



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία:

Παραγωγή της ανθρώπινης πρωτεΐνης Starch
Binding Domain-containing Protein 1
(STBD1)



Production of the human protein Starch
Binding Domain-containing Protein 1
(STBD1)

Θεοδοσίου Ειρήνη
Χριστόδουλου



Λάρισα, 2021

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2. Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3. Λεωνίδας Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Βασιλική Σκαμνάκη

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας

Περιεχόμενα:

I. Περίληψη	5
II. Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1. Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1)	6
1.2. Γλυκογόνο και πρόσδεση με STBD1	6
1.3. Αυτοφαγία	7
1.4. STBD1 και Γλυκοφαγία	8
1.5. Γλυκοφαγία και Σηματοδοτικά Μονοπάτια	8
1.6. STBD1 και Ενδοπλασματικό δίκτυο	10
1.7. STBD1 και Στρες Ενδοπλασματικού Δικτύου	11
1.8. Ρύθμιση STBD1 από Γλυκοκορτικοειδή	12
1.9. STBD1 ως στόχος της AMPK	12
1.10. Δομή της STBD1	12
1.11. Ασθένειες σχετιζόμενες με την STBD1	13
1.12. Σκοπός πειραματικής μελέτης	14
2. Υλικά και Μέθοδοι	14
2.1. Βιοπληροφορική - Βάσεις δεδομένων και ηλεκτρονικά εργαλεία	14
2.1.1. ProtParam tool - ExPASy	14
2.1.2. iTasser (<i>Iterative Threading ASSEMBLY Refinement</i>)	14
2.2. Μοριακές Μεθοδολογίες	15
2.2.1. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών	15
2.2.2. Κατασκευή πλασμιδίων και πλασμιδιακοί χάρτες	16
2.2.2.1. pGEX-6P-1	16
2.2.2.2. pETM-11	17
2.2.2.3. pET-28a	17
2.2.3. Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA	17
2.2.4. Πέψη πλασμιδίων και σύνδεση με γονίδιο στόχο	18
2.2.5. Αλληλούχιση των υποκλωνοποιημένων pET-28a και pETM-11	19
2.3. Ετερόλογη Έκφραση	19
2.3.1. XL1-Blue	19
2.3.2. DH5α	20
2.3.3. BL21(DE3)	20
2.3.4. B834(DE3)pLysS	20
2.3.5. Lemo21(DE3)	20
2.4. Παραγωγή Πρωτεΐνης	21
2.4.1. Θρεπτικά Μέσα	21
2.4.2. Stock γλυκερόλης	21
2.4.3. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα BL21 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG	21
2.4.4. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG	22
2.4.5. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα Lemo21 και σε 0,5mM IPTG	22
2.5. Large Scale Test	23
2.5.1. Large Scale Test σε κύτταρα BL21	23
2.5.2. Large Scale Test σε κύτταρα B834pLysS	23
2.6. Αναλυτικές Βιοχημικές Μέθοδοι	24
2.6.1. Μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών (SDS-PAGE)	24

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Αγαρόζης.....	25
2.6.3. pH Solubility Screen: Δοκιμές διαφορετικών pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης	25
2.6.4. Λύση Κυττάρων με Sonication και ρυθμιστικά διαλύματα λύσης.....	26
2.6.5. Bradford Assay	26
2.6.6. Western Blot	27
2.7. Παρασκευαστικές μέθοδοι	28
2.7.1. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη GST.....	28
2.7.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Cation).....	29
3. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα	30
3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση	30
3.2. Subcloning.....	31
3.3. Πέψη πλασμιδίων και σύνδεση με γονίδιο στόχο.....	31
3.4. Αλληλούχηση των υποκλωνοποιημένων <i>pET-28a</i> και <i>pETM-11</i>	33
3.5. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα BL21 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG.....	34
3.6. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG.....	36
3.7. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα Lemo21	37
3.8. Large Scale Test σε κύτταρα BL21 και καθαρισμός STBD1 με χρωματογραφία συγγένειας.....	38
3.9. Large Scale Test σε κύτταρα B834pLysS και καθαρισμός STBD1 με χρωματογραφία συγγένειας.....	39
3.10. Δοκιμασία διαλυτότητας πρωτεΐνης σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης με διαφορετικά pH.....	41
3.11. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης	42
3.12. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής	45
3.13. Western Blot.....	46
4. Συζήτηση.....	48
5. Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	49

I. Περίληψη

Την τελευταία εικοσαετία, η πρωτεΐνη Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1) αποτελεί αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί μερικοί από τους πιθανούς ρόλους της που αφορούν την μεταφορά του γλυκογόνου στα λυσοσώματα για καταβολισμό από το λυσοσωμικό ένζυμο GAA και την αγκυροβόληση του γλυκογόνου στις μεμβράνες του Ενδοπλασματικού Δικτύου (ER). Στην παρούσα μελέτη γίνεται μια προσπάθεια ετερόλογης έκφρασης και παραγωγής της ανθρώπινης πρωτεΐνης STBD1 με την χρήση διαφορετικών βακτηριακών στελεχών *E.coli*. Για βελτιστοποίηση της παραγωγής της STBD1 στο διαλυτό μέρος έγινε προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων IPTG, επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες και κατασκευάστηκαν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης με διαφορετικά pH. Με βάση τα αποτελέσματα, οι καλύτερες συνθήκες παραγωγής της πρωτεΐνης STBD1 είναι με προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε συγκέντρωση 0.5mM και σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης pH 8,5 που περιέχει 50mM Tris. Επίσης εκτός από το πλασμίδιο *pGEX-6P-1* χρησιμοποιήθηκαν και άλλα 2 υποκλωνοποιημένα πλασμίδια, το *pETM-11* και το *pET-28a*.



II. Abstract

For twenty years now, research has been conducted on a newly identified protein called Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1). So far, some of its possible roles that have been described is the transport of glycogen to lysosomes for catabolism by the lysosomal enzyme GAA and the anchoring of glycogen to the Endoplasmic reticulum (ER) membrane. The primary and secondary structure of STBD1 have also been extensively studied. In the present study, an attempt was made to heterologously express and produce human protein STBD1 using different *E. coli* bacterial strains. To optimize the production of STBD1 in the soluble part, different concentrations of IPTG were added, incubated at different temperatures and different lysis buffers were made with different pH. Based on the results, higher amounts of STBD1 protein were produced by adding 0.5 mM IPTG and in a lysis buffer containing 50mM Tris, pH 8.5. In addition, except from the plasmid *pGEX-6P-1*, 2 other subcloned plasmids, *pETM-11* and *pET-28a*, were used.

1. Εισαγωγή

1.1. *Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1)*

Τα τελευταία 20 χρόνια η επιστημονική κοινότητα ασχολήθηκε με την μελέτη μιας πρωτεΐνης που προσδένει υδατάνθρακες και η οποία ονομάστηκε Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1). Είναι σημαντική η επίλυση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης αυτής με στόχο την διερεύνηση του ρόλου και την κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας της στο κύτταρο.

Η αρχική αναφορά για το γονίδιο το οποίο εκφράζει την ανθρώπινη πρωτεΐνη STBD1 έγινε από τους Bouju *et al.* (1998) και ονομάστηκε GENX-3414. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 4 και πιο συγκεκριμένα στη θέση q24-q25 και αποτελείται από 2 ιντρόνια και 1 εξόνιο. Μετά από αναλύσεις μεταγραφής (Bouju *et al.*, 1998) φάνηκε ότι το γονίδιο GENX-3414 παράγει ένα μεταγράφημα μήκους 2,4kb, το οποίο έχει υψηλή έκφραση στους σκελετικούς και καρδιακούς μυς αλλά και στο ήπαρ. Το mRNA αυτό περιέχει ένα μοναδικό ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο (Open Reading Frame-ORF) 1074bp που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 358 αμινοξέων με μοριακό βάρος (Mr) ίσο με 39007 Da.

Η πρωτεΐνη η οποία παράγεται από το γονίδιο GENX-3414 ονομάστηκε αρχικά Genethonin από τον Janecsek S. (2002) μετά από αναλύσεις βιοπληροφορικής. Σε επόμενες μελέτες (Jiang *et al.*, 2010, Stapleton *et al.*, 2010) η πρωτεΐνη Genethonin μετονομάστηκε σε Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1). Οι αρχικές αναφορές για την λειτουργία της STBD1 (Jiang *et al.*, 2010, Jiang *et al.*, 2011) αφορούσαν την πρόσδεση της με το γλυκογόνο και τη μεταφορά του στην οδό γλυκοφαγίας, όμως στη συνέχεια αναφέρθηκαν και άλλοι ρόλοι που σχετίζονται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (Lytridou *et al.* 2020).

1.2. *Γλυκογόνο και πρόσδεση με STBD1*

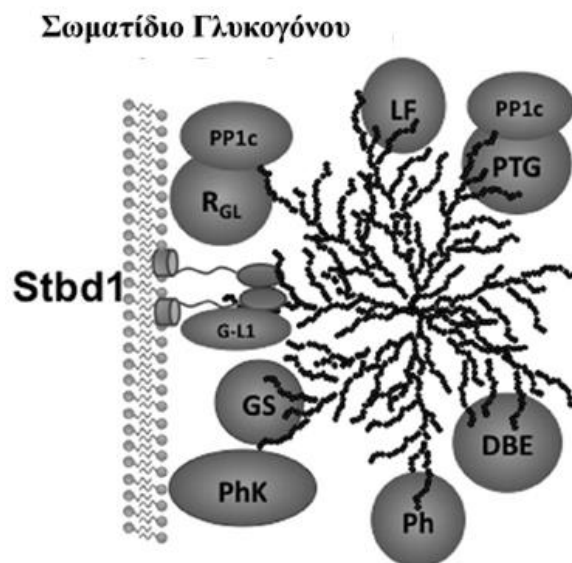
Το γλυκογόνο αποτελεί ένα από τα βασικότερα αποθηκευτικά πολυμερή της γλυκόζης καθώς υπάρχει σε όλα τα κύτταρα. Στα θηλαστικά, τα κύρια αποθέματα γλυκογόνου βρίσκονται στους σκελετικούς μυϊκούς ιστούς και στο ήπαρ. Το γλυκογόνο που βρίσκεται αποθηκευμένο στους σκελετικούς μυς, μέσω καταβολισμού, παρέχει γλυκόζη για την κάλυψη άμεσων ενεργειακών αναγκών που σχετίζονται με την κίνηση. Στο ήπαρ, το γλυκογόνο ενσωματώνει περίσσεια γλυκόζης, διατηρώντας τα επίπεδα γλυκόζης σταθερά στο αίμα (Stapleton *et al.*, 2010).

Το γλυκογόνο χαρακτηρίζεται ως ένα διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης στο οποίο τα κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4 και για περίπου κάθε 10 κατάλοιπα γλυκόζης δημιουργούνται διακλάδωσης μέσω γλυκοζιτικών δεσμών α -1,6 (Adeva-Andany *et al.*, 2016). Υπάρχουν 2 κύριες δομές του γλυκογόνου που ονομάζονται α - και β -σωματίδια (particles). Τα α -σωματίδια είναι τα μεγαλύτερα από τις δύο δομές, βρίσκονται κυρίως στο ήπαρ και προκύπτουν από τη σύνδεση αρκετών μικρότερων β -σωματιδίων. Το γλυκογόνο αποθηκεύεται ως β -σωματίδια κυρίως στους μυς και σε άλλους ιστούς, όπως στον εγκέφαλο. Ένα β -σωματίδιο αντιστοιχεί σε μία μόνο μονάδα γλυκογόνου (Lytridou *et al.*, 2020).

Τα σωματίδια γλυκογόνου (glycogen particles) προκύπτουν από την ικανότητα σύνδεσης πρωτεϊνών με το γλυκογόνο, μερικές φορές μεταξύ τους, και μερικές φορές σε μεμβράνες (Jiang *et al.*, 2010). Οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου αλληλεπιδρούν με το σωματίδιο γλυκογόνου για να σχηματίσουν ένα δυναμικό σύμπλεγμα υδατανθράκων/πρωτεϊνών (Εικόνα 1). Κάποιες από τις πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην σύνθεση του γλυκογόνου είναι η γλυκογενίνη (GN), η συνθάση του γλυκογόνου (GS) και το ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων (GBE ή BE). Από την άλλη, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου και η απελευθέρωση μορίων γλυκόζης γίνεται από την συντονισμένη δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP ή Ph) και του ενζύμου διάσπασης διακλαδώσεων (GDE

ή DBE) (Stapleton *et al.*, 2010). Μια πιο πρόσφατα αναγνωρισμένη πρωτεΐνη που σχετίζεται με γλυκογόνο είναι η Λαφορίνη (Laforin), η οποία είναι μια φωσφατάση του γλυκογόνου που εμπλέκεται στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του γλυκογόνου.

Το γλυκογόνο έχει βρεθεί να καταβολίζεται σε 3 διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου. Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα κυρίως στο κυτταρόπλασμα, με την δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και την παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης. Επίσης, το γλυκογόνο εντοπίστηκε σε μεμβρανώδεις δομές όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) στο ήπαρ ή το σαρκοπλασματικό δίκτυο στους μύες λόγω της γεινίαςσης του γλυκογόνου στις δομές αυτές. Τέλος στα λυσοσώματα, μεταφέρεται για διάσπαση ένα μικρό ποσοστό του γλυκογόνου, διαδικασία η οποία συμπεριλαμβάνει ένα ειδικό αυτοφαγικό μονοπάτι και ονομάζεται γλυκοφαγία. Η STBD1 θεωρείται ο υποδοχέας και ο μεταφορέας του γλυκογόνου στα λυσοσώματα και γι' αυτό πιστεύεται ότι είναι μια σημαντική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Στα λυσοσώματα το γλυκογόνο καταβολίζεται απευθείας σε ελεύθερη α-γλυκόζη μέσω της λυσοσωμικής α-γλυκοσιδάσης (GAA) (Jiang *et al.*, 2010). Η GAA συντίθεται στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (rER), το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά του ενζύμου μέσω του συμπλέγματος Golgi στα λυσοσώματα όπου και δρα (Zhao *et al.*, 2018).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση ενός σωματιδίου γλυκογόνου. Στην εικόνα παρουσιάζεται το γλυκογόνο συνδεδεμένο μαζί με τα ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του όπως η κινάση της φωσφορυλάσης (PhK), η πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 1 (PP1) και η λαφορίνη (LF). Επίσης εμφανίζεται η STBD1, η οποία αγκυροβολεί το γλυκογόνο σε μια ενδοκυτταρική μεμβράνη και η ίδια αλληλεπιδρά με την GABARAPL1 (G-L1) (Jiang *et al.*, 2010).

1.3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μια πολύ συντηρημένη διαδικασία αυτοπέψης, κατά την οποία αποικοδομούνται οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που έχουν λάθος διαμόρφωση, τα κατεστραμμένα οργανίδια, οι παθογόνοι οργανισμοί και το περιττό κυτταρόπλασμα. Η διαδικασία αυτή σχετίζεται με ένα μεγάλο αριθμό άλλων λειτουργιών όπως η μεταβολική ρύθμιση, η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση και η κινητοποίηση διαφόρων κυτταρικών ενεργειακών αποθεμάτων, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των ανόργανων συστατικών όταν υπάρχει έλλειψη θρεπτικών συστατικών (Zhao *et al.*, 2018).

Γενικά, η αυτοφαγία περιγράφει ένα σύνολο διαδικασιών που αφορά την μεταφορά των κυτταρικών συστατικών στα λυσοσώματα για ανακύκλωση. Μέχρι τώρα, έχουν αναγνωρισθεί πολλά είδη επιλεκτικής αυτοφαγίας, συμπεριλαμβανομένης της γλυκοφαγίας, της λιποφαγίας και άλλα. Μια μεγαλύτερη κατηγορία της αυτοφαγίας είναι η μακροαυτοφαγία, στην οποία τα

κυτταροπλασματικά υλικά κατακλύζονται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα σε δομές που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα που τελικά μεταφέρονται και συγχωνεύονται στο λυσοσώμα. Τα λυσοσώματα περιέχουν διάφορες υδρολάσες που εξυπηρετούν το σκοπό των υποκυτταρικών αυτών δομών στην αποικοδόμηση κυτταρικών συστατικών. Δυο πρωτεΐνες που έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας είναι οι Atg1 & Atg13 (Jiang *et al.*, 2010).

1.4. STBD1 και Γλυκοφαγία

Η γλυκοφαγία αποτελεί μια ειδική αυτοφαγία που αφορά το γλυκογόνο και έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του κυτταρικού γλυκογόνου μέσα σε αυτοφαγοσώματα. Ο βασικός ρόλος που παίζει η διαδικασία της γλυκοφαγίας είναι στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης υπό συνθήκες ζήτησης για απόδοση γλυκόζης σε ιστούς όπως στην καρδιά και το ήπαρ (Zhao *et al.*, 2018).

Οι πρώτες αναφορές για τον ρόλο της STBD1 (Jiang *et al.*, 2010, Stapleton *et al.*, 2010) αφορούσαν την πρόσδεση της με το γλυκογόνο, καθώς συνεντοπίστηκε με τις υπόλοιπες μεταβολικές πρωτεΐνες του γλυκογόνου όπως η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), η συνθάση του γλυκογόνου (GS), το ένζυμο διάσπασης διακλαδώσεων (DBE) και η γλυκογενίνη (GN). Παρατηρήθηκε επίσης ότι η STBD1 σχετίζεται με το μεταβολισμό του γλυκογόνου, μέσω της σύνδεσης και αγκυροβόλησης του σε μεμβράνες. Με τον τρόπο αυτό η STBD1 φαίνεται να επηρεάζει τόσο την θέση του γλυκογόνου εσωτερικά του κυττάρου όσο και την ενδοκυτταρική μετακίνηση του γλυκογόνου στα λυσοσώματα (Jiang *et al.*, 2010).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η STBD1 αλληλεπιδρά με μια γνωστή πρωτεΐνη αυτοφαγίας, την GABARAPL1 (GABA_A receptor-associated protein like 1), που αποτελεί μέλος της οικογένειας Atg8 (Autophagy-related protein 8). Οι πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια Atg8 είναι πρωτεΐνες Ubl (ubiquitin-like) που παίζουν ουσιαστικό ρόλο στη δημιουργία των αυτοφαγοσωμάτων (Slobodkin *et al.*, 2013). Στην αλληλουχία αμινοξέων της STBD1 έχει βρεθεί ένα μοτίβο αλληλεπίδρασης Atg8 που ονομάζεται AIM (Atg8 interacting motif), το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνδεση της STBD1 με την αυτοφαγική πρωτεΐνη GABARAPL1 (Jiang *et al.*, 2011, Zhu *et al.*, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η STBD1 έχει χαρακτηριστεί ως μια πρωτεΐνη που προσδένει το γλυκογόνο και το μεταφέρει στα λυσοσώματα (Εικόνα 2), μια αυτοφαγική διαδικασία που ονομάζεται γλυκοφαγία (Jiang *et al.*, 2011). Παρόλο που η STBD1 σχετίζεται με την μεταφορά του γλυκογόνου στα λυσοσώματα, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή δεν εμπλέκεται στη διακίνηση του γλυκογόνου στους σκελετικούς μύες (Yi *et al.*, 2013). Σε επόμενη μελέτη όμως (Sun *et al.*, 2016), βρέθηκε ότι η STBD1 παίζει κυρίαρχο ρόλο στη μεταφορά του γλυκογόνου στα ηπατικά λυσοσώματα.

1.5. Γλυκοφαγία και Σηματοδοτικά Μονοπάτια

Η STBD1 έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί το μονοπάτι της γλυκοφαγίας καθώς, όπως αναφέρθηκε και πριν, η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να προσδεθεί με το γλυκογόνο και μαζί με την πρωτεΐνη GABARAPL1 το μεταφέρουν κοντά στα λυσοσώματα για καταβολισμό (Jiang *et al.*, 2011). Η οδός της γλυκοφαγίας ρυθμίζεται από 3 μεταγωγικά μονοπάτια: 1) cAMP/PKA μονοπάτι, 2) PI3K-Akt/PKB-mTOR μονοπάτι και 3) από τα επίπεδα Ca²⁺ (Zhao *et al.*, 2018).

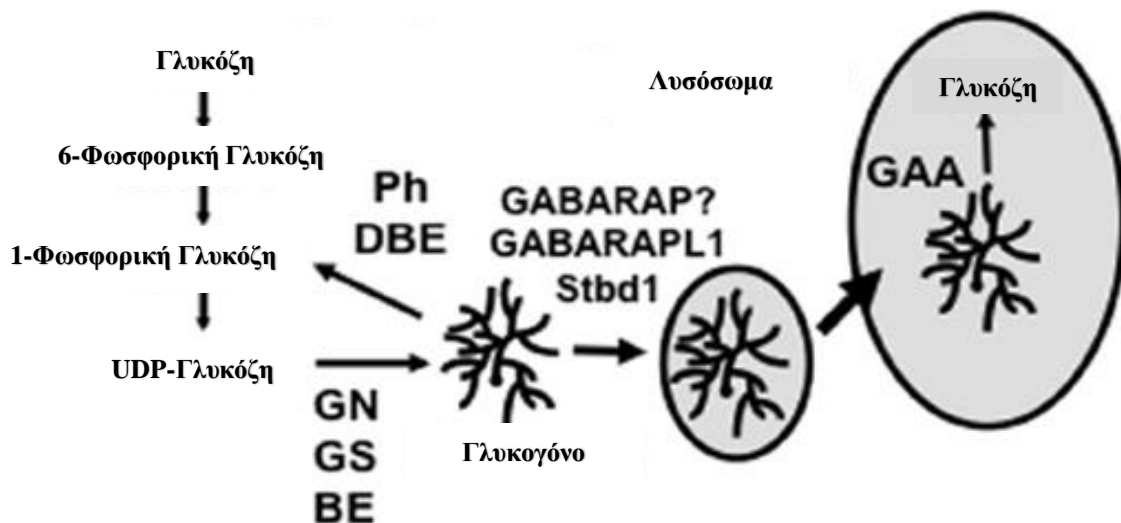
Η γλυκοφαγία ρυθμίζεται κυρίως από την οδό σήματος κυκλικής AMP (cyclic Adenosine Monophosphate-cAMP)/πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) (Εικόνα 3). Η cAMP αυξάνει το σχηματισμό αυτοφαγοσωμάτων και διευκολύνει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου μέσα σε αυτά. Σε καταστάσεις υπογλυκαιμίας αυξάνεται η δράση της ορμόνης γλυκαγόνης, η οποία συνδέεται στον GPCR υποδοχέα της και έτσι αυξάνεται η παραγωγή της cAMP μέσω της ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης. Η cAMP στη συνέχεια ενεργοποιεί την PKA που ενεργοποιεί πρωτεΐνες όπως η κινάση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (PhK) και την πρωτεϊνική φωσφατάση PP2A. Η PP2A όπως και η PhK επάγουν την σύνθεση και

ενεργοποίηση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, που διασπά το γλυκογόνο σε γλυκόζη (Berg *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2018).

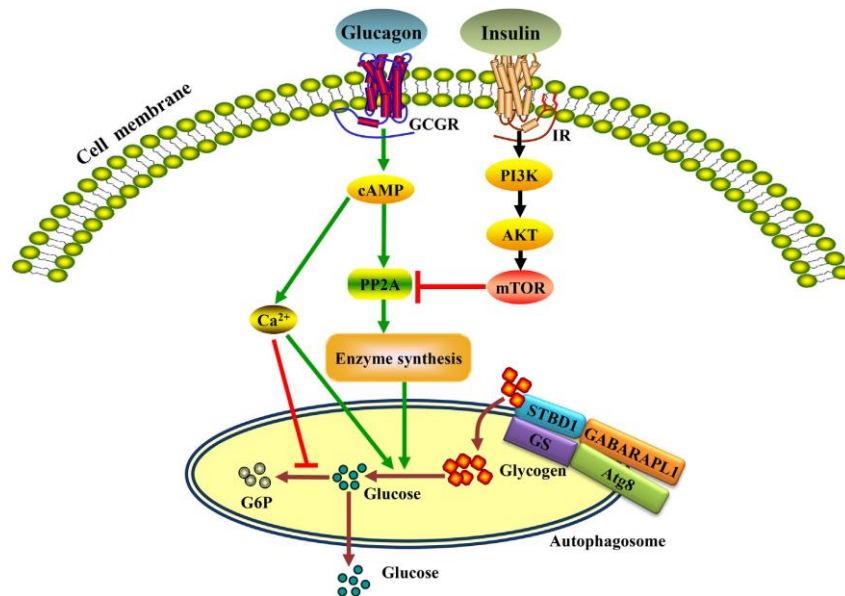
Επίσης μια άλλη οδός σήματος που ρυθμίζει την γλυκοφαγία είναι αυτή της PI3K-Akt/PKB-mTOR. Η σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της που έχει δράση κινάσης Tyr, ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K (Phosphoinoside-3-Kinase) / PKB (Protein Kinase B ή Akt) το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί την mTOR (mechanistic target of rapamycin). Η mTOR εμπλέκεται στην αυτοφαγία όπως και στο μονοπάτι των MAP κινασών, το οποίο ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (PP2A). Η ενεργοποίηση της mTOR προκαλεί την αναστολή της PP2A και επομένως αναστέλλει την οδό της γλυκοφαγίας.

Ένα ακόμα μονοπάτι ρύθμισης της γλυκοφαγίας είναι αυτό του ασβεστίου στα λυσοσώματα. Μια ακόμη λειτουργία της cAMP είναι ότι μπορεί να τροποποιήσει την δραστηριότητα των αντλιών ασβεστίου και να ανοίξει κανάλια ασβεστίου που βρίσκονται στην μεμβράνη του λυσοσώματος, αυξάνοντας έτσι την είσοδο του ασβεστίου στο λυσόσωμα. Τα αυξημένα επίπεδα ασβεστίου μέσα στο λυσόσωμα αναστέλλουν την παραγωγή της 6-φωσφορική γλυκόζης αλλά ταυτόχρονα ενεργοποιούν την GAA για παραγωγή ελεύθερης α-γλυκόζης.

Μεταβολικό Μονοπάτι Γλυκογόνου



Εικόνα 2. Μοντέλο συμμετοχής της *STBD1* στο μεταβολισμό του γλυκογόνου. Στο σχήμα εμφανίζεται η κυτταροπλασματική οδός σύνθεσης του γλυκογόνου από την γλυκόζη μέσω της 6-φωσφορικής γλυκόζης, της 1-φωσφορικής γλυκόζης και της UDP-γλυκόζης. Η οδός αυτή μεσολαβεί από την γλυκογενίνη (*GN*), την συνθάση του γλυκογόνου (*GS*) και το ένζυμο διακλάδωσης (*BE*). Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου για παραγωγή 1-φωσφορικής γλυκόζης, καταλύεται από φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Ph*) και το ένζυμο διάσπασης διακλαδώσεων (*DBE*). Η δεύτερη οδός διάσπασης του γλυκογόνου περιλαμβάνει την μεταφορά του σε λυσοσώματα όπου υδρολύεται σε γλυκόζη μέσω της δράσης της λυσοσωμικής α-γλυκοσιδάσης (*GAA*). Ο ρόλος της *STBD1* στην λυσοσωμική διάσπαση του γλυκογόνου είναι η μεταφορά κυστιδίων γλυκογόνου στα λυσοσώματα, μεσολαβούμενη επίσης από την αλληλεπίδρασή της με την *GABARAB1* (ή ίσως το *GABARAP*) (Jiang *et al.*, 2010).

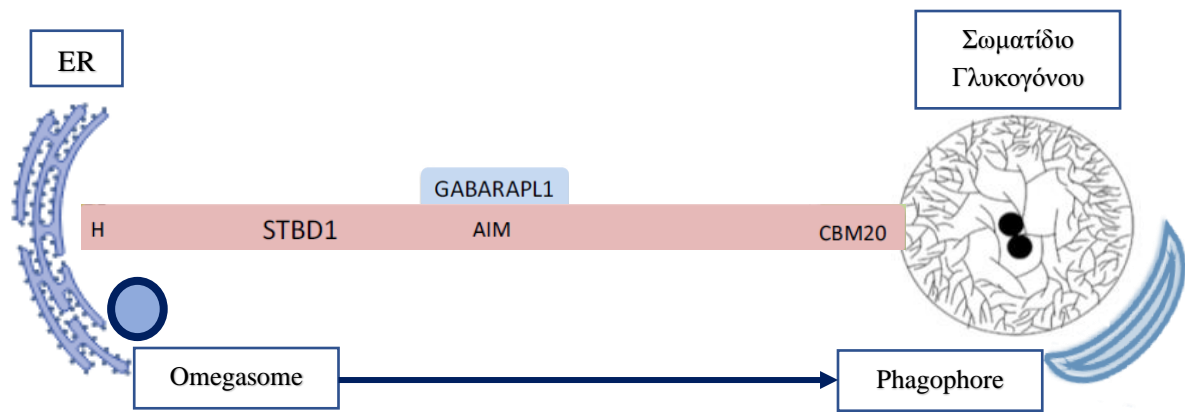


Εικόνα 3. Μηχανισμός ρύθμισης της γλυκοφαγίας μέσω της οδού σήματος cAMP/PKA, PI3K/Akt/mTOR και ασβεστίου. Φαίνονται περιληπτικά οι πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στα 3 μονοπάτια ρύθμισης της γλυκοφαγίας και τα αναρτημένα ορμονικά σήματα που τα πυροδοτούν. Akt=Πρωτεϊνική κινάση B, Atg8=Autophagy-related protein 8, cAMP=κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, GABARAPL1=GABA_A receptor-associated protein like 1, GPCR=Υποδοχέας γλυκαγόνης, GS=Glycogen Synthase, G6P=6-φωσφορική γλυκόζη, IR=Υποδοχέας Ινσουλίνης, mTOR=mechanistic Target of Rapamycin, PI3K=κινάση φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, PP2A=πρωτεϊνική φωσφατάση 2A, STBD1=Starch Binding Domain-containing Protein 1 (Zhao *et al.*, 2018).

1.6. STBD1 και Ενδοπλασματικό δίκτυο

Στα αρχικά στάδια της λυσοσωμικής διάσπασης του γλυκογόνου από την λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση (GAA), τα σωματίδια γλυκογόνου συνδέονται με μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Πιο συγκεκριμένα εικάζεται ότι (Mandl *et al.*, 2018) τα σωματίδια γλυκογόνου μπορούν να προσδεθούν με δομές που ονομάζονται phagophores και οι οποίες σχηματίζουν τα αυτοφαγισώματα. Τα phagophores ίσως να σχηματίζονται από τα omegasomes που αποτελούν μέρος της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι, τρία οργανίδια, το ενδοπλασματικό δίκτυο, το phagophore και το σωματίδιο γλυκογόνου αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και συμμετέχουν στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Ανάμεσα στα πιο πάνω οργανίδια, η πρωτεΐνη STBD1 έχει σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση σωματιδίων γλυκογόνου στο ER (Εικόνα 4) (Mandl *et al.*, 2018).

Σε πειράματα που διεξάχθηκαν σε ποντίκια (Demetriadou *et al.*, 2017), η STBD1 φάνηκε ότι είναι N-μυριστοϋλιωμένη και αυτή η λιπιδική τροποποίηση, μαζί με τη πρόσδεση του γλυκογόνου στην πρωτεΐνη, δρα ως βασικός καθοριστικός παράγοντας της υποκυτταρικής στόχευσης της STBD1. Βρέθηκε επίσης ότι η STBD1 αποτελεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), που δεσμεύεται σε αυτό μέσω της N-τελικής υδρόφοβης περιοχής της και προεξέχει στο κυττόςολιο. Ανάλογα με την κατάσταση μυριστοϋλίωσης της, η STBD1 μπορεί να μεταφέρει γλυκογόνο στο ER και στα μιτοχόνδρια. Επομένως, ένας ακόμα ρόλος της STBD1 θεωρείται να σχετίζεται με τη φυσική σύνδεση του ER με τα μιτοχόνδρια και έτσι μπορεί να είναι μέρος ενός νέου μηχανισμού που σηματοδοτεί την κατάσταση των θρεπτικών ουσιών στα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 4. Απεικόνιση της πρόσδεσης του ER και του σωματιδίου γλυκογόνου μέσω της STBD1. Στην εικόνα επίσης φαίνεται η αλληλεπίδραση της GABARAPL1 με την STBD1 μέσω της AIM περιοχής. Τα Omegasomes βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά του ER και από τις δομές αυτές σχηματίζονται τα phagophores. Με την σειρά τους τα phagophores ωριμάζουν σε αυτοφαγοσώματα, που συντήκονται με λυσοσώματα έτσι ώστε να αποικοδομήσουν το περιεχόμενο των αυτοφαγοσωμάτων.

1.7. STBD1 και Στρες Ενδοπλασματικού δικτύου

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) συμμετέχει στην ορθή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και υπό φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ του φορτίου πρωτεϊνών που δέχεται το ER και της ικανότητας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών από το ER. Αυτή η ισορροπία μπορεί να διαταραχθεί, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση λανθασμένων πρωτεϊνών, μια κατάσταση που περιγράφεται ως στρες ER (Lytridou *et al.* 2020). Μέσω του στρες ER ενεργοποιείται ένας μηχανισμός γνωστός ως unfolded protein response (UPR) για αποκατάσταση της ανώμαλης κατάστασης. Το στρες ER και η ενεργοποίηση της οδού UPR επηρεάζουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων των οδών μεταβολισμού γλυκόζης και γλυκογόνου. Η επαγωγή UPR ενεργοποιεί μια σειρά κυτταρικών γεγονότων, που προάγουν την προσαρμογή και την επιβίωση των κυττάρων. Στα θηλαστικά, το μονοπάτι UPR διαμεσολαβεί από τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του ER: IRE1 (inositol-requiring protein 1α), ATF6 (activating transcription factor 6) και PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), οι οποίες λειτουργούν ως αισθητήρες που παρακολουθούν συνεχώς το περιβάλλον του ER (Hetz C., 2012). Σε συνθήκες σταθερής κατάστασης, οι αισθητήρες αυτοί αλληλοεπιδρούν με την chaperone BiP του ER (Heat Shock Protein A5) και έτσι διατηρούνται αδρανείς. Η συσσώρευση λανθασμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ER προκαλεί την απόσπαση του BiP από τους παραπάνω αισθητήρες, οι οποίοι ενεργοποιούνται και ξεκινούν ξεχωριστές οδούς σηματοδότησης, γνωστές ως UPR branches.

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξάχθηκε σε μυοβλάστες ποντικών από τους Lytridou *et al.* (2020), αποκαλύπτουν ένα νέο ρόλο της STBD1 κατά τη διάρκεια απόκρισης σε στρες ER. Παρατηρήθηκε ότι η STBD1 απαιτείται για το σχηματισμό δομών γλυκογόνου κατά τη διάρκεια του στρες ER και επομένως συμβάλει στην επιβίωση των κυττάρων. Επιπρόσθετα του ρόλου της STBD1 στην προώθηση της συσσώρευσης γλυκογόνου στο ER, η STBD1 μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη διάρκεια του στρες ER επηρεάζοντας την σύνδεση μεταξύ ER και μιτοχονδρίων και/ή διεργασίες που σχετίζονται με την επικοινωνία ER-μιτοχονδρίων. Από το πείραμα τους, φάνηκε ότι η STBD1 είναι σημαντικά αυξημένη μετά την επαγωγή στρες ER και αυτό εξαρτάται από τη σηματοδότηση PERK. Σημαντικό είναι επίσης ότι η STBD1 λειτουργεί και ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς που μεσολαβεί στην πρόσληψη και μεταφορά των μεταβολικών πρωτεϊνών GS1 και GN προς το ER.

1.8. Ρύθμιση STBD1 από Γλυκοκορτικοειδή

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται από γλυκοκορτικοειδή, ειδικότερα στο ήπαρ όπου επάγουν την αύξηση αποθήκευσης του γλυκογόνου, ενώ στον σκελετικό μυ, προκαλούν γλυκογονόλυση και/ή αναστέλλουν τη σύνθεση γλυκογόνου (Divari *et al.*, 2020). Τα γλυκοκορτικοειδή θεωρούνται ευρέως υποκινητές της εναπόθεσης ηπατικού γλυκογόνου. Σε μια μελέτη που διεξάχθηκε σε βοοειδή χορηγήθηκαν σε χαμηλές δόσεις 2 γλυκοκορτικοειδή, η δεξαμεθαζόνη (DEX) και η πρεδνιζολόνη (PDN) και παρατηρήθηκε ότι προκάλεσαν μείωση της αποθήκευσης του γλυκογόνου στο ήπαρ. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η γονιδιακή έκφραση τόσο της STBD1 όσο και της GAPARAPL1 ρυθμίζονται από τις DEX και PDN. Είναι επομένως δυνατόν να θεωρηθεί ότι η διαδικασία της γλυκοφαγίας αυξάνεται μέσω θεραπειών με γλυκοκορτικοειδή βοηθώντας στη μείωση του ηπατικού γλυκογόνου.

1.9. STBD1 ως στόχος της AMPK

Η AMP-activated protein kinase (AMPK) είναι ένας βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής ομοιόστασης, ενεργώντας ως αισθητήρας της ενέργειας και της θρεπτικής κατάστασης. Ωστόσο, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις (Ducommuna *et al.*, 2019) ότι η AMPK ρυθμίζει βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της αυτοφαγίας. Για το λόγο αυτό θεωρείται ως ένας υποσχόμενος στόχος φαρμάκου για τη θεραπεία ιατρικών παθήσεων που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2.

Η AMPK είναι ένα ετεροτριμερές που περιλαμβάνει μια καταλυτική α -υπομονάδα και ρυθμιστικές β - και γ -υπομονάδες. Η AMPK δεσμεύει το γλυκογόνο μέσω της μονάδας δέσμευσης υδατανθράκων που βρίσκεται στη ρυθμιστική της β -υπομονάδα, αλλά ο φυσιολογικός ρόλος της δέσμευσης AMPK στο γλυκογόνο δεν είναι κατανοητός. Ένας προτεινόμενος ρόλος για την AMPK στον μεταβολισμό του γλυκογόνου είναι η αναστολή της σύνθεσης γλυκογόνου μέσω της άμεσης φωσφορυλίωσης της συνθάσης γλυκογόνου (GS) των μυών και του ήπατος, αλλά δεν είναι σαφές υπό ποιες φυσιολογικές συνθήκες η ενεργοποίηση της AMPK θα οδηγούσε στην αναστολή της σύνθεσης του γλυκογόνου. Μετά από πείραμα (Ducommuna *et al.*, 2019), βρέθηκαν 65 πρωτεΐνες που είναι άμεσοι στόχοι της AMPK και ανάμεσα σε αυτές βρίσκεται και η STBD1, η οποία φωσφορυλιώνεται από την AMPK στη Ser175 τόσο στα ηπατοκύτταρα όσο και στον σκελετικό μυ.

1.10. Δομή της STBD1

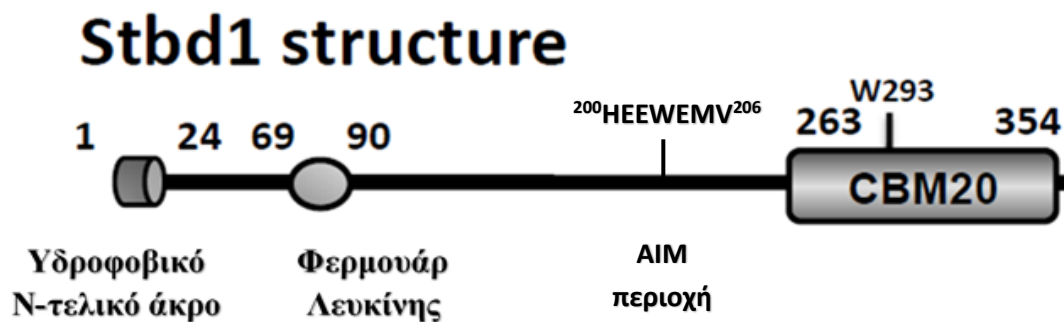
Η ανθρώπινη STBD1 είναι μια πρωτεΐνη 358 αμινοξέων. Αρχικά μέσα από βιοπληροφορικές αναλύσεις (Janecsek, 2002), βρέθηκε ότι η STBD1 διαθέτει στο καρβοξυτελικό άκρο της μια περιοχή ομόλογη με την Starch-Binding Domain (SBD), που αποτελείται από αρκετούς β -κλώνους που σχηματίζουν μια ανοιχτή, παραμορφωμένη δομή β -βαρελιού. Αυτή η δομή συσχετίστηκε με την ικανότητα να δεσμεύει υδατάνθρακες και ονομάστηκε Carbohydrate-Binding Module 20 (CBM20). Η δομή της STBD1 απαρτίζεται από 2 πολύ συντηρημένα άκρα, το N-τελικό και C-τελικό άκρο (Εικόνα 5).

Το N-τελικό άκρο αποτελείται από 24 αμινοξέα και επιτρέπει στην STBD1 να συνδέεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Jiang S. *et al.*, 2010). Επίσης το τμήμα αυτό συσχετίζεται και με την διαδικασία της ουβικουιτίνωσης της STBD1 και την μεταφορά της στο πρωτεάσωμα. Η STBD1 περιέχει επίσης ένα διαμεμβρανικό πεπτίδιο σήματος ενδοπλασματικού δικτύου (transmembrane endoplasmic reticulum signal peptide) (Stapleton *et al.*, 2010).

Στο C-τελικό άκρο εμφανίζεται η CBM20 επικράτεια η οποία προσδένει το γλυκογόνο και το μεταφέρει σε μεμβράνες μέσω αλληλεπίδρασης της με το N-τελικό τμήμα της. Ένας επιπρόσθετος ρόλος της CBM20 περιοχής είναι η σταθερότητα που προσδίδει στην STBD1 και επίσης δίνει την δυνατότητα στην STBD1 να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες. Αρκετές πρωτεΐνες που σχετίζονται με γλυκογόνο όπως GDE, Laforin και GS συνδέονται με την

STBD1, μέσω της CBM20 περιοχής και η παρουσία του γλυκογόνου είναι σημαντική για την δημιουργία των πρωτεϊνικών αυτών συμπλόκων. Πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της διάσπασης του γλυκογόνου, οι πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν πριν συνδέονται με την STBD1, και αυτό είναι πιθανόν να λειτουργεί ως σήμα μειωμένου γλυκογόνου στα κύτταρα. Ένα σημαντικό αμινοξύ της περιοχής αυτής είναι W293 (Zhu *et al.*, 2014). Είναι ακόμα πιθανόν η STBD1 να είναι ένα διμερές που σχηματίζεται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών CBM20.

Το φερμουάρ λευκίνης που συμπεριλαμβάνεται στη δομή της STBD1 έχει ακόμα άγνωστη λειτουργία αλλά είναι σίγουρο ότι δεν σχετίζεται με τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης (Jiang S. *et al.*, 2010). Η περιοχή AIM προσφέρει αλληλεπίδραση της STBD1 με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Atg8 όπως GABARAPL1. Η αλληλουχία AIM είναι ²⁰⁰HEEWEMV²⁰⁶ και τα σημαντικότερα αμινοξέα της περιοχής αυτής είναι W203 and V206 για δέσμευση της GABARAPL1 που παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην αυτοφαγία (Zhu Y. *et al.*, 2014, Jiang S. *et al.*, 2011).



Εικόνα 5. Δομή της STBD1 με βάση την πρωτογενή αλληλουχία, με το N-τελικό υδροφοβό άκρο (24 αμινοξέα), ένα πιθανό φερμουάρ λευκίνης, τα αμινοξέα 200-206 που αποτελούν την αλληλουχία AIM και την C-τελική περιοχή CBM20. Εμφανίζεται επίσης το W293, ένα αμινοξύ που διατηρείται σε όλη την οικογένεια STBD1 (Jiang S. *et al.*, 2010, Supp.).

1.11. Ασθένειες σχετιζόμενες με την STBD1

Η STBD1 δεσμεύεται πιο ισχυρά στο γλυκογόνο που έχει λιγότερα από το κανονικό σημεία διακλάδωσης. Η υπερβολική συσσώρευση τέτοιων κακώς διακλαδισμένων πολυσακχαριτών μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες και σχετίζεται με αρκετές γενετικές ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Andersen, νόσου Tarui και νόσου Lafora. Επομένως, προκειμένου να αποφευχθεί το κακώς διακλαδισμένο γλυκογόνο, η πρωτεΐνη STBD1 θα μπορούσε να έχει μια λειτουργία 'καθαρισμού' μέσω των λυσοσωμάτων καθώς επιλέγει τα ανώμαλα μόρια γλυκογόνου (Jiang *et al.*, 2011).

Μια άλλη μελέτη (Reichelt *et al.*, 2013) συσχετίζει την αυτοφαγία του γλυκογόνου (γλυκοφαγία) ως ένα σημαντικό μονοπάτι απόκρισης στο καρδιακό μεταβολικό στρες. Το καρδιακό μεταβολικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη διαβητική καρδιακή παθολογία, που χαρακτηρίζεται από διαταραχή στην ισορροπία γλυκόζης-ινσουλίνης. Η απόθεση γλυκογόνου αυξάνεται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο υπό παθολογικές συνθήκες που σχετίζονται με τη διαβητική καρδιομυοπάθεια. Οι ασθένειες αποθήκευσης γλυκογόνου χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση αυτοφαγοσωμάτων που περιέχουν γλυκογόνο στο μυοκάρδιο, καταδεικνύοντας στενή σχέση γλυκογόνου και αυτοφαγίας. Σε επόμενη μελέτη (Zhao *et al.* 2018) παρατηρήθηκε ότι η γλυκοφαγία μπορεί να επιδεινώσει τη διαβητική καρδιομυοπάθεια μέσω της οδού σήματος FoxO1 (Forkhead box-containing protein O). Το FoxO επάγει την έκφραση πολλών γονιδίων ATG συμπεριλαμβανομένων των ATG8 και GABARAPL1 επάγοντας έτσι την διαδικασία της γλυκοφαγίας και την παραγωγή γλυκόζης. Αναδυόμενα στοιχεία (Zhao *et al.*

2018) δείχνουν ότι η μεταβολή της γλυκοφαγίας εμπλέκεται και σε άλλες ασθένειες όπως η νόσος Pompe. Η γλυκοφαγία μπορεί να λειτουργήσει προστατευτικά σε ασθενείς με νόσο Pompe, στην αντιμετώπιση της συσσώρευσης λυσοσωμάτων πλούσιων σε γλυκογόνο.

Σε μια πρόσφατη μελέτη (Han Z., *et al.* 2021), υποστηρίζεται ότι η STBD1 συμμετέχει στην αναστολή της καρκινογένεσης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε περιπτώσεις μειωμένων επιπέδων της STBD1, ενισχύεται η διαδικασία της γλυκόλυσης με συνέπεια την προαγωγή ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

1.12. Σκοπός πειραματικής μελέτης

Στην παρούσα πειραματική μελέτη περιγράφεται μια προσπάθεια παραγωγής της ανθρώπινης STBD1. Σκοπός ήταν η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών παραγωγής της πρωτεΐνης έτσι ώστε να μπορεί να απομονωθεί ως καθαρή μορφή στο υδατοδιαλυτό μέρος. Με τον τρόπο αυτό θα είναι δυνατή η περαιτέρω μελέτη της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης STBD1 η οποία παραμένει ακόμα άγνωστη. Εάν καταφέρουμε να απομονώσουμε και να προσδιορίσουμε την τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή της ανθρώπινης STBD1, είναι πολύ πιθανόν να διαλευκάνουμε και κάποια από τα ερωτήματα που υπάρχουν σχετικά με την λειτουργία της στο κύτταρο και γενικά στον ανθρώπινο οργανισμό.



2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Βιοπληροφορική - Βάσεις δεδομένων και ηλεκτρονικά εργαλεία

Πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών έγινε πλοήγηση σε βάσεις δεδομένων και σε ηλεκτρονικά εργαλεία έτσι ώστε να συλλεχθούν όσο περισσότερες πληροφορίες υπάρχουν για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης STBD1 όπως για παράδειγμα ο αριθμός αμινοξέων της και το μοριακό της βάρος (MW).

2.1.1. ProtParam tool - ExPASy

Στο ηλεκτρονικό εργαλείο ProtParam tool - ExPASy (Gasteiger E. *et al.*, 2005) έγινε εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας της STBD1 από την UniProtKB (Εικόνα 6). Ακόμα έγινε εισαγωγή της αμινοξικής αλληλουχίας της STBD1 μαζί με την ετικέτα GST (Glutathione-S-Transferase-Tag) και την περιοχή HRV 3C (Εικόνα 7), στοιχεία τα οποία συνοδεύουν το βελτιστοποιημένο γονίδιο της STBD1 στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P-1, ο οποίος κατασκευάστηκε κατά παραγγελία από την GenScript.

2.1.2. iTasser (Iterative Threading ASSEMBly Refinement)

Με την χρήση της διαδικτυακής πλατφόρμας iTasser (Roy A. *et al.*, 2010) έγινε μια αρχική πρόβλεψη τόσο της πρωτεϊνικής δομής της STBD1 όσο και της λειτουργίας της πρωτεΐνης με βάση τη δομή της. Το iTasser επιτρέπει αυτόματα τη δημιουργία πιθανών 3D μοντέλων υψηλής ποιότητας και τον προσδιορισμό πιθανών βιολογικών λειτουργιών της πρωτεΐνης προς μελέτη. Το C_{score} είναι μια βαθμολογία εμπιστοσύνης (confidence score) για την εκτίμηση της ποιότητας των προβλεπόμενων τρισδιάστατων μοντέλων και κυμαίνεται από -5 μέχρι 2. Ένα υψηλό C_{score} αντιπροσωπεύει ένα μοντέλο με υψηλή εμπιστοσύνη και το αντίστροφο (Zhang Y., 2008).

10 20 30 40 50 60
 MGAVWSALLV GGGLAGALFV WLLRGGPGDT GKDGDAEQEK DAPLGGAAIP GGHQSGSSGL
 70 80 90 100 110 120
 SPGPGSQQLV TKPEHLQESN GHLISKTKDL GKLAASWRL QNPSREVCDN SREHVPSGQF
 130 140 150 160 170 180
 PDTEAPATSE TSNSRSYSEV SRNESLESPM GEWGFQKGQE ISAKAATCFA EKLPSNNLLK
 190 200 210 220 230 240
 NRAKEEMSL S DLNSQDRVDH EEWEMVPRHS SWGDVGVGG S LKAPVNLNLQ GMDNGRSTLV
 250 260 270 280 290 300
 EARGQQVHGK MERVAVMPAG SQQVSVRFQV HYVTSTDVQF IAVTGDHECL GRWNTYIPLH
 310 320 330 340 350
 YNKDGFWSHS IFLPADTVVE WKFVLVENG VTRWEECSNR FLETGHEDKV VHAWWGIH

Εικόνα 6. Αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης *STBD1* (358 αμινοξέα) από την UniProtKB (code:O95210).

10 20 30 40 50 60
 MSPILGYWIKI KGLVQPTLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
 70 80 90 100 110 120
 GDVKLTQSM A IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRIA YSKDFETLKV
 130 140 150 160 170 180
 DFLSKLP EML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK
 190 200 210 220 230 240
 KRIEAIPQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LEVLFQGPLG SMGAVWSALL
 250 260 270 280 290 300
 VGGGLAGALF WLLRGGPGD TGKDGDAEQE KDAPLGGAAI PGGHQSGSSG LSPGPGSQEL
 310 320 330 340 350 360
 VTKPEHLQES NGHLSKTKD LGKLAASWRL LQNPSREVCD NSREHVPSGQ FPDTEAPATS
 370 380 390 400 410 420
 ETSNSRSYSE VSRNESLESP MGEWGFQKGQE EISAKAATCF AEKLPSSNLL KNRAKEEMSL
 430 440 450 460 470 480
 SDLNSQDRVD HEEWEMVPRH SSWGDVGVGG SLKAPVNLNL QGMDNGRSTL VEARGQQVHG
 490 500 510 520 530 540
 KMERVAVMPA GSQQVSVRFQ VHYVTSTDVQ FIAVTGDHEC LGRWNTYIPL HYNKDGFWSH
 550 560 570 580 590
 SIFLPADTVV ENKFLVLENG GVTRWEECSN RFLETGHEDK VVHAWWGIH L E

Εικόνα 7. Αμινοξική αλληλουχία της *STBD1* (358 αμινοξέα) με την ετικέτα *GST* (κόκκινη υπογράμμιση) και την περιοχή *HRV 3C* (με μπλε υπογράμμιση). Στα πράσινα πλαίσια φαίνονται τα αμινοξέα των περιοριστικών ενζύμων *BamHI/XhoI*.

2.2. Μοριακές Μεθοδολογίες

Οι μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν αφορούσαν τον μετασχηματισμό βακτηριακών στελεχών *E. coli* για την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της *STBD1*. Ο βακτηριακός μετασχηματισμός είναι ένα βασικό βήμα της μοριακής κλωνοποίησης, ο στόχος της οποίας είναι η παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ενός ανασυνδυασμένου DNA. Επίσης επιτεύχθηκε η υποκλωνοποίηση του γονιδίου της *STBD1* σε άλλους 2 φορείς με διαφορετικές ετικέτες.

2.2.1. Μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών

Για να επιτευχθεί παραγωγή της πρωτεΐνης *STBD1* που μας ενδιαφέρει έπρεπε πρωτίστως να γίνει μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli* με βάση τη μέθοδο θερμικού σοκ. Η διαδικασία διαθέτει τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 1 μl πλασμιδιακού DNA (100ng/μl) σε 100 μl βακτηριακών κυττάρων,
- Επώση βακτηριακών κυττάρων μαζί με πλασμιδιακό DNA για 30 λεπτά σε πάγο,
- Εμβάπτιση σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42°C για 45 δευτερόλεπτα,

- Επώαση κυττάρων για 2 λεπτά σε πάγο.

Στη συνέχεια τα βακτηριακά κύτταρα επωάζονται στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm) για 1 ώρα, σε 900μl θρεπτικού μέσο SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) (Πίνακας 3). Ακολουθεί η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία Petri που περιέχουν θρεπτικό (Lysogeny Broth (LB) Agar) μαζί με το αντίστοιχο αντιβιοτικό ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος και το πλασμίδιο που χρησιμοποιείται.

Να σημειωθεί ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη ήταν αποθηκευμένα στους -80°C και προεπεξεργασμένα με χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂). Το CaCl₂ βοηθά, έτσι ώστε να αυξηθεί η επιδεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων προς το πλασμιδιακό DNA. Γενικά η έκθεση των κυττάρων σε ιόντα ασβεστίου τα καθιστά ικανά να προσλαμβάνουν DNA (competent cells) (Asif *et al.*, 2017). Το πλασμιδιακό DNA *pGEX-6P-1* αποθηκεύεται στους -20°C και η συγκέντρωση του είναι 100 ng/μl. Στην παρούσα εργασία μετασχηματίστηκαν συνολικά 5 βακτηριακά στελέχη *E. coli* με στόχο την κλωνοποίηση των πλασμιδίων και την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου-στόχου της STBD1: XL1-Blue, DH5α, BL21(DE3), B834(DE3)pLysS και Lemo21(DE3).

2.2.2. Κατασκευή πλασμιδίων και πλασμιδιακοί χάρτες

Τα βακτηριακά στελέχη που αναφέρθηκαν πιο πάνω μετασχηματίστηκαν από πλασμιδιακό DNA όπως φαίνεται στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Βακτηριακό Στέλεχος	Πλασμιδιακό DNA
XL1-Blue	<i>pGEX-6P-1</i> , <i>pETM-11</i>
DH5α	<i>pET-28α</i>
BL21 (DE3)	<i>pGEX-6P-1</i>
B834 (DE3) pLysS	<i>pGEX-6P-1</i>
Lemo21 (DE3)	<i>pGEX-6P-1</i>

Πίνακας 1. Στον πίνακα εμφανίζονται τα βακτηριακά στελέχη και τα αντίστοιχα πλασμίδια με τα οποία μετασχηματίστηκαν.

2.2.2.1. *pGEX-6P-1*

Με στόχο την παραγωγή της ανθρώπινης STBD1 έγινε βελτιστοποίηση της αλληλουχίας του γονιδίου GENX-3414, για έκφραση σε βακτήρια *E. coli* από την εταιρεία Genscript. Η αλληλουχία του αρχικού γονιδίου βελτιστοποιήθηκε, αναβαθμίζοντας το Codon Adaptation Index από 0,35 σε 0,96. Το περιεχόμενο GC έχει βελτιστοποιηθεί για παράταση του χρόνου ημιζωής του mRNA. Οι δομές Stem-Loop αφαιρέθηκαν, ώστε να μην επηρεάζουν τη ριβοσωμική σύνδεση και τη σταθερότητα του mRNA. Επιπλέον, αφαιρέθηκε το cis-στοιχείο Polymerase slippage site 1. Το βελτιστοποιημένο γονίδιο εισάχθηκε στο γονέα έκφρασης JM108 μέσω των περιοριστικών ενζύμων *BamHI/XhoI*. Επίσης σχεδιάστηκε έτσι ώστε να φέρει τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI*, *Sall*, *XhoI*, *NotI*. Το γονίδιο έκφρασης της STBD1 έχει μέγεθος 1089bp και διαθέτει ετικέτα GST όπως και περιοχή HRV 3C (ή αλλιώς preScission protease). Η ετικέτα GST αυξάνει συχνά τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και έτσι επιτρέπει τον καθαρισμό της και τον επακόλουθο λειτουργικό χαρακτηρισμό της (Schäfer F. *et al.*, 2015). Η περιοχή HRV 3C κόβεται από την αντίστοιχη πρωτεάση. Η πρωτεάση HRV 3C προέρχεται από τον ανθρώπινο rhinovirus και αυτό που την ξεχωρίζει είναι ότι ακόμα και σε χαμηλή θερμοκρασία έχει υψηλή δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό η περιοχή HRV 3C μαζί με την δράση της πρωτεάσης βοηθούν στο κόψιμο της ετικέτας GST από το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, όταν χρειαστεί να απομονωθεί σε καθαρή μορφή η πρωτεΐνη-στόχος (Xu *et al.*, 2019). Το γονίδιο STBD1 κλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό DNA

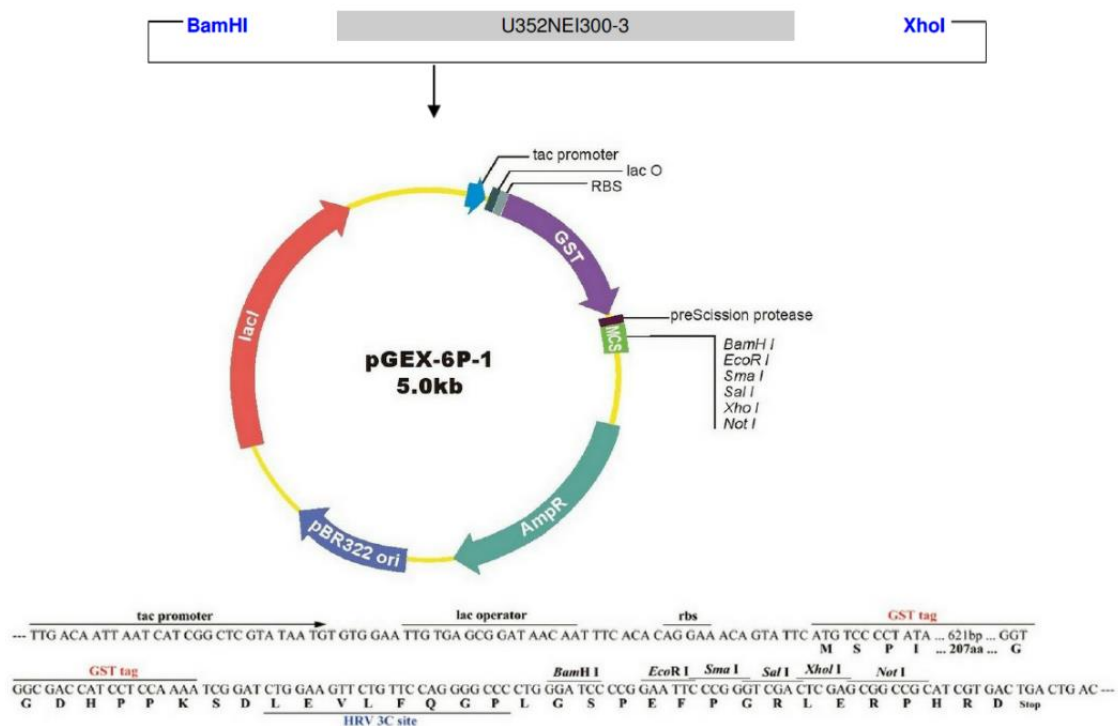
(*pGEX-6P-1*) μέσω των περιοριστικών ενζύμων *BamHI/XhoI*. Επίσης το *pGEX-6P-1* διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας για την Αμπικιλίνη (AmpR) και έχει μέγεθος 5kb.

2.2.2.2. *pETM-11*

Εκτός από το πλασμίδιο *pGEX-6P-1*, χρησιμοποιήθηκε και το πλασμίδιο *pETM-11*. Το πλασμίδιο αυτό διαθέτει ετικέτα His (His-Tag) έτσι ώστε να μελετηθεί η απομόνωση της STBD1 και από άλλες στήλες καθαρισμού χρωματογραφίας. Το *pETM-11* έχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Καναμυκίνη (KanR) και έχει μέγεθος 6029bp. Η εισαγωγή του γονιδίου STBD1 έγινε με υποκλωνοποίηση (subcloning) όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.2.3. *pET-28a*

Το τρίτο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το *pET-28a*. Το πλασμίδιο αυτό φέρει μια ετικέτα έξι Ιστιδινών (6xHis). Επίσης διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στην Καναμυκίνη (KanR) και έχει μέγεθος 5369 bp. Όπως και στο πλασμίδιο *pETM-11*, η εισαγωγή του γονιδίου STBD1 έγινε με υποκλωνοποίηση (subcloning) όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 8. Πλασμιδιακός χάρτης *pGEX-6P-1* και νουκλεοτιδική αλληλουχία από *tac promoter* μέχρι *Multiple Cloning Site (MCS)*.

2.2.3. Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA

Η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη χρήση ειδικού kit NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) από τα βακτηριακά κύτταρα (XL1-Blue και DH5α). Η ποσότητα πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε με βάση το πιο πάνω πρωτόκολλο, μετρήθηκε με τη χρήση NanoDrop. Το NanoDrop μπορεί να δώσει δεδομένα όσον αφορά την συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA (ng/μl) και τον λόγο 260_{nm}/280_{nm}. Ο λόγος απορρόφησης στα 260_{nm}/280_{nm} χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της καθαρότητας του DNA. Το DNA έχει απορρόφηση στα 260nm ενώ οι πρωτεΐνες έχουν απορρόφηση στα 280nm. Μια αναλογία κοντά στο 1,8 είναι γενικά αποδεκτή ως «καθαρό» DNA. Εάν η αναλογία είναι πολύ χαμηλότερη από 1,8, αυτό μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία πρωτεΐνης ή άλλων προσμείξεων (NanoDrop Technologies, Inc., 2007).

2.2.4. Πέψη πλασμιδίων και σύνδεση με γονίδιο στόχο

Εκτός από το πλασμίδιο *pGEX-6P-1*, θελήσαμε να εισάγουμε το γονίδιο έκφρασης της STBD1 σε άλλους 2 πλασμιδιακούς φορείς (Subcloning): *pET-28a* και *pETM-11*. Για να γίνει αυτό εφαρμόστηκε η διαδικασία πέψης (digestion) των 3 πλασμιδίων από περιοριστικά ένζυμα και εισαγωγή/σύνδεση (ligation) του γονιδίου στόχου της STBD1 στους 2 άλλους φορείς.

Για τον πολλαπλασιασμό αντιγράφων του *pGEX-6P-1*, έγινε μετασηματισμός και ανάπτυξη των κυττάρων XL1-Blue με την μέθοδο Streaking σε τρυβλία Petri με θρεπτικό LB Agar και 50 µg/ml Amp. Οι καλλιέργειες αυτές επώαστηκαν για 16 ώρες, στους 37°C, χωρίς ανάδευση. Από τις αποικίες που δημιουργήθηκαν έγινε εμβολιασμός μιας αποικίας σε υγρή καλλιέργεια με θρεπτικό LB Broth και 50 µg/ml Amp. Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα για 16 ώρες, στους 37°C, με ανάδευση στα 210 rpm. Στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA με τη χρήση kit και μετρήθηκε η συγκέντρωση του με NanoDrop.

Η διαδικασία πέψης των πλασμιδίων έγινε σε αποστειρωμένες συνθήκες σε θάλαμο με φως UV και είχε ως εξής:

- Προετοιμασία διαλυμάτων (50µl) που είχαν νερό, ρυθμιστικό διάλυμα, πλασμιδιακό DNA (2µg) και περιοριστικά ένζυμα *BamHI* και *XhoI*.
- Επώαση σε θερμοκυκλοποιητή για 3 ώρες στους 37°C

Ο θερμοκυκλοποιητής παράγει τα προϊόντα πέψης, τα οποία αργότερα ετοιμάζονται για να τρέξουν σε πηκτή αгарόζης (TAE Buffer (pH 8.3) και SYBR dye) σε τροφοδοτικό 90V. Στην συνέχεια συλλέχθηκαν τα πλασμιδιακά DNA όπως και η αλληλουχία του βελτιστοποιημένου γονιδίου που εκφράζει την πρωτεΐνη STBD1 μέσω kit (DNA extraction from agarose gel kit) και οι συγκεντρώσεις τους μετρήθηκαν με τη χρήση του οργάνου NanoDrop.

Για το επόμενο στάδιο του Ligation, κατασκευάστηκαν διαλύματα διαφορετικών μοριακών αναλογιών φορέα : ενθέτου όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Οι αναλογίες αυτές υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού εργαλείου NEBioCalculator.

Πλασμίδια/Συστατικά	Πλασμιδιακό DNA (µl)	Γονίδιο STBD1 (µl)	Ligase (µl)	Buffer (µl)	Water for Injection (µl)
pET-28a (control)	2,1	-	1	2	14,9
pET-28a (2:1)	2,1	0,7	1	2	14,2
pET-28a (3:1)	2,1	1,05	1	2	13,85
pET-28a (5:1)	2,1	1,7	1	2	13,2
pETM-11 (control)	2,5	-	1	2	14,5
pETM-11 (2:1)	2,5	0,6	1	2	13,9
pETM-11 (3:1)	2,5	1	1	2	13,5
pETM-11 (5:1)	2,5	1,6	1	2	12,9

Πίνακας 2. Διαλύματα που ετοιμάστηκαν για Ligation σε διαφορετικές αναλογίες φορέα : ενθέτου, με τελικό όγκο 20µl.

Τα διαλύματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, τοποθετήθηκαν σε θερμοκυκλοποιητή στους 16°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια τα πιο πάνω πλασμίδια στις διαφορετικές αναλογίες πλασμιδιακού φορέα : ενθέτου, εισάχθηκαν σε βακτηριακά στελέχη. Τα κύτταρα DH5α (50µl) μετασηματίστηκαν με το πλασμίδιο *pET-28a* (2µl) ενώ τα κύτταρα XL1-Blue (50µl) με το πλασμίδιο *pETM-11* (2µl). Και τα δυο βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν εις διπλού σε LB Agar μαζί με αντιβιοτικό Καναμυκίνης (20µg/ml) σε συνθήκες επώασης 37 °C, 16 ώρες, χωρίς ανάδευση.

Από τις στερεές καλλιέργειες των DH5α (*pET-28a*) και XL1-Blue (*pETM-11*), τις περισσότερες αποικίες εμφάνισαν τα εξής δείγματα: *pETM-11* (2:1), *pETM-11* (3:1) και από

τα 2 τρυβλία Petri, pETM-11 (5:1) και από τα 2 τρυβλία Petri, pET-28a (5:1). Από τις 6 αυτές στερεές καλλιέργειες, έγιναν εμβολιασμοί αποικιών για δημιουργία υγρών καλλιιεργειών με θρεπτικό μέσο το 2YT Broth και αντιβιοτικό Καναμυκίνη (20 µg/ml) και ακολούθησε επώαση αυτών στους 37°C για 16 ώρες υπό ανάδευση (210 rpm). Ακολούθως έγινε απομόνωση των πλασμιδιακών DNA μέσω ειδικού kit όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.3., από τις πιο πάνω (6) υγρές καλλιέργειες και μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού DNA μέσω του οργάνου NanoDrop. Επιπρόσθετα τα πλασμιδιακά DNA που απομονώθηκαν ετοιμάστηκαν κατάλληλα για να τρέξουν σε πηκτή αγαρόζης 1% (v/v) (TAE Buffer (pH 8,3) και SYBR dye) σε τροφοδοτικό 80V.

2.2.5. Αλληλούχιση των υποκλωνοποιημένων pET-28a και pETM-11

Για να διαπιστωθεί εάν έγινε η προσθήκη του γονιδίου της STBD1 στους Subcloned φορείς pET-28a και pETM-11, έχουν σταλθεί τα δείγματα που είχαν εμφάνιση ζώνης σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικόνα 14) για αλληλούχιση νουκλεοτιδικών αμινοξέων.

2.3. Ετερόλογη Έκφραση

Η παραγωγή πρωτεϊνών που είναι ξένες προς τον φορέα έκφρασης όπως το βακτήριο αναφέρεται ως ετερόλογη έκφραση. Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της STBD1 στα βακτηριακά στελέχη BL21(DE3), B834(DE3)pLysS και Lemo21(DE3). Ένα σημαντικό σημείο στην διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης είναι ότι οι καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων (δηλαδή εκείνες που παράγουν όσο το δυνατόν περισσότερη βιομάζα) δεν είναι απαραίτητα οι βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή πρωτεϊνών. Αν και πολλές πρωτεΐνες μπορούν να υπερεκφραστούν σε inclusion bodies, η αναδίπλωσή τους σε λειτουργικές πρωτεΐνες δεν είναι πάντα επιτυχής. Για να αποφευχθεί το πρόβλημα αναδίπλωσης, απαιτείται υπερέκφραση των πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ωστόσο, η υπερέκφραση πρωτεϊνών είναι συχνά τοξική για το κύτταρο (Wagner *et al.*, 2008).

Σε πολλές περιπτώσεις (Wagner *et al.*, 2006) η ετερόλογη έκφραση οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης λόγω των διαφορών που υπάρχουν μεταξύ των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα βακτηριακά κύτταρα, οι πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι πρωτεΐνες υπερεκφράζονται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ER), από όπου μπορούν να μεταφερθούν σε άλλες περιοχές του κυττάρου. Επίσης ο ρυθμός εισαγωγής αμινοξέων στην πρωτεΐνη και η αναδίπλωση της είναι σημαντικά υψηλότεροι στα προκαρυωτικά από ότι στα ευκαρυωτικά κύτταρα και κατά συνέπεια μπορεί να προκαλέσουν λανθασμένη στόχευση και αναδίπλωση των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν ετερόλογα. Οι παραπάνω διαφορές και πολλές άλλες παίζουν ρόλο για την βέλτιστη έκφραση ετερόλογων πρωτεϊνών σε βακτήρια.

Σημαντικό είναι επίσης να επιλεγθεί η σωστή αλληλουχία-ετικέτα έτσι ώστε να μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Η ετικέτα που επιλέχθηκε να συνοδεύει την πρωτεΐνη STBD1 για το παρόν πείραμα είναι η GST-tag. Ακόμα χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευές πλασμιδίων με ετικέτα Ιστιδίνης (His-tag) η οποία είναι ιδανική για πρωτεΐνες στόχους που απαιτούν επαναδιαλυτοποίηση και αναδίπλωση (refolding) για απομόνωση (Malhotra A., 2009).

2.3.1. XLI-Blue

Το βακτηριακό στέλεχος XLI-Blue είναι κατάλληλο για σκοπούς κλωνοποίησης και δίνει τη δυνατότητα για παραγωγή υψηλής ποιότητας πλασμιδιακού DNA. Επίσης μέσω των βακτηρίων αυτών μπορεί να εφαρμοστεί ο χρωματικός έλεγχος μπλε-λευκού επειδή διαθέτει το γονίδιο *lacIqZΔM15* στον επίτοπο F'. Επίσης από τα κύτταρα XLI-Blue απουσιάζει η ενδονουκλεάση (endA), με αποτέλεσμα να βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα του πλασμιδίου

και η απουσία της ρεκομπινάσης (*recA*) βελτιώνει τη σταθερότητα του πλασμιδίου. Στην παρούσα εργασία το στέλεχος αυτό χρησιμοποιήθηκε για κλωνοποίηση του πλασμιδιακού DNA, *pGEX-6P-1*. Ακόμα τα XL1-Blue μετασχηματίστηκαν με τον υποκλωνοποιημένο (subcloned) φορέα *pETM-11*.

2.3.2. *DH5α*

Το βακτηριακό στέλεχος *DH5α* του *E. coli* χρησιμοποιείται συχνά, ειδικά για διαδικασίες κλωνοποίησης. Επίσης διαθέτει αρκετά κοινά στοιχεία με το βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue όπως είναι το γονίδιο *lacZΔM15* για χρωματικό έλεγχο μπλε-λευκού και την απουσία τόσο της *recA* όσο και της *endA*. Εδώ τα βακτήρια αυτά μετασχηματίστηκαν με τον subcloned φορέα *pET-28α*.

2.3.3. *BL21 (DE3)*

Τα κύτταρα BL21 (DE3) αποτελούν ένα στέλεχος κατάλληλο για έκφραση πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα χρησιμοποιώντας ένα σύστημα επαγωγής RNA πολυμεράσης-IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactoside). Η IPTG είναι ένα ανάλογο της λακτόζης το οποίο όταν εισαχθεί στο κύτταρο αναστέλλει την δράση του αναστολέα *lac* (*lac repressor*) και επάγει την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου στόχου από την πολυμεράση. Τα κύτταρα αυτά φέρουν ένα αντίγραφο του γονιδίου της RNA πολυμεράσης που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5* (Jia B. and Jeon O.C., 2016). Η έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης προέρχεται από τους βακτηριοφάγους DE3 και γι' αυτό όλα βακτηριακά κύτταρα διαθέτουν το σύστημα RNA πολυμεράσης ονομάζονται DE3 (Rosenberg A.H. *et al.*, 1987). Επίσης τα κύτταρα BL21 δεν διαθέτουν κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό. Τα κύτταρα αυτά μετασχηματίστηκαν και αναπτύχθηκαν με στόχο την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της STBD1 με GST-tag που βρίσκεται στο πλασμίδιο *pGEX-6P-1*.

2.3.4. *B834(DE3) pLysS*

Τα κύτταρα B834 είναι το γονικό στέλεχος των κυττάρων BL21 και διαθέτει το σύστημα επαγωγής T7 RNA πολυμεράσης-IPTG. Αυτά τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται μόνο σε περιβάλλον που διαθέτει μεθειονίνη. Επίσης επιτρέπουν την επισήμανση των πρωτεϊνών με υψηλή και ειδική δραστηριότητα που περιέχουν 35S-μεθειονίνη ή selenomethionine για κρυσταλλογραφία (Leahy D.J. *et al.*, 1994). Επίσης τα *pLysS* κύτταρα εκφράζουν την λυσοζύμη T7 (T7Lys), η οποία δεν επιτρέπει τη βασική έκφραση της T7 RNA πολυμεράσης παραμόνο με την παρουσία της IPTG. Ακόμα τα κύτταρα B834(DE3)*pLysS* έχουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην Chloramphenicol (Cam). Τα κύτταρα αυτά μετασχηματίστηκαν και καλλιεργήθηκαν με στόχο την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της STBD1 με GST-tag που βρίσκεται στο πλασμίδιο *pGEX-6P-1*.

2.3.5. *Lemo21 (DE3)*

Τα βακτηριακά κύτταρα Lemo21(DE3) διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά με τα BL21(DE3) και επιτρέπουν, επίσης, την έκφραση δύσκολων πρωτεϊνών όπως οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι τοξικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες που εκφράζονται στο αδιάλυτο μέρος (Wagner S. *et al.*, 2008). Στα κύτταρα Lemo21(DE3) η δραστηριότητα της T7 RNA πολυμεράσης ρυθμίζεται από τον φυσικό αναστολέα T7Lys. Η διαφοροποίηση του στελέχους αυτού είναι ότι, ο αναστολέας T7Lys τέθηκε υπό τον έλεγχο του προαγωγέα L-rhamnose (*rhaBAD*). Ο προαγωγέας *rhaBAD* διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά που τον καθιστούν εξαιρετικά κατάλληλο για έκφραση του αναστολέα T7RNAP T7Lys με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει καθόλου την λειτουργία της T7 RNA πολυμεράσης παραμόνο με την παρουσία IPTG (Wagner *et al.*, 2008). Έτσι τα κύτταρα Lemo21(DE3) επιτρέπουν τη βελτιστοποίηση της υπερέκφρασης πρωτεϊνών. Τα κύτταρα αυτά

μετασηματίστηκαν και καλλιεργήθηκαν με στόχο την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της STBD1 με GST-tag που βρίσκεται στο πλασμίδιο *pGEX-6P-1*.

2.4. Παραγωγή πρωτεΐνης

Η έκφραση των πρωτεϊνών γίνεται μέσα από μια σειρά διαδικασιών καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών, αρχικά σε στερεά θρεπτικά (LB Agar) και στη συνέχεια σε υγρά θρεπτικά (LB Broth, SOC, 2YT) μαζί με την προσθήκη αντίστοιχου αντιβιοτικού. Σε όλες τις περιπτώσεις η διαχείριση των κυττάρων έγινε σύμφωνα με ασηπτικές συνθήκες (φλόγιστρο). Μετά τον εμβολιασμό (inoculation) βακτηριακών αποικιών και τον εμβολιασμό 1/100, γίνεται μέτρηση της ανάπτυξης των κυττάρων μέσω φωτόμετρου. Η απορρόφηση που περιμένουμε σε OD_{600nm} είναι από 0,5-0,7. Όταν φτάσει η μέτρηση στα επιθυμητά επίπεδα αρχίζει η διαδικασία έκφρασης της πρωτεΐνης προς μελέτη με την προσθήκη του επαγωγέα IPTG και η επώαση των υγρών καλλιεργειών σε ιδανικές συνθήκες (θερμοκρασία και διάρκεια επώασης).

2.4.1. Θρεπτικά Μέσα

Η ανάπτυξη των βακτηρίων απαιτεί συγκεκριμένα θρεπτικά μέσα με τον κατάλληλο συνδυασμό συστατικών. Όλα τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί. Για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων ως αποικίες σε τρυβλία Petri χρησιμοποιήθηκε το LB Broth with Agar ενώ για την ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το LB (Luria-Bertani) Broth 25g/L. Επίσης το θρεπτικό SOC χρησιμοποιείται για ανάπτυξη των κυττάρων ακριβώς μετά την διαδικασία του θερμικού σοκ για τον μετασηματισμό τους. Όσον αφορά την ανάπτυξη των κυττάρων XL1-Blue και DH5α που είχαν μετασηματιστεί με τους subcloned φορείς *pETM-11* και *pET-28α* αντίστοιχα, κατασκευάστηκε το θρεπτικό 2YT Broth.

LB Agar (pH 7)	LB Broth (pH 7)	SOC (pH 7)	2YT Broth (pH 7)
NaCl (10g/L)	NaCl (10g/L)	NaCl (0,5g/L)	NaCl (5g/L)
Tryptone (10g/L)	Tryptone (10g/L)	Tryptone (20g/L)	Tryptone (16g/L)
Yeast Extract (5g/L)	Yeast Extract (5g/L)	Yeast Extract (5g/L)	Yeast Extract Servabacter (10g/L)
H ₂ O (1L)	H ₂ O (1L)	H ₂ O (1L)	H ₂ O (1L)
Agar (15g/L)			

Πίνακας 3. Στον πίνακα αυτό αναγράφονται τα συστατικά από τα οποία αποτελούνται το κάθε θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη.

2.4.2. Stock γλυκερόλης

Για την επίτευξη ενός μακροπρόθεσμου αποθέματος των μετασηματισμένων βακτηρίων, χρησιμοποιείται γλυκερόλη. Η αποθήκευση των μετασηματισμένων βακτηρίων γίνεται στους -80°C παρουσία 20% (v/v) διαλύματος γλυκερόλης (π.χ. σε 200μl γλυκερόλης γίνεται προσθήκη 800μl βακτηριακών κυττάρων). Σημαντικό είναι να γίνει καλή ανάμειξη, για ομογενοποίηση των κυττάρων με την γλυκερόλη.

2.4.3. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα BL21 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG

Αρχικός στόχος ήταν να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση IPTG με την οποία επάγεται περισσότερη έκφραση της πρωτεΐνης STBD1. Για τον λόγο αυτό ετοιμάστηκαν στερεές καλλιέργειες σε τρυβλία Petri με LB Agar ως θρεπτικό και 50 μg/ml Αμπικιλίνης ως αντιβιοτικό για ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων BL21. Για 1μl πλασμιδιακό DNA, *pGEX-6P-1* (100 ng/μl) μετασηματίζονται 100μl βακτηριακών κυττάρων.

Στη συνέχεια από τις καλλιέργειες αυτές επιστρώνονται τα κύτταρα (50μl και 150μl) στα τρυβλία Petri. Στην συνέχεια έγινε εμβολιασμός αποικιών από τρυβλία Petri με κύτταρα BL21 σε θρεπτικό LB Broth μαζί με 50 μg/ml Αμπικιλίνης ως αντιβιοτικό. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάζονται 3 υγρές καλλιέργειες BL21 (20ml) οι οποίες επώάζονται στους 37 °C, υπο ανάδευση (210 rpm) για 16 ώρες. Μετά την επώαση 16 ωρών φτιάχνουμε υγρές καλλιέργειες με εμβολιασμό 1:100 (80ml θρεπτικού LB Broth για 800μl υγρής καλλιέργειας κυττάρων) και τις αφήνουμε στον επωαστήρα στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας των 2 ωρών μετράμε την απορρόφηση των κυττάρων σε OD_{600nm} στο φωτόμετρο και περιμένουμε μια ιδανική τιμή από 0,5-0,7. Η δοκιμασία έκφρασης της πρωτεΐνης STBD1 ξεκινά με την προσθήκη IPTG σε διαφορετικές συγκεντρώσεις: no IPTG, 0,1mM, 0,5mM και 1mM, σε διαφορετικές θερμοκρασίες: 37°C και 18°C και διαφορετικούς χρόνους επώασης: 3 και 16 ώρες αντίστοιχα με τις θερμοκρασίες. Έτσι συνολικά μελετήθηκαν 8 πιθανοί συνδυασμοί έκφρασης της STBD1. Πριν γίνει λύση των κυττάρων, οι καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν (5000 rpm, 5 λεπτά, 4°C) για διαχωρισμό των κυττάρων (ίζημα) από το θρεπτικό μέσο (υπερκείμενο). Η λύση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο υπερήχων (5 second), vortex (ισχυρή ανάδευση) και τη χρήση παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) με pH 8, το οποίο περιείχε: 50mM Tris-HCl (pH 8), 100mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) μονοθειογλυκερόλη (MTG). Στα δείγματα που δεν συμπεριλάμβαναν IPTG, προστέθηκε 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ενώ στα υπόλοιπα 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

2.4.4. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG

Εκτός από το βακτηριακό στέλεχος BL21, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες B834pLysS (LB Agar ως θρεπτικό + 50 μg/ml Αμπικιλίνης + 34 μg/ml Chloramphenicol) σε τρυβλία Petri μετά από μετασχηματισμό τους (100μl) με πλασμιακό DNA (1μl), *pGEX-6P-1* (100 ng/μl). Μαζί με προσθήκη θρεπτικού (900μl) τα κύτταρα επώάζονται στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm) για 1 ώρα. Στη συνέχεια από τις καλλιέργειες αυτές επιστρώνονται τα κύτταρα στα τρυβλία Petri (25μl και 60μl).

Ακολούθησε δοκιμασία έκφρασης πρωτεΐνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (no IPTG, 0,1mM, 0,5mM, 1mM), με διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C, 18°C) και διαφορετικούς χρόνους επώασης (3 και 16 ώρες αντίστοιχα με τις θερμοκρασίες) σε βακτηριακά στελέχη B834pLysS. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών από τα υπόλοιπα κυτταρικά στοιχεία έγινε με φυγοκέντρηση (5000rpm, 5 λεπτά, 4°C). Η λύση των κυττάρων έγινε με τη υπερήχους, vortex και τη χρήση 1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης με pH 8 (50mM Tris-HCl (pH 8), 100mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG).

2.4.5. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα Lemo21 και σε 0,5mM IPTG

Σε συνέχεια των πειραμάτων για μελέτη των βέλτιστων συνθηκών έκφρασης της πρωτεΐνης STBD1 χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος Lemo21. Ετοιμάστηκαν καλλιέργειες (LB Agar) μετασχηματισμένων Lemo21 με το πλασμίδιο *pGEX-6P-1* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ. Στις στερεές καλλιέργειες προστέθηκαν τα αντιβιοτικά Amp (50 μg/ml) και Cam (34μg/ml) και επιστρώθηκαν στα τρυβλία Petri 2 ποσότητες από τα μετασχηματισμένα Lemo21 (30μl και 70μl). Τα 2 τρυβλία επώαστηκαν για 16 ώρες, στους 37°C και χωρίς ανάδευση. Στη συνέχεια, όπως έγινε και στα προηγούμενα πειράματα έκφρασης, κατασκευάστηκαν υγρές καλλιέργειες (LB Broth) για ανάπτυξη δυο από τις αποικίες από το τρυβλίο που επιστρώθηκαν 70μl κυττάρων, μαζί με προσθήκη 50μg/ml Amp και 34μg/ml Cam. Δημιουργήθηκαν 2 υγρές καλλιέργειες (10ml) που επώαστηκαν για 16 ώρες, στους 37°C και με ανάδευση 210 rpm. Ακολούθησε 1/100 εμβολιασμός (δηλαδή σε 100ml LB Broth προστέθηκε 1ml τις προηγούμενης υγρής καλλιέργειας μαζί με τα ίδια αντιβιοτικά) για δημιουργία 2 καλλιέργειών Lemo21, επώαση στους 37 °C, 210 rpm και έγινε φωτομέτρηση σε

OD_{600nm}. Όταν η τιμή απορρόφησης φτάσει στα επιτρεπτά πλαίσια (0,5-0,7), οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε πάγο ώστε να σταματήσει η ανάπτυξη των κυττάρων και στην μια καλλιέργεια προστέθηκε 0,5mM IPTG, μια συγκέντρωση επαγωγέα που θεωρείται ως βέλτιστη από την πρώτη προσπάθεια έκφρασης της STBD1 από τα κύτταρα BL21. Στην 2^η καλλιέργεια δεν έγινε προσθήκη IPTG και έτσι χρησιμοποιήθηκε ως control. Οι 2 αυτές καλλιέργειες επώαστηκαν για 16 ώρες, στους 18 °C υπό ανάδευση (210rpm). Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 5000 rpm, στους 4 °C για 10 λεπτά για διαχωρισμό των κυττάρων Lemo21 από το θρεπτικό μέσο. Για λύση των κυττάρων εφαρμόστηκαν υπέρηχοι, vortex και κατασκευάστηκαν 4 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης (Πίνακας 4). Για 1ml κυττάρων Lemo21 γίνεται προσθήκη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης. Άρα συνολικά μελετώνται 4 διαφορετικά ρυθμιστικά για λύση των κυττάρων Lemo21.

Lysis Buffer	HEPES (pH 7.5)	Tris (pH 8.5)	2M NaCl	H ₂ O
1 (pH 7.5)	50mM	-	-	✓
2 (pH 7.5)	50mM	-	200mM	✓
3 (pH 8.5)	-	50mM	-	✓
4 (pH 8.5)	-	50mM	200mM	✓

Πίνακας 4. Συστατικά και συγκεντρώσεις των συστατικών των ρυθμιστικών διαλύματος λύσης (Lysis Buffers) που χρησιμοποιήθηκαν για λύση των κυττάρων Lemo21.

2.5. Large Scale Test

Η έκφραση πρωτεΐνης στόχου σε μεγαλύτερες καλλιέργειες με περισσότερο θρεπτικό μέσο και σε συγκεκριμένες συνθήκες έκφρασης και επώασης αποτελούν το λεγόμενο Large Scale Test. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει με σκοπό την συλλογή μεγάλης ποσότητας εκφραζόμενης πρωτεΐνης-στόχου και τον καθαρισμό της.

2.5.1. Large Scale Test σε κύτταρα BL21

Τα βακτηριακά κύτταρα BL21 αναπτύχθηκαν αρχικά σε 30ml LB Broth μαζί με 50μg/ml Αμπικιλίνης και επώαστηκαν στους 37°C, 16 ώρες, υπό ανάδευση (210rpm). Στη συνέχεια έγινε 1/100 εμβολιασμός σε καλλιέργειες 500ml LB Broth και 50 μg/ml Αμπικιλίνης δηλαδή προσθήκη 5ml από μικρές καλλιέργειες BL21. Αφήνουμε τις 4 μεγάλες καλλιέργειες στον επωαστήρα στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας των 2 ωρών μετράμε την απορρόφηση των κυττάρων μέσω φωτομέτρου σε OD_{600nm}. Μεταξύ των τιμών απορρόφησης 0,5-0,7 τα κύτταρα βρίσκονται στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης τους, μια φάση στην οποία τα βακτήρια έχουν αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε αυτή τη φάση ανάπτυξης τους, σε κάθε μεγάλη καλλιέργεια γίνεται προσθήκη 0,5mM IPTG και επώάζονται στους 18°C, για 16 ώρες, υπό ανάδευση (210rpm). Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρωση (5000rpm, 4°C, 40 λεπτά) για διαχωρισμό των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα BL21 διαλυτοποιούνται με την προσθήκη 5ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης με pH 8 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG). Επίσης γίνεται προσθήκη 0,1mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) που είναι ένας αναστολέας πρωτεασών.

Οι πρωτεΐνες από τα διαλυτοποιημένα αυτά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την χρωματογραφία συγγένειας όπως αναγράφεται στην παράγραφο 2.7.1.

2.5.2. Large Scale Test σε κύτταρα B834pLysS

Τα βακτηριακά κύτταρα B834pLysS αναπτύχθηκαν αρχικά σε 100ml LB Broth μαζί με 50μg/ml Αμπικιλίνης και 34μg/ml Chloramphenicol και επώαστηκαν στους 37°C, 16 ώρες, υπό ανάδευση (210rpm). Στη συνέχεια έγινε 1/100 εμβολιασμός σε καλλιέργειες 1L LB Broth και 50μg/ml Αμπικιλίνης και 34μg/ml Chloramphenicol δηλαδή προσθήκη 10ml από μικρές

καλλιέργειες BL834pLysS. Αφήνουμε τις 4 μεγάλες καλλιέργειες στον επωαστήρα στους 37°C, υπό ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας των 2 ωρών μετράμε των απορρόφηση των κυττάρων σε OD_{600nm} στο φωτόμετρο και περιμένουμε μια ιδανική τιμή από 0,5-0,7. Όταν γίνει αυτό προστίθεται σε κάθε μεγάλη καλλιέργεια 0,5mM IPTG και επωάζονται στους 18°C, για 16 ώρες, υπό ανάδευση (210rpm). Έπειτα ακολουθεί φυγοκέντρηση (5000rpm, 4°C, 40 λεπτά) για διαχωρισμό των κυττάρων από το θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα BL21 διαλυτοποιούνται με την προσθήκη 5ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης με pH 8 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG). Επίσης γίνεται προσθήκη 0,1mM PMSF.

Οι πρωτεΐνες από τα διαλυτοποιήμενα αυτά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την χρωματογραφία συγγένειας όπως αναγράφεται στην *παράγραφο 2.7.1*.

2.6. Αναλυτικές Βιοχημικές Μέθοδοι

Οι αναλυτικές βιοχημικές τεχνικές διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα μεθόδων για διαχωρισμό, ταυτοποίηση, ποσοτικοποίηση και λειτουργικό χαρακτηρισμό βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες και το DNA.

2.6.1. Μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών (SDS -PAGE)

Η μέθοδος που επιλέχθηκε για διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος ήταν με Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS – PAGE). Η ηλεκτροφόρηση (electrophoresis) των πρωτεϊνών αποτελεί μια διαδικασία διαχωρισμού των πρωτεϊνών όταν τα δείγματα πρωτεϊνών τοποθετηθούν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και γίνει εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (Berg M.J. *et al.*, 2012). Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες διαχωρίζονται καλά σε μεγάλη συγκέντρωση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Το μείγμα πηκτής διαχωρίζεται σε 2 φάσεις: Running Gel (10% ή 12% ανάλογα με την περίπτωση) και Stacking Gel 5% (Πίνακας 5).

Running Gel	Stacking Gel
H ₂ O	H ₂ O
30% acrylamide mix	30% acrylamide mix
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.0 M Tris (pH 6.8)
10% SDS	10% SDS
10% ammonium persulfate (APS)	10% ammonium persulfate (APS)
TEMED	TEMED

Πίνακας 5. Συστατικά των 2 πηκτών (gel), Running και Stacking (Joubert O. *et al.*, 2016)

Απαραίτητο είναι το 10% SDS να θερμανθεί και τα συστατικά APS και TEMED προστίθενται τελευταία έτσι ώστε να πήξει το μείγμα. Στην συσκευή ηλεκτροφόρησης πρώτα εκχύνεται το Running Gel και στη συνέχεια από πάνω το Stacking Gel μαζί με τα κτενάκια διαχωρισμού για φόρτωση των δειγμάτων. Στο δοχείο ηλεκτροφόρησης τοποθετείται εσωτερικά το Running Buffer 1x με pH 8.3 (Unused) και εξωτερικά το Running Buffer 1x με pH 8.3 (Used). Στα δείγματα προστίθεται Loading Buffer πριν φορτωθούν στην πηκτή και θερμαίνονται στους 95°C σε heatblock. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό για εφαρμογή δυναμικού (συνήθως 120V). Ο marker που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις πηκτές πολυακρυλαμιδίου φαίνεται στην *Εικόνα 9*.

Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης της πηκτής πολυακρυλαμιδίου ακολουθεί μια σειρά από βήματα για χρώση της πηκτής με Coomassie Blue Dye. Τα βήματα έχουν ως εξής:

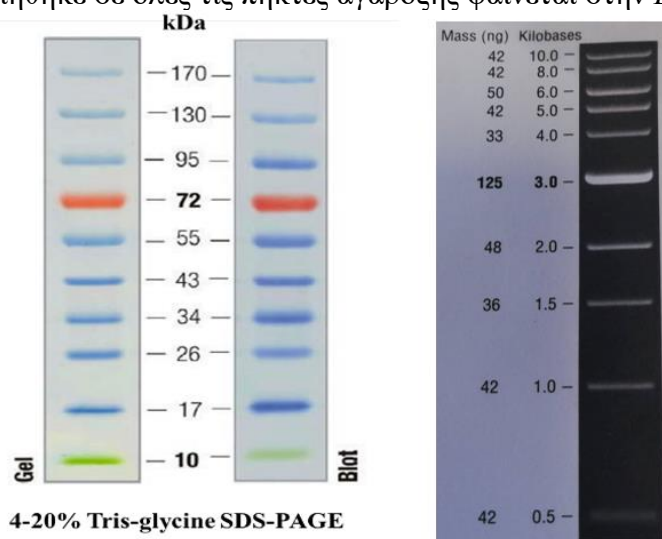
- Εμβάπτιση πηκτής σε 10% (v/v) Οξικό οξύ
- Θέρμανση πηκτής (Microwave)

- Απόρριψη οξικού οξέος
- Εμβάπτιση σε χρωστική Coomassie Blue
- Ανάδευση για 15 λεπτά της πηκτής μαζί με την χρωστική
- Απόρριψη της χρωστικής
- Ξέπλυμα επί τρεις φορές της πηκτής με 10% (v/v) Οξικό οξύ

Μετά την διαδικασία αυτή είναι πλέον εμφανής οι ζώνες πάνω στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.6.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή Αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel) είναι μια μέθοδος για το διαχωρισμό θραυσμάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος (Davis, L. G. et al., 1986). Η πηκτή αγαρόζης είναι πιο πορώδης από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου και γι' αυτό χρησιμοποιείται για διαχωρισμό μεγαλύτερων θραυσμάτων. Τα μικρά σε μέγεθος θραύσματα μεταναστεύουν ταχύτερα από τα μεγαλύτερα. Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα με συγκέντρωση αγαρόζης (0,8% και 1%) κατάλληλη για το μέγεθος των θραυσμάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν μαζί με το κατάλληλο ρυθμιστικό (TAE (pH 8,3) = Tris base, Acetic acid, EDTA) και την χρωστική (SYBR Green). Το μείγμα πηκτής τοποθετείται στην συσκευή για να πήξει και στην συνέχεια εισάγονται τα δείγματα στα οποία έχει πριν προστεθεί Loading Buffer. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό για εφαρμογή δυναμικού (συνήθως 80-90V). Ο marker που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις πηκτές αγαρόζης φαίνεται στην *Εικόνα 9*.



Εικόνα 9. Αριστερά παρουσιάζεται ο marker που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τις πηκτές πολυακρυλαμιδίου με τις ζώνες και τα αντίστοιχα kilodalton (kDa). Δεξιά παρουσιάζεται ο marker που χρησιμοποιήθηκε σε πηκτή Αγαρόζης με τις ζώνες και τις αντίστοιχες κιλοβάσης (kb).

2.6.3. pH Solubility Screen: Δοκιμές διαφορετικών pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης

Για την διερεύνηση του βέλτιστου pH ρυθμιστικού διαλύματος λύσης το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για λύση των βακτηριακών κυττάρων και θα βοηθήσει στην εμφάνιση της πρωτεΐνης-στόχου STBD1 στο διαλυτό μέρος κατασκευάστηκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα λύσης (Πίνακας 6). Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα B834pLysS τα οποία είχαν αποθηκευτεί στους -20°C μετά από Large Scale Expression Test. Για κάθε 1μl από τα B834pLysS προστέθηκαν 200μl από ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Άρα συνολικά είχαμε 8 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης προς μελέτη. Πρώτα έγινε διαλυτοποίηση των κυττάρων σε vortex και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν υπέρηχοι έτσι ώστε να διασπαστούν τα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος, γίνεται φυγοκέντρηση (20000g, 4°C , 30 λεπτά). Μετά την

φυγοκέντρωση το υπερκείμενο αποτελείται από τα υδατοδιαλυτά (Soluble) συστατικά ενώ το ίζημα (Pellet) από αδιάλυτα κυτταρικά συστατικά. Με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE διαχωρίστηκαν οι πρωτεΐνες που είναι υδατοδιαλυτές.

Lysis Buffer	CH ₃ COONa	MES	Tris-HCl	NaCl	EDTA	Lysozyme
5N (pH 5)	50mM	-	-	50mM	5mM	1 mg/ml
6N (pH 6)	-	50mM	-	50mM	5mM	1 mg/ml
7N (pH 7)	-	-	50mM	50mM	5mM	1 mg/ml
8N (pH 8)	-	-	50mM	50mM	5mM	1 mg/ml
9N (pH 9)	-	-	50mM	50mM	5mM	1 mg/ml

Πίνακας 6. Στον πίνακα αναγράφονται τα ρυθμιστικά διαλύματα λύσης κυττάρων (Lysis Buffer) και οι συγκεντρώσεις των συστατικών από τις οποίες αποτελούνται. CH₃COONa=Οξικό Νάτριο. MES= 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, EDTA= Ethylenediaminetetraacetic acid.

2.6.4. Λύση Κυττάρων με Sonication και ρυθμιστικά διαλύματα λύσης

Η κυτταρική λύση είναι το πρώτο βήμα της διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης που επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών, των νουκλεϊκών οξέων και άλλων μορίων μέσα στα κύτταρα. Όταν η λύση των κυττάρων είναι επιτυχής, το άθικτο περιεχόμενο του κυττάρου διαφεύγει μέσω της κατεστραμμένης κυτταρικής μεμβράνης.

Ηχητική επεξεργασία (Sonication) είναι η διαδικασία χρήσης υπερήχων μεγαλύτερη από 20 kHz. Μια συσκευή υπερήχων διασπά τα κύτταρα, δημιουργώντας δονήσεις οι οποίες προκαλούν μηχανική λύση της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά την λύση κυττάρων με υπέρηχους η ενέργεια που απελευθερώνεται επηρεάζει την κυτταρική μεμβράνη και η μεμβράνη καταστρέφεται ανεπανόρθωτα. Η λύση των κυττάρων με υπέρηχους είναι ένα παράδειγμα μηχανικής διάσπασης που χρησιμοποιείται για την απελευθέρωση του περιεχομένου των κυττάρων.

Εκτός από τους υπέρηχους, χρησιμοποιήθηκαν και πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης, τα οποία βοήθησαν στην διάσπαση των κυττάρων. Τα συστατικά από τα οποία αποτελείται ένα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης είναι κυρίως άλατα όπως Tris-HCl, CH₃COONa και ιοντικά άλατα όπως NaCl για την καλύτερη ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Στη παρούσα εργασία στα ρυθμιστικά διαλύματα λύσης προστέθηκαν και άλλα συστατικά όπως η γλυκερόλη και το MTG τα οποία προσδίδουν σταθερότητα, EDTA ο οποίος είναι ένας χηλικός παράγοντας που δεσμεύει δυσθενή μεταλλικά ιόντα όπως ασβέστιο και μαγνήσιο και έτσι απενεργοποιεί ένζυμα που απαιτούν μεταλλικά ιόντα, MES το οποίο κρατά σταθερό το pH στην τιμή 6. Να σημειωθεί ότι η ρύθμιση του pH των διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης έγινε με πεχάμετρο.

2.6.5. Bradford Assay

Η δοκιμή Bradford αποτελεί μια τεχνική χρωματομετρικού προσδιορισμού για την μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Η Bradford Assay χρησιμοποιεί την χρωστική δέσμευση Coomassie Blue (CB) G-250 και μαζί με το δείγμα πρωτεϊνών απορροφούν σε OD_{595nm} (Optical Density) στο φωτόμετρο (Sapan *et al.*, 1999). Η ένδειξη απορρόφησης στη συνέχεια εισάγεται σε μια μαθηματική εξίσωση για να υπολογιστεί η συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/ml) του δείγματος.

2.6.6. Western Blot

Η τεχνική Western Blot, ή όπως ονομάζεται αλλιώς ανοσοαποτύπωση (immunoblotting), χρησιμοποιεί τρία στοιχεία για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών από ένα σύνθετο μείγμα πρωτεϊνών που εξάγεται από κύτταρα: 1) διαχωρισμός πρωτεϊνών με βάση το μοριακό βάρος τους με SDS-PAGE 12%, 2) μεταφορά σε ένα στερεό υπόστρωμα (μεμβράνη PVDF) και 3) σήμανση πρωτεΐνης στόχου χρησιμοποιώντας ένα κατάλληλο πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα για οπτικοποίηση (Mahmood, T., & Yang, P. C., 2012).

Στο πρώτο βήμα κατασκευάστηκε πηκτική πολυακρυλαμίδης 12% και ετοιμάστηκαν τα δείγματα που θα τρέξουν σε αυτή. Για κάθε 20μl δείγματος προστέθηκαν 10μl Loading Buffer. Στην πηκτική φορτώσαμε 17μl από κάθε δείγμα, τα οποία προέκυψαν από χρωματογραφία με στήλη GST ως κλάσματα Elution που είχαν την μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Να σημειωθεί ότι οι ποσότητες των πρωτεϊνών από τα κλάσματα Elution μετρήθηκαν με τη μέθοδο Bradford. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό που παρείχε δυναμικό ίσο με 120V.

Στο δεύτερο βήμα γίνεται η μεταφορά των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene Difluoride membrane). Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Εμβάπτιση μεμβράνης PVDF σε 100% (v/v) Methanole για 30 δευτερόλεπτα
- Εμβάπτιση μεμβράνης 6 filter papers και πηκτικής πολυακρυλαμίδης σε Transfer Buffer
- Μεταφορά μεμβράνης PVDF σε δοχείο με Transfer Buffer
- Κατασκευή transfer sandwich (3 filter buffers με Transfer Buffer, μεμβράνη PVDF, πηκτική πολυακρυλαμίδης, 3 filter buffers με Transfer Buffer). Σημαντικό είναι να μην υπάρχουν φυσαλίδες κατά την συναρμολόγηση του transfer sandwich.
- Εφαρμογή δυναμικού 27 Amp για 40 λεπτά

Μετά την μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική στην μεμβράνη PVDF, η μεμβράνη PVDF εμβαπτίζεται σε χρωστική Ponceau και στη συνέχεια ξεπλένεται με νερό. Ακολούθως έρχεται η σειρά της διαδικασίας Blocking. Στην διαδικασία αυτή εμβαπτίζεται η μεμβράνη PVDF σε Blocking Buffer που περιέχει 5% (v/v) γάλα σε TBST (Tris Buffer Saline-Tween) για 1 ώρα υπό ανάδευση. Μετά την 1 ώρα γίνεται προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος κουνελιού έναντι του GST-Tag (α-GST, rabbit, 1:1000) και μαζί με το Blocking Buffer η μεμβράνη PVDF κλείνεται μέσα σε σελοφάν και επώάζεται για 16 ώρες, υπό ανάδευση στους 4°C. Μετά το πέρας των 16 ωρών ξεπλένεται η μεμβράνη PVDF με TBST 3 φορές ανά 5 λεπτά έτσι ώστε να απομακρυνθεί το περιττό πρωτογενές αντίσωμα και γίνεται προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ένα anti-rabbit αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει τμήμα του πρωτογενούς αντισώματος και προσδένεται σε αυτό. Επίσης το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με ειδικό ένζυμο που δίνει σήμα κατά την εμφάνιση της μεμβράνης. Η μεμβράνη PVDF επώάζεται μαζί με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα υπό ανάδευση και στη συνέχεια ξεπλένεται με TBST 3 φορές ανά 5 λεπτά έτσι ώστε να απομακρυνθεί το περιττό δευτερογενές αντίσωμα.

Τέλος έγινε η εμφάνιση της μεμβράνης με τη χρωματομετρική ανίχνευση κατά την οποία γίνεται προσθήκη υποστρώματος του ειδικού ενζύμου που είναι συζευγμένο με το δευτερογενές αντίσωμα και έτσι προκύπτει ανάλογο σήμα.

2.7. Παρασκευαστικές μέθοδοι

Οι παρασκευαστικές μέθοδοι είναι μια κατηγορία τεχνικών καθαρισμού βιομορίων και κυρίως των πρωτεϊνών. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι το κύριο εργαλείο καθαρισμού και ανάλυσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιούν μια κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι υγρή ή αέρια και μία στατική φάση η οποία είναι υγρή ή στερεή. Στην παρούσα εργασία

εφαρμόστηκαν τόσο η χρωματογραφία συγγένειας όσο και η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.

2.7.1. Χρωματογραφία συγγένειας με στήλη GST

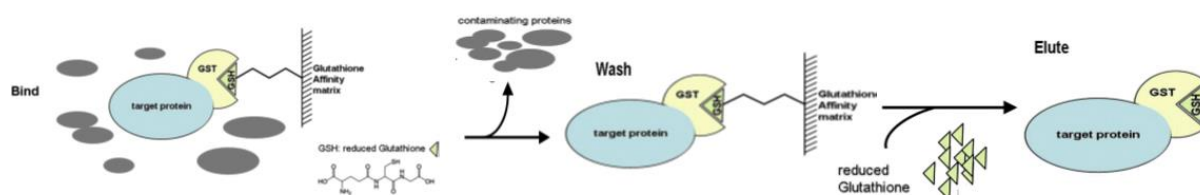
Η μέθοδος της χρωματογραφίας συγγένειας εκμεταλλεύεται τη χημική συγγένεια ορισμένων πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Στην δικιά μας περίπτωση η συγγένεια που υπήρχε ήταν μεταξύ της ετικέτας GST (συνεκφράζεται με STBD1) και της στήλης GST η οποία περιέχει το τριπεπτιδίο πρόσδεσης της GST, την γλουταθειόνη (GSH). Η επισημασμένη με GST πρωτεΐνη συνδέεται ειδικά με την γλουταθειόνη που βρίσκεται ακινητοποιημένη σε μήτρα (π.χ. αгарόζη) και μπορεί εύκολα να διαχωριστεί με μια διαδικασία δέσμευσης-έκπλυσης (Schäfer F. *et al.*, 2015). Τα στάδια Δέσμευσης-Έκπλυσης-Έκλουσης αναγράφονται στην *Εικόνα 10*. Η έκλυση των προσδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών, γίνεται με ανταγωνισμό από περίσσεια της ανταγωνιστικής χημικής ομάδας που στην περίπτωση εδώ είναι η GSH. Για την διαδικασία χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ρυθμιστικά διαλύματα (*Πίνακας 7*). Τα Buffers πριν την χρήση τους φιλτραρίστηκαν σε χαρτί φιλτράριματος 0,4μm και μετά πέρασαν από μηχανήμα για απαέρωση για 30 λεπτά.

Η στήλη χρωματογραφίας GSH τοποθετείται σε αυτοματοποιημένη συσκευή καθαρισμού Akta (Akta Purification System) η οποία είναι αποθηκευμένη σε αιθανόλη. Για να απομακρύνουμε την αιθανόλη και να ετοιμάσουμε το σύστημα και την στήλη για καθαρισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε το Buffer A1 (pH 8). Όταν η στήλη εξισορροπηθεί, προσθέτουμε το δείγμα πρωτεϊνών το οποίο περνά από την στήλη με flow 0,5ml/min. Ακολουθεί Έκπλυση (Wash) της στήλης με Buffer A1 (pH 8) και συλλέγονται τα αντίστοιχα κλάσματα που θεωρητικά περιέχουν τις πρωτεΐνες οι οποίες δεν δεσμεύτηκαν. Έπειτα γίνεται Έκλυση (Elution) με το Buffer B1 (pH 8) και συλλέγονται τα αντίστοιχα κλάσματα που θεωρητικά περιέχουν τις πρωτεΐνες οι οποίες είχαν δεσμευτεί στη στήλη. Τα Buffer A2 (pH 8,5) και B2 (pH 8,5) χρησιμεύουν στον καθαρισμό του συστήματος Akta.

Τα δείγματα πρωτεϊνών πριν περάσουν από την στήλη συγγένειας επεξεργάζονται με 1μl Βενζονάσης και φυγοκεντρώνται (25000g, 4°C, 40 λεπτά) για την απομάκρυνση DNA και RNA. Μετά την φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέγεται και περνάει από φίλτρο.

Συστατικά	Buffer A1 (pH 8)	Buffer B1 (pH 8)	Buffer A2 (pH 8,5)	Buffer B2 (pH 8,5)
Tris-HCl	50mM	50mM	0,1M	-
NaCl	200mM	50mM	0,5M	0,5M
Glycerol	5%	5%	-	-
MTG	0,1%	0,1%	-	-
GSH	-	20mM	-	-
CH ₃ COONa	-	-	-	0,1M

Πίνακας 7. Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers) που χρησιμοποιήθηκαν για την Χρωματογραφία Συγγένειας.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της χρωματογραφίας συγγένειας με σταθερό προσδέτη την γλουταθειόνη (GSH). Στάδιο Bind (δέσμευσης): Οι πρωτεΐνες σύντηξης με την ετικέτα GST, που περιέχονται σε ένα καθαρισμένο προϊόν λύσης συνδέονται με την ακινητοποιημένη GSH. Στάδιο Wash (έκπλυσης): Οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν εκπλένονται από τη μήτρα. Στάδιο Elute (έκλουσης): Οι

πρωτεΐνες σύντηξης GST που δεσμεύτηκαν, εκκλούνται από το υπόστρωμα με την προσθήκη περίσσειας GSH (έκλυση) (Schäfer F. et al., 2015).

2.7.2. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Cation)

Ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με τη χρήση της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής βασίζεται κυρίως στις διαφορές των ιοντικών ιδιοτήτων των αμινοξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης (Jungbauer, A. et al., 2009). Σε συγκεκριμένο pH, μια πρωτεΐνη διαθέτει ένα συνολικό καθαρό φορτίο. Το pH, όπου τα θετικά φορτία ισοδυναμούν με τα αρνητικά φορτία καθορίζει το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) αυτής. Σε χαμηλότερο pH, το καθαρό φορτίο θα είναι πιο αρνητικό. Στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, όταν διαχωρίζουμε μια πρωτεΐνη, της οποίας το ισοηλεκτρικό σημείο είναι γνωστό (pI STBD1=5.5) και το ρυθμιστικά διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων έχει υψηλότερο pH (pH 8) τότε η πρωτεΐνη διαθέτει αρνητικό φορτίο. Για το λόγο αυτό στην συγκεκριμένη περίπτωση η στήλη θα είναι κατιοανταλλαγής έτσι ώστε να μπορεί να δεσμευτεί με το αντίθετο φορτίο της πρωτεΐνης-στόχου.

Η στήλη χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής τοποθετείται σε αυτοματοποιημένη συσκευή καθαρισμού Akta (Akta Purification System) όπως γίνεται και στην χρωματογραφία συγγένειας. Για να απομακρύνουμε την αιθανόλη και να ετοιμάσουμε το σύστημα και την στήλη για καθαρισμό πρωτεϊνών χρησιμοποιούμε το Buffer A3 (pH 8). Όταν η στήλη εξισορροπηθεί, προσθέτουμε το δείγμα πρωτεϊνών το οποίο περνά από την στήλη με flow 0,5ml/min. Ακολουθεί Έκπλυση (Wash) της στήλης με Buffer A3 (pH 8) (Πίνακας 8) και συλλέγονται τα αντίστοιχα κλάσματα που θεωρητικά περιέχουν τις πρωτεΐνες οι οποίες δεν δεσμεύτηκαν. Έπειτα γίνεται Έκλυση (Elution) με το Buffer B3 (pH 8) το οποίο διαθέτει αυξημένη συγκέντρωση άλατος (NaCl) και συλλέγονται τα αντίστοιχα κλάσματα που θεωρητικά περιέχουν τις πρωτεΐνες οι οποίες είχαν δεσμευτεί στη στήλη.

Συστατικά	Buffer A3 (pH 8)	Buffer B3 (pH 8)
Tris-HCl	50mM	50mM
NaCl	-	1M
Glycerol	5%	5%
MTG	0,1%	0,1%

Πίνακας 8. Ρυθμιστικά διαλύματα (Buffers) που χρησιμοποιήθηκαν για την Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής.

3. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

3.1. Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα αρχικά δεδομένα από τις βιοπληροφορικές πηγές αφορούσαν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της STBD1 με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων της. Για την αμινοξική αλληλουχία της STBD1 και την αμινοξική αλληλουχία της STBD1 μαζί με την ετικέτα GST και την περιοχή HRV 3C, το εργαλείο ProtParam - ExPASy έδωσε τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Οι αρνητικές τιμές GRAVY αντιπροσωπεύουν ότι η πρωτεΐνη προς μελέτη δεν είναι υδρόφοβη. Οι τιμές Instability index μεγαλύτερες από 40 δείχνουν την αστάθεια της πρωτεΐνης προς μελέτη. Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 συμπεραίνεται θεωρητικά ότι η πρωτεΐνη STBD1 είναι υδρόφοβη και ασταθής.

Χαρακτηριστικά	STBD1	GST-Tag - STBD1 – HRV 3C site
Μοριακό Βάρος	390007,27 Da	66073,71 Da
Ισοηλεκτρικό φορτίο (pI)	5,46	5,5
GRAVY	-0,538	-0,451
Instability Index	47,01	42,32

Πίνακας 9. Αποτελέσματα από ProtParam - ExPASy για την πρωτεΐνη STBD1 και την αμινοξική αλληλουχία της STBD1 μαζί με την ετικέτα GST και την περιοχή HRV 3C.

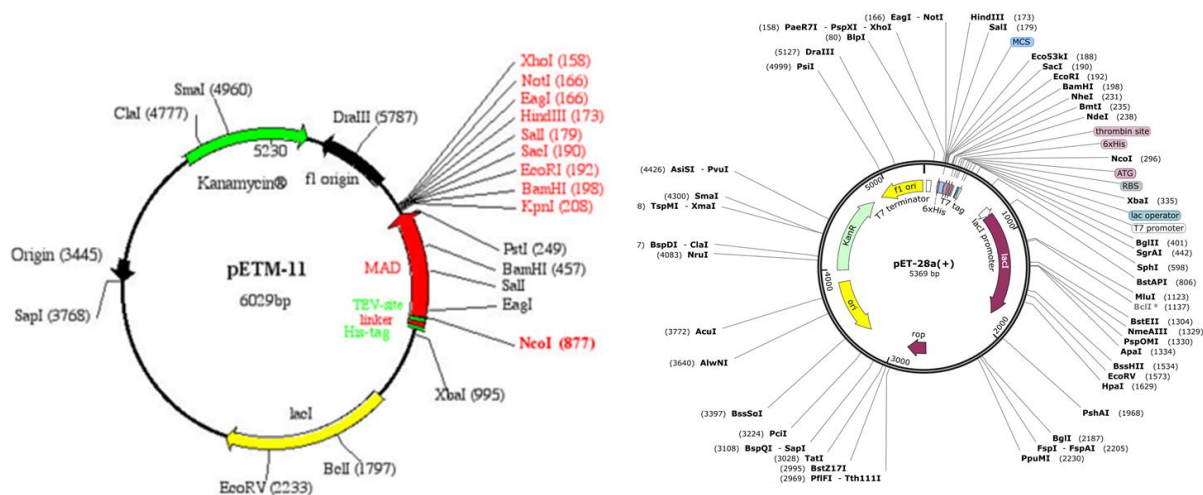
Το iTasser, μετά την εισαγωγή της αλληλουχίας αμινοξέων της πρωτεΐνης STBD1, έδωσε 5 πιθανά μοντέλα τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Στην *Εικόνα 11* φαίνεται η πιθανότερη δομή που μπορεί να έχει η STBD1 με $C_{score} = -0,65$. Εκτός από τρισδιάστατα μοντέλα το iTasser δίνει πληροφορίες και για την προβλεπόμενη δευτερογενής δομή. Για την STBD1 φαίνεται να υπερτερούν τα μοτίβα coil από τα β -strands και σε λιγότερο ποσοστό οι έλικες. Τα coil δεν διαθέτουν κάποια δομή και οι συνεχόμενες περιοχές coil στην πρωτεΐνη συνήθως υποδηλώνουν μη δομημένες/διαταραγμένες περιοχές (Roy *et al.*, 2011) όπως συμβαίνει και για την STBD1.



Εικόνα 11. Πιθανή τρισδιάστατη δομή της STBD1 με βάση το iTasser

3.2. Subcloning

Εκτός από την έκφραση του γονιδίου στόχου από το *pGEX-6P-1*, χρησιμοποιήθηκαν ακόμη 2 πλασμιδιακοί φορείς με διαφορετικές ετικέτες μεταφοράς της πρωτεΐνης-στόχου (STBD1): *pETM-11* και *pET-28a* (*Εικόνα 12*). Στον *Πίνακα 10* παρουσιάζονται οι μετρήσεις από το NanoDrop για την συγκέντρωση του *pGEX-6P-1* που χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των κυττάρων XL1-Blue.



Εικόνα 12. Αριστερά παρουσιάζεται ο πλασμιδιακός χάρτης του *pETM-11* (Dümmmler et al., 2005) και δεξιά παρουσιάζεται ο πλασμιδιακός χάρτης *pET-28a* (από SnapGene).

Πλασμιδίο ή DNA	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260nm/280nm
<i>pGEX-6P-1</i> (1)	336	1,8
<i>pGEX-6P-1</i> (2)	418,3	1,63

Πίνακας 10. Οι συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού DNA *pGEX-6P-1* μετά από απομόνωση του από κύτταρα *XL1-Blue*.

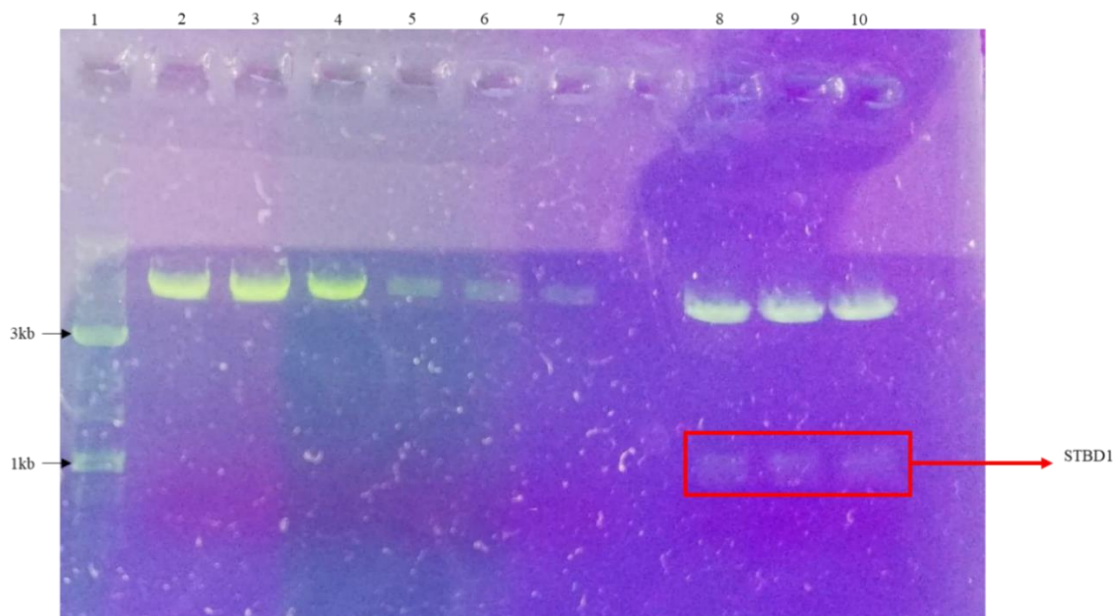
3.3. Πέψη πλασμιδίων και σύνδεση με γονίδιο στόχο

Η πέψη των 3 πλασμιδίων: *pGEX-6P-1*, *pETM-11* και *pET-28a*, έγινε με τα περιοριστικά ένζυμα *BamHI/XhoI* και στη συνέχεια πέρασαν από πηκτή αγαρόζης 0,8% που περιείχε TAE Buffer (pH 8,3) και SYBR Green Dye (Εικόνα 13). Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό που παρείχε στην πηκτή αγαρόζης δυναμικό ίσο με 90V.

Στην πηκτή αγαρόζης που φαίνεται στην Εικόνα 13, εμφανίζεται ο διαχωρισμός των 3 πλασμιδίων και σύμφωνα με τον μάρτυρα εμφανίζονται κοντά στις αναμενόμενες kb, όπως και το γονίδιο της STBD1.

Οι ζώνες που εμφανίζονται στην πηκτή αγαρόζης (Εικόνα 13) κόπηκαν με DNA extraction from agarose gel kit και οι συγκεντρώσεις τους μετρήθηκαν από το NanoDrop και εμφανίζονται στον Πίνακα 11.

Μετά από επιλογή των καλλιιεργειών που εμφάνισαν περισσότερες αποικίες και την ανάπτυξη αυτών σε υγρές καλλιιεργειες με θρεπτικό 2YT Broth, απομονώθηκαν τα πλασμιδιακά DNA με kit και στη συνέχεια μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους μέσω του NanoDrop (Πίνακας 12). Παρατηρείται ότι οι λόγοι 260nm/280nm αποκλίνουν από την επιθυμητή τιμή (1,8) και ότι την υψηλότερη συγκέντρωση DNA (159 ng/μl) την διαθέτει το κλάσμα *pETM-11* 3:1 (2).



Εικόνα 13. Διαχωρισμός πλασμιδιακού DNA και γονιδίου που εκφράζει την STBD1 μέσω πηκτής αгарόζης 0,8%. 1:Marker (N0468S), 2-4:Πλασμίδιο pET-28α, 5-7:Πλασμίδιο pETM-11, 8-10: Πλασμίδιο pGEX-6P-1 και γονίδιο που εκφράζει STBD1.

Πλασμίδιο ή DNA	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260nm/280nm
pET-28α	48,5	1,8
pETM-11	40,4	1,8
STBD1 γονίδιο	58	1,8

Πίνακας 11. Οι συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού DNA pET-28α, pETM-11 και του γονιδίου STBD1 μετά από απομόνωση από κύτταρα XL1-Blue και DH5α.

Πλασμίδιο	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260nm/280nm
pET-28α 5:1	75,2	1,7
pETM-11 2:1	66,6	1,6
pETM-11 3:1 (1)	101,3	1,6
pETM-11 3:1 (2)	159	1,6
pETM-11 5:1 (1)	96	1,3
pETM-11 5:1 (2)	76,4	1,6

Πίνακας 12. Οι συγκεντρώσεις του πλασμιδιακού DNA pET-28α (5:1), pETM-11 (2:1), 3:1 και 5:1 μετά από απομόνωση από υγρές καλλιέργειες κυττάρων XL1-Blue και DH5α.

Επίσης εκτός από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των πλασμιδιακών DNA, τα δείγματα που αναγράφονται στον Πίνακα 12 ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 14) που περιείχε TAE Buffer (pH 8,3) και SYBR Green Dye. Στην πηκτή αυτή συμπεριλήφθηκαν και άδειοι (empty) φορείς *pETM-11* και *pET-28a* δηλαδή που δεν διέθεταν το γονίδιο της STBD1. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέθηκε με τροφοδοτικό που παρείχε στην πηκτή αгарόζης δυναμικό ίσο με 80V.

Στην πηκτή αгарόζης που φαίνεται στην Εικόνα 14, παρατηρείται ότι στο κλάσμα 2 που έχει το πλασμιδίο *pETM11 5:1 (1)* εμφανίζεται μια ζώνη (κόκκινο πλαίσιο) κοντά στις αναμενόμενες kb του πλασμιδίου αυτού το οποίο επεξεργάστηκε με digestion και ligation. Από τον Πίνακα 12 όμως φαίνεται ότι το κλάσμα αυτό έχει αρκετά χαμηλό λόγο $260_{nm}/280_{nm}$. (1,3) και συγκέντρωση DNA ίση με 96 ng/μl.



Εικόνα 14. Πηκτή αгарόζης 1% για διάκριση πλασμιδιακού DNA. M ως Marker (N0468S), 1:*pETM-11 5:1 (2)*, 2:*pETM-11 5:1 (1)*, 3:*pETM-11 3:1 (2)*, 4:*pETM-11 3:1 (1)*, 5:*pETM-11 2:1*, 6:*empty pETM-11*, 7:*empty pET-28a*, 8:*pET-28a 5:1*.

3.4. Αλληλούχιση των υποκλωνοποιημένων *pET-28a* και *pETM-11*

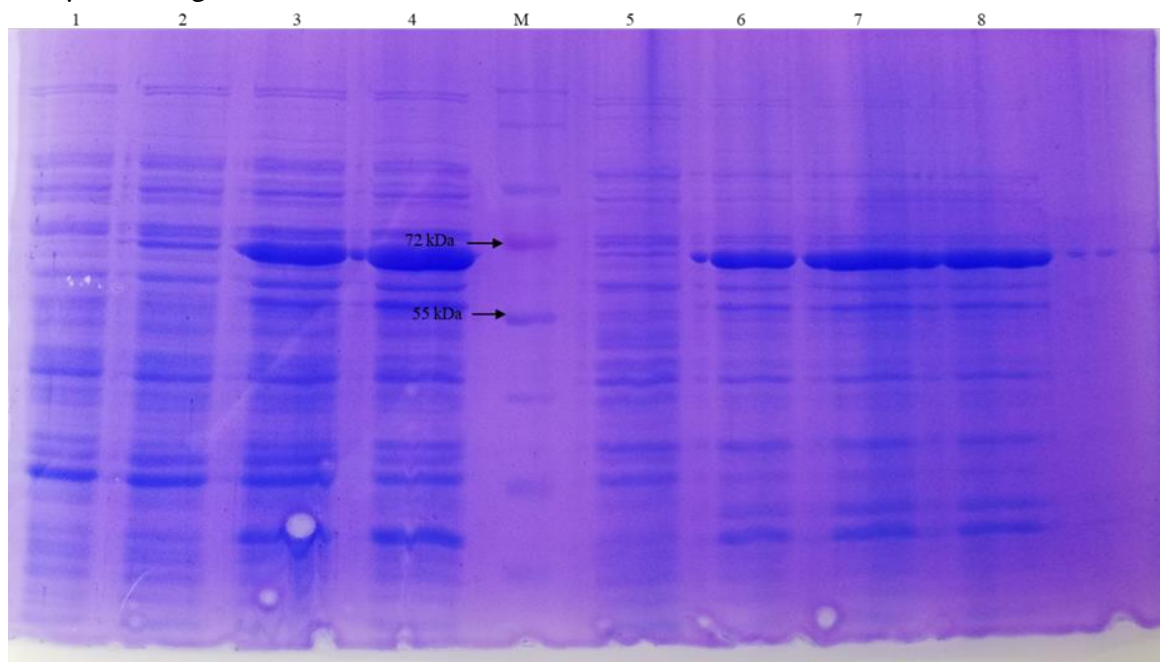
Για να διαπιστωθεί εάν έγινε η προσθήκη του γονιδίου της STBD1 στους Subcloned φορείς *pET-28a* και *pETM-11*, έχουν σταλθεί τα δείγματα που πέρασαν από την πηκτή αгарόζης 1% που φαίνεται στην Εικόνα 14 για αλληλούχιση. Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές με τις αντίστοιχες αλληλουχίες τους:

- A) frw1 seq STBD1: ATGGGGGCTTCCAGAG (19 nts)
- B) frw2 seq STBD1: TGAGTGGAAATTTGTGCTGG (20 nts)
- Γ) rev seq STBD1: CTTTCGCGCTGATTTCTT (18 nts)

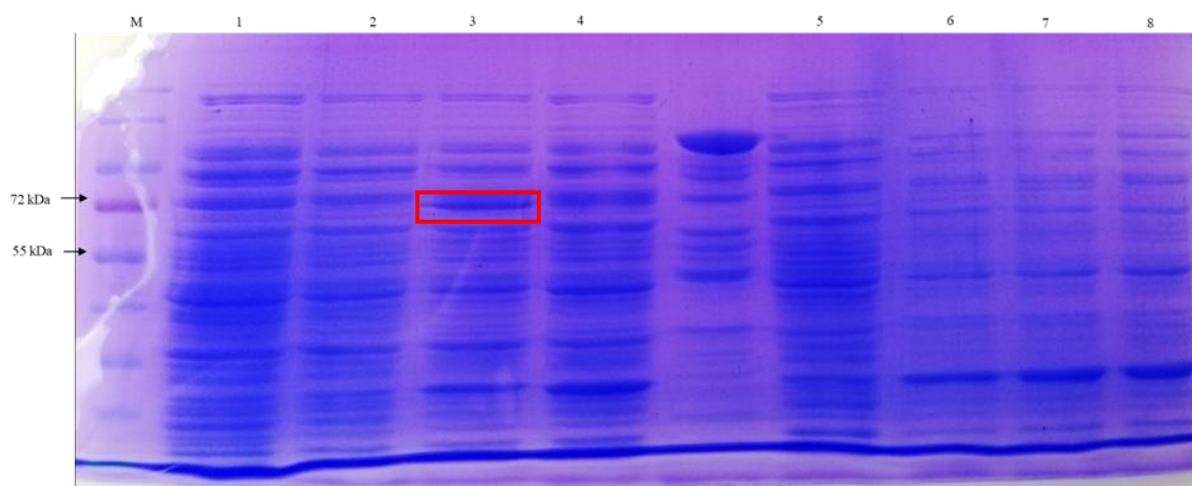
3.5. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα BL21 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG

Η πρώτη προσπάθεια έκφρασης της πρωτεΐνης STBD1 έγινε σε βακτηριακά κύτταρα BL21. Σε συνέχεια του πειράματος που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.3., κύτταρα BL21 αναπτύχθηκαν σε 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις του IPTG. Τα αποτελέσματα μετά την λύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (pH 8) που περιείχε 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% (v/v) Glycerol και 0,1% (v/v) MTG, φαίνονται στα SDS-PAGE τόσο για τις ολικές πρωτεΐνες (Total proteins, *Εικόνα 15*) όσο και για τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στο διαλυτό μέρος (Soluble proteins, *Εικόνα 16*). Οι φωτομετρικές τιμές από την απορρόφηση των καλλιεργειών BL21 σε OD_{600nm} για να ελέγξουμε αν έχουν φθάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης, ήταν 0,246 (μετά από 2 ώρες επώασης) και 0,493 (μετά από ακόμη 30 λεπτά).

Τα δείγματα Total ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 4μl Total + 36μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης + 10μl Loading Buffer. Τα δείγματα Soluble προκύπτουν μετά από φυγοκέντρηση (20000g, 4°C, 30 λεπτά) της υπόλοιπη ποσότητας Total και την συλλογή του υπερκείμενου. Τα δείγματα Soluble ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 40μl Soluble + 10μl Loading Buffer.



Εικόνα 15. Έκφραση των ολικών πρωτεϊνών σε κύτταρα BL21 στους 18°C για 16 ώρες και 37°C για 3 ώρες. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας (15μl) γνωστού μοριακού βάρους., 1:Χωρίς προσθήκη IPTG στους 18°C, 2: +0,1mM IPTG στους 18°C, 3: +0,5mM IPTG στους 18°C, 4: +1,0mM IPTG στους 18°C, 5:Χωρίς προσθήκη IPTG στους 37°C, 6:+0,1mM IPTG στους 37°C, 7: +0,5mM IPTG στους 37°C, 8:+1,0mM IPTG στους 37°C.



Εικόνα 16. Έκφραση των διαλυτών πρωτεϊνών σε κύτταρα BL21 στους 18°C και 37°C. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας (15μl) γνωστού μοριακού βάρους. 1:Χωρίς προσθήκη IPTG στους 18°C, 2:+0,1mM IPTG στους 18°C, 3:+0,5mM IPTG στους 18°C, 4:+1,0mM IPTG στους 18°C, 5:Χωρίς προσθήκη IPTG στους 37°C, 6:+0,1mM IPTG στους 37°C, 7:+0,5mM IPTG στους 37°C, 8:+1,0mM IPTG στους 37°C.

Από την πηκτική πολυακρυλαμίδης που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 16* παρατηρείται ότι σε όλα τα κλάσματα εμφανίζεται μια ζώνη κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος του πρωτεϊνικού προϊόντος (STBD1). Στο 3^ο κλάσμα όμως εμφανίζεται μια πιο έντονη ζώνη (κόκκινο πλαίσιο). Το 3^ο κλάσμα προέρχεται από τα κύτταρα BL21 τα οποία επώαστηκαν στους 18°C για 16 ώρες και έγινε επαγωγή έκφρασης της STBD1 με προσθήκη 0,5mM IPTG. Από το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται ότι ίσως η βέλτιστη συγκέντρωση IPTG για έκφραση της STBD1 είναι 0,5mM.

Ταυτόχρονα με την καλλιέργεια των κυττάρων BL21, έγινε και ανάπτυξη κυττάρων XL1-Blue για κλωνοποίηση του πλασμιδίου *pGEX-6P-1*. Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA από τα κύτταρα XL1-Blue μετρήθηκε από το NanoDrop και οι μετρήσεις που λήφθηκαν φαίνονται στον *Πίνακα 13*. Η μετρηση έγινε από 2 καλλιέργειες XL1-Blue για επαλήθευση των τιμών και τα δείγματα αυτά φυλάχθηκαν στους -20°C.

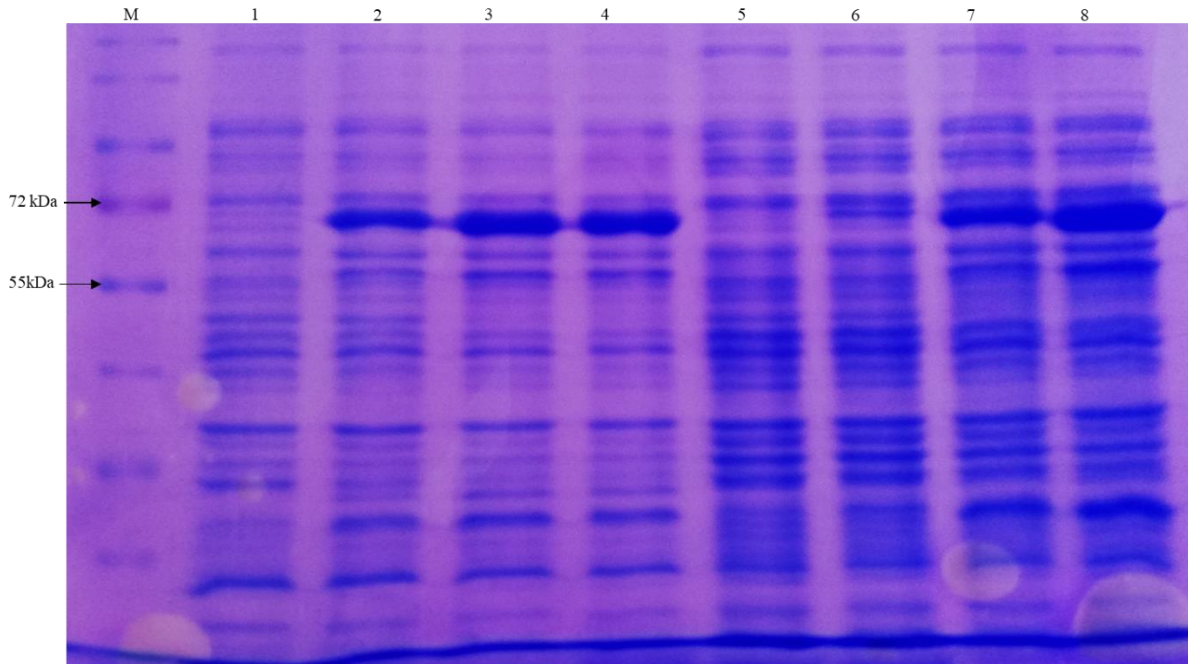
Πλασμιδιακό DNA	Συγκέντρωση (ng/μl)	Λόγος 260/280
<i>pGEX-6P-1</i> (1)	95.3	1,79
<i>pGEX-6P-1</i> (2)	86	1,8

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μετρήσεων NanoDrop μετά από απομόνωση πλασμιδιακού DNA (*pGEX-6P-1*) των XL1-Blue κυττάρων.

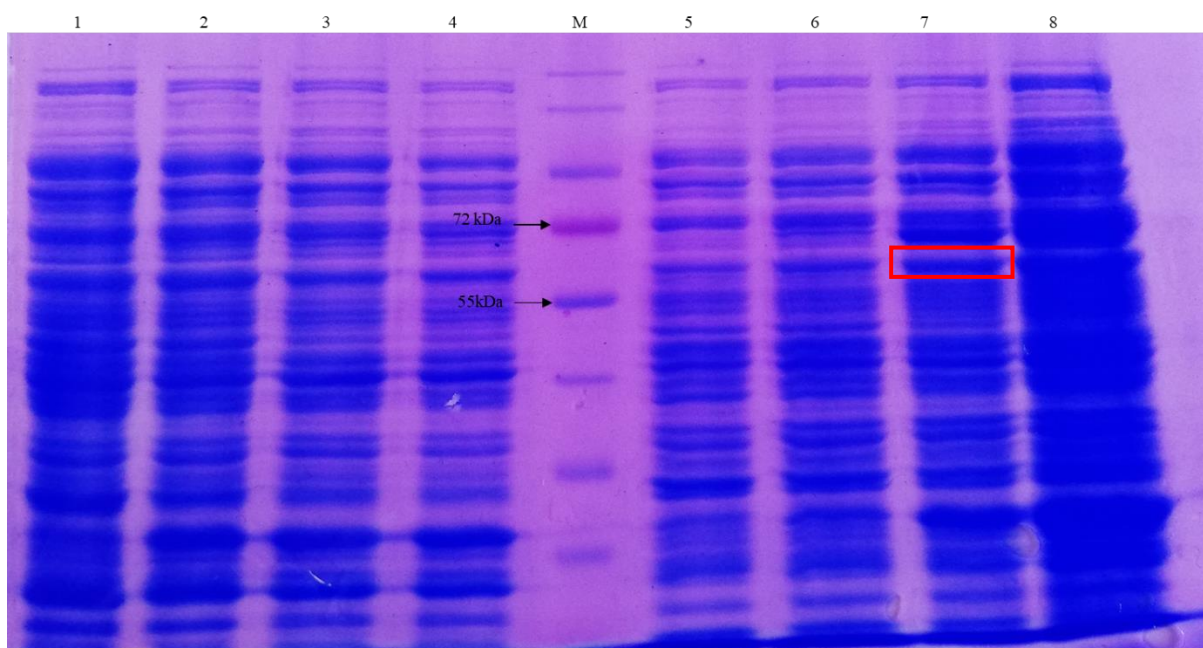
3.6. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG

Σε συνέχεια του πειράματος που περιγράφεται στην *παράγραφο 2.4.4.*, τα δείγματα για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ετοιμάστηκαν ως εξής: Τα δείγματα Total ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 4μl Total + 36μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης + 10μl Loading Buffer. Μετά από φυγοκέντριση (20000g, 4°C, 30 λεπτά) οι διαλυτές πρωτεΐνες (δείγμα Soluble) βρίσκονται στο υπερκείμενο κλάσμα και οι αδιάλυτες στο ίζημα (Pellet). Τα δείγματα Soluble ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 20μl Soluble + 5μl Loading Buffer. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην *Εικόνα 17* για τις Total πρωτεΐνες και στην *Εικόνα 18* για τις Soluble πρωτεΐνες.

Από την πηκτή πολυακρυλαμίδης που παρουσιάζεται στην *Εικόνα 20* παρατηρείται ότι σε όλα τα κλάσματα υπάρχει μια έκφραση πρωτεϊνών κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της STBD1. Οι καλύτερες συνθήκες έκφρασης παρατηρούνται στο 7^ο κλάσμα που αντιστοιχεί στις διαλυτές πρωτεΐνες οι οποίες εκφράστηκαν από τα κύτταρα B834pLysS σε συνθήκες 18 °C για 16 ώρες και επαγωγή έκφρασης της STBD1 με προσθήκη 0,5mM IPTG (κοκκίνο πλαίσιο).



Εικόνα 17. Έκφραση των ολικών πρωτεϊνών στους 37°C και 18°C. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Κύτταρα B834pLysS χωρίς προσθήκη IPTG στους 37°C, 2:Κύτταρα B834pLysS +0,1mM IPTG στους 37°C, 3:Κύτταρα B834pLysS +0,5mM IPTG στους 37°C, 4:Κύτταρα B834pLysS +1,0mM IPTG στους 37°C, 5:Κύτταρα B834pLysS χωρίς προσθήκη IPTG στους 18°C, 6:Κύτταρα B834pLysS +0,1mM IPTG στους 18°C, 7:Κύτταρα B834pLysS +0,5mM IPTG στους 18°C, 8:Κύτταρα B834pLysS +1,0mM IPTG στους 18°C.

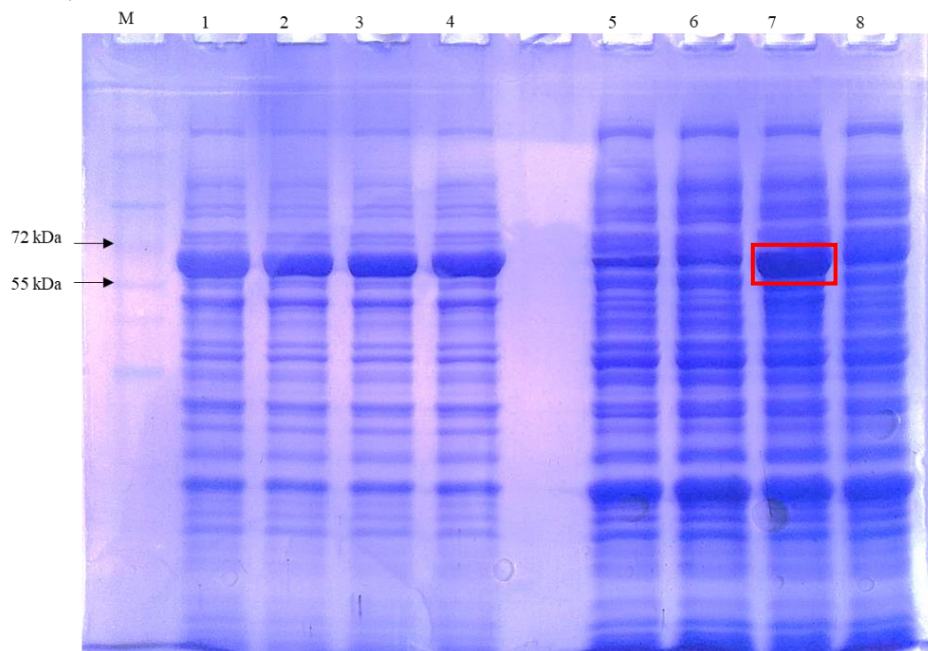


Εικόνα 18. Έκφραση των διαλυτών πρωτεϊνών στους 37°C και 18°C . Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Κύτταρα B834pLysS χωρίς προσθήκη IPTG στους 37°C, 2:Κύτταρα B834pLysS +0,1mM IPTG στους 37°C, 3:Κύτταρα B834pLysS +0,5mM IPTG στους 37°C, 4:Κύτταρα B834pLysS +1,0mM IPTG στους 37°C, 5:Κύτταρα B834pLysS χωρίς προσθήκη IPTG στους 18°C, 6:Κύτταρα B834pLysS +0,1mM IPTG στους 18°C, 7:Κύτταρα B834pLysS +0,5mM IPTG στους 18°C, 8:Κύτταρα B834pLysS +1,0mM IPTG στους 18°C.

3.7. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα Lemo21

Ακολουθώντας το πείραμα έκφρασης που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.5., η λύση των κυττάρων Lemo21 έγινε με 4 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης όπως φαίνονται στον Πίνακα 4. Τα δείγματα Total ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 4μl Total + 36μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης + 10μl Loading Buffer. Η λύση των κυττάρων έγινε με υπερήχους και μετά από φυγοκέντριση (15000g, 4°C, 20 λεπτά) οι διαλυτές πρωτεΐνες (δείγμα Soluble) βρίσκονται στο υπερκείμενο κλάσμα και οι αδιάλυτες στο ίζημα (Pellet). Τα δείγματα Soluble ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 20μl Soluble + 5μl Loading Buffer. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην Εικόνα 19 για τις Total και Soluble πρωτεΐνες.

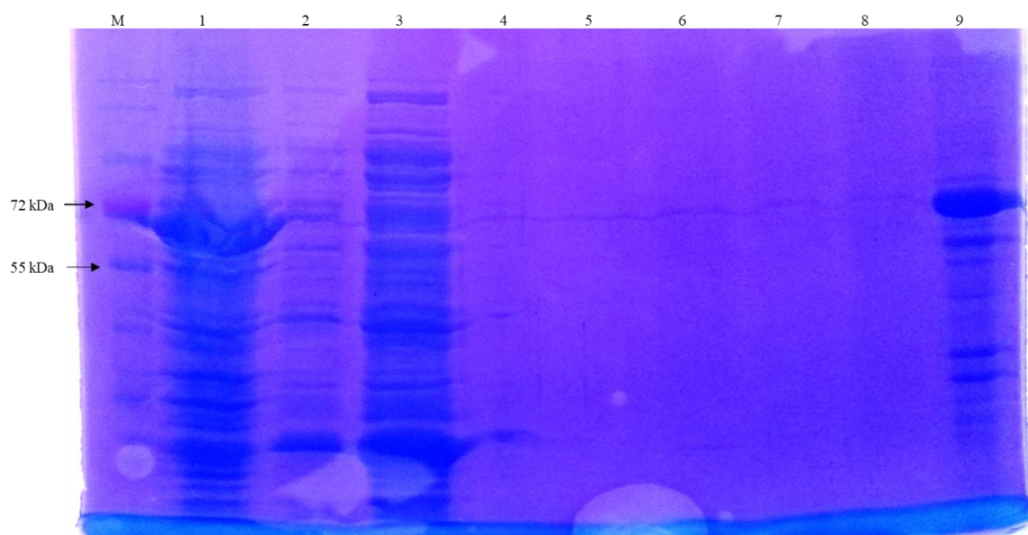
Στην Εικόνα 19 παρατηρείται εμφάνιση ζώνης κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της STBD1 σε όλα τα δείγματα Soluble (κλάσματα 5,6,7,8) αλλά παρατηρείται μια πολύ πιο έντονη ζώνη (κόκκινο πλαίσιο) στο δείγμα όπου επεξεργάστηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris (pH 8,5).



Εικόνα 19. Τεστ διαλυτότητας της πρωτεΐνης STBD1 σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, σε κύτταρα Lemo21 στους 18°C με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Total σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7,5), 2:Total σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 3:Total σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8,5), 4:Total σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5), 5:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7,5), 6:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 7:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8,5), 8:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50 mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5).

3.8. Large Scale Test σε κύτταρα BL21 και καθαρισμός STBD1 με χρωματογραφία συγγένειας

Σε συνέχεια των παραγράφων 2.5.1. και 2.7.1., πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός από δείγμα πρωτεϊνών το οποίο προήλθε από κύτταρα BL21 μεγάλης καλλιέργειας. Για την χρωματογραφία συγγένειας χρησιμοποιήθηκαν Buffer A1 με pH=8 (50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG) και Buffer B1 με pH=8 (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG, 20mM GSH). Τα κλάσματα έκλουσης που λήφθηκαν από τον καθαρισμό, περάστηκαν από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Καθαρισμός STBD1 (GST-Tag) σε συνθήκες έκφρασης 18°C για 16 ώρες σε κύτταρα BL21 και προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων BL21, 2:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε 25000g (Input), 3:Σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (FlowThrough), 4:Σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν (Wash), 5:Κλάσμα έκλουσης 12, 6:Κλάσμα έκλουσης 13, 7:Κλάσμα έκλουσης 14, 8:Κλάσμα έκλουσης 15, 9:Το pellet μετά από φυγοκέντρηση σε 25000g.

Από την Εικόνα 20 και ειδικότερα από τα κλάσματα έκλουσης (12-15) δεν παρατηρείται κάποια έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου όμως στο 9^ο κλάσμα που αποτελεί το Pellet μετά από φυγοκέντρηση των ολικών πρωτεϊνών σε 25000g εμφανίζεται μια ζώνη κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει (STBD1). Με αυτό το αποτέλεσμα συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται αλλά στο αδιάλυτο μέρος (pellet).

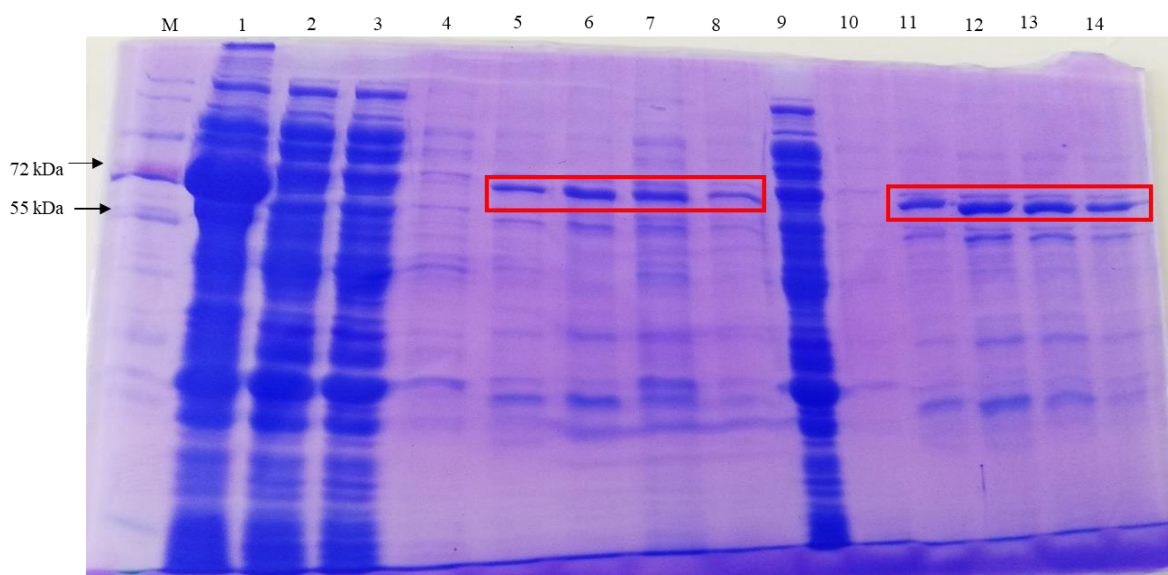
3.9. Large Scale Test σε κύτταρα B834pLysS και καθαρισμός STBD1 με χρωματογραφία συγγένειας

Σε συνέχεια των παραγράφων 2.5.2. και 2.7.1., πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός από δείγμα πρωτεϊνών το οποίο προήλθε από κύτταρα B834pLysS μεγάλης καλλιέργειας. Χρησιμοποιήθηκαν Buffer A1 με pH=8 (50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG) και Buffer B1 με pH=8 (50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1%(v/v) MTG, 20mM GSH). Τα κλάσματα έκλουσης που λήφθηκαν από 2 καθαρισμούς, περάστηκαν από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) (Εικόνα 21). Από την Εικόνα 21 και ειδικότερα από τα κλάσματα έκλουσης (11,12,13,15) από τον 1^ο καθαρισμό και από τα κλάσματα έκλουσης (9-12) από τον 2^ο καθαρισμό παρατηρείται κάποια έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου καθώς εμφανίζονται ζώνες (κόκκινα πλαίσια) κοντά στο

αναμενόμενο μοριακό βάρος της STBD1. Επίσης στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις για τα κλάσματα έκλουσης από τον 1^ο καθαρισμό (Elution 1) και για τα κλάσματα έκλουσης από τον 2^ο καθαρισμό (Elution 2) μετά από Bradford Assay. Από τα αποτελέσματα αυτά υπολογίστηκε ότι στον συνολικό όγκο του E1 (9,5ml) η συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι 1,03mg και του E2 (9,5ml) είναι 1,101mg.

Elution	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (mg/ml)
E1	0,102	0,108
E2	0,108	0,116

Πίνακας 14. Bradford Assay για μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης για τα κλάσματα έκλουσης από τον 1^ο καθαρισμό (Elution1) και για τα κλάσματα έκλουσης από τον 2^ο καθαρισμό (Elution2).

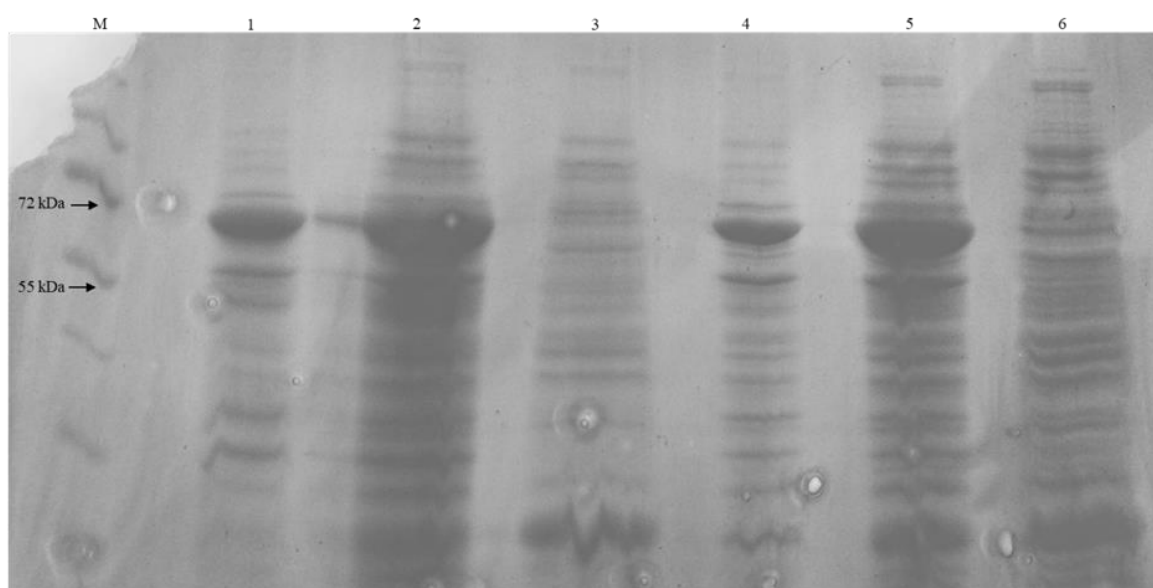


Εικόνα 21. Καθαρισμός STBD1 (GST-Tag) σε συνθήκες έκφρασης 18°C για 16 ώρες σε κύτταρα B834pLysS και προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων B834pLysS, 2:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρωση σε 27000g (Input), 3:Σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη από 1^ο καθαρισμό (FlowThrough), 4:Σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν από 1^ο καθαρισμό (Wash), 5:Κλάσμα έκλουσης 11 από 1^ο καθαρισμό, 6:Κλάσμα έκλουσης 12 από 1^ο καθαρισμό, 7:Κλάσμα έκλουσης 13 από 1^ο καθαρισμό, 8:Κλάσμα έκλουσης 15 από 1^ο καθαρισμό, 9:Σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη από 2^ο καθαρισμό (FlowThrough), 10:Σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν από 2^ο καθαρισμό (Wash), 11:Κλάσμα έκλουσης 9 από 2^ο καθαρισμό, 12:Κλάσμα έκλουσης 10 από 2^ο καθαρισμό, 13:Κλάσμα έκλουσης 11 από 2^ο καθαρισμό, 14:Κλάσμα έκλουσης 12 από 2^ο καθαρισμό.

Εκτός από την μελέτη εμφάνισης της πρωτεΐνης STBD1 στο διαλυτό μέρος (Soluble), διερευνήθηκε και το αν υπάρχει και στο αδιάλυτο μέρος (Pellet). Έγινε χρήση των βακτηριακών κυττάρων BL21 και B834pLysS σε συνθήκες επώασης 18°C για 16 ώρες και προσθήκη 0.5mM IPTG. Η λύση των κυττάρων έγινε με τη υπερήχους και τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος λύσης με pH=8 (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5% (v/v) Γλυκερόλη, 0,1% (v/v) MTG, 0,1M PMSF). Μετά από φυγοκέντρωση (20000g, 4°C, 30 λεπτά) οι διαλυτές πρωτεΐνες (δείγμα Soluble) βρίσκονται στο υπερκείμενο κλάσμα και οι αδιάλυτες στο ίζημα (Pellet). Σε ηλεκτροφόρηση SDS-Page (Εικόνα 22) έτρεξαν δείγματα συνολικών πρωτεϊνών (Total), πρωτεϊνών στο διαλυτό μέρος (Soluble) και των πρωτεϊνών στο αδιάλυτο μέρος-ίζημα (Pellet).

Στην Εικόνα 22 παρατηρείται έντονη εμφάνιση στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης STBD1 στα δείγματα Pellet και για τα δυο κυτταρικά στελέχη. Με το αποτέλεσμα

αυτό συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη STBD1 ίσως εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αδιάλυτο μέρος παρά στο διαλυτό μέρος και ίσως η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης να βοηθούσε στην έκφραση της πρωτεΐνης στο διαλυτό μέρος.



Εικόνα 22. Έκφραση πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα BL21 και B834pLysS στους 18°C με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1: Pellet από κύτταρα BL21, 2: Σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των κυττάρων BL21 (Total), 3: Soluble πρωτεΐνες από κύτταρα BL21 σε 20000g, 4: Pellet από κύτταρα B834pLysS, 5: Σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων B834pLysS (Total), 6: Soluble πρωτεΐνες από κύτταρα B834pLysS.

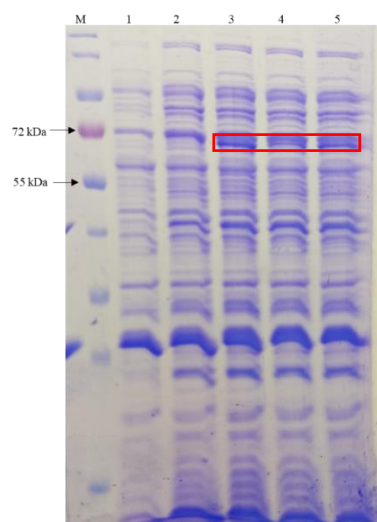
3.10. Δοκιμασία διαλυτότητας πρωτεΐνης σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης με διαφορετικά pH

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS + 200μl από κάθε Buffer όπως φαίνονται στον Πίνακα 6. Η λύση των κυττάρων έγινε με υπερήχους και μετά από φυγοκέντριση (20000g, 4°C, 30 λεπτά) οι διαλυτές πρωτεΐνες (δείγμα Soluble) βρίσκονται στο υπερκείμενο κλάσμα και οι αδιάλυτες στο ίζημα (Pellet). Σε ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Εικόνα 23) έτρεξαν δείγματα των πρωτεϊνών που βρίσκονται του διαλυτό μέρος (Soluble).

Από την πηκτή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 23 φαίνεται μια καλή εμφάνιση της ζώνης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της STBD1 στα ρυθμιστικά διαλύματα λύσης με pH=7, pH=8 και pH=9 (κλάσματα 3,4 και 5 αντίστοιχα). Το αποτέλεσμα αυτό επαλήθευται και από τις τιμές συγκέντρωσης οι οποίες μετρήθηκαν με τη μέθοδο Bradford (Πίνακας 15).

Lysis Buffer	Απορρόφηση	Συγκέντρωση (mg/ml)
5N	0,080	0,4
6N	0,189	1,3
7N	0,201	1,5
8N	0,220	1,6
9N	0,234	1,8

Πίνακας 15. Bradford Assay για μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης μετά από λύση των κυττάρων B834pLysS με τα 5 διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης (Lysis Buffers 5N, 6N, 7N, 8N και 9N).



Εικόνα 23. Τεστ διαλυτότητας της πρωτεΐνης STBD1 σε ρυθμιστικά διαλύματα λύσης διαφορετικών pH. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS που αναπτύχθηκαν στους 18°C για 16 ώρες και με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 1: Soluble πρωτεΐνες μετά από λύση κυττάρων B834pLysS με Lysis Buffer 5N (pH 5), 2: Soluble πρωτεΐνες μετά από λύση κυττάρων B834pLysS με Lysis Buffer 6N (pH 6), 3: Soluble πρωτεΐνες μετά από λύση κυττάρων B834pLysS με Lysis Buffer 7N (pH 7), 4: Soluble πρωτεΐνες μετά από λύση κυττάρων B834pLysS με Lysis Buffer 8N (pH 8), 5: Soluble πρωτεΐνες μετά από λύση κυττάρων B834pLysS με Lysis Buffer 9N (pH 9).

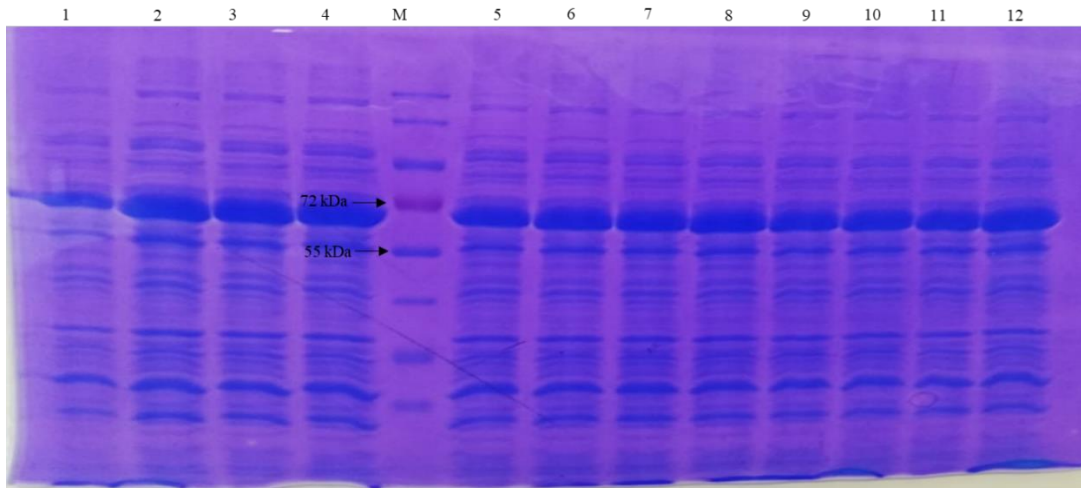
3.11. Παραγωγή της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης

Η διαδικασία καλλιέργειας κυττάρων B834pLysS που περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.4. έγινε και σε αυτή την περίπτωση με τη διαφορά ότι η λύση των κυττάρων έγινε με τη χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης (Πίνακας 16). Τα δείγματα Total ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 4μl Total + 36μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης + 10μl Loading Buffer. Η λύση των κυττάρων έγινε με υπερήχους και μετά από φυγοκέντριση (20000g, 4°C, 30 λεπτά) οι διαλυτές πρωτεΐνες (δείγμα Soluble) βρίσκονται στο υπερκείμενο κλάσμα και οι αδιάλυτες στο ίζημα (Pellet). Τα δείγματα Soluble ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση ως εξής: 20μl Soluble + 5μl Loading Buffer. Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης φαίνονται στην Εικόνα 24 για τις Total πρωτεΐνες και στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται οι Soluble πρωτεΐνες.

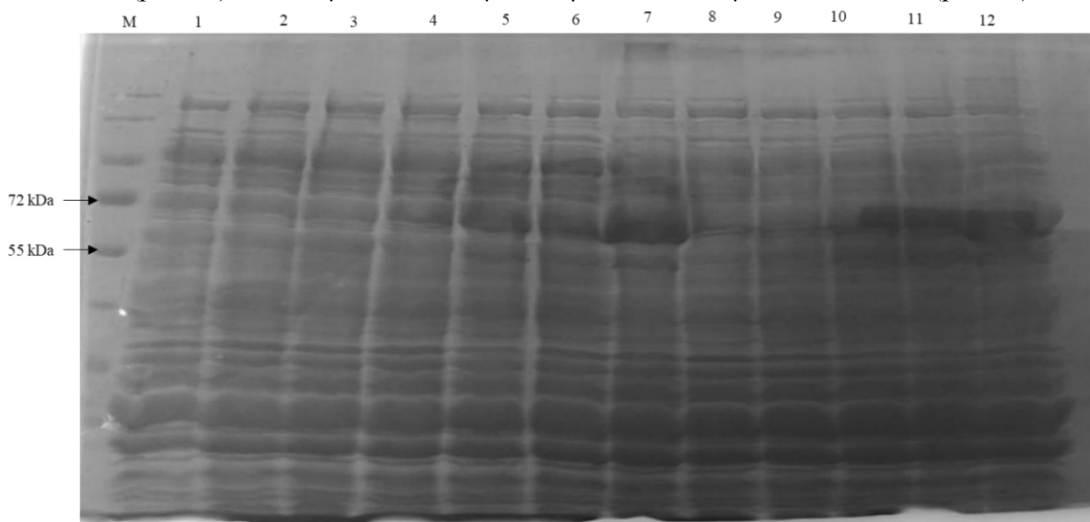
Lysis Buffer	MES	HEPES	Tris	NaCl	H ₂ O
1 (pH=6)	50mM	-	-	-	✓
2 (pH=6)	50mM	-	-	200mM	✓
3 (pH=6,5)	50mM	-	-	-	✓
4 (pH=6,5)	50mM	-	-	200mM	✓
5 (pH=7)	-	50mM	-	-	✓
6 (pH=7)	-	50mM	-	200mM	✓
7 (pH=7,5)	-	50mM	-	-	✓
8 (pH=7,5)	-	50mM	-	200mM	✓
9 (pH=8)	-	-	50mM	-	✓
10 (pH=8)	-	-	50mM	200mM	✓
11 (pH=8,5)	-	-	50mM	-	✓
12 (pH=8,5)	-	-	50mM	200mM	✓

Πίνακας 16. Σύσταση ρυθμιστικών διαλυμάτων λύσης (Lysis Buffer) για λύση κυττάρων B834pLysS.

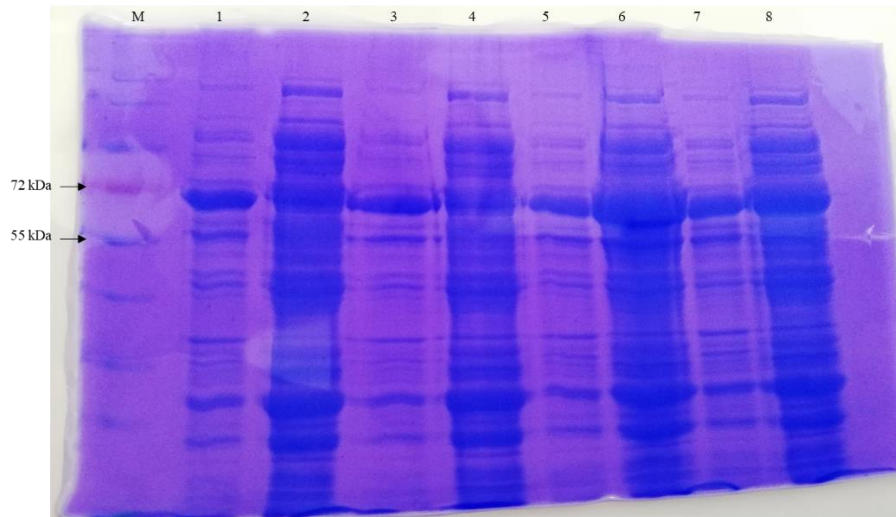
Από την πηκτική πολυακρυλαμίδης που εμφανίζεται στην *Εικόνα 25* παρατηρείται μια έντονη ζώνη έκφρασης κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης STBD1 στα δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 7: 50mM HEPES με pH 7,5, 8: 50mM HEPES + 200mM NaCl με pH 7,5, 11: 50mM Tris με pH 8,5 και 12: 50mM Tris + 200mM NaCl pH 8,5. Για επαλήθευση των αποτελεσμάτων, τα πιο πάνω δείγματα (Soluble και Total) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδης (*Εικόνα 26*). Από την πηκτική επαλήθευσης φαίνεται μια καλή έκφραση της πρωτεΐνης και στα 4 ρυθμιστικά διαλύματα λύσης. Παρατηρείται όμως μια πιο έντονη ζώνη έκφρασης στην στήλη 6 που αντιστοιχεί στο δείγμα με τις διαλυτές πρωτεΐνες που είχαν το Lysis Buffer με 50mM Tris, χωρίς ιοντική ισχύ και pH=8.5. Να σημειωθεί ότι η ίδια παρατήρηση έγινε και στο τεστ διαλυτότητας που περιγράφεται στην *παράγραφο 3.7*.



Εικόνα 24. Δείγματα συνολικών πρωτεϊνών (Total) από τεστ διαλυτότητας της πρωτεΐνης STBD1 σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS που αναπτύχθηκαν στους 18°C για 16 ώρες και με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 1:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES (pH 6), 2:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES με 200mM NaCl (pH 6), 3:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES (pH 6,5), 4:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES με 200mM NaCl (pH 6,5), 5:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7), 6: Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7), 7:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7,5), 8:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 9:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8), 10:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8), 11:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8,5), 12:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5).



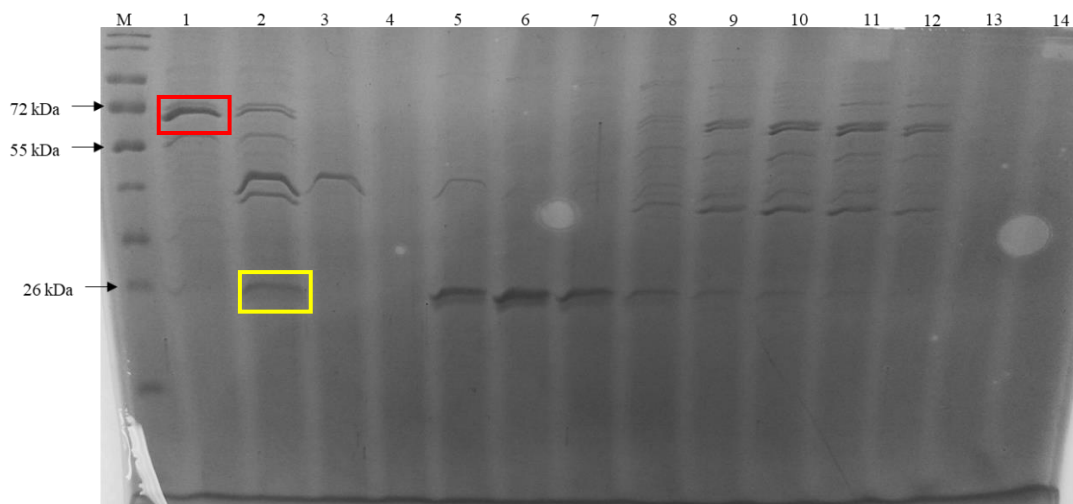
Εικόνα 25. Δείγματα διαλυτών πρωτεϊνών (Soluble) από τεστ διαλυτότητας της πρωτεΐνης STBD1 σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS που αναπτύχθηκαν στους 18°C για 16 ώρες και με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 1:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES (pH 6), 2:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES με 200mM NaCl (pH 6), 3:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES (pH 6,5), 4:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM MES με 200mM NaCl (pH 6,5), 5:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7), 6: Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7), 7:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES (pH 7,5), 8:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 9:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8), 10:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8), 11:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris (pH 8,5), 12:Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5).



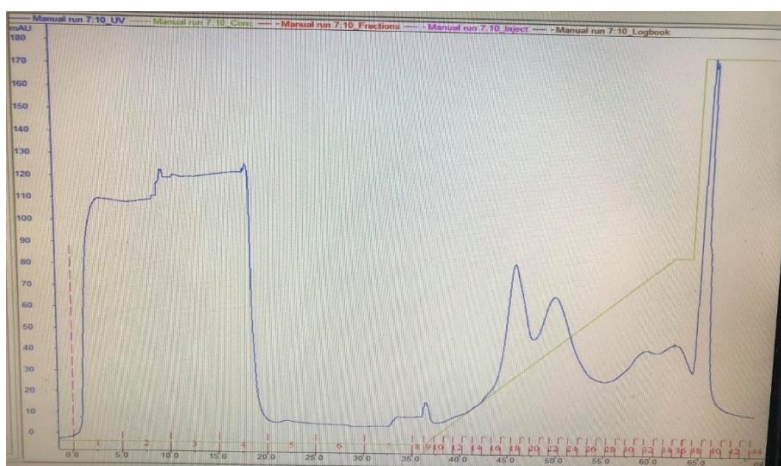
Εικόνα 26. Επαλήθευση τεστ διαλυτότητας της πρωτεΐνης STBD1 σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα B834pLysS που αναπτύχθηκαν στους 18°C για 16 ώρες και με προσθήκη 0,5mM IPTG. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, 1:Σύνολο πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES (pH 7,5), 2:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES (pH 7,5), 3:Σύνολο πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 4:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES με 200mM NaCl (pH 7,5), 5:Σύνολο πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris (pH 8,5), 6:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris (pH 8,5), 7:Σύνολο πρωτεϊνών σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5), 8:Soluble πρωτεΐνες σε ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris με 200mM NaCl (pH 8,5).

3.12. Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής

Σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.2. πραγματοποιήθηκε και μια χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής με στήλη κατιοανταλλαγής. Τα δείγματα πρωτεϊνών προκύπτουν από τα 2 κλάσματα έκλουσης (E1 και E2) της Χρωματογραφίας Συγγένειας που διεξάχθηκε για δείγματα πρωτεϊνών που προήλθαν από κύτταρα B834pLysS. Τα 2 κλάσματα έκλουσης αναμίχθηκαν μαζί με Buffer A3 με αποτέλεσμα η τελική συγκέντρωση άλατος (NaCl) να είναι 25mM. Να σημειωθεί ότι για μια ποσότητα από τον συνολικό όγκο των κλασμάτων έκλουσης (E1 και E2) γίνεται προσθήκη 3C Protease σε αναλογία 1:20 και γίνεται επώαση για 16 ώρες στους 4°C έτσι ώστε να αποκοπή η ετικέτα GST από το γονίδιο που εκφράζει την STBD1. Τα κλάσματα έκλουσης που λήφθηκαν από τον καθαρισμό, περάστηκαν από ηλεκτροφόρηση SDS-Page (Εικόνα 27) όπως και δείγμα άκοπης STBD1 (+GST-Tag) και δείγμα από κομμένη STBD1(-GST-Tag).



Εικόνα 27. Καθαρισμός STBD1 (Ion Exchange Column) σε συνθήκες έκφρασης 18°C, 0,5mM IPTG σε κύτταρα B834pLysS. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Δείγμα με άκοπη STBD1 από GST-Tag, 2:Δείγμα με κομμένη STBD1 από GST-Tag, 3:το σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (FlowThrough, κλάσματα 1,2,3,4), 4:Σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν (Wash, κλάσματα 5,6,7), 5: Κλάσμα έκλουσης 17, 6:Κλάσμα έκλουσης 18, 7:Κλάσμα έκλουσης 19, 8:Κλάσμα έκλουσης 20, 9:Κλάσμα έκλουσης 21, 10:Κλάσμα έκλουσης 22, 11:Κλάσμα έκλουσης 23, 12:Κλάσμα έκλουσης 24, 13:Κλάσμα έκλουσης 31, 14:Κλάσμα έκλουσης 38.



Εικόνα 28. Γράφημα UV απορρόφησης από Χρωματογραφία Ιονοανταλλαγής. Κλάσματα 1,2,3,4 αντιστοιχούν στο σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη (FlowThrough). Κλάσματα 5,6,7 αντιστοιχούν στο σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν (Wash). Κλάσματα έκλουσης είναι 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 31, 38.

Από τα αποτελέσματα της πηκτής πολυακρυλαμιδίου 12% (Εικόνα 27) παρατηρείται μια ζώνη έκφρασης στο δείγμα με την άκοπη STBD1 (Κόκκινο πλαίσιο), μια ζώνη έκφρασης (κίτρινο πλαίσιο) στο δείγμα με την κομμένη STBD1 κοντά στο μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην ετικέτα GST. Επίσης από τα κλάσματα έκλουσης 21, 22, 23, 24 είναι εμφανής η παρουσία ζώνης κοντά στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της STBD1. Η ίδια παρατήρηση φαίνεται και από την απορρόφηση σε UV φως κατά την έκλουση (Εικόνα 28).

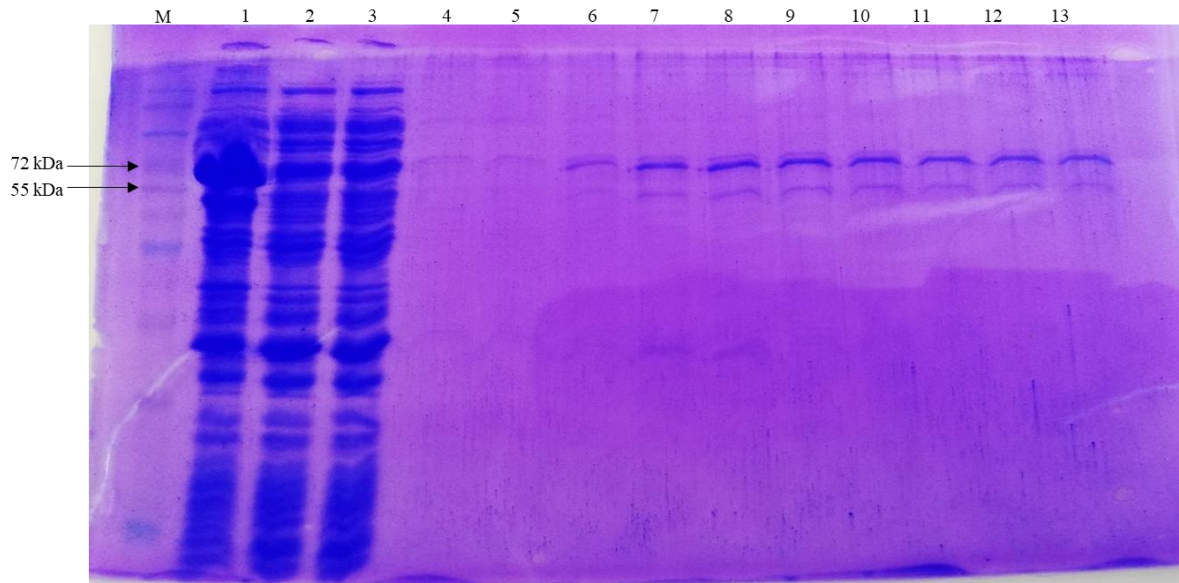
3.13. Western Blot

Με βάση τη μέθοδο και τα στάδια που περιγράφονται στην παράγραφο 2.6.6., εφαρμόστηκε η τεχνική Western Blot για να διαπιστώσουμε εάν όντως η πρωτεΐνη STBD1 βρίσκεται στο δείγμα μας. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν από κλάσματα έκλουσης μετά από χρωματογραφία συγγένειας των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν από κύτταρα B834pLysS. Τα κλάσματα έκλουσης τα οποία διέθεταν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης STBD1, εντοπίστηκαν εφαρμόζοντας τον μέθοδο Bradford. Στον Πίνακα 17 φαίνονται τα κλάσματα αυτά από τον 1^ο και τον 2^ο καθαρισμό που έλαβε χώρα με πράσινο, κίτρινο και μπλε χρώμα.

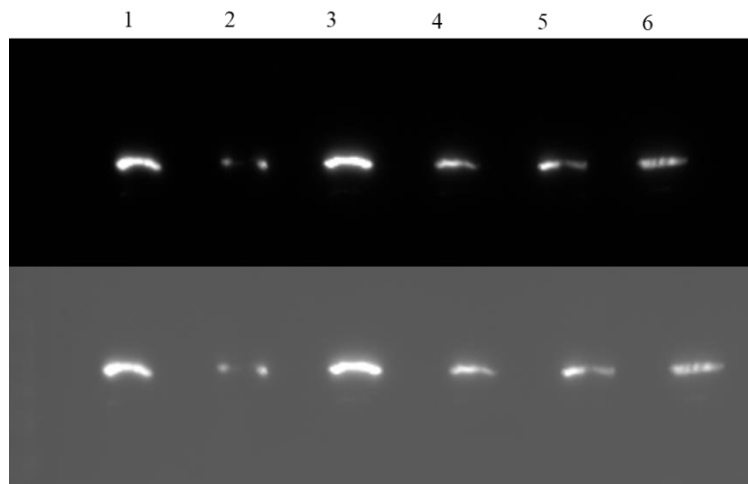
Τα κλάσματα έκλουσης με την υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (12%) για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως πηκτή για μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Εικόνα 29). Στην Εικόνα 30 παρουσιάζεται η εμφάνιση της μεμβράνης PVDF για τα κλάσματα έκλουσης από καθαρισμό πρωτεΐνης STBD1, τα οποία είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης: 1:E12(1), 2:E13(1), 3:E14, 4:E11(2), 5:E12(2), 6:E13(2). Όπως φαίνεται και στα 6 δείγματα είναι εμφανής η παρουσία της STBD1.

Δείγμα	Absorbance	$y=0.8347x + 0,0112$ (μg)	Sum (μg)
10 (1)	0.024	0.014721457	0.348714508
11 (1)	0.033	0.025072481	
12 (1)	0.054	0.049224871	
13 (1)	0.065	0.061876123	
14 (1)	0.062	0.058425782	
15 (1)	0.05	0.044624416	
16 (1)	0.049	0.043474302	
17 (1)	0.034	0.026222595	
18 (1)	0.033	0.025072481	
9 (2)	0.022	0.012421229	0.426692225
10 (2)	0.039	0.031973164	
11 (2)	0.064	0.060726009	
12 (2)	0.071	0.068776806	
13 (2)	0.068	0.065326465	
14 (2)	0.063	0.059575896	
15 (2)	0.037	0.029672936	
16 (2)	0.042	0.035423505	
17 (2)	0.042	0.035423505	
18 (2)	0.035	0.027372709	

Πίνακας 17. Bradford Assay για κλάσματα έκλουσης από τον 1^ο και 2^ο καθαρισμό της πρωτεΐνης STBD1 σε κύτταρα B834pLysS με προσθήκη 0,5mM IPTG. Για κάθε κλάσμα φαίνεται η αντίστοιχη απορρόφηση και συγκέντρωση.



Εικόνα 29. Καθαρισμός STBD1 (GST-Tag) σε συνθήκες έκφρασης 18°C, 0,5mM IPTG σε κύτταρα B834pLysS. Το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που χρησιμοποιήθηκε για λύση των κυττάρων περιείχε 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl και 0,1% MTG (pH: 8,5). Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Ως M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. 1:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά την λύση των βακτηριακών κυττάρων B834pLysS, 2:Σύνολο των πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση σε 20000 rpm (Input), 3:Σύνολο των πρωτεϊνών που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη από 1^ο καθαρισμό (FlowThrough), 4:Σύνολο των πρωτεϊνών που εκπλύθηκαν από 1^ο καθαρισμό (Wash), 5:Κλάσμα έκλουσης 10 από 1^ο καθαρισμό, 6:Κλάσμα έκλουσης 11 από 1^ο καθαρισμό, 7:Κλάσμα έκλουσης 12 από 1^ο καθαρισμό, 8:Κλάσμα έκλουσης 13 από 1^ο καθαρισμό, 9:Κλάσμα έκλουσης 14 από 1^ο καθαρισμό, 10:Κλάσμα έκλουσης 15 από 1^ο καθαρισμό, 11:Κλάσμα έκλουσης 16 από 1^ο καθαρισμό, 12:Κλάσμα έκλουσης 17 από 1^ο καθαρισμό, 13:Κλάσμα έκλουσης 18 από 1^ο καθαρισμό.



Εικόνα 30. Western Blot κλασμάτων έκλουσης από καθαρισμό πρωτεΐνης STBD1, τα οποία είχαν την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης: 1:E12(1) 0,049μg, 2:E13(1)=0,061μg, 3:E14(1)=0,058μg, 4:E11(2)=0,060μg, 5:E12(2)=0,068μg, 6:E13(2)=0,065μg.



4. Συζήτηση

Το αντικείμενο της εργασίας αυτής είναι η ανθρώπινη πρωτεΐνη STBD1, που λειτουργεί ως μεταφορέας του γλυκογόνου στο μονοπάτι της γλυκοφαγίας. Πάραυτα έχουν βρεθεί και άλλες λειτουργίες της STBD1 όπως είναι η συμμετοχή της στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Για την περαιτέρω μελέτη των ρόλων της STBD1 είναι απαραίτητο να απομονωθεί η πρωτεΐνη σε καθαρή μορφή και να εφαρμοστεί κρυστάλλωση έτσι ώστε να συλλεχθούν πληροφορίες για την δομή της.

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η πρώτη προσπάθεια παραγωγής της ανθρώπινης πρωτεΐνης STBD1 μέσω ετερόλογης έκφρασης του γονιδίου της STBD1 από διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *E. coli*. Επίσης έγινε προσπάθεια υποκλωνοποίησης (subcloned) του βελτιστοποιημένου γονιδίου που εκφράζει την STBD1 από το πλασμίδιο *pGEX-6P-1* με GST-tag σε άλλα 2 πλασμίδια: *pETM-11* και *pET-28a* με His-tag. Τα 2 υποκλωνοποιημένα πλασμίδια έχουν σταλθεί για αλληλούχιση και τα αποτελέσματα αναμένονται.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, συμπεραίνεται ότι υπήρξε υπερέκφραση της STBD1 στα στελέχη *E. coli* αλλά όχι στην διαλυτή μορφή. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων είναι σε θερμοκρασία επώασης 18°C για 16 ώρες. Η ιδανική συγκέντρωση IPTG για επαγωγή έκφρασης του γονιδίου της STBD1 είναι 0,5mM. Μετά από χρωματογραφία συγγένειας για καθαρισμό της STBD1, η αναμενόμενη ποσότητα της πρωτεΐνης εμφανίζεται στο κλάσμα ιζήματος (pellet) το οποίο προκύπτει από φυγοκέντρηση των ολικών πρωτεϊνών και όχι στα κλάσμα έκλυσης όπως αναμενόταν. Με το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη STBD1 ίσως εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αδιάλυτο μέρος παρά στο διαλυτό μέρος και ίσως η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης να βοηθούσε στην έκφραση της πρωτεΐνης-στόχου στο διαλυτό μέρος. Σε συνέχεια της μελέτης δοκιμάστηκαν περαιτέρω συνθήκες έκφρασης με στόχο την αύξηση της διαλυτότητας της STBD1. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν πολλά διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λύσης κυττάρων με διαφορετικά pH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ίσως το ιδανικότερο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης να είναι αυτό που περιέχει 50mM Tris χωρίς NaCl με pH 8,5.

Τέλος, συνίσταται περαιτέρω μελέτη των συνθηκών έκφρασης και η έκφραση σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Επίσης μπορούν να καλλιεργηθούν μεγάλες καλλιέργειες από κύτταρα Lemo21 τα οποία μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο *pGEX-6P-1* και να δοκιμαστεί η απομόνωση της STBD1 μέσω χρωματογραφίας συγγένειας. Άλλες προοπτικές για την συνέχεια μελέτης της STBD1 είναι: η χρήση άλλων βακτηριακών κυττάρων που βοηθούν στην έκφραση της STBD1 στο διαλυτό μέρος και η χρήση μεθόδων αναδίπλωσης της πρωτεΐνης (Refolding).

5. Βιβλιογραφικές αναφορές

Adeva-Andany M.M., González-Lucán M., Donapetry-García C., Fernández-Fernández C., Ameneiros-Rodríguez E., (2016), 'Glycogen metabolism in humans', *BBA Clinical*, **5**, 85-100

Asif A., Mohsin H., Tanvir R., Rehman Y., (2017), 'Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation', *Front. Microbiol.* **8:2169**, 1-5

Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., (2012), ‘Βιοχημεία’, Πνευματικές Εκδόσεις Κρήτης, 7^η Έκδοση

Bouju S., Lignon M., Pie Tu G., Le Cunff M., Le J., Auffray C. and Dechesne A. C., (1998), ‘Molecular cloning and functional expression of a novel human gene encoding two 41–43 kDa skeletal muscle internal membrane proteins’, *Biochem. J.*, **335**, 549-556

Davis, L. G., Dibner, M. D., & Battey, J. F. (1986) ‘Agarose Gel Electrophoresis’, *Basic Methods in Molecular Biology*, 58–61.

Demetriadou A., Morales-Sanfrutos J., Nearchou M., Baba O., Kyriacou K., Tate W.E., Drousiotou A. and Petrou P.P., (2017) ‘Mouse Stbd1 is N-myristoylated and affects ER–mitochondria association and mitochondrial morphology’, *Journal of Cell Science*, **130**, 903-915

Divari S., Lucia F. De, Berioy E., Sereno A., Biolatti B., Cannizzo F.T., (2020) ‘Dexamethasone and prednisolone treatment in beef cattle: influence on glycogen deposition and gene expression in the liver’, *Domestic Animal Endocrinology*, **72**, 1-9

Ducommuna S., Deaka M., Zeigererc A., Göranssonf O., Susanne Seitzc, S., Collodeta C., Madseng B.A., Jenseng E.T., Violleth B., Foretzh M., Guta P., Sumptonk D., Sakamotoa K., (2019) ‘Chemical genetic screen identifies Gapex-5/GAPVD1 and STBD1 as novel AMPK substrates’, *Cellular Signalling*, **57**, 45-57

Dümmler A., Lawrence A., Marco A., (2005), ‘Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in E. coli using a modular set of vectors’, *Microbial Cell Factories*, **4:34**, 1-10

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., (2005), ‘Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server’ (In) *John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press*, pp. 571-607

Han Z., Zhang W., Ning W., Wang C., Deng W., Li Z., Shang Z., Shen X., Liu X., Baba O., Morita T., Chen L., Xue Y., Jia D., (2021), ‘Model-based analysis uncovers mutations altering autophagy selectivity in human cancer’, *Nature Communications* **12**, 3258, 1-16

Hetz C., (2012), ‘The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond’, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 89-102

Janecek S., (2002), ‘A motif of a microbial starch-binding domain found in human genthoinin’, *Oxford University Press*, **18:11**, 1534–1537

Jia B. and Jeon O.C., (2016), ‘High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives’, *Open Biol.*, **6: 160196**, 1-17

Jiang S., Heller B., et al., (2010), ‘Starch Binding Domain-containing Protein 1/Genthoinin 1 Is a Novel Participant in Glycogen Metabolism’, *Journal of Biological Chemistry*, **285:45**, 34960-34971

Jiang S., Wells D.C., Roach J.P., (2011), ‘Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1

- required for interaction with GABARAPL1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **413**, 420–425
- Joubert O., Nehmé R., Bidet M., Mus-Veteau I., (2016)., 'Heterologous Expression of Human Membrane Receptors in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Methods in Molecular Biology*, 1432, Chapter 6
- Jungbauer, A., & Hahn, R., (2009), 'Ion-exchange chromatography', *Methods in enzymology*, **463**, 349-371
- Leahy D.J., Erickson H.P., Aukhil I., Joshi P, Hendrickson W.A., (1994), 'Crystallization of a fragment of human fibronectin: introduction of methionine by site-directed mutagenesis to allow phasing via selenomethionine.' *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **19(1)**, 48-54
- Lytridou A.A., Demetriadou A., Christou M., Potamiti L., Mastroiannopoulos P.N., Kyriacou K., Phylactou A. L., Drousiotou A. and Petrou P., (2020), 'Stbd1 promotes glycogen clustering during endoplasmic reticulum stress and supports survival of mouse myoblasts', *Journal of Cell Science*, **133**, 1-24
- Mahmood, T., & Yang, P. C., (2012), 'Western blot: technique, theory, and troubleshooting', *North American journal of medical sciences*, **4(9)**, 429–434
- Malhotra A., (2009), 'Tagging for protein expression', *Methods Enzymol.*, **463**, 239-58.
- Mandl J., Bánhegyi G., (2018), 'Review:The ER – Glycogen Particle – Phagophore Triangle: A Hub Connecting Glycogenolysis and Glycophagy?', *Pathology & Oncology Research*, **24**, 821–826
- 'NanoDrop and design are registered trademarks of NanoDrop Technologies' (2007), *NanoDrop Technologies, Inc*
- Reichelt M.E., Mellor K.M., Curl C.L., Stapleton D., Delbridge L.M.D., (2013), 'Myocardial glycophagy-A specific glycogen handling response to metabolic stress is accentuated in the female heart', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **65**, 67–75
- Rosenberg A.H., Lade B.N., Chui D.S., Lin S.W., Dunn J.J. and Studier F.W. (1987), 'Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase', *Gene*, **56**, 125–135.
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y., (2010), 'I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction.' *Nature Protocols*, **5**: 725-738
- Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y., (2011), 'A Protocol for Computer-Based Protein Structure and Function Prediction', *Journal of Visualized Experiments*, **57**, 1-10
- Sapan V.C., Lundblad L. R. and Price C.N., (1999), 'Colorimetric protein assay techniques', *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**, 99–108
- Schäfer F., Seip N., Maertens B., Block H., Kubicek J., (2015), 'Purification of GST-Tagged Proteins', *Methods Enzymol.*, **559**, 127-139.
- Slobodkin R.M., Elazar Z. (2013), 'The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy', *Essays Biochem*, **55**, 51-64

Stapleton D., Nelson C., Parsawar K., McClain D., Gilbert-Wilson R., Barker E., Rudd B., Brown K., Hendrix W., O'Donnell P., Parker G., (2010), 'Analysis of Hepatic Glycogen-Associated Proteins', *Proteomics*, **10:12**, 2320–2329

Sun T., Yi H., Yang C., Kishnani S. P., and Sun B., (2016) ' Starch Binding Domain containing Protein 1 Plays a Dominant Role in Glycogen Transport to Lysosomes in Liver', *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, **291:32**, 16479–16484

Wagner S., Bader M.L., Drew D., Jan-Willem de Gier J.W., (2006), 'Rationalizing membrane protein Overexpression', *TRENDS in Biotechnology*, **24(8)**, 364-371

Wagner S., Klepsch M.M., Schlegel S., Appel A., Draheim R., Tarry M., Högbom M., van Wijk K.J., Slotboom D.J., Persson J.O., de Gier J.W., (2008) 'Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression' *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105(38)**,14371-14376

Xu H., Wanga Q, Zhanga Z., Yia L., Maa L., Zhaia C., (2019), 'A simplified method to remove fusion tags from a xylanase of Bacillus sp.HBP8 with HRV 3C protease', *Enzyme and Microbial Technology*, **123**, 15-20

Yi H., Fredrickson K. B., Das S., Kishnani P. S., and Sun B. (2013) 'Stbd1 is highly elevated in skeletal muscle of Pompe disease mice but suppression of its expression does not affect lysosomal glycogen accumulation.' *Mol. Genet. Metab.* **109**, 312–314

Zhang Y., (2008), 'I-TASSER server for protein 3D structure prediction', *BMC Bioinformatics*, **9:40**, 1-8

Zhao H., Tang M., Liu M., Chen L., (2018), 'Glycophagy: An emerging target in pathology', *Clinica Chimica Acta*, **484**, 298-303

Zhu Y., Zhang M., Kelly R.A. and Cheng A., (2014), 'The carbohydrate-binding domain of overexpressed STBD1 is important for its stability and protein–protein interactions', *Biosci. Rep.*, **34(4)**, 311-320

