι' αυτό η παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύει στην κλωνοποίηση, έκφραση, απομόνωση και σε μελέτες πρόσδεσης αναστολέων στην κυτοσολική ισομορφή της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (cPEPCK). Αναλυτικότερα πραγματοποιήθηκε:

→ Κατασκευή φορέα έκφρασης που ονομάστηκε pGEX-6p-1-PCK1 ο οποίος είναι κατάλληλος για την έκφραση γονιδίων σε *E. coli*.

→ Μελέτες έκφρασης της PEPCK όπου μελετήθηκαν πολλές κυτταρικές σειρές και διαφορετικές συνθήκες επαγωγής, συγκέντρώσεις επαγωγέα και θερμοκρασίες.

→ Απομόνωση της πρωτεΐνης μέσω υγρής χρωματογραφίας, χρωματογραφία συγγένειας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

→ Ανάπτυξη κινητικού πρωτοκόλλου για την μελέτη πρόσδεσης αναστολέων υψηλής απόδοσης.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα και υψηλή καθαρότητα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για βιοχημικές και δομικές μελέτες συμβάλλοντας έτσι στην διερεύνηση της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) ως μοριακού στόχου, πιθανού φαρμακολογικού ενδιαφέροντος, για την αντιμετώπιση ασθενειών σχετιζόμενων με διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Το kit που χρησιμοποιήθηκε στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ήταν προϊόν της Kara Biosystems. Η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την εταιρεία Takara ενώ το kit για την σύνδεση φορέα και ενθέματος (DNA) ήταν της εταιρείας Clonetech. Για την απομόνωση των πλασμιδίων και για την εξαγωγή του DNA από πηκτώματα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα kit της εταιρείας Macherey-Nagel.

Υλικά και αντιδραστήρια

Εταιρείες	Αντιδραστήρια
Serva	LB Agar, Sodium dodecyl Sulfate (SDS), Ampicillin, N,N'-Methylenebisacrylamide, Na-Sulfate, IPTG, Acrylamide, Bis Acrylamide, Yeast extract, HEPES
Appllichem	LB Broth, Tris ultrapure, TEMED, L-Glutathione reduced (GSH), Sodium Chloride
Sigma	Agarose, Ammonium Persulfate (APS), Ethanol Absolute, Tryptone, Benzonase, Chloroamphenicol
Nippon Genetics	Midori green
Thermo Scientific	1kb plus DNA Ladder
Panreac	EDTA, Coomassie R250, EDTA, Tris Base, Glycerol
Bio rad	Bradford protein assay 5X,
Merck	Υδροχλωρικόξύ(HCl), Acetic Acid
Sartorius	Vivaspin centrifugal concentrators 10000 MWCO,

Πίνακας 1 : Υλικά και αντιδραστήρια

Γονίδιο

Ως εκμαγείο για την ενίσχυση του γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη PEPCK χρησιμοποιήθηκε το cDNA PCK1 που προήλθε από συλλογή κλώνων της Invitrogen (IOH12383).

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Στελέχη του βακτηρίου *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την κλωνοποίηση και την υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και στην συνέχεια για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Στελέχη για την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

- X11-Blue (Agilent Technologies)

Το στελέχος αυτό είναι γενετικά τροποποιημένα ώστε να επιτρέπει τον εύκολο μετασχηματισμό και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Στελέχη για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης

- BL21- Gold (DE3) (Agilenttechnologies)
- B834 (DE3)(Novagen)
- B834 pLysS(Novagen)

Τα συγκεκριμένα στελέχη της E.coli χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς περιέχουν κάποια επιπλέον κωδικόνια που χρησιμοποιούνται από την E.coli σπάνια. Δεν διαθέτουν Lon και OmpT πρωτεάσες γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για αυτό τον σκοπό. Το στελέχος BL21-GOLD(DE3) είναι ειδικό για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς χρησιμοποιεί τον εκκινητή της T7 RNA πολυμεράσης για άμεση έκφραση σε υψηλά επίπεδα. Το στελέχος B834 pLysS είναι όμοιο με το B834 στελέχος με την μόνη διαφορά ότι διαθέτει ένα επιπλέον πλασμίδιο (pLys) γεγονός που βοηθάει στον καλύτερο έλεγχο της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης καθώς και ένα επιπλέον γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη (Cam). [31]

3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια DNA τα οποία συνυπάρχουν με το κύριο χρωμόσωμα σε ένα βακτηριακό κύτταρο αλλά ο μηχανισμός αντιγραφής τους είναι ανεξάρτητος από το κύριο χρωμόσωμα. Για να χρησιμοποιηθούν ως φορείς κλωνοποίησης πρέπει να διαθέτουν κάποιες χαρακτηριστικές ιδιότητες όπως μικρό μέγεθος, γονίδια τα οποία δεν είναι συνήθως απαραίτητα για την επιβίωση του κυτταρού και δεν υπάρχουν στο κύριο χρωμόσωμα αλλά προσδίδουν επιπλέον ιδιότητες στο βακτήριο όπως η αντοχή σε αντιβιοτικά καθώς και μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής (origin of replication), την οποία αναγνωρίζουν τόσο οι DNA πολυμεράσες όσο και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μηχανισμό αντιγραφής του κύριου χρωμοσώματος. Με αυτόν τον τρόπο ένα γονίδιο που έχει ενσωματωθεί σε έναν πλασμιδιακό φορέα αντιγράφεται και πολλαπλασιάζεται μαζί του με τη χρήση των ενζύμων του κυτταρού ξενιστή. Η περιοχή που χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ξένου DNA, αποτελείται από μια αλληλουχία DNA που περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ονομάζεται πολυσυνδέτης (polylinker ή multiple cloning site, MCS) ενώ η ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε

αντιβιοτικά βοηθάει στην επιλογή των κυττάρων που διαθέτουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο από αυτά που δεν το διαθέτουν. Επιπλέον πολλά από αυτά έχουν τη ικανότητα να μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο, ενώ συχνά, τα ίδια πλασμίδια μπορεί να βρίσκονται σε βακτήρια διαφορετικών ειδών. [32]

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν ο pGEX-6p-1 στον οποίο έγινε ένθεση ολόκληρου του γονιδίου της PCK1. Το μήκος του συγκεκριμένου πλασμιδιακού φορέα είναι 4984bp και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Αμπικιλίνη (Amp). Οι φορείς pGEX διαθέτουν τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την τρανσφεράση της S- γλουταθειόνης (GST) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (LEVLFGQP) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση Rhinovirus 3C (PreScission Protease). Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που εκφράζονται με GST-tag απομονώνονται εύκολα χρησιμοποιώντας το συμπλέγμα σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη. Στην συνέχεια η ετικέτα αποκόπτεται από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με την πρωτεάση PreScission Protease που κόβει μεταξύ της GST και του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου. Τέλος ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας διαθέτει έναν προαγωγέα tac ώστε να είναι εφικτή η χημική επαγωγή με μεγάλη απόδοση της έκφρασης και παραγωγής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. [43]

3.1.4 Χρωματογραφία

Εταιρείες	Στήλες Χρωματογραφίας
GE Healthcare	Resource Q, HiTrap Blue Sepharose (Cibacron Blue F3GA), Superose 12 10/300GL
Macherey-Nagel	Protino GST 4B agarose

Πίνακας 2: Στήλες χρωματογραφίας

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 erpendorf centrifuge 5810R και το φασματοφωτόμετρο ορατού- υπεριώδους UV 1600-PC της VWR. Η συσκευή της PCR ήταν της εταιρείας erpendorf. Η συσκευή απεικόνισης πηκτωμάτων ανήκε στην εταιρεία Protein Simple Cambridge. Το pHμετρο ήταν της εταιρείας Metrohm. Τέλος η AKTA purifier (FPLCsystem) είναι της εταιρείας GEHealthcareLifeSciences και το HeatBlock της εταιρείας Thermoleader.

3.3 Παρασκευαστικές μέθοδοι

3.3.1 Κλωνοποίηση

Τεχνικές κλωνοποίησης

Για την εισαγωγή του ενθέματος DNA στον φορέα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε μία τεχνική που στηρίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού, δηλαδή στη σύνδεση φορέα και ενθέματος μέσω του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clonetech ενζύμου *in-fusion*. [34]

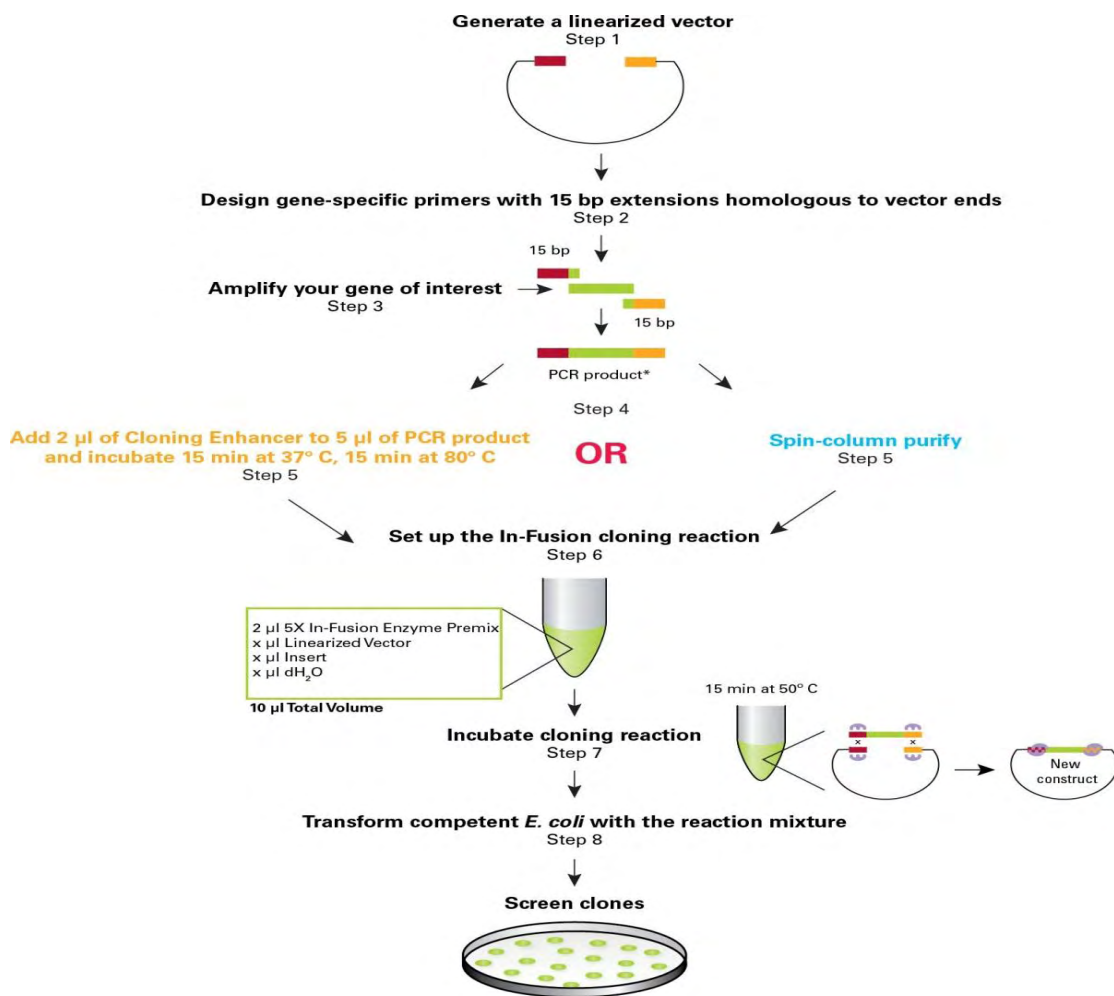
Μέθοδος In-fusion

Η ένθεση του γονιδίου της PCK1 στον φορέα pGEX-6p-1 πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου *In-fusion* ένα πρωτόκολλο σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων DNA σε έναν φορέα. Το πρωτόκολλο κάνει χρήση του κατοχυρωμένου από την Clontech ενζύμου *In-Fusion*, ένα ένζυμο που συνδέει τμήματα DNA μεταξύ τους (όπως είναι ένα προϊόν PCR και ένας γραμμικοποιημένος πλασμιδιακός φορέας). Τα τμήματα αυτά πρέπει να έχουν μια αλληλοεπικάλυψη 15bp στα άκρα τους, με ακρίβεια και με το σωστό προσανατολισμό, η οποία μπορεί να δημιουργηθεί κατά τον σχεδιασμό των εκκινήτων για την αντίδραση της αλυσιδωτή αντίδρασης πολυμεράσης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από μία ρεκομπινάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα που έχουν ο φορέας και το ένθεμα. [34]

Τα βήματα που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης είναι τα εξής:

- I. PCR για ενίσχυση του τμήματος προς κλωνοποίηση με τους ειδικούς *In-Fusion* εκκινήτες
- II. Πέψη του φορέα (pGEX-6p-1) με ενδονουκλεάση περιορισμού η οποία έχει εξασφαλιστεί πως έχει μόνο μια θέση αναγνώρισης στο φορέα στην περιοχή πολυσυνδέτη, έτσι ώστε ο φορέας να γίνει γραμμικός
- III. Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA του φορέα και του ενθέματος για την ταυτοποίηση της παρουσίας τους και την ποσοτικοποίησή τους.
- IV. Έκπλυση και ανάκτηση των τμημάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης (Gel & PCR clean up kit, Macherey-Nagel)
- V. Επίδεση του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (Ligation) με τη χρήση του *In-Fusion* ενζύμου
- VI. Μετασχηματισμός σε επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα
- VII. Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων και αλληλούχηση.

Τα βασικά βήματα της παραπάνω μεθόδου παρουσιάζονται 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 19: Σχηματική παρουσίαση του πρωτοκόλλου της μεθόδου In-Fusion [38]

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός εκκινητών πραγματοποιείται για την ενίσχυση ενός γονιδίου ή τμήματός του μέσω της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ώστε το προϊόν που προκύπτει να είναι εξειδικευμένο και με γνωστά άκρα. Αποτελεί ένα σημαντικό βήμα καθώς ορίζει την επιτυχία ή μη των μετέπειτα βημάτων του πειράματός και για αυτό απαιτείται μεγάλη προσοχή στη λεπτομέρεια κατά την κατασκευή τους. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών έγινε χρήση των οδηγιών του πρωτοκόλλου Cloning RSTRATEGY PRIMER DESIGN του EMBL. [45]

Για την ενίσχυση του γονιδίου της PCK1 έγινε σχεδιασμός εκκινητών επίσης σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας clontech από την οποία προέρχεται το kit. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη μιας αλληλουχίας 15 νουκλεοτιδίων που αλληλεπικαλύπτεται με την αντίστοιχη του φορέα. Η υπόλοιπη αλληλουχία του εκκινητή κατασκευάζεται βάση των παραπάνω οδηγιών. Εκτός από τις παραπάνω

οδηγίες χρησιμοποιήθηκε και το διαδικτυακό εργαλείο της Clonetech για τον σχεδιασμό των εκκινητών. [36]

Εκκινητές για cDNA της PCK1 (προς ένθεση στον pGEX-6p-1):

Forward Primer:

5'-GGGATCCCCGGAATTCCTCCCTCAGCTGCAAAACG-3'

(60% GC content / T_m=69°C)

Reverse Primer:

5'-GTGACCCGGGAATTCCTACTACATCTGGCTTATTCTTTGC-3'

(49% GC content / T_m=65°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 T_m Calculator (www.tmcalculator.neb.com).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR έχει ως αποτέλεσμα την επαναλαμβανόμενη αντιγραφή της περιοχής ενδιαφέροντος ενός μορίου DNA η οποία διεξάγεται *in vitro*. Αποτελεί μία ευαίσθητη διαδικασία και μπορεί να λειτουργήσει ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα DNA. Οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών πρέπει να είναι γνωστές διότι οι εκκινητές προσδένονται στο DNA στόχο και στις δύο πλευρές του τμήματος προς αντιγραφή.

Αρχικά θερμαίνουμε το μείγμα προς αποδιάταξη των αλληλουχιών DNA (98°C) όπου πραγματοποιείται διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκροτούν τη διπλή έλικα και προκύπτουν μονόκλωνες αλυσίδες. Στη συνέχεια μειώνουμε την θερμοκρασία στην θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_m) ώστε να πραγματοποιηθεί πρόσδεση των εκκινητών στο DNA και τέλος πραγματοποιείται αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C η οποία είναι η θερμοκρασία δράσης της HotStart πολυμεράσης η οποία πραγματοποιεί την αντιγραφή του DNA. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται σε έναν κατάλληλο αριθμό κύκλων, οι οποίοι είναι συνήθως τριάντα, και η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά. [37]

Το γονίδιο της PCK1 ενισχύεται με τους παραπάνω εκκινητές. Τα προϊόντα που προκύπτουν διαθέτουν άκρα κατάλληλα για ομόλογο ανασυνδυασμό με το κατοχυρωμένο από την εταιρεία Clonetech ένζυμο *in-fusion*.

Πρωτόκολλο PCR (Τελικός όγκος 50μL)

	Όγκος (μL)	Συγκέντρωση[Ⓞ]
Forward Primer	2,5	0,5μM
Reverse Primer	2,5	0,5μM
DNTPs	1	200μM
Q5 Reaction Buffer	10	1X
Hot Start Polymerase	0,5	0,02u/μL
GC Enhancer	10	1X
Template DNA	1	
Water for Injection	22,5	

Πίνακας 3: Όγκοι και συγκεντρώσεις για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Συνθήκες	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Initial denature	98	30 sec	1
Denature	98	10sec	30
Annealing	66	30sec	
Extension	72	45sec	
Final Extension	72	2min	1
Hold	4	-	-

Πίνακας 4 : Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Ο φορέα κλωνοποίησης pGEX-6p-1 κόπηκε με το περιοριστικό ενζύμο EcoRI, το οποίο αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή MSC του πλασμιδίου (GAATTC). Τα υπόλοιπα 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 $\leq 1\mu\text{g}$.

	Όγκοι (μL)	Συγκέντρωση (C)
Water for Injection	12	
10x Buffer H	2	1x
pGEX-6p-1	5	$\approx 1\mu\text{g}$
EcoRI	1	1U
Υτελ	20	

Πίνακας 5: Πέψη του φορέα pGEX-6p-1 με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI

Μετά τοτέλος της επώασης, στους 37°Cγια 2 ώρες, η αντίδραση περατώθηκε με προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

πηκτής αγαρόζης 6x (6x loading buffer) , ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ποσοτικοποίηση του γραμμικοποιημένου πλέον φορέα.

Εξαγωγή και καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

Για την εξαγωγή και τον καθαρισμό του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε χρήση του kit της εταιρείας Macherey-nagel το οποίο περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια: [38]

- NT1: διάλυμα για διαλυτοποίηση του πηκτώματος
- NT3: διάλυμα για έκπλυση της στήλης (είχε προστεθεί EtOH 100%)
- NE: διάλυμα για έκλυση DNA (5 mM Tris/HCl, pH 8.5)

Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Η διαδικασία σύνδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον γραμμικοποιημένο φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Καταλύεται από μία ανασυνδετάση η οποία αναγνωρίζει με εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης ορίστηκε ως 2 προς 1 αντίστοιχα σύμφωνα με το In-fusion HD cloning kit για την ελαχιστοποίηση των πιθανοτήτων ο φορέας να επανακυκλοποιηθεί χωρίς να γίνει ένθεση του γονιδίου προς κλωνοποίηση. Μετά το πέρας της επώασης, στους 50°C για 30min, η αντίδραση περατώθηκε στον πάγο και στην συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -20°C.[34]

	Όγκοι	Συγκέντρωση (C)
5X In-fusion HD cloning	2μL	-
Insert	2,2μL	51,3ng/μL
Linearized pGEX-6p-1	2,3μL	64,3ng/μL
WFI	3,5μL	-

Πίνακας 6: Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

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

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

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων *E.coli* στελέχους XL1 Blue πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock). Σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli* XL1-Blue (100μl), προστίθενται 90ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου τα οποία έπειτα από ελαφριά ανάδευση τοποθετούνται στους 0°C για 30min. Στη συνέχεια ακολουθεί θέρμανση στους 42°C για 45 sec και επανατοποθετούνται στους 0°C για 2min. Μετά το

πέρας των 2min προστίθενται στο διάλυμα των κυττάρων 900μL SOC θρεπτικού μέσου (Σε 50ml SOB medium προστίθενται 4ml διαλύματος glucose 1M το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με filter 0.22μM) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Στην συνέχεια ακολουθεί επίστρωσημέρους των μετασηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία petri με θρεπτικό μέσο LB Agar (35gr/L LB Agar), στα οποία έχει προστεθεί το αντιβιοτικό Αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, με γυάλινο διανομέα (πιπέττα pasteur). Τέλος ακολουθεί επώαση των τρυβλίων 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 αμπικιλίνη (50μg/ml) έγινε εμβολιασμός με μία αποικία των μετασηματισμένων βακτηρίων E. coli (XL1Blue) που διαθέτουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 12-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm).

Για την εξαγωγή του πλασμιδίου από τα κύτταρα ακολουθείται το πρωτόκολλο που διατίθεται από την εταιρεία Macherey-Nagel το οποίο διαθέτει τα παρακάτω διαλύματα: [39]

- A1: διάλυμα για επαναϊώρηση 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 έκλυση του DNA από τη στήλη (Tris/HCl)

Στοιχίση (Alignment)

Με τη βοήθεια των προγραμμάτων BioEdit και LAlign (ExpASy.org) στοιχίζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης με την πρωτότυπη αλληλουχία της PCK1 που δίνεται από την Pubmed (Παράρτημα) και διαπιστώθηκε ότι όντως ταυτίζονται. Για την αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που προέκυψε από την αντίδραση σύνδεσης του φορέα και το ενθέματος έγινε σχεδιασμός εσωτερικών εκκινητών με την χρήση του διαδικτυακού εργαλείου της Genscript.

Εκκινητές για την αλληλούχιση του PCK1:

FOR1 : CTCTGTCGAAGATCGGCATC (501-1000)

FOR2: GCACAAGGTCATTTAAGGGC (1001-1500)

FOR3: TCTTTGGCTACAACCTTCGGC (1501-1869)

REV1: CAGTGCTTCCAGGACGGG (500-1)

3.3.2 Μελέτες έκφρασης της κυτοσολικής καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK)

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* διαφορετικών στελεχών BL21-GOLD (DE3), B834(DE3) και B834pLysS με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heat shock) όπως περιγράφεται παραπάνω.

Έλεγχος έκφρασης

Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (IPTG), σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους. Εξετάστηκαν επίσης τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές *E.coli*.

Μετά το πέρας του μετασχηματισμού των βακτηριακών στελεχών έγινε επιλογή μια μοναδικής στηκτής αποικίας απο το τρυβλίο Petri και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου falcon (θρεπτικό μέσο 5ml) που περιείχε αμπικιλίνη (50μg/ml) και χλωραμφενικόλη (34ng/ml) και επώαστηκαν για 16h στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm). Εφόσον τα κύτταρα αναπτύχθηκαν ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα (θρεπτικό μέσο 80ml) με αναλογία 1:100 για κάθε κυτταρική σειρά. Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της επαγωγής σε συγκέντρωση 0,1mM IPTG και χωρίς επαγωγέα σε θερμοκρασία 37°C.

Το θρεπτικό μέσο ήταν το LbBrothHandmade (10gBacto-Trypnone, 10gNaCl, 5gYeastExtract, pH 7) και όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες.

Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C συναρτήσει της ώρας

Σε θρεπτικό μέσο LBBroth (Handmade) στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν 1/100 απο μία καλλιέργεια των 5ml που έχει αναπτυχθεί για 16h για κάθε κυτταρική σειρά προς μελέτη. Επώαστηκαν υπο συνεχή ανάδευση (210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει OD_{600nm}=0,5-0,6. Στο σημείο αυτό όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη του επαγωγέα IPTG. Η καλλιέργεια διαιρείται σε δύο κωνικές φιάλες (25ml καλλιέργειας) ανάλογα με την παρουσία ή μη επαγωγέα και ονομάστηκαν '0,5' στην οποία προστίθεται επαγωγέας (IPTG) με τελική συγκέντρωση 0,5mM και 'control'. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210rpm) για 4h και ανά μία ώρα παίρναμε δείγμα 1ml για κάθε κυτταρική σειρά. Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών στα 5000g, 4°C για 5 λεπτά το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 3 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. Δείγματα συλλέχθηκαν από το συνολικό κυτταρόλυμα και για ανάλυση σεπήκτωμαπολυακρυλαμιδίου(SDS-PAGE) (TOTAL) .Τουπόλοιποδείγματου περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 15000g, 4°C για 30 λεπτά και προέκυψε το διαλυτό υπερκείμενο απο το οποίο συλλέχθηκαν δείγματα για ανάλυση σεπήκτωμαπολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (SOLUBLE).Η διαδικασία ακολουθήθηκε για όλες τις κυτταρικές σειρές και για κάθε δείγμα που παίρναμε ανα μία ώρα.

Η συνέχεια του ελέγχου έκφρασης πραγματοποιήθηκε μόνο για την κυτταρική σειρά B834pLysS

Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C συναρτήσει της συγκέντρωσης επαγωγέα

Σε θρεπτικό μέσο LBBroth (Handmade) στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν 1/100 απο μία καλλιέργεια των 10mL που έχει αναπτυχθεί για 16h. Επώαστηκαν υπο συνεχή ανάδευση(210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει OD600nm=0,5-0,6.Στο σημείο αυτό όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεϊνης με προσθήκη του επαγωγέα IPTG. Η καλλιέργεια διαιρείται σε τρεις κωνικές φιάλες (10mL καλλιέργειας) ανάλογα με την συγκέντρωση επαγωγέα σε 'control' στην οποία δεν προστίθεται επαγωγέας, '0,1' στην οποία προστίθεται επαγωγέας (IPTG) με τελική συγκέντρωση 0,1mM και '0,5' στην οποία προστίθεται επαγωγέας (IPTG) με τελική συγκέντρωση 0,5mM. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 37°C υπο συνεχή ανάδευση (210rpm) για 3h. Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρωση των καλλιεργειών στα 5000g, 4°C για 5 λεπτά το υπερκείμενο απορριφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50mMHEPESpH 7,5). Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 3 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. Δείγματα συλλέχθηκαν από το συνολικό κυτταρόλυμα για ανάλυση σεπήκτωμαπολυακρυλαμιδίου(SDS-PAGE) (TOTAL) .Τουπόλοιποδείγματου περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 15000g, 4°C για 30 λεπτά και προέκυψε το διαλυτό υπερκείμενο απο το οποίο συλλέχθηκαν δείγματα για ανάλυση σε πήκτωμαπολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (SOLUBLE).

Επαγωγή υπερέκφρασης στους 18°Cσυναρτήσει της συγκέντρωσης επαγωγέα

Ακολουθείται η ίδια περαματική διαδικασία με τους 37°Cμε την μόνη διαφορά ότι μετά την επαγωγή ο χρόνος επώασης ανέρχεται στις 16h καθώς η θερμοκρασία αυτή απαιτεί περισσότερο χρόνο για την ανάπτυξη των βακτηρίων.

3.3.3 Χρωματογραφία

Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Το σύστημα ÄKTA FPLC αποτελεί το πιο διαδεδομένο σύστημα που χρησιμοποιείται στο καθαρισμό πρωτεϊνών. Είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα όπου τα διαλύματα περνούν μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας αντλίες θετικής μετατόπισης οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα από το σύστημα υπό υψηλή πίεση. Για την απομόνωση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται διάφορα είδη χρωματογραφικών τεχνικών όπως η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης και συγγένειας. Μετά την λύση και φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων το υπερκείμενο πέρασε από φίλτρο 0,45μm και τοποθετήθηκε στον σωλήνα superloop. Επίσης τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν την χρήση τους φιλτραρίστηκαν υπό κενό με φίλτρο 0,45μm και απαερώθηκαν με την χρήση υπερήχων και στην συνέχεια τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες. Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα UNICORN™.[40]

Κατά τη διαδικασία καθαρισμού των πρωτεϊνών με χρωματογραφία ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα: [40]

- I. Εξισορρόπηση: Κατά την εξισορρόπηση γίνεται χρήση του διαλύματος A οποίο απομακρύνει την αιθανόλη από τη στήλη. Το διάλυμα αυτό είναι αυτό που χρησιμοποιείται για τη διαλυτοποίηση των κυττάρων ώστε να υπάρχει ομοιογένεια μεταξύ του δείγματος που θα εισαχθεί στην στήλη και του διαλύματος εξισορρόπησης.
- II. Εισαγωγή δείγματος (injection): Το δείγμα εισέρχεται στη στήλη, κάτω από συνθήκες που ευνοούν την ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στο υλικό της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια, λόγω της πρόσδεσης ενός ακινητοποιημένου προσδέτη. Τα συστατικά που δεν συνδέονται απομακρύνονται από τη στήλη με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του UV (Flow through). Το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη στόχος θα πρέπει να έχει το ίδιο pH και ιοντική ισχύ με το διάλυμα το οποίο έχει εξισορροπηθεί η στήλη.
- III. Πλύση: Όλες οι προσμίξεις που δεν προσδέονται στην στήλη απομακρύνονται με το διάλυμα πλύσης, ώστε να μείνει μόνο η πρωτεΐνη που εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τον ακινητοποιημένο προσδέτη. Στο χρωματογράφημα συνήθως εμφανίζεται μεγάλη μείωση και στην συνέχεια σταθεροποίηση της απορρόφησης του UV. Η πλύση της στήλης γίνεται με το διάλυμα A.
- IV. Έκλυση: Η έκλυση της ειδικά προσδεμένης πρωτεΐνης γίνεται είτε σταδιακά μέσω αύξησης της συγκέντρωσης του (διαβάθμιση συγκέντρωσης), είτε μέσω εφαρμογής 100 % του διαλύματος έκλυσης (διάλυμα B). Αυτό οδηγεί σε απομάκρυνση της πρωτεΐνης που έχει μείνει προσδεμένη στο υλικό της στήλης. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται συλλογή της πρωτεΐνης στόχου σε καθαρή και συμπυκνωμένη μορφή.

Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography) εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που έχουν σχεδιαστεί για να εμφανίζουν συγγένεια με ειδικές χημικές ομάδες. Το δείγμα περνά μέσω της στήλης και οποια βιομόρια εμφανίζουν συγγένεια με το ακινητοποιημένο υλικό(προσδέτη) θα παραμείνουν προσδεμένα στη στήλη, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες που δεν έχουν συγγένεια θα περάσουν από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη στόχος που έχει συνδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη, θα αποσυνδεθεί από αυτόν μέσω κάποιας αλλαγής στις πειραματικές συνθήκες, όπως αλλαγή του pH, της ιοντικής ισχύος ή της σύστασης του διαλύματος. [41]

➤ Στήλη πρόσδεσης GST

Ένας από τους πιο διαδεδομένους τρόπους καθαρισμού πρωτεϊνών που στηρίζεται στη συγγένεια μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη, είναι η προσθήκη ετικέτας της S-τρασφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag, 26 KDa). Η έκφραση πρωτεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα pGEX προσδίδει την επικράτεια της GST στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στήλη που έχει ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια απομακρύνονται μετά την εκπλύση της στήλης. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλύεται με χρήση ανηγμένης γλουταθειόνης(GSH). [42]

➤ Χρωστική Cibacron Blue F3G-A

Στην υγρή χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιείται συχνά η συνθετική πολυκυκλική χρωστική, Cibacron Blue F3G-A που βρίσκεται ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Η εκλεκτικότητα που εμφανίζει έναντι των κινάσων οφείλεται στο γεγονός ότι η χρωστική εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τον συμπάραγοντα NAD^+ . Οι αφυδρογονάσες που εξαρτώνται από NAD^+ και οι ATP^- εξαρτώμενες κινάσες μπορούν να προσδένονται σε αυτή τη χρωστική. Με σταδιακή αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος έκλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί η έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών. [43]

Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Στην τεχνική της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων μορίων που πρόκειται να διαχωριστούν και των αντίθετα φορτισμένων σφαιριδίων του υλικού της ρητίνης από την οποία αποτελείται η στήλη. Όταν μία πρωτεΐνη έχει τιμή pH πάνω από το pI (ισοηλεκτρικό σημείο) της είναι θετικά φορτισμένη, ενώ κάτω από αυτό αντίστοιχα είναι αρνητικά φορτισμένη. Αυτή η ιδιότητά τους οδηγεί στο διαχωρισμό πρωτεϊνών ανάλογα με το φορτίο τους. [40]

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης βασίζεται στο ταχύ διαχωρισμό μορίων ανάλογα με το μέγεθος. Η στήλη που χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία μοριακής

διήθησης αποτελείται από την στερεή στατική φάση (gel) και την υγρή κινητή φάση. Ο διαχωρισμός ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος γίνεται κυρίως σε στήλες που έχουν σαν υλικό πλήρωσης διάφορες πηκτές. Τα gels αποτελούνται από ανοιχτά τρισδιάστατα επίπεδα πλέγματα που σχηματίζονται με διασταυρούμενους συνδυασμούς δημιουργώντας οπές οι οποίες έχουν συγκεκριμένη διάμετρο. Με αυτό τον τρόπο τα μεγάλα μόρια διέρχονται από την στήλη χωρίς να εισχωρίσουν στα gel ενώ τα μικρότερα εισχωρούν ανάλογα με το μέγεθος τους. Με κατάλληλη επιλογή της στήλης μοριακής διήθησης μπορούμε να διαχωρίσουμε τις πρωτεΐνες ανάλογα το μοριακό τους βάρος καθώς τα μεγαλύτερα μόρια θα εκλουστούν πρώτα. [48]

Πειραματική διαδικασία

Στο πρώτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της PEPCK το διάλυμα λύσης το οποίο ήταν και το διάλυμα εξισσορόπησης (A) περιείχε: 25mM HEPES, 200mM NaCl και 0,1% MTG με pH=7,5 ενώ το διάλυμα έκλουσης περιείχε επιπλέον 20mM L-glutathione. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η GST Sepharose 4B η οποία είναι διαθέσιμη από την GE Healthcare. Η απομόνωση στηρίζεται στη συγγένεια μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη, λόγω της ετικέτας της S-τρασφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag, 26 KDa). Η έκφραση της πρωτεΐνης στον πλασμιδιακό φορέα pGEX προσδίδει την επικράτεια της GST στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στήλη που έχει ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια απομακρύνονται μετά την εκπλύση της στήλης. Στο δείγμα πριν φορτωθεί στην superioor προστέθηκε 1μL βενζονάση. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε 1 κύκλο εύρους 70% για 4min με παύσεις 15sec. Μετά το πέρας της λύσης πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1h στα 12.000rpm στους 4°C. Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διάλυμα έκλουσης (B) και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE και αυτά τα οποία περιείχαν τη PEPCK συλλέχθηκαν, ποσοτικοποιήθηκαν και προστέθηκε 3C Protease για την αφαίρεση της σηματοδοτικής ετικέτας από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη για 16 ώρες. (Εικόνα 4.9)

Το δεύτερο στάδιο της απομόνωσης, μετά το πέρας των 16 ωρών, συνεχίστηκε με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής όπου το διάλυμα εξισσορόπησης περιείχε: 25mM HEPES και 0,1% MTG με pH=7,5 ενώ το διάλυμα έκλουσης περιείχε επιπλέον 25mM HEPES, 0,1% MTG και 1M NaCl με pH=7,5. Στο pH 7,5 η PCK1 έχει αρνητικό φορτίο και ως εκ τούτου μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη, όπως είναι η στήλη Resource Q. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Resource Q η οποία είναι διαθέσιμη από την GE Healthcare. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.3 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (flow through). Η πλύση της

στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος έκλουσης (B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Πιο συγκεκριμένα η έκλουση έγινε για 40 min, από 0-100 % του διαλύματος B, δηλαδή σε κάθε κλάσμα (1 mL) το NaCl αυξανόταν ανά 50 mM. (Εικόνα 4.10)

Στο τρίτο στάδιο της απομόνωσης και του καθαρισμού της PEPCK το διάλυμα εξισορρόπησης περιείχε: 25mMHEPES, 200mMNaClκαι 0,1%MTGμε pH=7,5 ενώ το διάλυμα έκλουσης περιείχε επιπλέον 20mM-glutathione. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η GSTSepharose 4B (αφαιρετική) η οποία είναι διαθέσιμη από την GEHealthcare. Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα αποτελέσματα από SDSPAGEυικνότητας 10% όπου τα κλάσματα που εκλούστηκαν και περιέχουν την PEPCKήταν τα FT (Flow-through) και 4.. Το πρωτεϊνικό διάλυμα από το δεύτερο βήμα εφαρμόστηκε σε στήλη βαρύτητας της οποίας το υλικό αποτελούνταν από σφαιρίδια που είχαν προσροφημένη γλουταθειόνη και είχαν εξισορροπηθεί με το διάλυμα εξισορρόπησης. Η PEPCK δεν προσδενεται στα σφαιρίδια και απομακρυνεται στο flow through, ενώ η πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα GST, θα πρέπει να συνδεθεί πάνω στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε πλύση της στήλης με διάλυμα A και έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών με το διάλυμα B.

Στο τέταρτο στάδιο της απομόνωσης ακολούθησε συμπύκνωση ενός μέρους της πρωτεΐνης με φίλτρα κατώφ 10.000 στους 4°C/4000xg, ποσοτικοποίηση της με την μέθοδο Bradfordκαι η τελική της συγκέντρωση ανέρχεται 31mg/mL. Έγινε χρήση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Superose 12 10/300GLκαι το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε:25mMHEPES, 200mMNaClκαι 0,1%MTGμε pH=7,5. Η στήλη αυτή δίνει την δυνατότητα του διαχωρισμού των πρωτεϊνών βάση του μεγέθους τους.

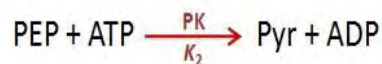
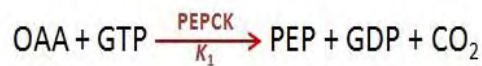
Η υπολοιπη ποσότητα πρωτεΐνης που απομονώθηκε από το τρίτο βήμα της απομόνωσης αραιώθηκε σε αναλογία 1:4, ώστε η συγκέντρωση του NaCl να γίνει 50 mM, με διάλυμα που περιείχε 25mMHEPESκαι 0,1%MTGμε pH=7,5 και έγινε χρήση της στήλης HiTrap™BlueHP (Cibacron Blue F3G-A, GE HealthCare). Η διαδικασία αυτή γίνεται γιατί σε συγκέντρωση NaCl 200 mM η πρωτεΐνη δεν θα μπορέσει να προσδεθεί στη στήλη. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με διάλυμα 25 mM HEPES pH 7.5, και 0,1% MTG (διάλυμα A) με ροή 0.5 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με ροή 0.5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 10 mL (flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (wash). Η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη έγινε με διάλυμα που περιείχε περιείχε 25 mM HEPES pH 7.5, 0,1% MTGκαι 1MNaCl(διάλυμα B) και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 1 mL. Πιο συγκεκριμένα η έκλουση έγινε για 40 min, από 0-100 % του διαλύματος B, δηλαδή σε κάθε κλάσμα (1 mL) το NaCl αυξανόταν ανά 50 mM.(Εικόνα 4.13)

Τα κλάσματα που περιείχαν την ΡΕΡCΚσυμπυκνώθηκαν με φίλτρα κατώφ 10.000 στους 4°C/4000xg, ποσοτικοποιήθηκαν με την μέθοδο Bradfordκαι η τελική της συγκέντρωση ανέρχεται 8mg/mL.Στην συνέχεια έγινε προσθήκη ίσου όγκου γλυκερόλης και αποθήκευση στους -20°C.

3.4 Κινητικές μελέτες

3.4.1 Αντίδραση Καρβοξυκινάσης του Φωσφοενολοπυροσταφυλικού

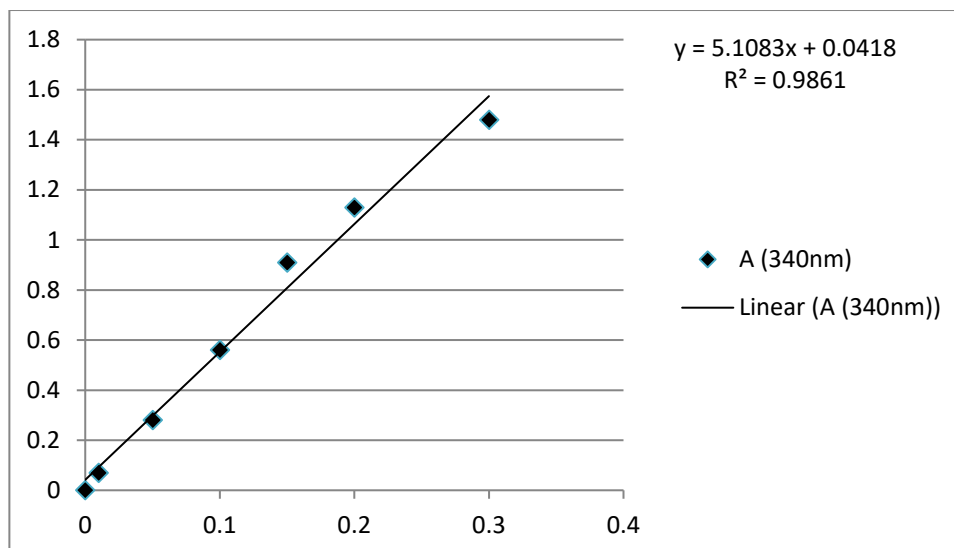
Τα κινητικά πειράματα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο LambdaBio+ της PerkinElmer, όπου χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα αναφοράς και κυψελίδα μέτρησης, όπου η δραστηριότητα του ενζύμου μετρήθηκε σύζευξης με τα ένζυμα PK και LDH. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη σύζευξη της παραγωγής PEP από την αντίδραση του ενζύμου PEPCK με την μετατροπή του σε πυροσταφυλικό οξύ από το ένζυμο κινάση του πυροσταφυλικού οξέος (PK) και την μετέπειτα μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ από την αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (LDH). Η τελευταία αντίδραση αυτών των συζευγμένων αντιδράσεων στάδιο απαιτεί NADH, το οποίο οξειδώνεται σε NAD⁺. Το NADH απορροφά στα 340nm επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την παρακολούθηση της αντίδρασης. Η μείωση της OD_{340nm} μετατρέπεται σε δραστηριότητα της PEPCK όπου 1 μόριο NADH που οξειδώνεται σε NAD⁺ αντιστοιχεί σε 1 μόριο PEP που παράγεται από τη δράση του ενζύμου ενδιαφέροντος όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Coupled enzyme reaction

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη ως προς NADH όπου χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0mM, 0,01mM, 0,05mM, 0,1mM, 0,15mM, 0,2mM και 0,3mM NADH η οποία παρουσιάζεται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Πρότυπη καμπύλη NADH

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος του δεύτερου μέρους των αντιδράσεων σύζευξης για την εύρεση των ιδανικών συγκεντρώσεων των ενζύμων PK και LDH που θα χρησιμοποιηθούν στην αντίδραση. Οι συγκεντρώσεις που ελεγχθηκαν είναι 10/30units, 15/30 units, 10/40units και 10/20units PK και LDH αντίστοιχα. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 0.75mL. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 50mMHesperH 7.5, 2mMMgCl, 2mMDTT, 0,2 MnCl₂, 0,1mMADP, 1mMPEP, 0.15mMNADH. (Εικόνα 4.15)

Η ιδανικές συγκεντρώσεις PK και LDH ήταν 10 και 30 units αντίστοιχα.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος των συγκεντρώσεων 0,5nM, 1nM, 2nM, 10nM και 30nMPEPCK. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 0.45mL. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 50mMHesperH 7.5, 2mMMgCl, 2mMDTT, 0,2 MnCl₂, 1mMADP, 0,5mMGTP, 0.15mMNADH, 10unitsPK, 30units LDH και OAA 0,3mM. Παράλληλα με τη μέτρηση του δείγματος μετρήθηκε και τυφλό δείγμα, το οποίο περιείχε το μείγμα της αντίδρασης εκτός από το ένζυμο PEPCCK, ώστε να αφαιρείται αυτόματα τυχόν υδρόλυση του ATP λόγω δράσης της PK ή λόγω μη ενζυμικής υδρόλυσης. Όλες οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη 0,3mM OAA. Τα κινητικά δεδομένα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.16.

Παρατηρήθηκε ότι η μείωση του NADH στις αντιδράσεις που περιείχαν την καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού δεν διέφερε σημαντικά από το τυφλό δείγμα επομένως πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση που περιείχε 50mMHesperH 7.5, 2mMMgCl, 2mMDTT, 0,2 MnCl₂, 0.15mMNADH, 30unitsLDH και OAA 0,3mM και παρατηρήθηκε η μείωση του NADH που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.17.

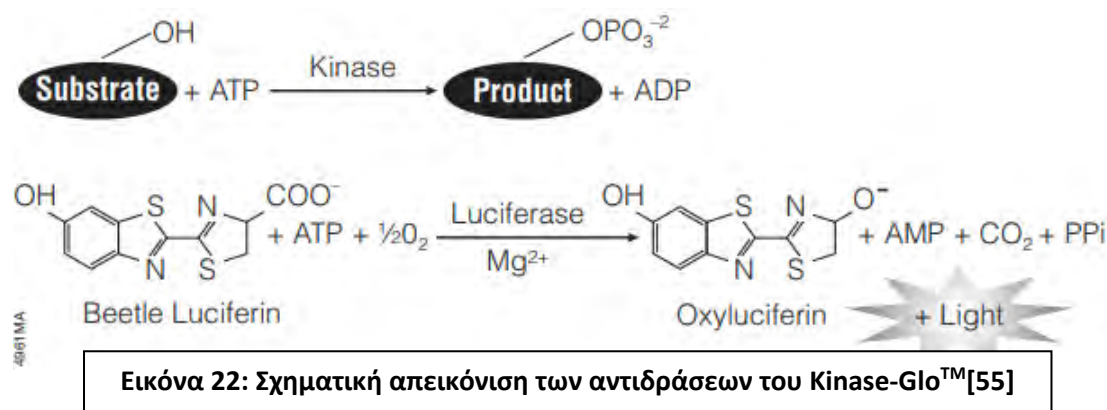
Συμφωνα με τους Johnson and Hologak το οξαλοξικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται αυθόρμητα σε πυροσταφυλικό παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων MgCl και MnCl₂. Για να επαληθεύσουμε αυτό το αποτέλεσμα πραγματοποιήθηκε μια αντίδραση που περιείχε 50mMHesperH 7.5, 2mMDTT, 0.15mMNADH, 30unitsLDH και OAA 0,3mM και

μετρήθηκε η απορρόφηση στα 340 nM η οποία για 2 λεπτά παρέμενε σταθερή στα 870^A. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 0,2mM MnCl₂ και μετρήθηκαν οι απορροφησεις ανα 30sec έως ότου αρχίζει να σταθεροποιείται. Μόλις σταθεροποιήθηκε έγινε προσθήκη 2mM MgCl₂ και μετρήθηκαν οι απορροφησεις μέχρι τέλους της αντίδρασης. Τα κινητικά δεδομένα παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.18.

Εξαιτίας της αυθόρμητης αποκαρβοξυλίωσης του οξαλοξικού οξέος σε πυροσταφυλικό δεν κατέσσει δυνατή η μέτρηση της δραστηριότητας της PEPCK μέσω του πρωτοκόλλου σύζευξης και η συνέχεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με το kit Kinase-Glo[®] Luminescent της Promega.

3.4.2 Kinase-Glo[®] Luminescent Kinase Assay Platform

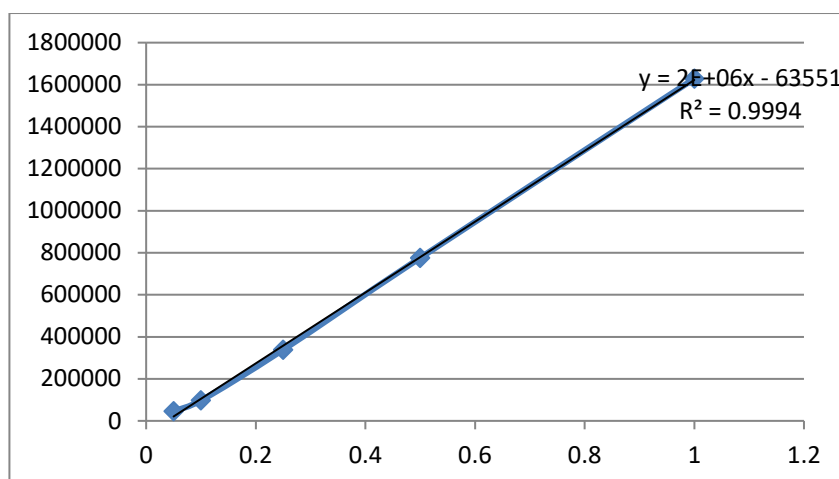
Αυτή η τεχνική αποτελεί μία μέθοδος που παρέχει την δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ATP που απομένει σε ένα διάλυμα μετά την αντίδραση της κινάσης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι το ATP που απομένει τη στιγμή που προστίθεται το αντιδραστήριο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από το Ultra-Glo[™] luciferase για να καταλύσει τη μονοοξυγόνωση της λουσιφερίνης. Η αντίδραση της λουσιφεράσης παράγει ένα φωτόνιο φωτός ανά κύκλο δραστηριότητας. Η φωταύγεια με αυτόν τον τρόπο συσχετίζεται με την δραστηριότητα της κινάσης.[44]



Μέσω αυτού του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση της δραστηριότητας του ενζύμου κινάση του πυροσταφυλικού, καθώς χρησιμοποιήθηκε η σύζευξη του ενζύμου όπως και στον προηγούμενο πρωτόκολλο, με την δραστηριότητα της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού.

Πειραματική διαδικασία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προτυπη καμπύλη ως προς ATP σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit Kinase-Glo[®] Luminescent Kinase Assay Platform της Promega. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0,05μM, 0,1μM, 0,25μM, 0,5μM και 1μM ATP. Η πρότυπη καμπύλη παρουσιάζεται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23: Πρότυπη καμπύλη ως προς ATP

→ Προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης PEPCK

Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 0.12 mL. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 50 mM HEPES pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.2 mM MnCl₂, BSA 0.2 mg/mL, 1 mM ADP, 0.1 mM GTP, 4 units PK, και 0.1 mM OAA. Οι συγκεντρώσεις PEPCK που ελέγχθηκαν ήταν 100 nM, 200 nM και 300 nM. Η αντίδραση σταματούσε ανά 30 sec μέχρι τα 2 min στο αντιδραστήριο που παρέχεται από το kit της Promega ενώ η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη OAA στους 30°C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.19.

→ Μελέτη πρόσδεσης υποξανθίνης

Ακολούθησε η ίδια αντίδραση με την συγκέντρωση της PEPCK να ανέρχεται στα 200 nM η αντίδραση σταματούσε ανά 30 sec μέχρι τα 2 min με 0 μM, 1 μM και 10 μM Υποξανθίνης τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην εικόνα 4.20.

3.5 Αναλυτικές μέθοδοι

Ηλεκτροφόρηση ονομάζεται το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Η κίνηση των ουσιών εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών καθώς τα μόρια λόγω του φορτίου τους κατευθύνονται προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου λόγω της ηλεκτροστατικής δύναμης που αναπτύσσεται. Τα μόρια επίσης εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μάζων κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες. Ανάλογα με το είδος του δείγματος προς διαχωρισμό η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αгарόζης ή πολυακρυλαμιδίου. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση τόσο πηκτής αгарόζης, που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA), όσο και πηκτής πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. [32]

3.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

Για τον διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ταχύτητα μετανάστευσης των μορίων καθορίζεται από το μήκος των μορίων. Το πήκτωμα είναι ένα δίκτυο με πόρους διαμέσου των οποίων πρέπει να διέλθουν τα μόρια του DNA προκειμένου να προσεγγίσουν το θετικό ηλεκτρόδιο. Γι' αυτό τον λόγο τα μικρότερα μόρια έχουν μεγαλύτερη ταχύτητα μετανάστευσης κατά τη δίοδο τους συγκριτικά με τα μεγαλύτερα μόρια τα οποία μετακινούνται με μικρότερη ταχύτητα μέσα στην πηκτή.

Η αγαρόζη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που σχηματίζει πήκτωμα με πόρους διαμέτρου από 100nm μέχρι 300nm ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης.[32] Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (TAE στην προκειμένη περίπτωση) το οποίο αναμειγνύεται με την σωστή ποσότητα σκόνης αγαρόζης και ακολουθεί θέρμανση μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη. Στην συνέχεια προστίθεται ειδική χρωστική (Midori Green), η οποία δεσμεύεται στο DNA η οποία παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει πράσινο φθορισμό, όταν είναι προσδεσμένη σε DNA ή RNA (~530nm), όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270nm). [36] (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).

3.5.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS(SDS-PAGE)

Η τεχνική SDS-PAGE βασίζεται στην δημιουργία μίας πηκτής η οποία αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel) με 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. Η πηκτή επιστοιβάξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, συσσωρεύει 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 καθώς το μέγεθος των πόρων του πλέγματος που δημιουργούνται αυξάνει τις διαφορές στην κινητικότητα μεταξύ πρωτεϊνών οι οποίες διαφέρουν σε μέγεθος. [45]

Η πηκτή σχηματίζεται λόγω του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και δι-ακρυλαμιδίου 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. [45]

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 (5.9ml H₂O, 5ml 30%Acryl/BisacrylamideMix, 3.8ml 1.5MTrisHClpH8.8, 0.15ml 10%SDS, 0.15ml APS, 6μLTEMED) και στην συνέχεια προστίθεται από πάνω η πηκτή επιστοιβάξης (3.4ml H₂O, 0.83ml 30% Acryl/BisacrylamideMix, 0.63ml, 1MTrisHClpH6.8., 0.05ml 10%SDS, 0.05ml APS, 5μLTEMED), στην οποία σχηματίζονται 10 ή 15 υποδοχές με τη βοήθεια ειδικής “χτένας”. Μόλις η πηκτή είναι έτοιμη τοποθετείται στην κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x Running Buffer 1x (72g Glycine (MW:75.04), 15g Tris (MW:121.14), 5gSDS, μέχρι τα 500 ml dH₂O). [46]

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται με 4x SDS protein Sample Buffer (4ml 100%glycerol, 2.4ml 1MTris/HClpH6.8, 0.8gSDS, 4mg bromophenolblue, 0.5mlbeta-mercaptoethanol, 3.1ml dH₂O) έτσι ώστε σε όλα να περιέχεται ίση συγκέντρωση πρωτεΐνης και η τελική αραιώση των δειγμάτων να είναι 1x. Ο αποδιατακτικός παράγοντας SDSκαταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων, καθώς τα φορτίζει αρνητικά ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο βάσει του μοριακού τους βάρους. Το διάλυμα αυτό περιέχει επίσης 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 και 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. [46]

Το μίγμα θερμαίνεται στους 95oC 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). [47] Οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue 0.05% (80ml Methanol40%, 20ml Acetic Acid10%, 100ml dH₂O, 0.1g Coomassie Blue R-250). Η χρώση γίνεται σε 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. Αρχικά η πηκτή πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζεται σε διάλυμα Coomassie Blue και θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Αφήνεται κατόπιν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. 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. [46]

3.4.3 Ανοσοανίχνευση κατά Western (Western Blot)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου βρίσκει εφαρμογή και κατα την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισώματος για ποιοτική

αλλα και ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος. Κατα την τεχνική αυτή όλα τα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν διαχωριστεί με την τεχνική της πηκτής πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται υπο την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου σε μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που έχει την ικανότητα να τα δεσμεύει. Στην συνέχεια επωάζονται με ειδικό αντίσωμα για την προς ανίχνευση πρωτεΐνη το οποίο είναι σημασμένο κατάλληλα. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν δυο διαφορετικά αντισώματα με το πρώτο να αλληλεπιδρά με την προς μελέτη πρωτεΐνη ενώ το δεύτερο συνδέεται με την σταθερή μη μεταβλητή περιοχή Fc του πρώτου αντισώματος . [1]

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου η πηκτή αφαιρείται από την συσκευή ηλεκτροφόρησης και αποκόπτεται η πηκτή επιστοιβάξης. Η πηκτη επιστοιβάξης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα τεσσερα διηθητικά χαρτιά Watman 3nm και τα δύο σφουγγάρια τοποθετούνται σε δύο λεκάνες που περιέχουν το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (10 % Running Buffer 10x, 20 % MeOH , 0.05 % SDS, dH₂O) για 10 λεπτά με σκοπό την εξισορρόπηση τους. Στην συνέχεια συναρμολογείται η συσκευή μεταφοράς ως εξής: σφουγγαρι-2 χαρτιά Watman-μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-2 χαρτιά Watman- σφουγγαρι. Η μεμβράνη τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτρομεταφοράς προς τον θετικό πόλο ενώ η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προς τον αρνητικό. Πριν την έναρξη της μεταφοράς απομακρύνονται οι φυσαλίδες που παρεμβάλλονται ανάμεσα στην πηκτή και την μεμβράνη ώστε να μην παρεμποδιστεί η διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος και επομένως η μεταφορά. Στην συνέχεια η μεταφορά πραγματοποιείται σε πάγο για 70 λεπτά υπο επίδραση σταθερής έντασης κάθετου ηλεκτρικού πεδίου 350mA. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς αφαιρείται από την συσκευή, η μεμβράνη τοποθετείται σε PBSTx1 με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (Stockbuffer PBST 10x , Tween-20 1%, dH₂O) για 1 ώρα υπο ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αυτό είναι υπεύθυνο για τον κορεσμό των ελεύθερων περιοχών της μεμβράνης με τις πρωτεΐνες του γάλακτος (μη ειδικές θέσεις) ώστε το πρώτο αντίσωμα θα δεσμευτεί μόνο στην πρωτεΐνη προς ανίχνευση. Ακολουθεί έκπλυση της μεμβράνης με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tx1 για την απομάκρυνση των υπολειμάτων του blocking buffer και επώαση της μεμβράνης με διάλυμα που περιέχει το πρωτογενές αντίσωμα, σε cold room στους 4°C καθ'όλη την διάρκεια της νύχτας. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθούν πέντε εκπλύσεις πέντε λεπτών με διάλυμα PBS-Tx1 για την απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος. Στην συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα για μία ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπο ελαφριά ανάδευση, το οποίο αναγνωρίζει τις ειδικές περιοχές του πρωτογενούς αντισώματος. Τέλος η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές με PBS-T για πέντε λεπτά και ακολουθεί εμφάνιση του σήματος.[47]

Για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια δηλαδή την εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο

υπόστρωμα. Το φως ανιχνεύεται ύστερα από σύντομη έκθεση με τη χρήση φιλμ αυτοραδιογραφίας. Μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια όπου επωάζεται για 3 λεπτά στο σκοτάδι με μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας ECL A και ECL B ίσης αναλογίας ++και μετά χωρίς να ξεπλυθεί η μεμβράνη τοποθετείται στην κασετίνα έκθεσης κοντά στον φθορίζοντα μάρτυρα Έπειτα, η κασέτα μεταφέρεται στο σκοτεινό θάλαμο (darkroom) . Στην συνέχεια τοποθετούνται στην κασέτα τα φιλμ στα οποία εμφανίζεται τελικά το σήμα φθορισμού.Μετά το πέρας του κατάλληλου χρόνου το φιλμ αφαιρείται από την κασετίνα και μεταφέρεται σε διάλυμα εμφάνισης (Developer) για ένα λεπτό υπό ανακίνηση το οποίο χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη του σήματος. Τέλος ξεπλένεται με νερό και τοποθετείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) υπό ανακίνηση για ένα λεπτόfixer για την μονιμοποίηση του σήματος. Μετά το φιλμ ξεπλένεται και πάλι με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.Τοκίτπου χρησιμοποιείται στο πρωτόκολλο είναι της Kodak.

4. Αποτελέσματα

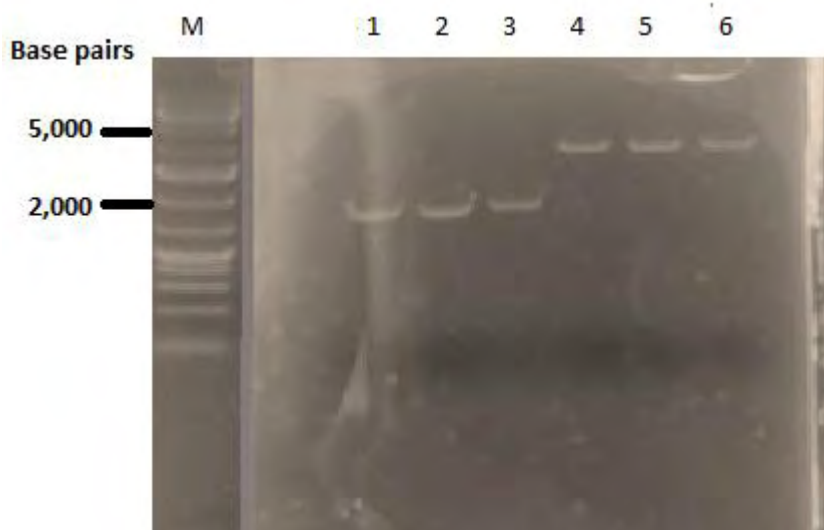
4.1 Τεχνικές Κλωνοποίησης

Ενίσχυση ολόκληρου του γονιδίου με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Το πρώτο βήμα του πειράματος ήταν η κατασκευή του τμήματος προς ένθεση στον φορέα PGEX-6p-1 με τη δημιουργία κατάλληλων εκκινήτων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Οι εκκινήτες προσδίδουν άκρα που θα επιτρέπουν τη σύνδεση στο φορέα με τη χρήση του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clonetech ενζύμου *in-fusion*. Το μήκος ολόκληρου του γονιδίου αναμένεται να έχει μοριακό βάρος 1869bp συν τις βάσεις που προσθέτουν οι εκκινήτες. ΑποτηνPCRη οποία πραγματοποιήθηκε με το kit της εταιρείας Clonetech προέκειψαν 50μL δείγματος που μετά την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας Loading dye 6x φορτώθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1% προς εξαγωγή και καθαρισμό με το kit της εταιρείας macherey-nagel. (Εικόνα 4.1)

Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

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 αγαρόζης 1% προς εξαγωγή και καθαρισμό. Ο πλασμιδιακός φορέας είχε το αναμενόμενο μοριακό βάρος. (Εικόνα 4.1)

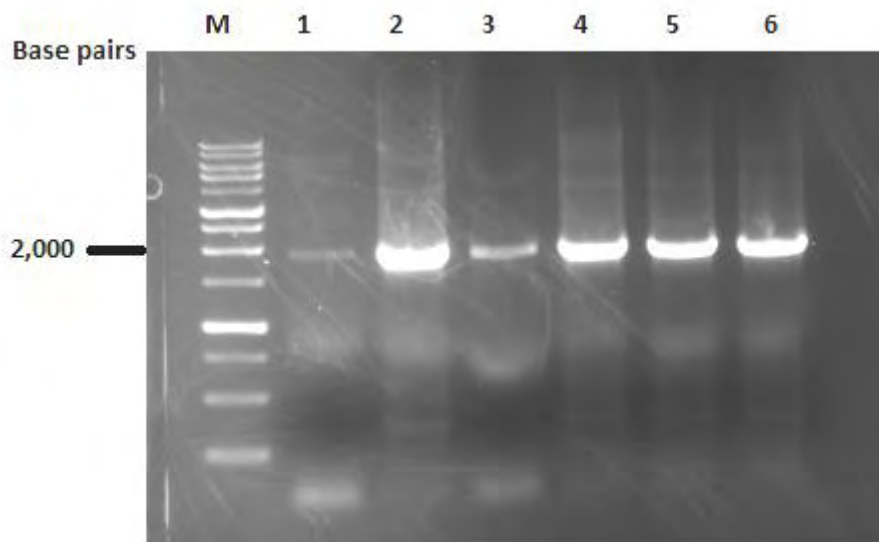


Εικόνα 4.1: Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά από την πέψη του pGEX-6p-1 (διαδρομές 4,5 και 6) και του γονιδίου PCK1 μετά από ενίσχυση με τους κατάλληλους εκκινήτες (διαδρομές 1, 2 και 3). Τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα διακρίνονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (M) είναι ο 1kb DNA ladder της εταιρείας Nippon genetics

Αντίδραση σύνδεσης με κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clonetech ενζύμου in-fusion.

Για την σύνδεση φορέα και ενθέματος έγινε με τη χρήση του κατοχυρωμένου από την εταιρεία Clonetech ενζύμου *in-fusion*. Ο λόγος φορέα - ενθέματος ήταν 1:2. Πραγματοποιείται μετασηματισμός του προϊόντος της σύνδεσης σε βακτηρια *E.coli* στελέχους XL1 Blue με τη μέθοδο του θερμικού σοκ και στην συνέχεια έγινε απομόνωση του πλασμιδίου με το kit της εταιρείας Macherey-nagel. Για την

επιβεβαίωση της παρουσίας ενθέματος χρησιμοποιήθηκε το KAPA Taq PCR kit της KAPABIOSYSTEMS. Τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR παρουσιάζονται στην εικόνα 4.2 όπου παρατηρούμε ότι υπάρχει το ένθεμα.



Εικόνα 4.2: Πήκτωμα αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά απο την σύνδεση του φορέα pGEX-6p-1 και του γονιδίου PCK1 και επιβεβαίωση της ύπαρξης ενθέματος με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (διαδρομές 2, 4, 5 και 6). Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (διαδρομή M) είναι ο 1kbDNALadderRT της εταιρείας Nippongenetics.

4.2 Στοιχισή

Η στοιχισή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της PCK1 και της αλληλουχίας του γονιδίου που προέκυψε μετά την αντίδραση σύνδεσης με την χρήση του καταχυρομένου απο την εταιρεία Clontech ενζύμου *in-fusion* έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος LAlign (Expasy.org). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει ταύτιση στις δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και παρουσιάζονται στην εικόνα 4.3.

PCK1	AAACGGCTGAACCTCTGCCCAAAGTTTCAGGAAAGCTGCGACAGCTGCCCCAGG	500	510	520	530	540	550	
unknow	AMMKGGGCTTTATCTCTGCGGCAAGTTCTCCAGGAAAGCTGCGACAGCTGCCCCAGG	PKC1	TGGTGCCAGCATGCGGATCATGACGGGATGGGACGCGCTGGGAAGCATGGGGG	560	570	580	590	600
unknow	10 20 30 40 50 60	unknow	TGGTGCCAGCATGCGGATCATGACGGGATGGGACGCGCTGGGAAGCATGGGGG	unknow	590	600	610	620
PCK1	CAGTAGGGAGTTCCTCGAATAAGCTAGAGCTGTGTCCAGCTGTACATCCACATCT	PCK1	ATGGGGAGTTTCTCAATGCTCCATTCTGTTGGGTCGCTTGTCCCTTACAAAAGCTT	unknow	610	620	630	640
unknow	70 80 90 100 110 120	unknow	ATGGGGAGTTTCTCAATGCTCCATTCTGTTGGGTCGCTTGTCCCTTACAAAAGCTT	unknow	640	650	660	670
PCK1	GTAGCGCTTGAGGAGGAATGGCGGCTTCTGGCCAGATGGAGGAGGCGCATCC	PCK1	TGTCACAGACTTGCCCTGACCGGAGTGGAGTGCACCTGACCTGCTGACGCGCA	unknow	670	680	690	700
unknow	130 140 150 160 170 180	unknow	TGTCACAGACTTGCCCTGACCGGAGTGGAGTGCACCTGACCTGCTGACGCGCA	unknow	700	710	720	730
PCK1	TCAGGCGCTGAAGAGTATGACAACTGGTGGCTCTCACTGACCAGAGGATGTGG	PCK1	GAGAGTATCTCTTTGGAGTGGTACGGCGGGAGCTGCTGCGGAGGAGTGCT	unknow	730	740	750	760
unknow	190 200 210 220 230 240	unknow	GAGAGTATCTCTTTGGAGTGGTACGGCGGGAGCTGCTGCGGAGGAGTGCT	unknow	760	770	780	790
PCK1	CCAGGATGAAGCAGAGCGGTATGCTCACCCAGAGCAAGAGGACAGTCCCATCC	PCK1	TTGCTCTCAGGATGCGCCAGCGGGTGGCCAGGAGGAGGAGTGCTGGCAGAGCAGTCC	unknow	790	800	810	820
unknow	250 260 270 280 290 300	unknow	TTGCTCTCAGGATGCGCCAGCGGGTGGCCAGGAGGAGGAGTGCTGGCAGAGCAGTCC	unknow	820	830	840	850
PCK1	CCAAAAGGCTCAGCAGCTCGTCTGGTGTACAGAGGAGATTTGAGAAAAGCT	PCK1	TGGTTCTGGGTATAAACAACCTGAGGAGTGAGAGGAGATCTGGGCGGATTTCCCA	unknow	850	860	870	880
unknow	310 320 330 340 350 360	unknow	TGGTTCTGGGTATAAACAACCTGAGGAGTGAGAGGAGATCTGGGCGGATTTCCCA	unknow	880	890	900	910
PCK1	TCAAATCCAGGTTCCAGGTCATGAAAGTGCACCACTATGCTATCCATTACGCA	PCK1	GCCCTGGCGAGAGCAACCTCCCATGATGAAAGGCGAGCTGCCGAGTGGGA-GTT	unknow	910	920	930	940
unknow	370 380 390 400 410 420	unknow	GCCCTGGCGAGAGCAACCTCCCATGATGAAAGGCGAGCTGCCGAGTGGGA-GTT	unknow	940	950	960	970
PCK1	TGGGCGGCTGGGCTCAACTTGTGAAGTGCAGCTGAGCTGACGATTCGCTTACG	PCK1	GAGTGCTGGGGATGACATGCTGGAGAAATTTGACGCAAGGCTATTAAAGG-CC	unknow	970	980	990	1000
unknow	430 440 450 460 470 480	unknow	GAGTGCTGGGGATGACATGCTGGAGAAATTTGACGCAAGGCTATTAAAGG-CC	unknow	990	1000	1010	1020
PCK1	GATTTCCAGCGCTGGGGAGAGCAACTGGCTGATGAAAGGCTGCTCCCGGGT	PCK1	TAGTCTATGAGCTCTCAACTGGACATTTGTGGGCGGCATGAGATCAG	unknow	1020	1030	1040	1050
unknow	10 20 30 40 50	unknow	TAGTCTATGAGCTCTCAACTGGACATTTGTGGGCGGCATGAGATCAG	unknow	1050	1060	1070	1080
PCK1	GGAAAGTGAAGTGTGGGGAGCATTTGCCATGAAGTTTGAAGCAAGGTCATT	PCK1	AGGCACAGGCGCTGAGAGCATAAAGGCAAAATCATCATGACACCTTTGACATGC	unknow	1080	1090	1100	1110
unknow	60 70 80 90 100 110	unknow	AGGCACAGGCGCTGAGAGCATAAAGGCAAAATCATCATGACACCTTTGACATGC	unknow	1110	1120	1130	1140
PCK1	TAGGCGCATCAACCGAAAATGCTTTTGGTGTGCTCTGGGACTCAGTGAAGA	PCK1	GGCCCTCTTTGAGTACACTTGGCAAATAGCTGGCCAACTGGCCTAGTGAGAGG	unknow	1140	1150	1160	1170
unknow	120 130 140 150 160 170	unknow	GGCCCTCTTTGAGTACACTTGGCAAATAGCTGGCCAACTGGCCTAGTGAGAGG	unknow	1170	1180	1190	1200
PCK1	CCAAAGGATGTCATGAAGCAATCCAGAGCAACACATTTTACCAATGTGGCGAGA	PCK1	ACCCAGCAGCAAACTCCCAAGTCTTTCATGTCAGTGGTCCGAGGAGGAGGAG	unknow	1200	1210	1220	1230
unknow	180 190 200 210 220 230	unknow	ACCCAGCAGCAAACTCCCAAGTCTTTCATGTCAGTGGTCCGAGGAGGAGGAG	unknow	1230	1240	1250	1260
PCK1	CCAGGACGGGGGTTTACTGGAAGGATGATGAGCCGCTAGCTCAGGTCACCA	PCK1	GCAAACTCTGCGCAGGCTTTGGAGAACTCCAGGGTCTGGGATGATTCAACC	unknow	1260	1270	1280	1290
unknow	240 250 260 270 280 290	unknow	GCAAACTCTGCGCAGGCTTTGGAGAACTCCAGGGTCTGGGATGATTCAACC	unknow	1290	1300	1310	1320
PCK1	TCACCTCTGGAAGAATAGAGGTTGAGCTCAGAGATGGGAACTTGTGCCACCCCA	PCK1	GGATCTGGAAAGTCAACAGCACTGGCCTAAGTCCATGGCTTCCAGGAGATG	unknow	1320	1330	1340	1350
unknow	300 310 320 330 340 350	unknow	GGATCTGGAAAGTCAACAGCACTGGCCTAAGTCCATGGCTTCCAGGAGATG	unknow	1350	1360	1370	1380
PCK1	ACTGAGGTTCTGACCCCTGCAAGCAAGTCCCCATTGATGCTGCTGGGAGTCTC	PCK1	CCCTGAACTGGAAGGCTGGGGCACATCAACTGATGGAGCTTTGACATTCAGAG	unknow	1380	1390	1400	1410
unknow	360 370 380 390 400 410	unknow	CCCTGAACTGGAAGGCTGGGGCACATCAACTGATGGAGCTTTGACATTCAGAG	unknow	1410	1420	1430	1440
PCK1	CGGAAGTGTCCATTGAAGGATTATCTTGGAGGCTAGACCTGGTGTCCCTC	PCK1	AATTCTGGGAGGAGGTTGAGGACATGAGAAATTTGGAGGATCAAGTCAATCGCG	unknow	1440	1450	1460	1470
unknow	420 430 440 450 460 470	unknow	AATTCTGGGAGGAGGTTGAGGACATGAGAAATTTGGAGGATCAAGTCAATCGCG	unknow	1470	1480	1490	1500
PCK1	GCCCTCAGTGGTGCCAGCATGCGGATCATGACGGGATGGGACGCGCTGCGGAAG	PCK1	TAGGCGCATCAACCGAAAATGCTTTTGGTGTGCTCTGGGACTCAGTGAAGA	unknow	1500	1510	1520	1530
unknow	20 30 40 50 60 70	unknow	TAGGCGCATCAACCGAAAATGCTTTTGGTGTGCTCTGGGACTCAGTGAAGA	unknow	1530	1540	1550	1560
PCK1	CACGAGGAGTGGAGTGTCAATGCTCTCATTCTGTTGGGTGCTCTGCCTTTAC	PCK1	CCAAAGGATGTCATGAGCAATCCAGAGCAACACATTTTACCAATGTGGCGAGA	unknow	1560	1570	1580	1590
unknow	80 90 100 110 120 130	unknow	CCAAAGGATGTCATGAGCAATCCAGAGCAACACATTTTACCAATGTGGCGAGA	unknow	1590	1600	1610	1620
PCK1	AAAAGCTTTGGTCAACAACCTGGCCCTGCAACCGGAGCTGACCTCACTGCCCACTGC	PCK1	CCAGGACGGGGGCTTACTGGAAGGATGATGAGCCGCTAGCTCAGGTCACCA	unknow	1620	1630	1640	1650
unknow	140 150 160 170 180 190	unknow	CCAGGACGGGGGCTTACTGGAAGGATGATGAGCCGCTAGCTCAGGTCACCA	unknow	1650	1660	1670	1680
PCK1	GTAGCGAGAGAGATCATCTCTTTGGAGTGGGTACGGGGAACTGCTGCTCGGGA	PCK1	TCAGCTCTGGAAGAATAGAGGTTGAGCTCAGAGATGGGAACTTGTGCCACCCCA	unknow	1680	1690	1700	1710
unknow	200 210 220 230 240 250	unknow	TCAGCTCTGGAAGAATAGAGGTTGAGCTCAGAGATGGGAACTTGTGCCACCCCA	unknow	1710	1720	1730	1740
PCK1	AGAAAGTGTGCTCGAGTGGCGCAGCTCCAGAGAGGAGGATGGCTGGCAG	PCK1	ACTGAGGTTCTGACCCCTGCAAGCAAGTCCCCATTGATGCTGCTGGGAGTCTC	unknow	1740	1750	1760	1770
unknow	260 270 280 290 300 310	unknow	ACTGAGGTTCTGACCCCTGCAAGCAAGTCCCCATTGATGCTGCTGGGAGTCTC	unknow	1770	1780	1790	1800
PCK1	AGCACAATGCTTGGTATAACCAACCTGAGGGTGAAGAAAGTACCCTGGCGGCC	PCK1	CGGAAGTGTCCATTGAAGGATTATCTTGGAGGCTAGACCTGGTGTCCCTC	unknow	1800	1810	1820	1830
unknow	320 330 340 350 360 370	unknow	CGGAAGTGTCCATTGAAGGATTATCTTGGAGGCTAGACCTGGTGTCCCTC	unknow	1830	1840	1850	1860
PCK1	CATTTCCAGCGCTGGGAGAGCAACCTGGCCATGATGAACCCAGGCTCCCGGGT	PCK1	TAGTCTATGAGCTCTCAGCTGGCAACATGGAGTCTTTGTTGGGGGCGG-CATGATC	unknow	1860	1870	1880	1890
unknow	380 390 400 410 420 430	unknow	TAGTCTATGAGCTCTCAGCTGGCAACATGGAGTCTTTGTTGGGGGCGG-CATGATC	unknow	1890	1900	1910	1920
PCK1	GGAAAGTGAAGTGTGGGGAGCATTTGCCATGAAGTTTGAAGCAAGGTCATT	PCK1	AGAGGCGCACAGGCTGAGAGCATAAAGGCAAAATCATCATGACACCTTTGACATGC	unknow	1920	1930	1940	1950
unknow	440 450 460 470 480 490	unknow	AGAGGCGCACAGGCTGAGAGCATAAAGGCAAAATCATCATGACACCTTTGACATGC	unknow	1950	1960	1970	1980


```

1550 1560 1570 1580 1590 1600
PCK1 GGTTCGGAAGGACAAGGAAGGCAATTCCTCTGGCCAGGCTTTGGAGAGAACTCCAGGG
unknow GGTTCGGAAGGACAAGGAAGGCAATTCCTCTGGCCAGGCTTTGGAGAGAACTCCAGGG
80 90 100 110 120 130

1610 1620 1630 1640 1650 1660
PCK1 TGCTGGAGTGGATGTTCAACCGGATCGATGGAAAAGCCAGCACCAAGCTCACGCCCATAG
unknow TGCTGGAGTGGATGTTCAACCGGATCGATGGAAAAGCCAGCACCAAGCTCACGCCCATAG
140 150 160 170 180 190

1670 1680 1690 1700 1710 1720
PCK1 GCTACATCCCAGGAGGATGCCCTGAACCTGAAGGCCCTGGGGCACATCAACATGATGG
unknow GCTACATCCCAGGAGGATGCCCTGAACCTGAAGGCCCTGGGGCACATCAACATGATGG
200 210 220 230 240 250

1730 1740 1750 1760 1770 1780
PCK1 AGCTTTTCAGCATCTCCAAGGAATTCGGGAAAGGAGTGGAAAGACATCGAGAAGTATC
unknow AGCTTTTCAGCATCTCCAAGGAATTCGGGAAAGGAGTGGAAAGACATCGAGAAGTATC
260 270 280 290 300 310

1790 1800 1810 1820 1830 1840
PCK1 TGGAGGATCAAGTCAATGCCGACCTCCCTGTGAAATCGAGAGAGATCCTGCCTTGA
unknow TGGAGGATCAAGTCAATGCCGACCTCCCTGTGAAATCGAGAGAGATCCTGCCTTGA
320 330 340 350 360 370

1850 1860 1870
PCK1 AGCAAAGAATAAGCCAGATGATAG
unknow AGCAAAGAATAAGCCAGATGATAG
380 390

```

```

10 20 30 40 50 60 PCK1GS CTGGAAAGTCTGTGTTCCAGGGCCCCCTGGGATCCCGGAAATTCCTCCAGTGC AAAAC
unknow CTGGAAAGTCTGTGTTCCAGGGCCCCCTGGGATCCCGGAAATTCCTCCAGTGC AAAAC
450 460 470 480 490 500

490 500 510 520 530 540 PCK1GS CCBCCTGGCTCACCTCTGTCTGAAGATCGGCATCGAGCTGACGGATTCGCCCTACGTGGTG
unknow CCBCCTGGCTCACCTCTGTCTGAAGATCGGCATCGAGCTGACGGATTCGCCCTACGTGGTG
930 940 950 960 970 980

70 80 90 100 110 120 PCK1GS GGCCTGAACCTCTCGCCAAAGTTGTCCAGGAAAGCCCTGGACAGCCTGCCCCAGGCAATG
unknow GGCCTGAACCTCTCGCCAAAGTTGTCCAGGAAAGCCCTGGACAGCCTGCCCCAGGCAATG
510 520 530 540 550 560

550 560 PCK1GS GCCAGCATGCGGATCATGAGG
unknow GCCAGCATGCGGATCATGAGG
990 1000

130 140 150 160 170 180 PCK1GS AGGGAGTTTCTCGAAGATAAACGCTGAGCTGTGTCAAGCTGATCACATCCACATCTGTGAC
unknow AGGGAGTTTCTCGAAGATAAACGCTGAGCTGTGTCAAGCTGATCACATCCACATCTGTGAC
570 580 590 600 610 620

190 200 210 220 230 240 PCK1GS GGCCTGAGGAGGAGAAATGGCCGCTCTGGGCCAGATGGAGGAAGAGGCACTCCACAGG
unknow GGCCTGAGGAGGAGAAATGGCCGCTCTGGGCCAGATGGAGGAAGAGGCACTCCACAGG
630 640 650 660 670 680

250 260 270 280 290 300 PCK1GS CCGCTGAGAAAGTATGACAACTGCTGGTGGCTCTCACTGACCCAGGGATGTGGCCAGG
unknow CCGCTGAGAAAGTATGACAACTGCTGGTGGCTCTCACTGACCCAGGGATGTGGCCAGG
690 700 710 720 730 740

310 320 330 340 350 360 PCK1GS ATCGAAAGCAAGACGGTTATCGTACCCAAAGGCAAAAGACACAGTGC CATCCCAA
unknow ATCGAAAGCAAGACGGTTATCGTACCCAAAGGCAAAAGACACAGTGC CATCCCAA
750 760 770 780 790 800

370 380 390 400 410 420 PCK1GS ACAGGCTCAGCCAGCTCGGTCGCTGGATGTCAGAGGAGGATTTGAGAAAGGTTCAAT
unknow ACAGGCTCAGCCAGCTCGGTCGCTGGATGTCAGAGGAGGATTTGAGAAAGGTTCAAT
810 820 830 840 850 860

430 440 450 460 470 480 PCK1GS GCCAGGTTCCCAAGGTTGCATGAAAGGTCGACCATGTACGTATCCGATTCAGCATGGG
unknow GCCAGGTTCCCAAGGTTGCATGAAAGGTCGACCATGTACGTATCCGATTCAGCATGGG
870 880 890 900 910 920

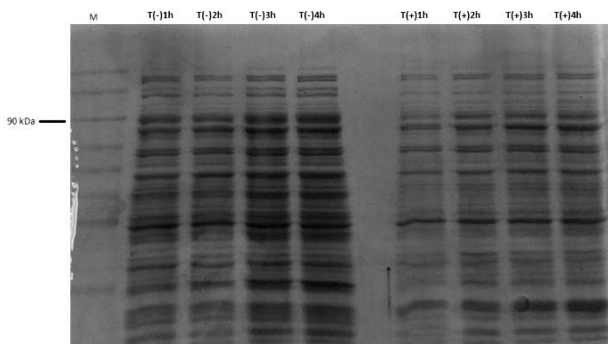
```

Εικόνα 4.3: Το τμήμα DNA προέκυψε από την PCR στάθηκε για αλληλούχιση (unknow). Η αλληλουχία φαίνεται να ταυτίζεται με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου (PCK1).

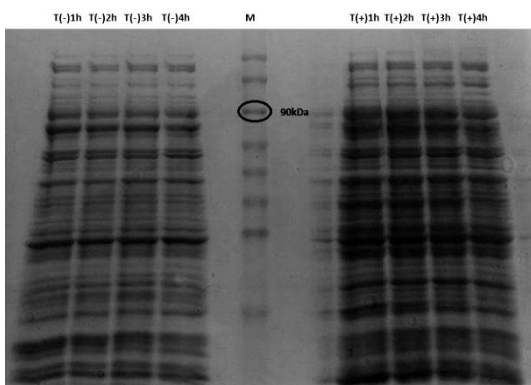
4.2 Μελέτες έκφρασης της κυτοσολικής PEPCK

Μελέτες έκφρασης της cPEPCK στις κυτταρικές σειρές BL21-GOLD, B834 και B834plysS.

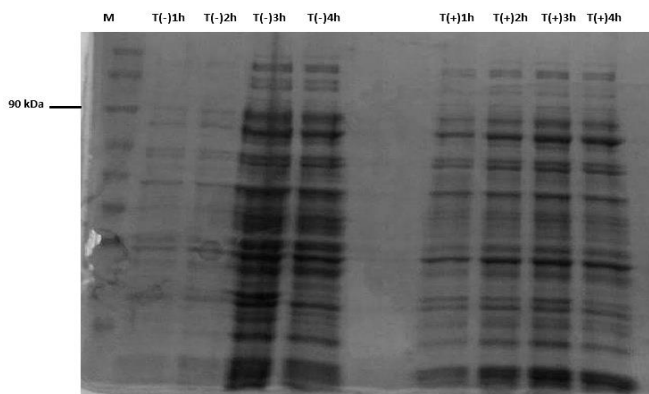
Με σκοπό την απομόνωση της cPEPCK σε μεγάλη κλίμακα έγιναν μελέτες διαφόρων συνθηκών της βακτηριακής καλλιέργειας. Έγινε έλεγχος στις κυτταρικές σειρές BL21-GOLD (DE3), B834(DE3) και B834plysS σύμφωνα με την μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 95kDa μαζί με την ετικετα της S-γλουταθειόνης. Καλλιέργειες των 80ml θρεπτικού μεσου LB Broth (Handmade) επώαστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει $OD_{600nm}=0,5-0,6$ όπου έγινε η προσθήκη του επαγωγέα (IPTG). Δοκιμαστήκαν η συγκεντρώσεις επαγωγέα 0mM και 0,5mM και η θερμοκρασία επώασης ήταν 37°C για 4h όπου παίρναμε δείγμα ανά μία ώρα. Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών στα 5000g, 4°C για 5 λεπτά το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιείχε 50mM HEPES pH=7,5 και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτη πολυακρυλαμιδίου 10% (TOTAL).



Εικόνα 4.4: Ανάλυση σε πηκτη πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της cPEPCK σε βακτήρια E.coli του στελέχους BL21-Gold (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C για τέσσερις ώρες. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, (-) απουσία επαγωγέα, (+) προσθήκη 0,5mM επαγωγέα.

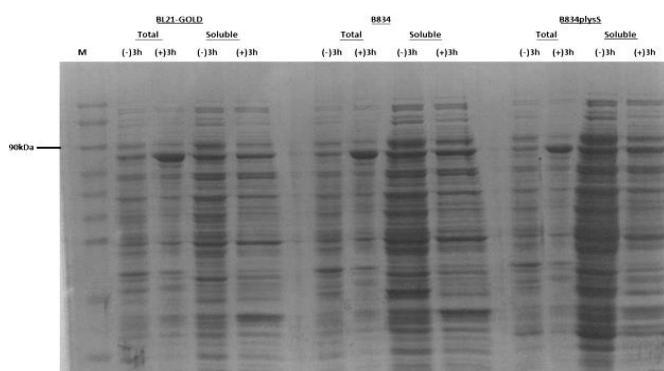


Εικόνα 4.5: Ανάλυση σε πηκτη πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της cPEPCK σε βακτήρια E.coli του στελέχους B834plysS και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°C για τέσσερις ώρες. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, (-) απουσία επαγωγέα, (+) προσθήκη 0,5mM επαγωγέα.



Εικόνα 4.6: Ανάλυση σε πηκτη πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της cPEPCKσε βακτήρια E.coliτου στελέχους B834 (DE3) και επαγωγή της υπερέκφρασης στους 37°Cγια τέσσερις ώρες. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, (-) απουσία επαγωγέα, (+) προσθήκη 0,5mMεπαγωγέα.

Στην συνέχεια τουπόλοιποδείγματος περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 15000g, 4°C για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο αποτελεί το διαλυτό μέρος της καλλιέργειας (SOLUBLE) αλλά και το ίζημα ώστε να αναλυθούν και αυτά σε SDS-PAGE σε σύγκριση με το αδιάλυτο (TOTAL) μέρος της καλλιέργειας στις τρεις ώρες για κάθε κυτταρική σειρά.

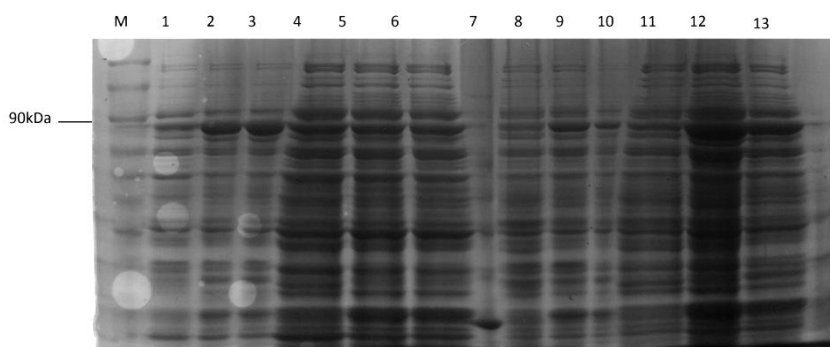


Εικόνα 4.7: Ανάλυση σε πηκτή ακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης cPEPCK απόβακτήρια E.coli, στελέχους B1 21 Gold (DE3), B834 (DE3) και B834rlyssS και επαγωγήτης υπερέκφρασης στους 37°Cόπου συγκρίνεται η έκφραση στο διαλυτό (SOLUBLE) και στο αδιάλυτο κομμάτι (TOTAL) . Στηνκυτταρική σειρά B834rlyssS φαίνεται πως η έκφραση είναι σε μεγαλύτερα επίπεδα, ειδικά στο διαλυτό με 0.5mM IPTG.

Η συνέχεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με την κυτταρική σειρά B834rlyssS. Για τηνεπαγωγή της υπερέκφρασης δοκιμάστηκαν δύο θερμοκρασίες, 37°C και 18°C, και διαφορετικές συγκέντρωσης επαγωγέα, 0mMIPTG 0,5mMIPTGκαι 0,1mMIPTG.

Σε θρεπτικό μέσο LBBroth (Handmade) στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν 1/100 απο μία καλλιέργεια των 10mLπου έχει αναπτυχθεί για 16h. Επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση(210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει OD600nm=0,5-0,6.Στο σημείο αυτό όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη του επαγωγέα IPTG. Η καλλιέργεια διαιρείται σε κωνικές φιάλες (10mLκαλλιέργειας) ανάλογα με την συγκέντρωση επαγωγέα σε 'control' στην οποία δεν προστίθεται επαγωγέας, '0,1' στην οποία προστίθεται επαγωγέας (IPTG) με τελική συγκέντρωση 0,1mMκαι '0,5' στην οποία προστίθεται επαγωγέας (IPTG) με τελική συγκέντρωση 0,5mM. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 37°Cυπο συνεχή ανάδευση (210rpm) για 3h. Μετά το πέρας της

επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών στα 5000g, 4°C για 5 λεπτά το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιείχε 50mM HEPES pH=7,5. Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 3 sec με παραγωγή υπερήχων εύρους 70%. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας από τους υπέρηχους, οι σωλήνες τύπου erpendorf που περιέχουν το δείγμα είναι τοποθετημένοι σε πάγο. Μέρος του δείγματος αφαιρείται μετά τη λύση για να γίνει ανάλυσή του σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) (TOTAL). Το υπόλοιπο δείγμα περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 13000rpm, 4°C για 30 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο (SOLUBLE) ώστε να αναλυθεί σε SDS-PAGE. Ακολουθεί η ίδια πειραματική διαδικασία με τους 37°C με την μόνη διαφορά ότι μετά την επαγωγή ο χρόνος επώασης ανέρχεται στις 16h καθώς η θερμοκρασία αυτή απαιτεί περισσότερο χρόνο για την ανάπτυξη των βακτηρίων. (Εικόνα 4.8)

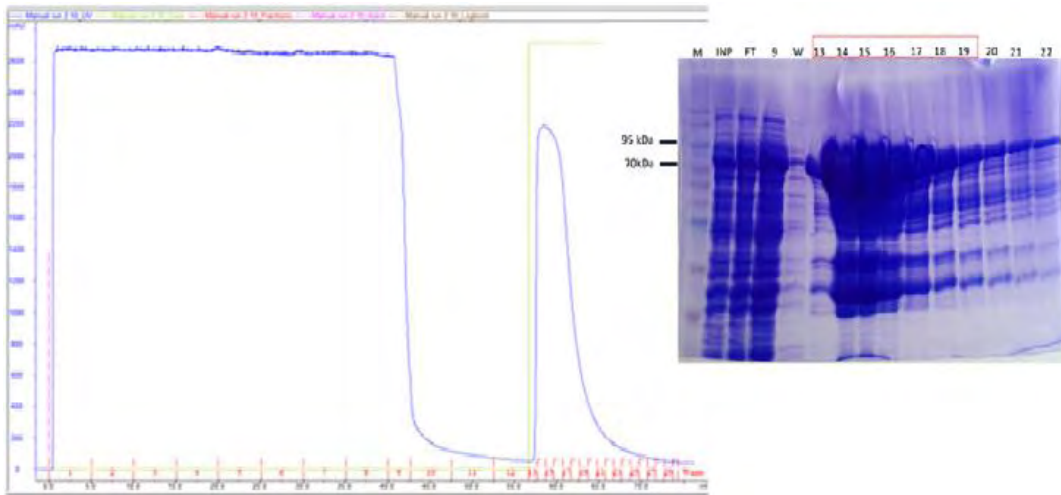


Εικόνα 4.8: Ανάλυση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου του προτύπου έκφρασης της cPEPCK σε βακτήρια *E.coli* του στελέχους B834rlysS και επαγωγή της υπερέκφρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις επαγωγέα. M: μάρτυρας μοριακού βάρους, 1: T(-)37°C, 2: T(0,1mM)37°C, 3: T(0,5mM)37°C, 4: S(-)37°C, 5: S(0,1mM)37°C, 6: S(0,5mM)37°C, 7: κενό, 8: T(-)18°C, 9: T(0,1mM)18°C, 10: T(0,5mM)18°C, 11: S(-)18°C, 12: S(0,1mM)18°C, 13: S(0,5mM)18°C

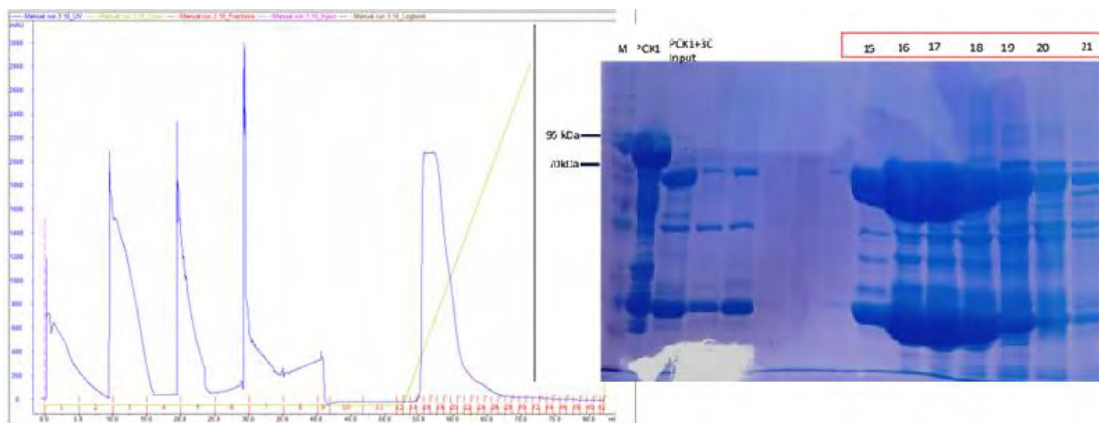
→ Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε σύμφωνα με την ανάλυση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου στην διαλυτή μορφή με συγκέντρωση επαγωγέα 0,1mM και θερμοκρασία επαγωγής τους 18°C.

4.3 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

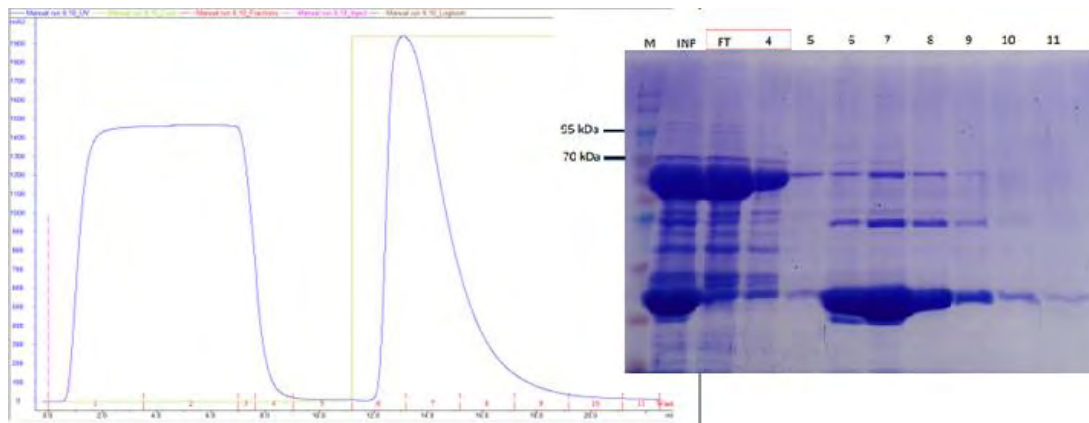
Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.3 παρουσιάζονται παρακάτω:



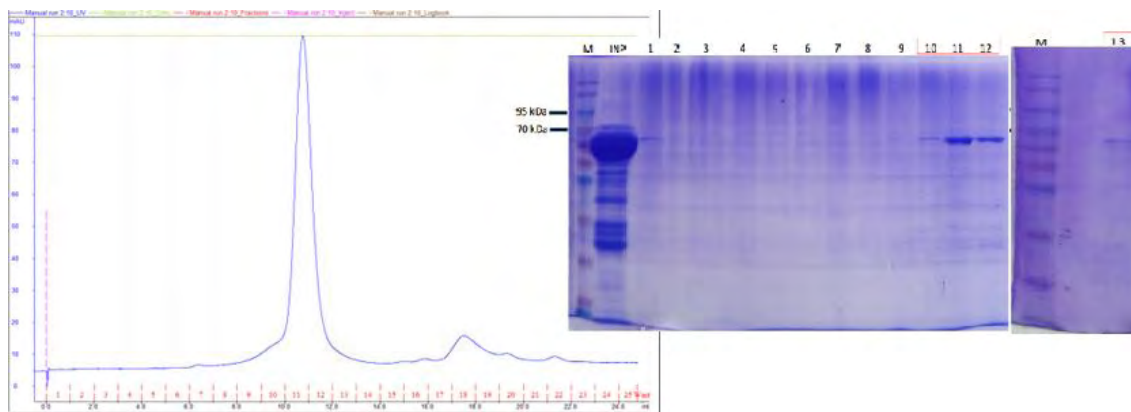
Εικόνα 4.9: Από το χρωματογράφημα του πρώτου σταδίου φαίνεται ότι τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε η PEPCKείναι τα 13,14,15,16,17,18 ΚΑΙ 19. Αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος M: δείκτης μοριακώνμαζών, INP: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash).(GSTSepharose 4B,GEHealthcare)



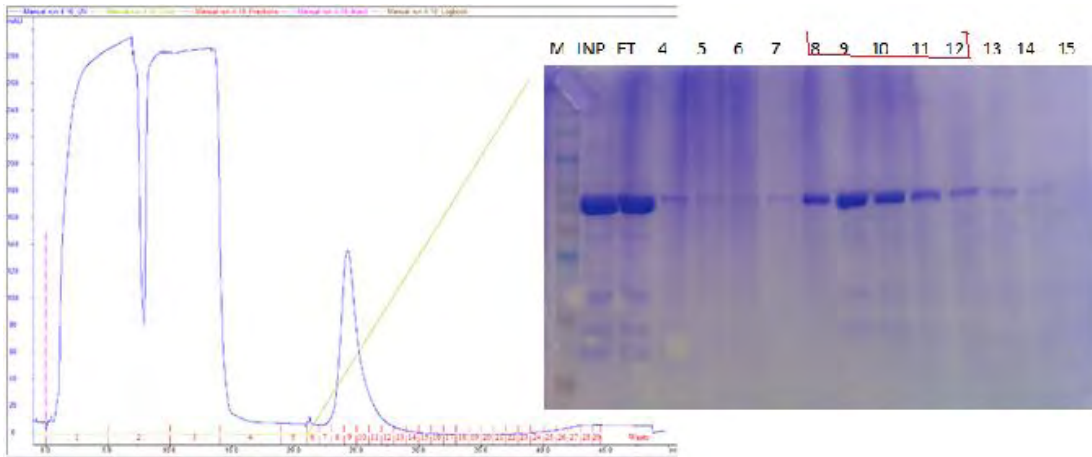
Εικόνα 4.10:Από το χρωματογράφημα του δεύτερου σταδίου φαίνεται ότι εκλούστηκαν πολλά κλάσματα όμως αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η PEPCK εκλούστηκε στα 15,16,17,18,19,20 και 21. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος M: δείκτης μοριακώνμαζών, Input: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη, FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash).(ResourceQ, GEHealthcare)



Εικόνα 4.11: Ο σκοπός της στήλης ήταν ο καθαρισμός της PEPCK από την S-γλουταθειόνης και από την πρωτεάση Rhiponivirus 3C. Το τρίτο σταδιο της απομόνωσης ήταν επιτυχής καθώς η PEPCK δεν προσδέθηκε στη στήλη και βρίσκεται στα κλάσματα 1,2 και 3, δηλαδή στο flow through και στο κλάσμα 4 σύμφωνα με την ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος. M: δείκτης μοριακών μαζών, INP: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through), W: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (wash).(GSTSepharose 4B,GEhealthcare)



Εικόνα 4.12: Ο σκοπός της στήλης είναι ο καθαρισμός της PEPCK λόγω του μεγέθους της. Συμφωνα με το χρωματογράφημα του τέταρτου σταδίου εκλούστηκαν πολλά κλάσματα και γι'αυτό αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ώστε να επιβεβαιωθεί ότι η PEPCK εκλούστηκε στα 10,11,12 και 13. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, M: δείκτης μοριακών μαζών, INP: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη.(Superose 12 10/300GL)

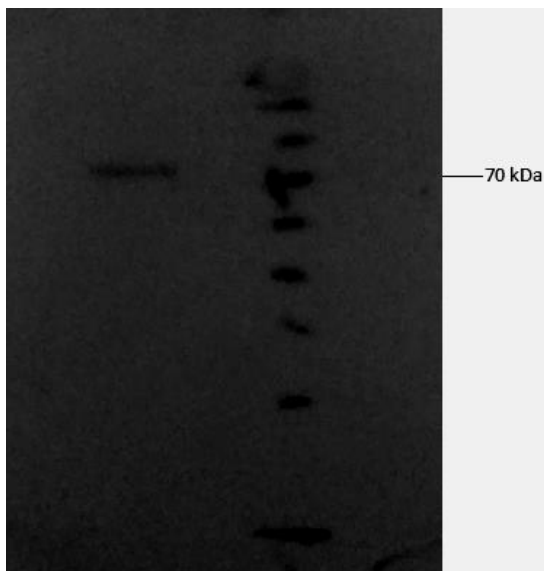


Εικόνα 4.13: Από το χρωματογράφημα φαίνεται ότι τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε η PEPCK είναι τα 8,9,10,11 και 12. Αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος M: δείκτης μοριακών μαζών, INP: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (In put), FT: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (flow through). (Cibacron Blue F3G-A, GE HeathCare).

→ Η τελική συγκέντρωση της PEPCK ανέρχεται στα 8mg/mL.

4.4 Εμφάνιση σήματος με ανοσοανίχνευση κατά Western

Για την επιβεβαίωση της παραγωγής της πρωτεΐνης PEPCK πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του δείγματος μετά το στάδιο της απομόνωσης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στην συνέχεια, έγινε ηλεκτρομεταφορά της πρωτεΐνης της πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε επώαση της με αντισώματα. Η εμφάνιση του σήματος φαίνεται ακολούθως (Εικόνα 4.14).

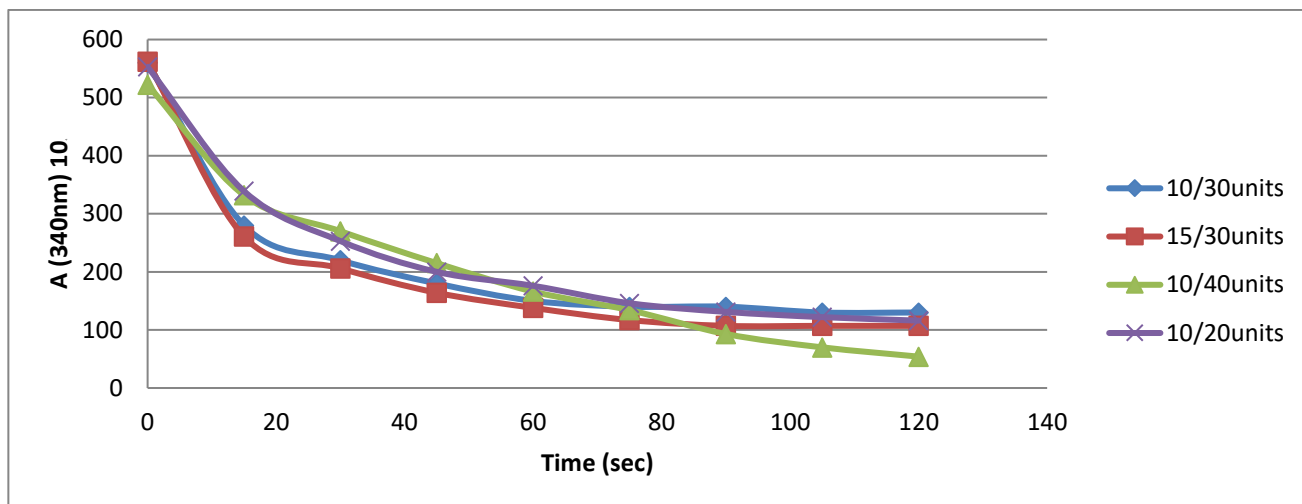


Εικόνα 4.14: Ανοσοανίχνευση κατά Western της κυτοσολικής καρβοξυκινάσης του φωσφοενολπυροσταφυλικού (cPEPCK).

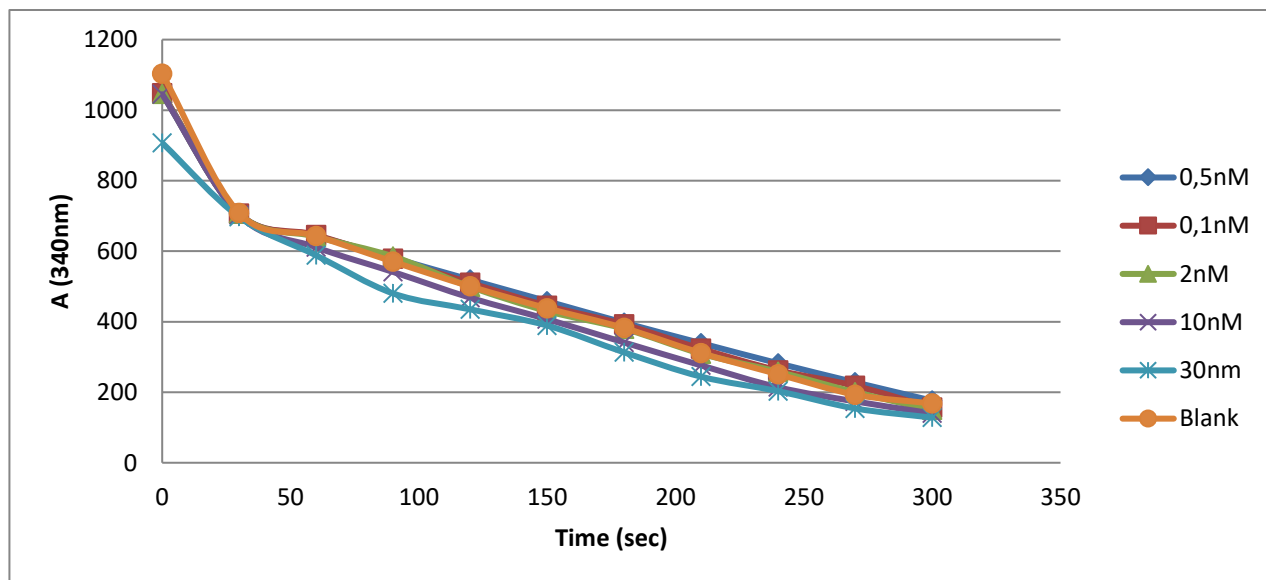
4.5 Κινητικές μελέτες

Αντίδραση Καρβοξυκινάσης του Φωσφοενολοπυροσταφυλικού

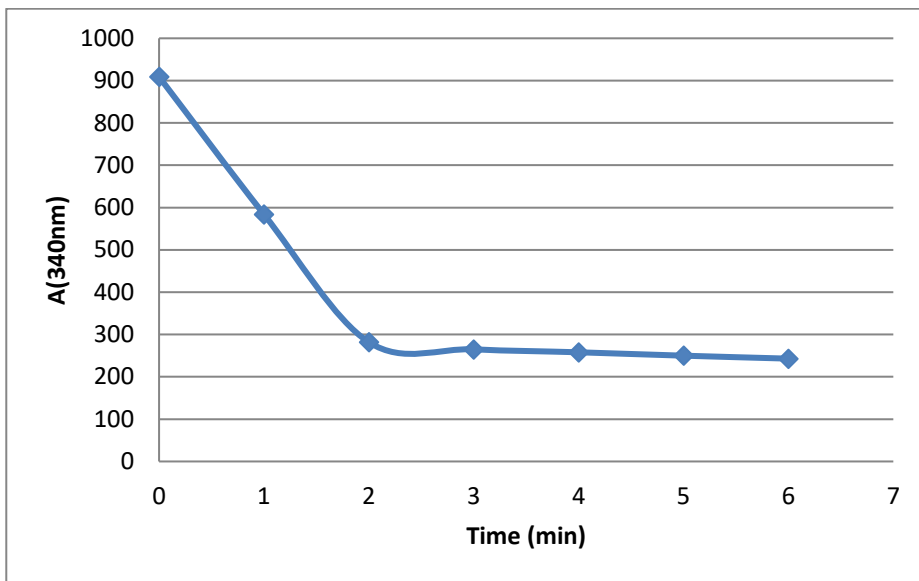
Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 4.15: Έλεγχος των συγκεντρώσεων PK και LDH

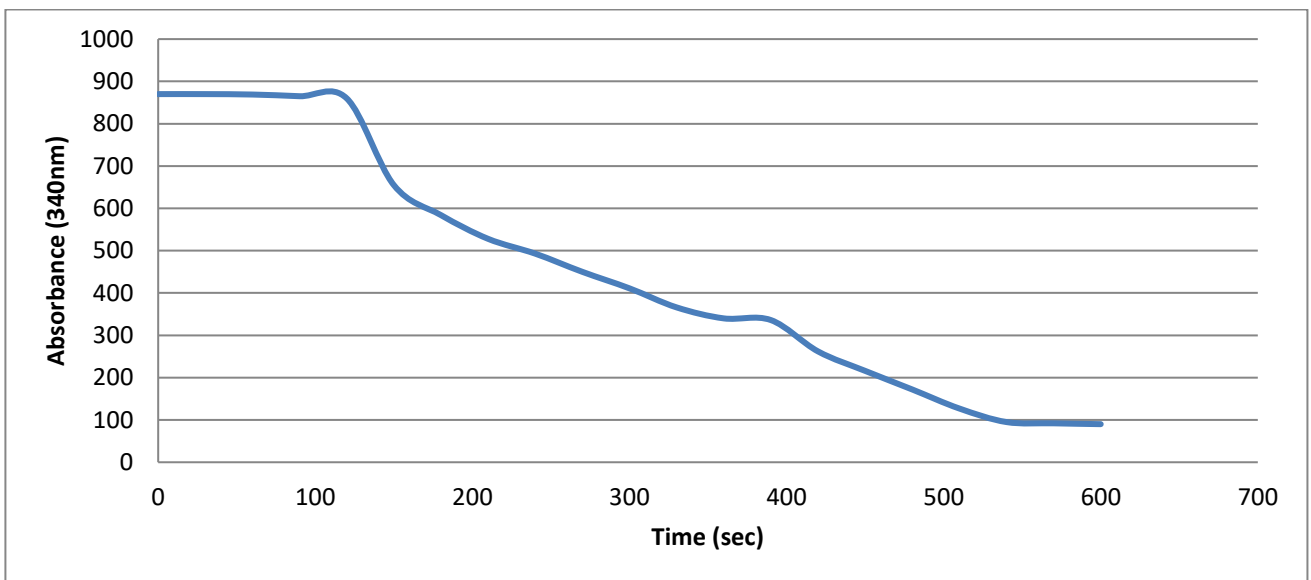


Εικόνα 4.16: Διάγραμμα αντιδρασεων με 0nM, 0,5nM, 1nM, 2nM, 10nM και 30nMPEPCK



Time (min)	A (340nm)
0	909
1	584
2	282
3	265
4	258
5	250
6	243

Εικόνα 4.17: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης του NADH μέσω της δράσης της LDH

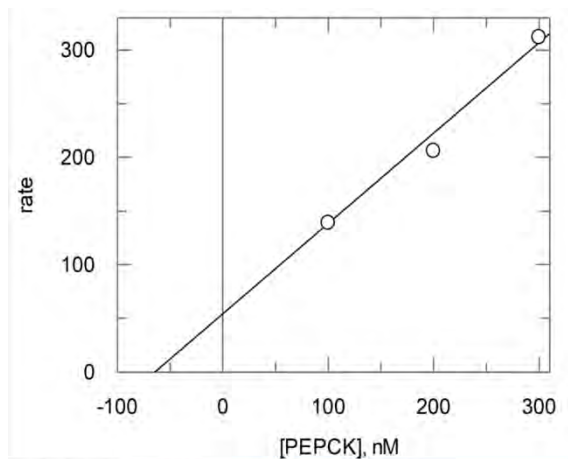


Εικόνα 4.18: Διαγραμματική απεικόνιση της μείωσης του NADH με προσθήκη MnCl₂ και MgCl₂

Η συνέχεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με το kitKinase-Glo® Luminescent της Promega.

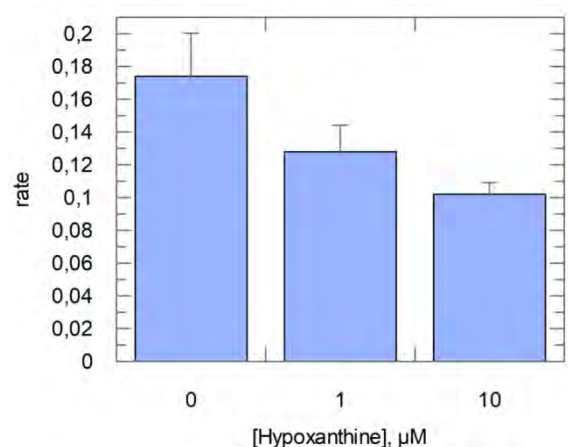
Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.2 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



[PEPCK] nM	Rate ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Error
100	139	8,2
200	206	32,4
300	312	25,5

Εικόνα 4.19: Έλεγχος των βέλτιστων συγκεντρώσεων PEPCK



[Hypoxanthine] μM	Rate ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Error	%activity
0	174	26	100
1	126	16,2	73
10	102	7,2	58

Εικόνα 4.20: Διαγραμματική απεικόνιση της αντίδρασης με 0 μM , 1 μM και 10 μM Υποξανθίνης (200nM PEPCK)

Εκρεμμεί η μελέτη της δράσης της υποξανθίνης στην PK διότι η αναστολή που φαίνεται στην Εικόνα 4.20 μπορεί να οφείλεται επίσης και στην PK.

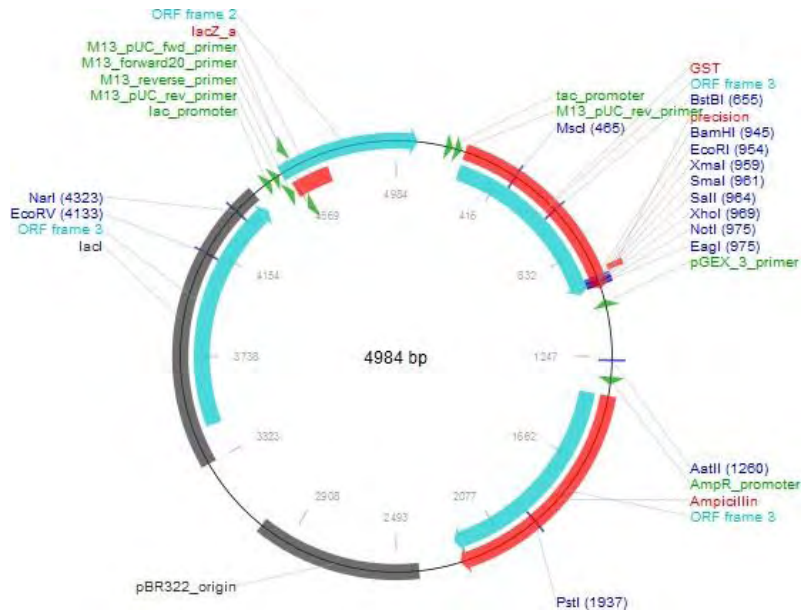
5.Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν κατασκευή φορέα έκφρασης που ονομάστηκε pGEX-6p-1-PCK1 ο οποίος είναι κατάλληλος για την έκφραση γονιδίων σε *E.coli*, μελέτες έκφρασης της PEPCK σε κυτταρικές σειρές και διαφορετικές συνθήκες επαγωγής, συγκέντρωσεις επαγωγέα και θερμοκρασίες, απομόνωση της πρωτεΐνης μέσω υγρής χρωματογραφίας, χρωματογραφία συγγένειας χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και χρωματογραφία μοριακής διήθησης καθώς και ανάπτυξη κινητικού πρωτοκόλλου για την μελέτη πρόσδεσης αναστολέων υψηλής απόδοσης. Η αλληλούχηση επιβεβαίωσε την ένθεση του γονιδίου της PCK1 στον φορέα έκφρασης pGEX-6p-1. Η παραγωγή της PEPCK επιβεβαιώθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε σε μεγάλη ποσότητα και υψηλή καθαρότητα είναι απαραίτητη προϋπόθεση για βιοχημικές και δομικές μελέτες συμβάλλοντας έτσι στην διερεύνηση της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) ως μοριακού στόχου. Σχεδιάστηκαν κινητικά πρωτόκολλα, με σύζευξη με τα ένζυμα PK και LDH και Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform, για την μελέτη πρόσδεσης αναστολέων από τα οποία επιβεβαιώθηκε ότι η PEPCK είναι δραστική ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την ανάπτυξη κινητικού πρωτοκόλλου που θα επιτρέψει την μελέτη αναστολέων υψηλής απόδοσης (high-throughput).

6.Παράρτημα

Χάρτης φορέα pGEX-6p1



7.Βιβλιογραφία

- [1] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, *Biochemistry*, Fifth edition 2013
- [2] Trudy McKee and James R. McKee , *Biochemistry: The Molecular Basis of Life* , Sixth edition, 2015
- [3] Troy A. Johnson and Todd Holyoak, Increasing the conformational entropy of the Ω -loop lid domain in PEPCK impairs catalysis and decreases catalytic fidelity, *Biochemistry*. 2010 Jun 29; 49(25): 5176–5187.
- [4] Troy A. Johnson, Matthew J. Mcleod, and Todd Holyoak, Utilization of Substrate Intrinsic Binding Energy for Conformational Change and Catalytic Function in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, *Biochemistry* 2016,55,3,575-587
- [5] Elmus G. Beale, Brandy J. Harvey and Claude Forest, PCK1 and PCK2 as candidate diabetes and obesity genes, *Cell Biochem Biophys*,2007 48:89–95
- [6] Roy E. Weiss and Samuel Refetoff, *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders*, 2nd edition 2015
- [7] Modaressi S, Brechtel K, Christ B, Jungermann K. Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. Structure, chromosomal localization and tissue-specific expression, *Biochem J*. 1998) 333, 359–366
- [8] R.W. Hanson and L. Reshef, Glyceroneogenesis revisited, *Biochimie* 2003 Dec;85(12):1199-205
- [9] M.M. McGrane, et al., Metabolic effects of developmental, tissue-, and cell-specific expression of a chimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)/bovine growth hormone gene in transgenic mice, *J. Biol. Chem*, 1990 Dec 25;265(36):22371-9
- [10] C.L. Eisenberger, et al., Differential regulation of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in several tissues of transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.* 12, 1992 1396–1403.
- [11] N. Benvenisty, L. Reshef, Developmental expression and modification of genes, *Biology of the Neonate*, 1987;52(2):61-9.
- [12] Jiang, W. Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K. L., Zhao, S. Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase, *Mol. Cell* 43, 2011 Jul 8;43(1):33-44
- [13] Benvenisty, N., Mencher, D., Meyuhas, O., Razin, A., Reshef, L. Sequential Changes in DNA Methylation Patterns of the Rat Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene during Development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1986 Sep 23;25(19):5571-5.
- [14] Hall, R. K., Wang, X. L., George, L., Koch, S. R. & Granner, D. K. Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol. Endocrinol.* 21, 550–563 (2007).

- [15] Balan, M. D., McLeod, M. J., Lotosky, W. R., Ghaly, M. & Holyoak, T. Inhibition and Allosteric Regulation of Monomeric Phosphoenolpyruvate Carboxykinase by 3-Mercaptopicolinic Acid. *Biochemistry*, 2015 Sep 29;54(38):5878-87
- [16] Kioussis D, Reshef L, Cohen H, Tilghman SM, Iynedjian PB, et al., *J. Biol. Chem.* 1978
- [17] J Jaeken, M Detheux, L Van Maldergem, M Foulon, H Carchon, E Van Schaftingen, 3-Phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: an inborn error of serine biosynthesis, *Archives of Disease in Childhood*, Vol. 251, No. 1, Issue of January 10, pp. 37-44, 1976 Printed in U.S.A.
- [18] Elmus G. Beale, Robert E. Hammer, Benedicte Antoine and Claude Forest, Disregulated glyceroneogenesis: PCK1 as a candidate diabetes and obesity gene *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, P129-135, 2004
- [19] Lea Reshef, Yael Olswang, Hanoch Cassuto, Barak Blum, Colleen M. Croniger, Satish C. Kalhan, Shirley M. Tilghman and Richard W. Hanson Glyceroneogenesis and the Triglyceride/Fatty Acid Cycle, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278, 30413-30416, August 15, 2003
- [20] Ballard, F.J. et al, Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J. Biol. Chem*, 1967 Jun 10;242(11):2746-50
- [21] Jianqi Yang, Satish C. Kalhan and Richard W. Hanson What Is the Metabolic Role of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase?, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2009 284(40): 27025–27029
- [22] Colombo G, Carlson GM, Lardy HA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine 5'-triphosphate) from rat liver cytosol. Dual-cation requirement for the carboxylation reaction, *Biochemistry*, 1981 May 12;20(10):2749-57
- [23] Carlson GM, Holyoak T. Structural insights into the mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis, *J Biol Chem*, 2009 Oct 2; 284(40): 27037–27041
- [24] Castillo, D., Sepu Iveda, C., Cardemil, E., and Jabalquinto, A. M. Functional Evaluation of serine 252 of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate kinase, *Biochemie*, 2009, 295-299
- [25] Troy A. Johnson, and Todd Holyoak, The Ω -loop lid domain of phosphoenolpyruvate carboxykinase is essential for catalytic function, *Biochemistry*, 2012 Nov 27; 51(47): 9547–9559.
- [26] Sullivan, S. M., and Holyoak, T. Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008 Sep 16;105(37):13829-34
- [27] Holyoak T., Sullivan S. M., and Nowak, T. Structural insights into the mechanism of PEPCK catalysis, *Biochemistry*, 2006 Jul 11;45(27):8254-63

- [28] Balan, M. D., McLeod, M. J., Lotosky, W. R., Ghaly, M. & Holyoak, T. Inhibition and Allosteric Regulation of Monomeric Phosphoenolpyruvate Carboxykinase by 3-Mercaptopicolinic Acid. *Biochemistry*, 2015
- [29] Jomain-Baum, M., Schramm, V. & Hanson, R, Mechanism of 3-Mercaptopicolinic Acid Inhibition Phosphoenolpyruvate Carboxykinase of Hepatic. *J. Biol. Chem*, 1976
- [30] Kenneth A. Johnson and Roger S. Goody, The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten , 2011, *Biochemistry*, 50(39), 8264-8269. doi:10.1021/bi201284u
- [31] Novagen, Competent cells
- [32] Brown T. A, *Genomes 3*, εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης
- [33] GE Healthcare, GST Gene fusion system Handbook, 2009
- [34] Clontech-. In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual, PT5162-1 (PR133833) April 2011
- [35] EMBL, Cloning R STRATEGY PRIMER DESIGN
- [36] 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 Jun;31(5):366-73.
- [37] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986;51 Pt 1:263-73
- [38] PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up User manual, February 2017 / Rev. 04
- [39] Plasmid DNA purification User manual NucleoSpin® Plasmid NucleoSpin® Plasmid (NoLid) NucleoSpin® Plasmid QuickPure March 2019
- [40] GE Healthcare. Ion Exchange Chromatography Principles and Methods
- [41] Waugh DS. Making the most of affinity tags, *Trends in biotechnology*, 2005 Jun;23(6):316-202005
- [42] Macherey-Nagel, Purification of GST-tagged Proteins User Manual, 2010
- [43] GE Healthcare, Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules
- [44] Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay Platform, PROMEGA
- [45] Weber K, Osborn M, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of biological chemistry*, 1969 Aug 25;244(16):4406-12

[46]Bio-Rad, A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection

[47]Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang, Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, N Am J Med Sci., 2012 Sep; 4(9): 429–434

[48] GE Healthcare Gel filtration Principles and Methods

