



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία - Bachelor's thesis

Βιοχημική μελέτη της πρωτεΐνης Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1)

Biochemical study of the Starch Binding Domain-containing Protein 1 (STBD1)

Μαστοράκης Παναγιώτης του Μιχαήλ

Λάρισα 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: **ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

Εργαστήριο: **Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας**

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	9
1.2 Starch-binding domain-containing protein 1	9
1.3 Γλυκόζη και Γλυκογόνο	10
1.3.1 Κατάσταση πέψης	10
1.3.2 Κατάσταση νηστείας.....	10
1.4 Αποικοδόμηση γλυκογόνου	11
1.4.1 Φωσφορλυτική αποδόμηση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα.....	11
1.4.2 Υδρολυτική αποδόμηση γλυκογόνου στα λυσοσώματα	11
1.5 Αυτοφαγία	12
1.6 Γλυκοφαγία	12
1.6.1 Ρύθμιση γλυκοφαγίας	12
1.6.2 Γλυκοφαγία και STBD1	13
1.7 Υποκυτταρικός εντοπισμός STBD1 και γλυκογόνου	14
1.8 Ρόλος STBD1 στη μορφολογία των μιτοχονδρίων και του Ενδοπλασματικού Δικτύου	15
1.9 Ρόλος STBD1 στο Στρες Ενδοπλασματικό Δικτύου	15
1.10 STBD1 ως στόχος της AMPK	16
1.11 Ασθένειες σχετιζόμενες με την STBD1.....	16
2. Σκοπός	17
3. Υλικά και Μέθοδοι	18
3.1 Υλικά	18
3.1.1 Οργανολογία	18
3.1.2 Αντιδραστήρια	18
3.1.3 Αναλώσιμα.....	19
3.2 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός της CBM20 της STBD1	19
3.2.1 Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1.....	19
3.2.2 Κύτταρα BL21-Gold (DE3)	20
3.2.3 Μεθοδολογία υπερέκφρασης STBD1.....	20
3.2.3.1 Προετοιμασία θρεπτικών διαλυμάτων για την υπερέκφραση πρωτεϊνών	20
3.2.3.2 Μετασηματισμός βακτηριακού στελέχους BL21 με pGEX-6P-1_CB20 και ανάπτυξη σε τρυβλία.....	21
3.2.3.3 Μικρές υγρές καλλιέργειες.....	22
3.2.3.4 Μεγάλες υγρές καλλιέργειες (Παραγωγή πρωτεΐνης)	22
3.2.4 Expression Test.....	23
3.2.5 Λύση βακτηριακών κυττάρων.....	23

3.2.5.1 Λύση με Lysis Buffer	23
3.2.5.2 Λύση με Sonication.....	23
3.2.6 Αναλυτικές Βιοχημικές Μέθοδοι.....	23
3.2.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (1D SDS-PAGE)	23
3.2.6.2 Χρώσεις πηκτής πολυακρυλαμιδίου	25
3.2.6.2.1 Χρώση με διάλυμα χρώσης που περιέχει Coomassie Brilliant Blue R250	25
3.2.6.2.2 Χρώση μέσω της τεχνικής Silver Staining.....	26
3.2.7 Μέθοδος Bradford.....	26
3.2.8 Στήλες Χρωματογραφίας	27
3.2.8.1 Χρωματογραφία συγγένειας (Στήλη GST).....	28
3.2.8.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Στήλη Resource Q).....	29
3.2.8.3 2η στήλη GST με sepharose beads	30
3.2.8.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Superdex 75).....	30
3.2.9 Διαπίδυση	31
3.2.10 Συμπύκνωση δείγματος.....	31
3.2.10.1 Συμπύκνωση με υπερδιήθηση μέσω φυγοκέντρησης	31
3.2.10.2 Συμπύκνωση μέσω στερεών απορροφητικών ουσιών.....	32
3.3 Προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης mRNA της STBD1 μέσω ποσοτικής Real-Time PCR σε κύτταρα HepG2.....	32
3.3.1 Κυτταρική σειρά HepG2.....	32
3.3.2 Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειών	32
3.3.2.1 Δημιουργία θρεπτικού μέσου.....	32
3.3.2.2 Απόψυξη κυττάρων	33
3.3.2.3 Θρυψινοποίηση κυττάρων	33
3.3.2.4 Ανακαλλιέργεια κυττάρων.....	34
3.3.2.5 Ψύξη κυττάρων	34
3.3.2.6 Μέτρηση κυττάρων	34
3.3.2.7 Επαγωγή γλυκογονόλυσης.....	35
3.3.2.8 Συλλογή Κυττάρων (Harvest)	35
3.3.3 Απομόνωση RNA	36
3.3.4 Αντίστροφη μεταγραφή.....	36
3.3.5 Σχεδιασμός εκκινητών (Primers)	37
3.3.6 Αντίδραση PCR	38
4 Αποτελέσματα	39
4.1 Ετερόλογη έκφραση και απομόνωση της περιοχής CBM20 της STBD1	39
4.1.1 Αποτελέσματα expression test.....	39
4.1.2 Αποτελέσματα στήλης GST/χρωματογραφίας συγγένειας.....	39
4.1.3 Αποτελέσματα 1ης στήλης Resource Q (Cation)/χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής	41
4.1.4 Πέψη ετικέτας GST	43

4.1.5 Αποτελέσματα 2ης στήλης GST με sepharose beads.....	43
4.1.6 Αποτελέσματα 2ης στήλης Resource Q (Cation)/χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής	44
4.1.7 Αποτελέσματα στήλης Superdex 75/χρωματογραφίας μοριακής διήθησης	46
4.2 Αποτελέσματα ποσοτικής Real-Time PCR.....	48
4.2.1 Αποτελέσματα απομόνωσης RNA	48
4.2.2 Αποτελέσματα αντίδρασης Real-Time PCR.....	49
5.Συζήτηση.....	52
6.Βιβλιογραφικές αναφορές	53

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. Δομή της STBD1	9
Εικόνα 2 (A). Πολυμερισμός καταλοίπων γλυκόζης προς σχηματισμό γλυκογόνου	10
Εικόνα 2 (B). Οργάνωση γλυκογόνου	10
Εικόνα 3 (A). Φωσφορυλυτική αποδόμηση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα	12
Εικόνα 3 (B). Υδρολυτική αποδόμηση γλυκογόνου στα λυσοσώματα.	12
Εικόνα 4. Ρύθμιση γλυκοφαγίας.....	13
Εικόνα 5. Η διαδικασία της γλυκοφαγίας και ο ρόλος της STBD1.....	14
Εικόνα 6. Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1.....	20
Εικόνα 7. Φορέας pGEX-6P-1_CBM20. (33).....	20
Εικόνα 8. Χρωματογραφία συγγένειας με Στήλη GST.	28
Εικόνα 9. Ζευγάρι εκκνητών για την στόχευση του cDNA της STBD1 και χαρακτηριστικά	38
Εικόνα 10. 1 ^{ος} Μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε στα gel.....	39
Εικόνα 11. 1D SDS-PAGE ύστερα από expression test.	39
Εικόνα 12. Χρωματογράφημα 1ης στήλης GST.....	40
Εικόνα 13. 1D SDS-PAGE μετά από 1η χρωματογραφία στήλης GST	41
Εικόνα 14. Χρωματογράφημα 1ης στήλης Resource Q	42
Εικόνα 15 και 16. Αποτελέσματα SDS PAGE ύστερα από την 1η στήλη Resource Q.....	43
Εικόνα 17. 2ος Μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε στα gel.	44
Εικόνα 18. 1D SDS-PAGE ύστερα από στήλη GST με Sepharose beads	44
Εικόνα 19. Χρωματογράφημα 2ης στήλης Resource Q	45
Εικόνα 20 και 21. 1D SDS-PAGE μετά από τη 2η στήλη Resource Q.....	45
Εικόνα 22. Χρωματογράφημα στήλης Superdex 75.....	46
Εικόνα 23. SDS PAGE μετά από στήλη Superdex 75.....	47
Εικόνα 24. Συγκεντρική παρουσίαση μεθοδολογίας καθαρισμού ανθρώπινης CBM20.....	48
Εικόνα 25. Διάταξη δειγμάτων που εισήχθησαν στον θερμικό κυκλοποιητή	49
Εικόνα 26. Καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot).....	50
Εικόνα 27. Διάγραμμα που συγκρίνει τα σχετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα δείγματα Control, DEX και GLUCAGON.....	50
Εικόνα 28. Καμπύλη αποδιάταξης προϊόντων μέσω θέρμανσης (Melt Curve)	51
Εικόνα 29. Θερμοκρασία τήξης των προϊόντων της RT-PCR στα δείγματα με στόχο την STBD1	51

Περιεχόμενα πινάκων

Οργανολογία.....	18
Αντιδραστήρια	18
Αναλώσιμα.....	19
Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων	20
Lysis Buffer.....	23
Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης.....	25
Διαλύματα Silver Staining	26
Διαλύματα στήλης GST.....	28
Διαλύματα στήλης Resource Q	29
Διαλύματα 2ης στήλης GST με Sepharose beads	30
Διάλυμα στήλης Superdex 75	30
Διάλυμα διαπίδυσης	31
Περιεχόμενα Template RNA Primer Mix.....	37
Περιεχόμενα αντίδρασης σύνθεσης πρώτου κλώνου cDNA	37
Περιεχόμενα δειγμάτων για PCR	38
Διαδικασία PCR	38
Αποτελέσματα δοκιμασίας Bradford μετά από 1η Resource Q.....	42
Αποτελέσματα δοκιμασίας Bradford μετά από στήλη GST με Sepharose beads.....	44
Συγκεντρωτική παρουσίαση συγκέντρωσης και ποσότητας πρωτεΐνης ύστερα από κάθε βήμα	47
Αποτελέσματα Nanodrop μετά την απομόνωση RNA.....	48

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Μάρτιο έως τον Σεπτέμβριο του 2022 στην Λάρισα, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Βιοχημείας - Μεταβολισμού, Δρ. Σκαμνάκη Βασιλικής. Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη καθηγήτρια που δέχθηκε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας, για το συνεχές ενδιαφέρον, την βοήθεια και την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Λεωνίδα Δημήτριο και τον Επίκουρο Καθηγητή Μπαλατσό Νικόλαο που δέχθηκαν να αποτελέσουν μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Αλεξόπουλο Σεραφείμ για την αδιάκοπη καθοδήγηση, την υπομονή, τη προσφορά βοήθειας και τον χρόνο που διέθεσε καθ' όλη τη διάρκεια που βρέθηκα στο εργαστήριο, και για την διεξαγωγή των πειραμάτων στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Παπακωστοπούλου Σουζάνα, απόφοιτο της σχολής, για τη συνεχή στήριξη, τον χρόνο που διέθεσε και την ανιδιοτελή βοήθεια. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Δεκούλου Μαρία για την συνεργασία και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια εκπόνησης των πτυχιακών εργασιών μας. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Μπαλή Λάμπρο για την προθυμία και τον χρόνο που διέθεσε για να με καθοδηγήσει κατά τη διεξαγωγή του πειράματος Real-Time PCR. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους υποψήφιους διδάκτορες Κούλα Συμεών και Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα για τις συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέφεραν. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την πάντα υπάρχουσα προθυμία για βοήθεια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Μιχαήλ και Παρασκευή, και την αδερφή μου, Ιωάννα, για την αμέριστη υποστήριξη, κατανόηση και βοήθεια.

Περίληψη

Η γλυκόζη συνιστά την κύρια πηγή ενέργειας σε όλους τους οργανισμούς και η ρύθμιση των επιπέδων της αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού. Η περίσσεια γλυκόζης αποθηκεύεται υπό τη μορφή γλυκογόνου, το οποίο αποικοδομείται σε καταστάσεις έλλειψης γλυκόζης για την αύξηση των επιπέδων της. Η φωσφορυλυτική αποικοδόμηση του γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα έχει μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο, πρόσφατα, ένα εναλλακτικό μονοπάτι για την αποικοδόμηση του γλυκογόνου, η γλυκοφαγία, έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Καθοριστικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία διαδραματίζει η Starch-binding domain-containing protein 1 (STBD1), η οποία λειτουργεί ως “ενδιάμεσο” μόριο που συνδέει το γλυκογόνο με την GABARAPL1 και η διαδικασία καταλήγει στην αποικοδόμηση στα λυσοσώματα. Επιπλέον, ανακαλύπτονται συνεχώς νέοι πιθανοί ρόλοι της STBD1. Ιδιαίτερα σημαντική για την λειτουργία της STBD1 είναι η περιοχή CBM20, η οποία προσδένεται στο γλυκογόνο και πιθανώς με άλλα μόρια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό του γλυκογόνου. Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η απομόνωση και ο χρωματογραφικός καθαρισμός της ανθρώπινης CBM20. Επίσης, επιτεύχθηκε ο σχεδιασμός ζεύγους εκκινητών για την στόχευση της *STBD1* σε πειράματα Real-Time PCR και ο σχεδιασμός πειραματικού πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό των επιπέδων mRNA της στη κυτταρική σειρά HepG2 κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της γλυκογένεσης και της γλυκογονόλυσης. Από τα αποτελέσματα, προκύπτει ένδειξη πως τα επίπεδα mRNA της *STBD1* είναι αυξημένα κατά την γλυκογονόλυση (3,6 φορές) και ελαφρώς αυξημένα κατά τη γλυκογένεση (1,2 φορές, που είναι στα όρια του στατιστικού λάθους) σε σχέση με το control.

Abstract

Glucose is the main source of energy for all organisms and the regulation of glucose levels is essential for the regular function of the organism. Excess glucose is stored as glycogen, which is degraded in order to increase its levels when glucose is absent. The cytosolic glycogen degradation has been studied extensively. Recently, an alternative pathway of glycogen degradation, called glycophagy, has been the subject of studies. Starch-binding domain-containing protein 1 (STBD1) plays a key role in this process, functioning as a cargo protein that binds glycogen and GABARAPL1 simultaneously and leads to glycogen degradation in the lysosomes. Moreover, new possible roles of STBD1 are constantly discovered. The CBM20 region is very important for the function of STBD1, as it binds to glycogen and possibly other molecules that take part in glycogen degradation. In this study, the isolation and the purification of the human CBM20 region were achieved. Also, the design of a primer pair for the detection of *STBD1* during Real-Time PCR was successful. In addition, the design of an experimental protocol for the quantification of mRNA levels of *STBD1* in HepG2 cells during glycogenesis and glycogenolysis was achieved. Our results indicate an increase of the mRNA levels of *STBD1* during glycogenolysis (3,6 times) and a slight increase during glycogenesis (1,2 times, inside the limits of statistical error) compared to the control sample

1.Εισαγωγή

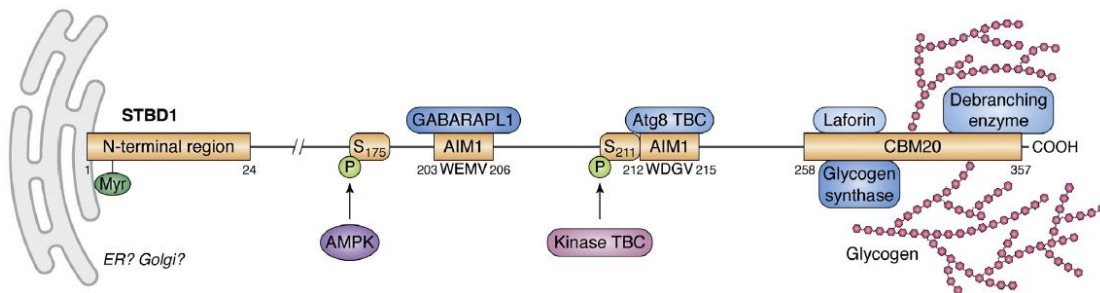
1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η STBD1 ανακαλύφθηκε το 1998 κατά τη διάρκεια πειραμάτων που στόχευαν στην εύρεση γονιδίων με αυξημένα ή σταθερά επίπεδα έκφρασης σε σκελετικούς μύες ανθρώπων. Οι ερευνητές παρατήρησαν πολύ υψηλά επίπεδα mRNA σε σκελετικά και καρδιακά μυϊκά κύτταρα και αυξημένα επίπεδα στο ήπαρ και τον πλακούντα και ονόμασαν το γονίδιο GENX-3414 (1). Η επόμενη βιβλιογραφική αναφορά εμφανίστηκε το 2002, όταν πραγματοποιήθηκαν μελέτες βιοπληροφορικής για την ανίχνευση πρωτεϊνών με χαρακτηριστικές περιοχές που δεσμεύουν άμυλο. Οι ερευνητές εντόπισαν μία πρωτεΐνη που διαθέτει «starch-binding domain» στο καρβοξυτελικό άκρο και την ονόμασαν genethonin (2). Η ύπαρξη και η ανακάλυψη του ρόλου της περιοχής αυτής το 2010 οδήγησε στη χρήση του ονόματος «Starch-binding domain-containing protein 1», το οποίο τελικά επικράτησε. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε την ικανότητα της STBD1 να συνδέεται με το γλυκογόνο και να συμμετέχει στον μεταβολισμό του (3). Τα επόμενα έτη ακολούθησαν μελέτες που ανέδειξαν τους πολλαπλούς ρόλους της STBD1.

1.2 Starch-binding domain-containing protein 1

Το ανθρώπινο γονίδιο της *STBD1* έχει μέγεθος 4398 ζεύγη βάσεων, βρίσκεται στο 4^ο ζεύγος χρωμοσωμάτων και αποτελείται από 2 εξόνια και 1 ιντρόνιο. Το ώριμο mRNA που προκύπτει διαθέτει 2244 ζεύγη βάσεων (4).

Η πρωτεΐνη STBD1 συνίσταται από 358 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος ισούται με 39 kDa (5). Η δομή της πρωτεΐνης δεν είναι γνωστή καθώς δεν έχει επιτευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων. Ωστόσο, ύστερα από ποικίλες μελέτες γνωρίζουμε ορισμένες χαρακτηριστικές περιοχές. Αρχικά, η STBD1 διαθέτει μία ιδιαίτερα υδρόφοβη περιοχή στο αμινοτελικό άκρο, μέσω της οποίας μπορεί να προσδένεται σε μεμβράνες (3). Καθοδικά περιέχει φερμουάρ λευκίνης, χωρίς σαφή ρόλο (3). Στη συνέχεια, εντοπίζεται μια περιοχή που ονομάζεται AIM (Atg8-family interacting motifs) και επιτρέπει τη σύνδεση της με πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8, και συγκεκριμένα με την GABARAP (κυρίως την GABARAPL1), που συμμετέχουν σε μονοπάτια αυτοφαγίας (6). Ιδιαίτερα σημαντική είναι η συντηρημένη περιοχή CBM20 στο καρβοξυτελικό άκρο. Η CBM20 διαθέτει μία starch-binding επικράτεια μέσω της οποίας η STBD1 μπορεί να συνδεθεί στο γλυκογόνο και άλλους υδατάνθρακες, σε άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με το γλυκογόνο, αλλά και να διμερίζεται (3, 7). Η δομή της CBM20 παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα με ένα ανοιχτό β-βαρέλι (2).



Εικόνα 1. Δομή της STBD1. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι σημαντικότερες περιοχές της STBD1, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τα μόρια με τα οποία πιθανώς αλληλεπιδρά και ο υποκυτταρικός εντοπισμός. (8)

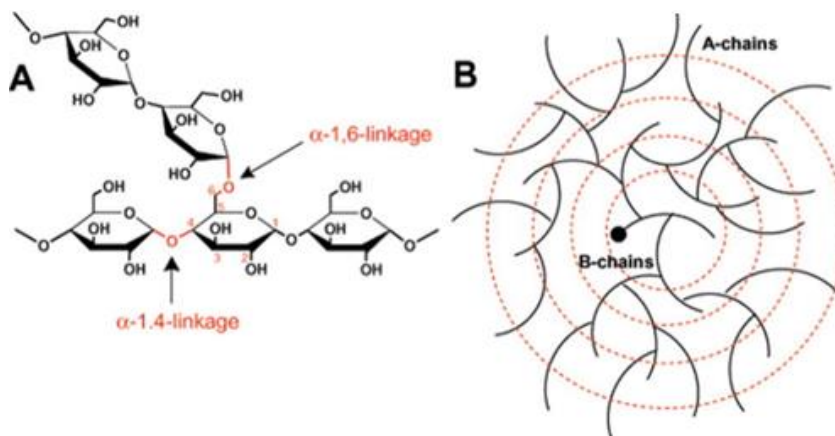
1.3 Γλυκόζη και Γλυκογόνο

Η γλυκόζη αποτελεί την βασική πηγή ενέργειας της πλειοψηφίας των κυττάρων των θηλαστικών (9) και συνιστά το κύριο καύσιμο του εγκεφάλου (10).

1.3.1 Κατάσταση πέψης

Όταν ο οργανισμός τρέφεται, η γλυκόζη που εισέρχεται μέσω της τροφής στο πεπτικό σύστημα μετατρέπεται σε ενέργεια και αποθηκεύεται υπό τη μορφή μορίων ATP. Υπό αερόβιες συνθήκες, μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρική αναπνοή, μπορούν να προκύψουν 36 μόρια ATP από ένα μόνο μόριο γλυκόζης. Ο αναερόβιος καταβολισμός της γλυκόζης (αλκοολική ή γαλακτική ζύμωση) δεν είναι τόσο αποδοτικός σε παραγωγή ATP, ωστόσο, δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου και μπορεί να παραγάγει ταχύτερα ενέργεια (πχ στα ταχύτατα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ή μικροοργανισμούς)(11). Επιπλέον, συνιστά την μοναδική οδό παραγωγής ενέργειας στα ερυθροκύτταρα, καθώς δεν διαθέτουν μιτοχόνδρια (12). Τα μόρια ATP μπορούν να καταναλωθούν για να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων.

Ταυτόχρονα, η περίσσεια της γλυκόζης αποθηκεύεται για μελλοντική χρήση υπό τη μορφή γλυκογόνου. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γλυκογένεση. Το γλυκογόνο συνιστά ένα διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, που αξιοποιείται σε περιόδους βραχυπρόθεσμης νηστείας (<30h). Τα κατάλοιπα γλυκόζης πολυμερίζονται σε ευθεία αλυσίδα μέσω α -1,4 γλυκοζιτικού δεσμού, ενώ οι διακλαδώσεις προκύπτουν από α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (13).



Εικόνα 2 (A). Πολυμερισμός καταλοίπων γλυκόζης προς σχηματισμό γλυκογόνου. Παρουσιάζονται ο α -1,4 γλυκοζιτικός δεσμός σε ευθεία αλυσίδα και ο α -1,6 γλυκοζιτικός δεσμός σε σημείο διακλάδωσης.

Εικόνα 2 (B). Οργάνωση γλυκογόνου. Οι εσωτερικές β -αλυσίδες ενώνονται συνήθως με δύο-τρεις «κλάδους», ενώ οι εξωτερικές α -αλυσίδες με έναν. (13)

1.3.2 Κατάσταση νηστείας

Απουσία τροφής ο οργανισμός χρειάζεται εναλλακτικές πηγές ενέργειας για να καλύψει τις ανάγκες του. Για το σκοπό αυτό, το αποθηκευμένο γλυκογόνο που βρίσκεται στο ήπαρ καταβολίζεται (γλυκογονόλυση), με αποτέλεσμα να προκύπτει κάθε φορά ελεύθερη γλυκόζη και γλυκογόνο με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης. Η γλυκόζη μεταφέρεται στο αίμα και από εκεί στους ιστούς που την χρειάζονται (12).

Η γλυκόζη μπορεί να παραχθεί και *de novo*, διαδικασία που ονομάζεται γλυκονεογένεση. Ωστόσο, αυτή η αναβολική πορεία πραγματοποιείται μόνο σε παρατεταμένες περιόδους νηστείας (>30h), όταν έχουν εξαντληθεί τα αποθέματα γλυκογόνου (12).

1.4 Αποικοδόμηση γλυκογόνου

Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών: α) την φωσφορυλυτική αποδόμηση του στο κυτταρόπλασμα μέσω της συντονισμένης δράσης του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης γλυκογόνου (GDE), β) την υδρολυτική αποδόμηση του στα λυσοσώματα από το ένζυμο λυσοσωμική α-γλυκοσιδάση (GAA) (14). Η υδρολυτική διάσπαση αποτελεί δευτερεύοντα μηχανισμό μεταβολισμού του γλυκογόνου (5% στα μυϊκά, 10% στα ηπατικά κύτταρα) (15). Οι παράγοντες που καθορίζουν το μονοπάτι αποδόμησης του γλυκογόνου δεν είναι γνωστοί.

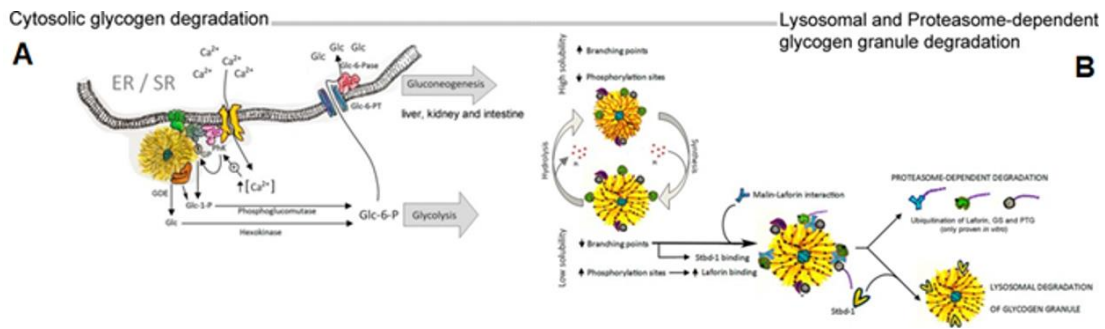
1.4.1 Φωσφορυλυτική αποδόμηση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα

Στο κυτταρόπλασμα η GP διασπάει τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4, με αποτέλεσμα να προκύπτει 1-φωσφορική γλυκόζη και γλυκογόνο με ένα λιγότερο κατάλοιπο γλυκόζης. Όταν μία αλυσίδα γλυκογόνου περιοριστεί σε 4 κατάλοιπα, τότε η GP δεν μπορεί να δράσει και είναι απαραίτητη η δράση του GDE. Το GDE διαθέτει δύο καταλυτικές περιοχές με δράση α-1,4-γλυκανομεταφοράς και άμυλο-α-1,6-γλυκοζιτάσης και με αυτόν τον τρόπο καταλύει σε δύο στάδια την μεταφορά τεσσάρων καταλοίπων σε νέα ευθύγραμμη αλυσίδα γλυκογόνου (14, 16). Η 1-φωσφορική γλυκόζη που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία μπορεί να μετατραπεί ταχύτατα μέσω φωσφογλυκομουτάσης σε 6-φωσφορική γλυκόζη και να εισέλθει σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, όπως: α) γλυκόλυσης για παραγωγή ενέργειας, β) φωσφορικών πεντοζών για παραγωγή NADPH ή ριβόζης, γ) μετατροπή σε γλυκόζη και μεταφορά μέσω του αίματος σε άλλους ιστούς.

1.4.2 Υδρολυτική αποδόμηση γλυκογόνου στα λυσοσώματα

Η υδρολυτική διάσπαση στα λυσοσώματα ονομάζεται γλυκοφαγία και αποτελεί μία διαδικασία αυτοφαγίας. Πραγματοποιείται κυρίως στην καρδιά, τους μύες και το ήπαρ. Το γλυκογόνο που αποθηκεύεται στα αυτοφαγώματα, μια διαδικασία στην οποία συμμετέχει η STBD1, υδρολύεται σε γλυκόζη από ένζυμα που βρίσκονται στο αυτοφαγώσωμα, και κυρίως από την α-γλυκοσιδάση (GAA) (14).

Οι μελέτες για την υδρολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πραγματοποιούνται, κυρίως, σε νεογνά ζώων. Αυτό συμβαίνει διότι λίγο μετά τη γέννηση τα επίπεδα της γλυκόζης του νεογνού μειώνονται, καθώς δεν μεταφέρονται πλέον συστατικά μέσω του πλακούντα και δεν έχουν εδραιωθεί ακόμα οι μηχανισμοί της γλυκονεογένεσης. Επίσης, από τη φωσφορυλυτική αποδόμηση προκύπτει φωσφορυλιωμένη γλυκόζη, ενώ από την υδρολυτική προκύπτει ελεύθερη γλυκόζη που μπορεί να μεταφερθεί στο αίμα. Συνεπώς, στη σύντομη περίοδο μετά τη γέννηση, ο ρόλος της υδρολυτικής διάσπασης είναι κυρίαρχος. Επιπλέον, η γλυκοφαγία ενεργοποιείται σε συνθήκες όπως η υποξία, σε απομονωμένα εμβρυικά ηπατοκύτταρα και έπειτα από χορήγηση φλοριζίνης (16).



Εικόνα 3 (Α). Φωσφορλυτική αποδόμηση γλυκογόνου στο κυτταρόπλασμα. Τα ένζυμα GP και GDE καταλύουν τη διάσπαση των α -1,4 και α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών αντίστοιχα. Το προϊόν μετατρέπεται σε 6-P-Γλυκόζη και είτε συμμετέχει στη γλυκόλυση είτε εισέρχεται μέσω ειδικού μεταφορέα στο ΕΔ για να συμβάλει στην γλυκονεογένεση.

Εικόνα 3 (Β). Υδρολυτική αποδόμηση γλυκογόνου στα λυσοσώματα. Μόρια γλυκογόνου με λιγότερες διακλαδώσεις και πιο φωσφορλυμένα από το φυσιολογικό έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να συνδεθούν με τις πρωτεΐνες STBD1 και Laforin αντίστοιχα, οι οποίες καθοδηγούν το γλυκογόνο στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. (15)

1.5 Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία είναι μία κυτταρική διαδικασία αυτοαποδόμησης με πολλαπλούς ρόλους. Καταρχάς, η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης και στην διασφάλιση της ύπαρξης θρεπτικών συστατικών για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου, αλλά και ολόκληρου του οργανισμού, υπό συνθήκες έντονου στρες. Επιπλέον, οδηγεί στην απόπτωση κατεστραμμένων ή μη λειτουργικών μορίων και οργανιδίων (πχ λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες), αλλά και παθογόνων, συμβάλλοντας στην άμυνα του οργανισμού. Επιπλέον, δράσεις της αυτοφαγίας συνιστούν η μεταβολική ρύθμιση, η συμμετοχή στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση και η ρύθμιση της γήρανσης (16-19).

Η απορρύθμιση της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές παθήσεις, τόσο συστηματικές (διάφορες μορφές καρκίνου, μεταβολικά σύνδρομα, αυτοάνοσες διαταραχές, δυσλειτουργία ανοσοποιητικού συστήματος) όσο και οργανοειδικές (20).

Αρχικά, η αυτοφαγία θεωρούταν ως μία μη επιλεκτική διαδικασία αποδόμησης συστατικών του κυτταροπλάσματος που διακρινόταν σε τρεις βασικούς τύπους: την μακροαυτοφαγία, την μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία που μεσολαβείται από πρωτεΐνες συνοδούς (chaperones). Ωστόσο, επακόλουθες έρευνες ανέδειξαν την στοχευμένη αποικοδόμηση μορίων, όπως το γλυκογόνο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται γλυκοφαγία (16).

1.6 Γλυκοφαγία

Η γλυκοφαγία περιλαμβάνει την εξειδικευμένη αποδόμηση γλυκογόνου εντός αυτοφαγοσωμάτων και συντελεί στην ομοιόσταση του γλυκογόνου.

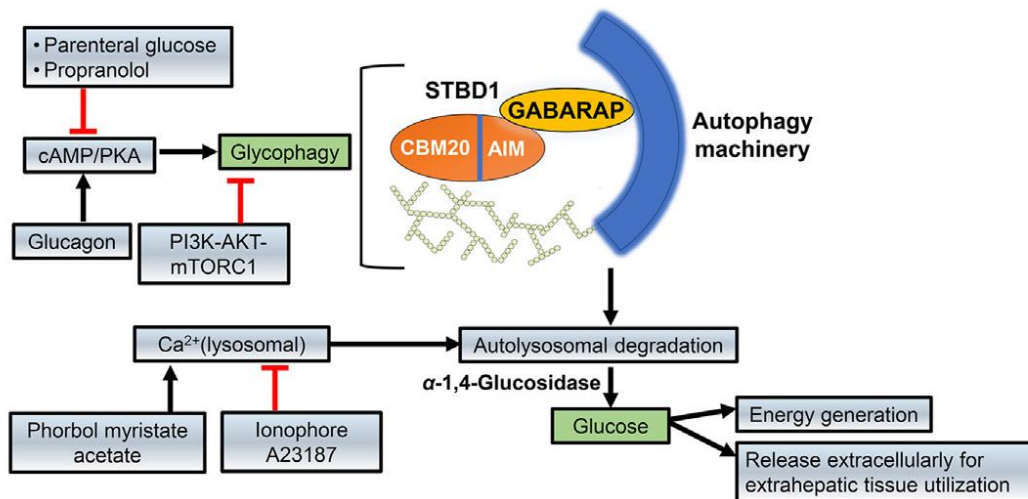
1.6.1 Ρύθμιση γλυκοφαγίας

Η ρύθμιση της γλυκοφαγίας πραγματοποιείται, κυρίως, από δύο μονοπάτια, το μονοπάτι cAMP/PKA που επάγει την γλυκοφαγία και το μονοπάτι PI3K-Akt/PKB-mTOR που την καταστέλλει.

Όσον αφορά το μονοπάτι cAMP/PKA μόρια που ενισχύουν τα επίπεδα cAMP, όπως η γλυκαγόνη και η αδρεναλίνη στο ήπαρ και στην καρδιά επάγουν την γλυκοφαγία. Παρόμοια δράση έχει και η καφεΐνη που αναστέλλει την κυκλική νουκλεοτιδική φωσφοδιεστεράση, προστατεύοντας το cAMP από αποικοδόμηση. Αντίθετα, η προπρανολόλη που μειώνει τα επίπεδα cAMP και ο αναστολέας του PKA H89 περιορίζουν το φαινόμενο της αυτοφαγίας του γλυκογόνου.

Αντίθετα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K-Akt/PKB-mTOR από μόρια όπως η ινσουλίνη εμποδίζει την γλυκοφαγία καταστέλλοντας την πρωτεϊνική φωσφατάση 2 (PP2A), ενώ η απενεργοποίησή του από ενώσεις, όπως η ραπαμυκίνη, που δρουν ως ανταγωνιστές του mTOR ενισχύει την αυτοφαγία.

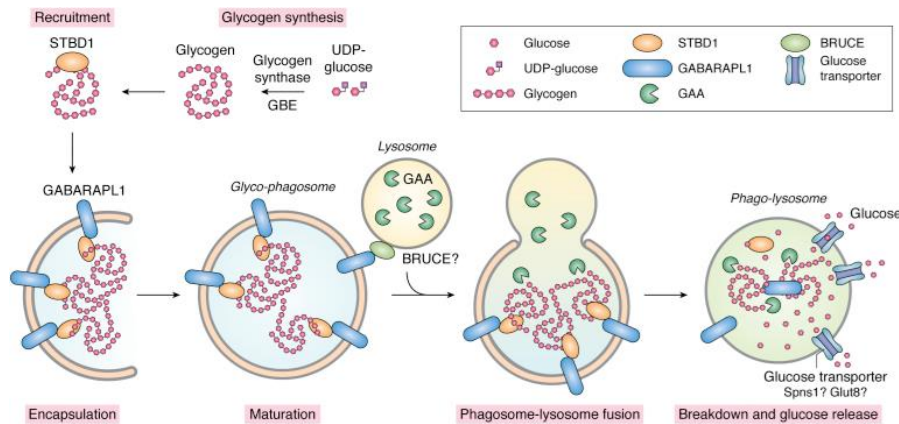
Δύο ορμόνες διακατέχουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γλυκοφαγίας, λειτουργώντας ως αισθητήρες της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται ως απάντηση σε έλλειψη θρεπτικών ουσιών και επάγει τον καταβολισμό του γλυκογόνου, ενώ η ινσουλίνη υποδεικνύει αφθονία θρεπτικών και καταστέλλει τη γλυκοφαγία (16, 21).



Εικόνα 4. Ρύθμιση γλυκοφαγίας. Το μονοπάτι cAMP/PKA που επάγει την γλυκοφαγία ενεργοποιείται από τη γλυκαγόνη, ενώ καταστέλλεται από την προπρανολόλη και την περίσσεια υπάρχουσας γλυκόζης. Αντίθετα, το μονοπάτι PI3K-Akt/PKB-mTOR καταστέλλει την γλυκοφαγία, ενώ η αύξηση του λυσοσωμικού Ca²⁺ την επάγει. (22)

1.6.2 Γλυκοφαγία και STBD1

Η STBD1 μέσω της περιοχής CBM20 προσδένει το γλυκογόνο, ενώ, ταυτόχρονα, μέσω της περιοχής AIM συνδέεται σε πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8 και ιδιαίτερα με την GABARAPL1. Στη συνέχεια, η GABARAPL1 μπορεί να μεταφέρει το σύμπλοκο γλυκογόνο-STBD1 στα αυτοφαγοσώματα. Ύστερα, πραγματοποιείται σύντηξη του αυτοφαγοσώματος με λυσόσωμα, το οποίο περιέχει λυτικά ένζυμα, όπως η α-γλυκοσιδάση, που υδρολύουν το γλυκογόνο (6, 7). Η διαδικασία αυτή απεικονίζεται στην Εικόνα 5. Επίσης, η STBD1 μπορεί να συνδεθεί απευθείας στη μεμβράνη των λυσοσωμάτων μέσω της λιπόφιλης N-τελικής της περιοχής (3).



Εικόνα 5. Η διαδικασία της γλυκοφαγίας και ο ρόλος της STBD1. Η STBD1 προσδένεται στο γλυκογόνο και έπειτα στην GABARAPL1. Το σύμπλοκο μεταφέρεται σε αυτοφαγοσώματα, τα οποία σχηματίζουν κλειστές κυκλικές δομές. Τα ώριμα αυτοφαγοσώματα συντήκονται με λυσοσώματα, διαδικασία που καταλήγει στην απελευθέρωση GAA. Η GAA καταλύει την αποικοδόμηση της STBD1 (8).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση πως η STBD1 συνδέεται πιο αποτελεσματικά σε αμυλοπεκτίνη σε σχέση με το γλυκογόνο. Η αμυλοπεκτίνη είναι ένας υδατάνθρακας που διαφέρει από το γλυκογόνο διότι διαθέτει λιγότερες διακλάδωσεις και είναι περισσότερο φωσφορυλιωμένη. Η αυξημένη φωσφορυλίωση του γλυκογόνου ευθύνεται για την πάθηση Lafora, ενώ η ύπαρξη λιγότερων σημείων διακλάδωσης από το φυσιολογικό σχετίζεται με ασθένειες όπως η νόσος Andersen, η νόσος Tarui και η νόσος σωματίων πολυγλυκοζάνης σε ενήλικες. Συνεπώς, η STBD1 προσδένει πιο αποτελεσματικά ελαττωματικά μόρια γλυκογόνου προστατεύοντας τον οργανισμό από δυσάρεστες συνέπειες (3).

1.7 Υποκυτταρικός εντοπισμός STBD1 και γλυκογόνου

Η STBD1 διαθέτει μία υδρόφοβη περιοχή στο N-τελικό άκρο, μέσω της οποίας μπορεί να προσδένεται σε μεμβράνες. Εκτός από τα λυσοσώματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως, η STBD1 προσδένεται σε μεμβράνες του μεγαλύτερου μέρους του Ενδοπλασματικού Δικτύου (bulk ER) και σε περιοχές του ΕΔ που βρίσκονται κοντά σε μιτοχόνδρια και ονομάζονται mitochondria-associated membranes (MAM). Η προτίμηση ανάμεσα στις περιοχές του ΕΔ καθορίζεται από την ύπαρξη ή μη N-μυριστοϋλίωσης στην Gly2 της STBD1 και από τον σχηματισμό συμπλόκου με το γλυκογόνο. Η ενσωμάτωση μυριστικού οξέος ευνοεί την σύνδεση της STBD1 στο bulk ER. Πιθανώς, η N-μυριστοϋλίωση «κλειδώνει» την N-τελική διαμεμβρανική επικράτεια σε διαμόρφωση που ευνοεί τον trans-διμερισμό της STBD1 και την πρόσδεση σε μεμβράνες του bulk ER. Αντίθετα, η απουσία N-μυριστοϋλίωσης ίσως αποτρέπει τον διμερισμό της STBD1. Το γεγονός αυτό δεν επαρκεί για την σύνδεση της STBD1 στις MAM, αλλά είναι απαραίτητη η ύπαρξη επιπλέον σήματος, η πρόσδεση γλυκογόνου. Ταυτόχρονη απουσία N-μυριστοϋλίωσης και σύνδεσης με γλυκογόνο επιφέρει τον εντοπισμό της STBD1 στον κύριο όγκο του ΕΔ (23).

Επομένως, το γλυκογόνο μπορεί να προσδεθεί στην STBD1 και να μεταφερθεί είτε στο bulk ER είτε στις MAM. Η σύνδεση της STBD1 στο bulk ER μπορεί να επάγει το σχηματισμό δομών οργανωμένου λείου ΕΔ (περιγράφεται στην υποενότητα 1.8). Τόσο το οργανωμένο λείο ΕΔ, όσο και οι MAM έχουν συσχετιστεί με την διαδικασία της αυτοφαγίας. Συνεπώς, είναι πιθανό η μεταφορά του συμπλόκου STBD1-γλυκογόνου στο ΕΔ και τις MAM να συμμετέχει σε εναλλακτικό μονοπάτι λυσοσωμικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου (23).

1.8 Ρόλος STBD1 στη μορφολογία των μιτοχονδρίων και του Ενδοπλασματικού Δικτύου

Πρόσφατες μελέτες σε κύτταρα HeLa απέδειξαν συσχέτιση ανάμεσα στη μορφολογία του ΕΔ με τα επίπεδα της STBD1 (23). Σε χαμηλά επίπεδα STBD1, η πρωτεΐνη εντοπίζεται ομοιόμορφα στο ΕΔ, σε μεσαία εμφανίζεται σε ολιγάριθμες μεγάλες διακριτές δομές με σφαιρικό σχήμα, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις σχηματίζονται πολυάριθμες μικρές παρόμοιες δομές. Παρατηρήθηκε πως οι δομές αυτές εμφανίζουν αξιοσημείωτη ομοιότητα με δομές οργανωμένου Λείου ΕΔ. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η STBD1 έχει τη δυνατότητα να επάγει τον σχηματισμό δομών οργανωμένου Λείου ΕΔ, ωστόσο, όχι κατά αποκλειστικότητα, και πως αυτή η ικανότητα είναι ανεξάρτητη από τη σύνδεση γλυκογόνου στην STBD1.

Εκτός από αλλαγές στο ΕΔ, η STBD1 επηρεάζει τη μορφολογία των μιτοχονδρίων. Η σίγηση της πρωτεΐνης μέσω shRNA είχε ως αποτέλεσμα την ύπαρξη λιγότερων, επιμηκυμένων και στενότερα συνδεδεμένων μιτοχονδρίων, ενώ η υπερέκφραση της επέφερε τον σχηματισμό συσσωματωμάτων αποτελούμενα από κατακερματισμένα μιτοχόνδρια. Η παραπάνω παρατήρηση, σε συνδυασμό με το γεγονός πως ο εντοπισμός της STBD1 στις MAM προϋποθέτει την πρόσδεση γλυκογόνου, υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού, ο οποίος μεταδίδει σήματα στα μιτοχόνδρια σχετικά με την ενεργειακή κατάσταση. Ως αποτέλεσμα, οδηγεί σε ανάλογες τροποποιήσεις της μορφολογίας τους και ρύθμιση της παραγωγής ATP.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε αλλαγή στη σύνδεση ΕΔ-μιτοχονδρίων. Η σίγηση της STBD1 επέφερε αξιοσημείωτη αύξηση στην μέση απόσταση ανάμεσα στο ΕΔ και τα μιτοχόνδρια, ενώ σε χαμηλά και μεσαία επίπεδα STBD1 παρατηρήθηκαν μιτοχόνδρια σε κοντινές αποστάσεις περιφερειακά του ΕΔ. Ωστόσο, σε κύτταρα με υπερέκφραση της STBD1 τα μιτοχόνδρια και το ΕΔ αλληλεπικαλύπτονταν (23).

1.9 Ρόλος STBD1 στο Στρες Ενδοπλασματικό Δικτύου

Βασικό ρόλο του ΕΔ συνιστά η σύνθεση πρωτεϊνών που, κυρίως, προορίζονται για μεμβράνες και η σωστή αναδίπλωση τους. Ωστόσο, ένα ποσοστό πρωτεϊνών δεν καταφέρνει να αναδιπλωθεί σωστά ή σχηματίζει συσσωματώματα. Η συσσώρευση τέτοιων πρωτεϊνών μπορεί να παρεμποδίσει την φυσιολογική λειτουργία του ΕΔ. Αυτό το φαινόμενο της ανισορροπίας στην ομοιόσταση του ΕΔ ονομάζεται Στρες ΕΔ (24). Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει έναν συντηρημένο μηχανισμό άμυνας ενάντια στο στρες ΕΔ που ονομάζεται Unfolded Protein Response (UPR). Η ενεργοποίηση του μηχανισμού UPR πυροδοτεί διαδικασίες για την επιβράδυνση μετάφρασης περαιτέρω πρωτεϊνών και για την επιβίωση του κυττάρου μέχρι να διορθωθεί το πρόβλημα. Για παράδειγμα, ενισχύει την σύνθεση και την αναδίπλωση πρωτεϊνών συνοδών (chaperones) για τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών. Αδυναμία επίλυσης του στρες ΕΔ έχει ως αποτέλεσμα ο μηχανισμός UPR να στέλνει σήματα για την απόπτωση του κυττάρου.

Για την αναγνώριση του στρες ΕΔ το κύτταρο διαθέτει τρεις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως αισθητήρες, τις IRE1, ATF8 και PERK. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν μέσω της περιοχής τους που βρίσκεται εντός του αυλού του ΕΔ με την chaperon BiP, διατηρώντας την ανενεργή. Η αναγνώριση σημάτων στρες ΕΔ οδηγεί στην αποκόλληση της BiP και στην ενεργοποίηση της, η οποία καταλήγει στην ενεργοποίηση διακριτών κλάδων του μηχανισμού UPR.

Η ενεργοποίηση του αισθητήρα PERK λόγω στρες ΕΔ επάγει την αύξηση επιπέδων STBD1. Η STBD1 σχηματίζει σύμπλοκα με τα ένζυμα συνθάση του γλυκογόνου 1 (GS1) και γλυκογενίνη (GN) και αποφέρει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων γλυκογόνου. Η γλυκογενίνη εκκινεί την μετατροπή γλυκόζης σε γλυκογόνο (τρόπος δράσης παρόμοιος με εκκινητή στην αντιγραφή του DNA), ενώ η GS1 αποτελεί το κύριο ένζυμο πολυμερισμού γλυκόζης. Συνεπώς, το σύμπλοκο STBD1-GS1-GN που προκύπτει επάγει τη σύνθεση γλυκογόνου. Το γλυκογόνο που προκύπτει μπορεί να αποικοδομηθεί από α-αμυλάση και η διαδικασία αποδόμησης δεν σχετίζεται με την γλυκοφαγία.

Η STBD1 λειτουργεί ως πρωτεΐνη “μεταφορέας” (cargo protein) που καθοδηγεί τα ένζυμα GS1 και GN σε μεμβράνη ΕΔ, χωρίς, ωστόσο, να συμμετέχει η ίδια στη σύνθεση γλυκογόνου. Επίσης, ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού πραγματοποιείται απουσία στρες ΕΔ, ωστόσο, σήματα που παράγονται κατά το στρες ΕΔ είναι απαραίτητα για να επάγουν σύνθεση γλυκογόνου. Απουσία STBD1 δεν παρατηρείται συσσώρευση γλυκογόνου, γεγονός το οποίο, όμως, δεν εμποδίζει τη σύνθεσή του. Παρ’ όλο που η σύνθεση γλυκογόνου πραγματοποιείται, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως η απουσία των χαρακτηριστικών συσσωματωμάτων γλυκογόνου συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα απόπτωσης (25).

1.10 STBD1 ως στόχος της AMPK

Η πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από AMP (AMPK) αποτελεί έναν αισθητήρα της ενεργειακής κατάστασης του κυττάρου και συνιστά ρυθμιστής της ενεργειακής του ομοιόστασης. Όταν η συγκέντρωση του AMP αυξάνεται, δηλαδή όταν εξαντλούνται τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου, ενεργοποιείται η AMPK, η οποία πυροδοτεί διαδικασίες που καταστέλλουν τις αναβολικές διεργασίες (κατανάλωση ενέργειας) και επάγουν τις καταβολικές (παραγωγή ενέργειας) ώστε να επανέλθει η ενεργειακή ομοιόσταση. Εκτός από τη ρύθμιση του μεταβολισμού, υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν σύνδεση της AMPK με διαδικασίες όπως η αυτοφαγία και η κυτταρική διαίρεση και μετανάστευση.

Όσον αφορά το μεταβολισμό του γλυκογόνου, έχει αποδειχθεί πως η AMPK ευθύνεται για την αναστολή της συνθάσης του γλυκογόνου μέσω φωσφορυλίωσής της.

Πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την STBD1 ως στόχο της AMPK. Η ενεργοποίηση της AMPK οδηγεί στη φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser175 στα ηπατικά και μυϊκά κύτταρα. Ωστόσο, ο ρόλος αυτής της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός.

1.11 Ασθένειες σχετιζόμενες με την STBD1

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η STBD1 προσδένει πιο αποτελεσματικά σε μόρια γλυκογόνου που διαθέτουν λιγότερες διακλαδώσεις και είναι περισσότερο φωσφορυλιωμένα σε σχέση με τα φυσιολογικά, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τον οργανισμό από τις νόσους Lafora, Andersen, Tarui και σωματίων πολυγλυκοζάνης σε ενήλικες (3).

Η ανακάλυψη του μηχανισμού δράσης της STBD1 προσέλυσε ταχύτατα το ενδιαφέρον των ερευνητών ως πιθανός φαρμακευτικός στόχος για την θεραπεία της νόσου Pompe. Η πάθηση αυτή κληρονομείται υπολειπόμενα και αυτοσωμικά, και οφείλεται στην ανεπάρκεια του ενζύμου α-γλυκοσιδάση (GAA). Η απουσία αυτή αποτρέπει την αποικοδόμηση του γλυκογόνου στα λυσοσώματα και οδηγεί στη συσσώρευση του. Ως

αποτέλεσμα, τα λυσοσώματα διογκώνονται επιφέρουν ταχύτατα τον θάνατο. Οι ερευνητές υπέθεσαν πως η αναστολή της STBD1 θα περιόριζε σημαντικά τη μεταφορά του γλυκογόνου στα λυσοσώματα και, επομένως, θα απέφευγαν την διόγκωσή τους. Ωστόσο, οι πρώτες προσπάθειες σε κύτταρα σκελετικών μυών δεν είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας πιθανώς την ύπαρξη περαιτέρω άγνωστων μηχανισμών που συμμετέχουν στη μεταφορά γλυκογόνου στα λυσοσώματα (26). Μεταγενέστερη έρευνα επαλήθευσε την παρατήρηση αυτή σε κύτταρα σκελετικών και καρδιακών μυών, ωστόσο, δεν συνέβη το ίδιο στα ηπατικά κύτταρα. Η ταυτόχρονη σίγηση της STBD1 και της GAA μείωσε κατά 73% το περιεχόμενο του ήπατος σε γλυκογόνο σε σχέση με κύτταρα με σίγηση μόνο της GAA. Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει εξειδικευμένο ρόλο της STBD1 στη μεταφορά γλυκογόνου στα ηπατικά κύτταρα και επιβεβαιώνει την ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών μεταφοράς γλυκογόνου (27).

Πρόσφατες μελέτες αναζήτησαν τη σχέση ανάμεσα στην STBD1 και τον καρκίνο. Η πρώτη έρευνα αφορούσε πρόδρομες μορφές νεοπλασματικών κυττάρων που οδηγούν σε αδενώματα και καρκινώματα στο ήπαρ. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της STBD1 (2,2 φορές) και οι ερευνητές υπέθεσαν πως το γεγονός αυτό συνεισφέρει στη συσσώρευση γλυκογόνου. Ωστόσο, η απουσία της STBD1 δεν επηρέασε σημαντικά την ποσότητα γλυκογόνου. Σύμφωνα με το επικρατέστερο σενάριο το κύτταρο επαναπρογραμματίζει τον μεταβολισμό του γλυκογόνου, για το οποίο ευθύνεται η STBD1, περιορίζοντας την αποικοδόμησή του από τα λυσοσώματα και τη μεταφορά του εκτός κυττάρου, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενδοκυτταρική διαθεσιμότητα του γλυκογόνου (28). Η αποσιώπηση της STBD1 ή της GAA επάγουν τον σχηματισμό όγκων αποκαλύπτοντας την ύπαρξη σχέσης ανάμεσα σε γλυκοφαγία και καρκίνο. Η απουσία της STBD1 συνοδεύεται από στοιχεία αυξημένης αποικοδόμησης γλυκόζης μέσω της γλυκολυτικής πορείας και ενισχυμένης πραγματοποίησης αντιδράσεων του κύκλου Krebs και του μονοπατιού φωσφορικών πεντοζών. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως ο ρόλος της STBD1 μπορεί να διαφέρει σημαντικά σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου (29).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνιστούν μέρος ενός ευρύτερου ερευνητικού σχεδίου του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας (ΔΛΒ) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) με έδρα το Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (ΠΘ), που αποσκοπεί στη βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης της STBD1. Βασικό στόχο του εγχειρήματος αποτελεί ο προσδιορισμός της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής της περιοχής CBM20 της πρωτεΐνης, η οποία συμμετέχει στη σύνδεση της πρωτεΐνης με το γλυκογόνο και πιθανώς άλλα μόρια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό γλυκογόνου. Προηγούμενη μελέτη στο αντικείμενο οδήγησε στην υπερέκφραση της STBD1, ωστόσο αυτή εμφανίστηκε σε μεγαλύτερη αναλογία στο αδιάλυτο μέρος. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα οφείλεται στην N-τελική υδρόφοβη περιοχή της πρωτεΐνης, μέσω της οποίας η STBD1 συνδέεται με μεμβράνες. Μεταγενέστερη έρευνα βελτιστοποίησε τις συνθήκες υπερέκφρασης μόνο της C-τελικής περιοχής (CBM20) της STBD1, η οποία εμφανίστηκε σε σημαντική συγκέντρωση στο διαλυτό μέρος. Πάνω σε αυτές τις δύο έρευνες στηρίχθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία αποσκοπεί στην εύρεση αποτελεσματικού πρωτοκόλλου απομόνωσης της CBM20 της STBD1. Επιπρόσθετος στόχος της εργασίας συνιστά ο σχεδιασμός εκκινητών και πειραματικού πρωτοκόλλου για τον

προσδιορισμό των επιπέδων mRNA STBD1 στη κυτταρική σειρά HepG2 κατά την γλυκογένεση και την γλυκογονόλυση.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Οργανολογία

Οργανολογία			
Όργανο	Εταιρεία	Όργανο	Εταιρεία
Air displacement pipettes (0,2-20 μ L, 20-200 μ L και 200-1000 μ L)	Gilson	Minisart filters 0,45 μ m	Sartorius
Automatic Pipettes	HTL Lab Solutions	MJ Mini Gradient Thermal Cycler	Biorad
ÄKTA Purifier (FPLC)	GE Healthcare Life Sciences	Nanodrop	Thermo Fisher
Centrifugal Concentrator vivaspin 3000 cut-off	Sartorius Stedim	pH meter	Metrohm
Centrifuge (model Z36HK)	HermLe	Power supply	Wealtec
Centrifuge (model Centrifriger BL-II)	Selecta	Quartz Cuvette	Hellma Analytics
CO ₂ Incubator (model Galaxy 170 S)	New Brunswick	Scale (model 440-47N)	Kern
Column Protino GST/4B FPLC	Macherey-Nagel	Scale (model EW)	Kern
Column Resource Q	GE Healthcare	Sonicator (model UP400S)	Hielscher Ultrasound Technology
Column Superdex 75		StepOnePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher
Heatblock	Kisker	UV-1600pc spectrophotometer	VWR
Hemocytometer/ Neubauer plate		Vertical electrophoresis system	BioRad
Inverted Microscope	Krüss Optronic Germany	Vertical Laminar Air Flow Hood (model AV-30/70)	Telstar
Magnetic Stirrer	Thermolyne	Water bath	Selecta, WiseBath

3.1.2 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια					
Αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αντιδραστήρια	Εταιρεία
1-Bromo-3-chloropropane	Merck	DTT	AppliChem	PBS	Gibco
37% formaldehyde	Panreac	EDTA	Panreac	PEG	Serva
Acetic acid	Fluka	Ethanol Absolute	Sigma	Penicillin-Streptomycin	Gibco
Acrylamide	Serva	FBS	Gibco	pGEX-6P-1 (πλασμίδια)	Merck
Agar	Fisher	GST 4B Sepharose beads	GE Healthcare	PMSF	AppliChem
AgNO ₃	Panreac	Glycagon	Sigma	Prime Script Buffer	Takara
Ammonium Persulfate (APS)	Serva	Glycerol	Kalo Cosmetics	Random Hexamers	Takara
Ampicillin	Serva	Glycine	Serva	Reduced GSH	EMD Millipore Corporation
Benzonase	EMD Millipore Corporation	HCl	AppliChem	Reverse Transcriptase	Takara
beta-mercaptoethanol	Sigma	HEPES	Serva	RNase-free H ₂ O	Takara

Bis acrylamide	Serva	Insulin	Sigma	RNAse inhibitor	Takara
BL21-Gold (DE3) (κύτταρα)	Agilent Technologies	IPTG	Serva	SDS	Serva
Bradford protein assay 5x	Biorad	LB	Merck	SYBR Green	KAPA Biosystems
Bromophenole blue	Research Organics	L-Glutamine	Gibco	TEMED	Invitrogen
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka	Methanol	Scharleu	Tri Reagent	Invitrogen
Dexamethasone (DEX)	Riedel-de Haen	Monarch Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs	Tris	Merck
Dialysis Membranes	Sigma	Na ₂ CO ₃	Serva	Trypsin	Gibco
DMEM	Life Technologies - Invitrogen	Na ₂ S ₂ O ₃	ChemLab	WFI	DEMO
DNTP mix	Takara	NaCl	Scharleu		

3.1.3 Αναλώσιμα

Αναλώσιμα			
Αναλώσιμα	Εταιρεία	Αναλώσιμα	Εταιρεία
Cryovials	Sarstedt	Parafilm	BEMIS
Eppendorfs	Sarstedt	Serological pipettes (2,5 and 10 mL)	Sarstedt
Falcons (15 and 50 mL)	Sarstedt	Tips (0,2-20 µL, 20-200 µL και 200-1000 µL)	Sarstedt
Flasks T ₇₅ (75 cm ²)	Sarstedt		

3.2 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός της CBM20 της STBD1

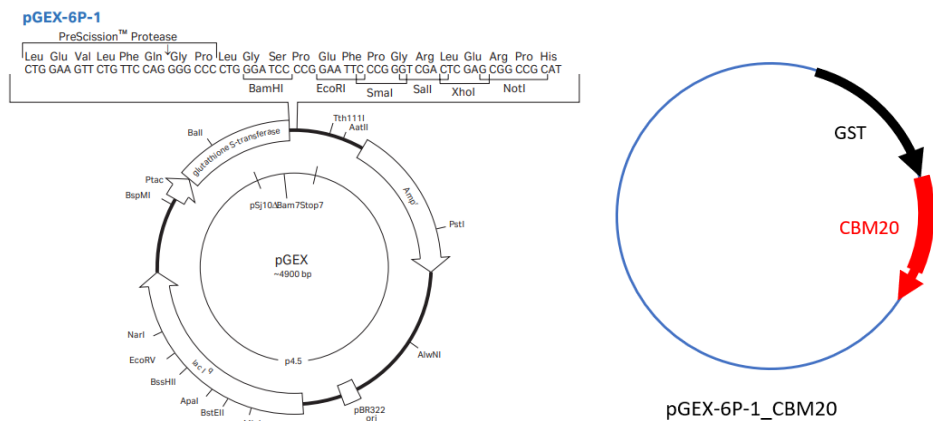
3.2.1 Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pGEX-6P-1, ο οποίος έχει σχεδιαστεί για την υπερέκφραση πρωτεϊνών συνδεδεμένες με ετικέτα GST (GST Tag) (Glutathione S-transferase) σε κύτταρα *E. coli*. Η πρωτεΐνη *S. japonicum* GST έχει μοριακή μάζα που ισούται με 26 kDa και εμφανίζει χημική συγγένεια με τη γλουταθειόνη, διευκολύνοντας τον καθαρισμό της πρωτεΐνης μέσω χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη GST. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως η σύζευξη πρωτεϊνών με μόρια ετικέτες μεγάλου μοριακού βάρους, όπως η GST, μπορεί να αυξήσει την παραγωγή και την διαλυτότητα, να ενισχύσει την προστασία από πρωτεάσες και να βελτιώσει την αναδίπλωση τους (30).

Ο φορέας διαθέτει ειδική αλληλουχία που εντοπίζεται ανοδικά της θέσης ένθεσης του επιθυμητού γονιδίου και καθοδικά του GST Tag, το οποίο επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση της ετικέτας για την παραλαβή της πρωτεΐνης σε καθαρή μορφή. Η ειδική αλληλουχία Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro αναγνωρίζεται από την πρωτεάση PreScission, η οποία διασπάει τον πεπτιδικό δεσμό ανάμεσα σε Gln και Gly. Η πρωτεάση PreScission συνιστά μια γενετικά κατασκευασμένη πρωτεΐνη μέσω σύντηξης GST και την πρωτεάση 3C του ανθρώπινου ρινοϊού και εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα στους 4 °C.

Επιπλέον, ο φορέας περιέχει θέση πολλαπλής κλωνοποίησης για την εισαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας μέσω κοπής με περιοριστικά ένζυμα, και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη για την επιλογή μόνο των βακτηρίων που δέχθηκαν το πλασμίδιο pGEX-6P-1 (31, 32).

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται pGEX-6P-1_CBM20 και περιέχει την αλληλουχία μόνο της CBM20 της STBD1 καθοδικά της ετικέτας GST. Η κατασκευή αυτού του φορέα πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια προγενέστερης διατριβής (33).



Εικόνα 6. Πλασμιδιακός φορέας pGEX-6P-1. Το πλασμίδιο περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας σε αμικικιλίνη και υποκινητή (Ptac) για την παραγωγή επιθυμητής πρωτεΐνης με ετικέτα GST (glutathione S-transferase). Απεικονίζεται η θέση πέψης από την πρωτεάση PreScission για την απομάκρυνση της ετικέτας GST και θέση πολλαπλής κλωνοποίησης (θέσεις κοπής από περιοριστικά ένζυμα) για την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου. (32)

Εικόνα 7. Φορέας pGEX-6P-1_CBM20. (33)

3.2.2 Κύτταρα BL21-Gold (DE3)

Τα BL21-Gold competent cells που χρησιμοποιήθηκαν είναι κύτταρα επιδεκτικά σε χημικό μετασχηματισμό. Τα κύτταρα είναι ιδανικά για την υπερέκφραση πρωτεϊνών, καθώς χαρακτηρίζονται από αυξημένη αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού και αξιοποιούν τον υποκινητή της πολυμεράσης του RNA T7. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από την απουσία των πρωτεασών Lon και OmpT, προστατεύοντας από την αποικοδόμηση της παραγόμενης πρωτεΐνης, και την έλλειψη της ενδονουκλεάσης I, η οποία ευθύνεται για την αποικοδόμηση πλασμιδιακού DNA. Εκτός από αυτά, τα BL21-Gold διαθέτουν τον φαινότυπο Hte, ο οποίος αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία του μετασχηματισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα BL21-Gold (DE3) κύτταρα αποτελούν ένα στέλεχος ικανό για πολλαπλές χρήσεις και επιτρέπει την υπερέκφραση πρωτεϊνών και την εύκολη επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Αυτή πραγματοποιείται μέσω της προσθήκης IPTG, το οποίο επιτρέπει τη σύνδεση ανάμεσα στην πολυμεράση του RNA T7 και του υποκινητή lacUV5 οδηγώντας σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης (34).

3.2.3 Μεθοδολογία υπερέκφρασης STBD1

3.2.3.1 Προετοιμασία θρεπτικών διαλυμάτων για την υπερέκφραση πρωτεϊνών

Διαλύματα καλλιέργειας κυττάρων		
Συστατικά	LB Agar	LB Broth
NaCl	10 g/L	10 g/L
Tryptone	10g/L	10g/L
Yeast Extract	5g/L	5g/L
NaOH	(ρύθμιση pH)	(ρύθμιση pH)

H ₂ O	(Συμπλήρωση μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο)	(Συμπλήρωση μέχρι επιθυμητό τελικό όγκο)
Agar	12 g/L	-

Κατά την προετοιμασία των θρεπτικών με LB medium ζυγίστηκαν οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων και το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε κλίβανο αποστείρωσης ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροοργανισμών. Η δημιουργία τρυβλίων με θρεπτικό μέσο στηρίζεται στο γεγονός ότι το Agar έχει σημείο τήξης κοντά στους 85 °C, ενώ σημείο πήξης τους περίπου 42 °C. Μετά την αποστείρωση (121 °C) το θρεπτικό αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία του να είναι λίγο μεγαλύτερη από το σημείο πήξης. Σε αυτό το σημείο προστίθενται τα επιθυμητά αντιβιοτικά (αμπικιλίνη), πραγματοποιείται ανάδευση και το θρεπτικό διαμοιράζεται στα τρυβλία. Σύντομα μειώνεται η θερμοκρασία του Agar και συνεπώς, το θρεπτικό σταθεροποιείται στη μορφή gel. Όταν το τρυβλίο στεγνώσει πλήρως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη μικροοργανισμών είτε να τυλιχτεί με Parafilm και να αποθηκευτεί στους 4 °C για μελλοντική χρήση. Το τρυβλίο διατηρείται για λιγότερο από μήνα, καθώς σταδιακά μειώνεται η ενεργότητα της αμπικιλίνης (35). Η προσθήκη αντιβιοτικού πραγματοποιείται όσο το δυνατό συντομότερα πριν την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η διαδικασία μετά την αποστείρωση πραγματοποιείται πάντα υπό στείρες συνθήκες.

3.2.3.2 Μετασχηματισμός βακτηριακού στελέχους BL21 με pGEX-6P-1_CBM20 και ανάπτυξη σε τρυβλία

Η εισαγωγή του pGEX-6P-1_CBM20 στο επιθυμητό στέλεχος E. Coli πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου θερμικού σοκ (36). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την εναλλαγή χαμηλής και υψηλής θερμοκρασίας. Το σοκ λόγω θέρμανσης προκαλεί την απελευθέρωση των λιπιδίων από τη μεμβράνη. Ως αποτέλεσμα, σχηματίζονται πόροι στη μεμβράνη που επιτρέπουν τη διέλευση του πλασμιδίου. Επίσης, η αφαίρεση των αρνητικά φορτισμένων λιπιδίων μειώνει την πολικότητα της μεμβράνης και διευκολύνει την εισαγωγή του αρνητικά φορτισμένου πλασμιδίου. Στη συνέχεια, το σοκ λόγω ψύξης οδηγεί στην απελευθέρωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών εκτός του κυττάρου, ευνοώντας περαιτέρω τον μετασχηματισμό (37). Η διαδικασία αυτή καταπονεί τα κύτταρα και για την αποκατάσταση τους προστίθεται ειδικό θρεπτικό μέσο που ονομάζεται SOC. Αυτό περιέχει έναν συνδυασμό από μαγνήσιο, άλατα και γλυκόζη, που σταθεροποιούν την κατάσταση των βακτηρίων και αυξάνουν την πιθανότητα επιτυχημένου μετασχηματισμού (38).

Συνοπτικά βήματα:

- Προσθήκη 1μL pGEX-6P-1_CBM20 (100ng/μL) σε 100 μL βακτηρίων E. coli
- Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο για 30 min
- Επώαση του δείγματος για 45 sec στους 42 °C στο υδατόλουτρο (ή Heat block)
- Μεταφορά του δείγματος σε πάγο για 2 min
- Προσθήκη 900 μL SOC medium (εναλλακτικά LB Broth)
- Επώαση υπό κίνηση για 1 h στους 37 °C
- Επίστρωση δύο διαφορετικών ποσοτήτων σε τρυβλία που περιέχουν μέσο LB Agar και αμπικιλίνη με συγκέντρωση 50 μg/mL (αντιβιοτικό)
- Overnight επώαση (16-18 h) στους 37 °C χωρίς ανάδευση
- Αποθήκευση των τρυβλίων στους 4 °C τυλιγμένα με Parafilm

Η χρήση αντιβιοτικού εξασφαλίζει την ανάπτυξη μόνο των επιθυμητών βακτηρίων, δηλαδή αυτών που έχουν μετασηματιστεί με το πλασμίδιο που περιέχει τόσο το γονίδιο ανθεκτικότητας όσο και το επιθυμητό γονίδιο.

3.2.3.3 Μικρές υγρές καλλιέργειες

Για τη δημιουργία θρεπτικού μέσου για μικρές υγρές καλλιέργειες, αποστειρώνεται LB medium (χωρίς Agar) , προστίθεται αντιβιοτικό (αμπικιλίνη) και το θρεπτικό αναδεύεται και διαμοιράζεται σε Falcon. Στη συνέχεια, μεταφέρεται μία στική αποικία από το τρυβλίο στα Falcon, εκτός από ένα, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως control. Τα δείγματα επωάζονται στους 37 °C για 16-18 h.

3.2.3.4 Μεγάλες υγρές καλλιέργειες (Παραγωγή πρωτεΐνης)

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες. Για το σκοπό αυτό, μεταφέρεται ποσότητα από το πιο θολορό falcon σε κωνικές φιάλες μεγάλου όγκου και ακολουθεί ανάπτυξη των μικροοργανισμών, έως η τιμή της οπτικής πυκνότητας να ισούται με περίπου 0,5 - 0,6. Η επαγωγή της έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης πραγματοποιείται με την προσθήκη IPTG και επώαση. Η απομάκρυνση όλων των συστατικών, εκτός των πρωτεϊνών που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος, επιτυγχάνεται με λύση των κυττάρων, προσθήκη βενζονάσης (νουκλεάση) και φυγοκεντρήσεις. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

- Μεταφορά δείγματος από το πιο θολορό Falcon σε κωνικές φιάλες (πχ τέσσερις) με θρεπτικό μέσο LB (ή φλάσκα). Η ποσότητα που μεταφέρεται ισούται με το 1% του όγκου του θρεπτικού της κωνικής φιάλης
- Επώαση των κωνικών φιαλών στους 37 °C
- Μέτρηση οπτικής πυκνότητας δειγμάτων. Όταν τα δείγματα φτάσουν σε $OD_{600} = 0,5-0,6$ σταματάει η επώαση
- Προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,1 mM (διαφέρει ανάλογα με το πρωτόκολλο) σε όλες τις κωνικές φιάλες.
- Επώαση στους 18 °C για 16-18 h (διαφέρει ανάλογα με το πρωτόκολλο)
- Φυγοκέντρωση στα 5000 g στους 4 °C για 30 min και λήψη ιζήματος
- Λύση των κυττάρων σε Lysis Buffer
- Προσθήκη 1 μL βενζονάσης
- Τοποθέτηση σε πάγο για 15 min
- Sonication (40% Amplitude για 10 sec)
- Φυγοκέντρωση στα 5000 g στους 4 °C για 30 min και λήψη υπερκείμενου

Για τη μελέτη των αποτελεσμάτων κρατάω δείγματα που περιέχουν α) το ολικό δείγμα (total) και β) το σύνολο των διαλυτών πρωτεϊνών (soluble). Το total δείγμα λαμβάνεται μετά το sonication, ενώ το soluble αποτελεί το υπερκείμενο που συλλέγεται μετά τη φυγοκέντρωση στα 5000 g.

Έπειτα από την λύση των κυττάρων το δείγμα μπορεί να αποθηκευτεί και η υπόλοιπη διαδικασία να πραγματοποιηθεί σε μελλοντικό χρόνο.

3.2.4 Expression Test

Οι δοκιμασίες έκφρασης πραγματοποιούνται πριν την παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής ή να επιβεβαιωθεί η λειτουργία του πρωτοκόλλου. Η μέθοδος είναι παρόμοια με τη διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.3 σε μικρότερους όγκους. Η κύρια διαφορά εντοπίζεται στο γεγονός πως χρησιμοποιούνται ως control δείγματα, στα οποία δεν έχει προστεθεί IPTG. Έπειτα, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και τα δείγματα στα οποία έχει προστεθεί IPTG (IPTG+) συγκρίνονται με τα control (IPTG-).

3.2.5 Λύση βακτηριακών κυττάρων

3.2.5.1 Λύση με Lysis Buffer

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση των πρωτεϊνών συνιστά η απελευθέρωση τους από το εσωτερικό του κυττάρου. Η επιλογή ενός κατάλληλου διαλύματος λύσης είναι καθοριστική για την απομόνωση πρωτεϊνών. Τα συστατικά του διαλύματος λύσης που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Lysis Buffer				
HEPES pH= 7,4	NaCl	EDTA	DTT	PMSF
20mM	0,15M	0,5mM	5mM	0,5 mM

Ως διαλύτης χρησιμοποιείται το HEPES, το οποίο διατηρεί σταθερό το pH και την ωσμωτικότητα, δεν επηρεάζει τη δομική ακεραιότητα των πρωτεϊνών και διακρίνεται από υψηλή διαλυτότητα (39). Το NaCl αυξάνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος, αποτρέποντας τις μοριακές αλληλεπιδράσεις, ενώ το EDTA αποτελεί χηλική ένωση, που αποτρέπει τη δράση δισθενών κατιόντων (πχ Mg^{2+}). Τα δισθενή κατιόντα μπορούν να δράσουν ως συμπαραγοντες ενζύμων, όπως πρωτεασών. Το DTT είναι αναγωγικός παράγοντας, που προστατεύει ευαίσθητες πρωτεΐνες από οξείδωση, και το PMSF συνιστά αναστολέα πρωτεασών. Η βενζονάση (νουκλεάση) που προστίθεται μετά την λύση έχει ως στόχο την απομάκρυνση DNA και RNA.

3.2.5.2 Λύση με Sonication

Η μέθοδος Sonication περιλαμβάνει την χρήση υπερηχητικών κυμάτων για τη λύση των εξωτερικών μεμβρανών των κυττάρων. Η άκρη από το μηχάνημα Sonication τοποθετείται εντός του υγρού του δείγματος και αρχίζει να ταλαντώνεται στο επιθυμητό πλάτος κύματος (Amplitude), προκαλώντας ταχύτατα κύματα του υγρού. Ως αποτέλεσμα, διαδίδονται κύματα υψηλής πίεσης που δημιουργούν και καταστρέφουν φυσαλίδες. Η απότομη ρήξη των φυσαλίδων οδηγεί στο σχηματισμό δυνάμεων ικανών για τη διάρρηξη μεμβρανών (40).

3.2.6 Αναλυτικές Βιοχημικές Μέθοδοι

3.2.6.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (1D SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση συνιστά μια απλή, αλλά, ταυτόχρονα, ιδιαίτερα χρήσιμη διαδικασία για την επιβεβαίωση του καθαρισμού πρωτεϊνών, τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας αγνώστων μορίων και τον έλεγχο καθαρότητας δειγμάτων. Κατά την διαδικασία 1D SDS-PAGE τα περιεχόμενα ενός δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μοριακό βάρος τους. Το gel της ηλεκτροφόρησης αποτελείται στην πραγματικότητα από δύο

διαφορετικά gel, το stacking και το separating. Το stacking gel βρίσκεται στο πάνω μέρος και περιέχει μικρότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου, γεγονός που επιτρέπει στις πρωτεΐνες να διασχίσουν ταχύτατα το gel και να στοιβαχθούν (stacking) στο σημείο που ενώνονται τα δύο gel. Αντίθετα, το separating gel περιέχει υψηλότερο ποσοστό πολυακρυλαμιδίου που δυσχεραίνει τη διέλευση, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται τα περιεχόμενα του δείγματος. Η κίνηση των μορίων πραγματοποιείται έπειτα από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου από την κάθοδο προς την άνοδο (κάτω μέρος του gel) με ρυθμό ανάλογα του μεγέθους τους. Συνεπώς, τα μόρια με μικρότερη μάζα μετακινούνται ταχύτερα και εντοπίζονται σε χαμηλότερο ύψος στην τελική μορφή του gel.

Τα gel περιέχουν acrylamide mix, Tris-HCl, SDS, ammonium persulfate (APS), TEMED και dH_2O σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και pH. Το acrylamide mix 30% αποτελείται από acrylamide και bisacrylamide σε αναλογία 29:1 και περιέχει τα μόρια ακρυλαμιδίου που θα σχηματίσουν το gel. Το APS και το TEMED δρουν συνδυαστικά για να καταλύουν τον πολυμερισμό των μορίων ακρυλαμιδίου και, συνεπώς, προστίθενται τελευταία. Το TEMED επάγει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών θείου από το APS, οι οποίες ευνοούν τον πολυμερισμό πολυακρυλαμιδίου όταν το pH είναι αλκαλικό. Ανάλογα με τη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου σχηματίζονται πόροι διαφορετικού μεγέθους. Υψηλές συγκεντρώσεις στο separating buffer οδηγούν στο σχηματισμό μικρών πόρων, οι οποίοι συνεισφέρουν στον αποτελεσματικό διαχωρισμό μικρών μορίων, αλλά όχι αυτών με μεγαλύτερη μάζα. Αντίθετα, χαμηλές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου προτιμώνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων.

Το Running buffer περιέχει γλυκίνη, Tris και SDS. Η γλυκίνη συνιστά ένα αμφιτεριόν και το φορτίο της εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Στο stacking gel (pH=6,8) είναι ουδέτερα φορτισμένα και, ως αποτέλεσμα, μετακινείται αργότερα από τα αρνητικά φορτισμένα μόρια. Ωστόσο, όταν περάσει στο separating gel (pH=8,8) τότε βρίσκεται σε αρνητικά φορτισμένη μορφή και μεταφέρεται ταχύτατα προς την άνοδο, συμπιέζοντας τις πρωτεΐνες σε έναν στενό χώρο στην κορυφή του separating gel.

Κατά τη δημιουργία της πηκτής πρώτα προστίθεται το separating και έπειτα το stacking με ένα χτενάκι για τη δημιουργία των πηγαδιών. Η πηκτή μεταφέρεται, στη συνέχεια, σε ειδική κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με Running buffer. Η συσκευή συνδέεται με το τροφοδοτικό για την εφαρμογή δυναμικού (120 V).

Πριν την φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια προστίθεται loading buffer 4X και πραγματοποιείται θέρμανση στους 95 °C σε Heatblock. Το SDS, η β-μερκαπτοαιθανόλη και η θέρμανση αποσκοπούν στην αποδιάταξη της δευτεροταγής και τεταρτοταγής δομής των μορίων, μετατρέποντας τα σε γραμμικά. Επιπλέον, το SDS προσδένεται στα μόρια και προσδίδει σε όλα αρνητικό φορτίο ανάλογο με το μήκος τους. Ως αποτέλεσμα, η μετακίνηση των μορίων στο gel δεν εξαρτάται από τη δομή και το φορτίο τους. Η χρώση bromophenol blue μετακινείται ταυτόχρονα με το DNA και επιτρέπει την παρακολούθηση της εξέλιξης της ηλεκτροφόρησης, ενώ η γλυκερόλη καθιστά το δείγμα πιο πυκνό από το running buffer διευκολύνοντας την φόρτωση στα πηγάδια. Τέλος, το Tris έχει pK_a ίση με 8,1 και καθιστά το pH βασικό. Όλα αυτά τα συστατικά περιέχονται στο loading buffer 4X (41).

Διαλύματα Ηλεκτροφόρησης			
Separating 10% 5 mL	Separating 12% 5 mL	Separating 15% 5 mL	Separating 18% 5 mL
30% acrylamide mix <i>1,7 mL</i>	30% acrylamide mix <i>2 mL</i>	30% acrylamide mix <i>2,5 mL</i>	30% acrylamide mix <i>3 mL</i>
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) <i>1,3 mL</i>	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) <i>1,3 mL</i>	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) <i>1,3 mL</i>	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) <i>1,3 mL</i>
10% SDS <i>0,05 mL</i>	10% SDS <i>0,05 mL</i>	10% SDS <i>0,05 mL</i>	10% SDS <i>0,05 mL</i>
10% ammonium persulfate (APS) <i>0,05 mL</i>	10% ammonium persulfate (APS) <i>0,05 mL</i>	10% ammonium persulfate (APS) <i>0,05 mL</i>	10% ammonium persulfate (APS) <i>0,05 mL</i>
TEMED <i>0,002 mL</i>	TEMED <i>0,002 mL</i>	TEMED <i>0,002 mL</i>	TEMED <i>0,002 mL</i>
dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>	dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>	dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>	dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>
Stacking 3 mL	Running Buffer	Loading Buffer (4X)	Διάλυμα Χρώσης
30% acrylamide mix <i>0,5 mL</i>	Glycine <i>192 mM</i>	Glycerol <i>40%</i>	Coomassie Brilliant Blue R250 <i>0.1%</i>
1.0 M Tris (pH 6.8) <i>0,38 mL</i>	Tris <i>25 mM</i>	Tris <i>616 mM</i>	Οξικό οξύ <i>10%</i>
10% SDS <i>0,03 mL</i>	SDS <i>0,1%</i>	SDS <i>8%</i>	Μεθανόλη <i>50%</i>
10% ammonium persulfate (APS) <i>0,03 mL</i>	dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>	bromophenol blue <i>0,04%</i>	dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>
TEMED <i>0,003 mL</i>		β-Mercaptoethanol <i>5%</i>	
dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>		dH ₂ O <i>μέχρι τελικό όγκο</i>	

3.2.6.2 Χρώσεις πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Στη συνέχεια ακολουθεί η χρώση του gel για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Η πιο συχνή χρώση πραγματοποιείται μέσω του διαλύματος χρώσης που περιέχει Coomassie Brilliant Blue R250. Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική και ταχύτατη, και επιτρέπει την ανίχνευση ποσότητας πρωτεϊνών με εύρος 0.1–0.5 μg. Επιπλέον, για την χρώση πηκτών εφαρμόζεται η μέθοδος Silver Staining. Διακρίνεται από υψηλή ευαισθησία, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών σε επίπεδα nanogram, ωστόσο, περιλαμβάνει περισσότερα βήματα και αντιδραστήρια (42, 43).

3.2.6.2.1 Χρώση με διάλυμα χρώσης που περιέχει Coomassie Brilliant Blue R250

Αρχικά, το gel απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται σε δοχείο με διάλυμα οξικού οξέος (10% v/v) και μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως να αρχίσει ο βρασμός. Το διάλυμα αφαιρείται και προστίθεται το διάλυμα χρώσης. Το gel τοποθετείται ξανά στο φούρνο για βρασμό και ύστερα σε ανάδευση για 15-20 λεπτά. Το διάλυμα χρώσης απομακρύνεται και ακολουθούν κύκλοι βρασμού με διάλυμα οξικού οξέος έως την ικανοποιητική απομάκρυνση του θορύβου λόγω χρωστικής (44).

3.2.6.2.2 Χρώση μέσω της τεχνικής Silver Staining

Διαλύματα Silver Staining					
A 50 mL	B 100 mL	C 50 mL	D 50 mL	E 50 mL	F 50 mL
Αιθανόλη 25 mL	αιθανόλη 50 mL	Na ₂ S ₂ O ₃ 5 mg	AgNO ₃ 50 mg	Na ₂ CO ₃ 1,5 g	EDTA 0,46 g
οξικό οξύ 6 mL	dH ₂ O 50 mL	dH ₂ O 50 mL	dH ₂ O 50 mL	37% φορμαλδεύδη 25 μL	dH ₂ O 50 mL
dH ₂ O 19 mL				Διάλυμα C 1 μL	
37% φορμαλδεύδη 25 μL				dH ₂ O 49 mL	

- Μεταφορά πηκτής σε δοχείο με διάλυμα A και ανάδευση για 1 h
- Αφαίρεση διαλύματος A, προσθήκη διαλύματος B και ανάδευση για 20 min
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος τρεις φορές
- Αφαίρεση διαλύματος B, προσθήκη διαλύματος C και ανάδευση για 1 min
- Αντικατάσταση διαλύματος C με dH₂O και ανάδευση για 20 sec
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος τρεις φορές
- Αντικατάσταση dH₂O με διάλυμα D και ανάδευση για 30 min
- Αντικατάσταση διαλύματος D με dH₂O και ανάδευση για 20 sec
- Αφαίρεση διαλύματος D, προσθήκη διαλύματος E και ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες
- Αντικατάσταση διαλύματος E με διάλυμα F και ανάδευση για 20 min
- Αντικατάσταση διαλύματος F με dH₂O και ανάδευση για 10 min

Το gel μπορεί να αποθηκευτεί στη συνέχεια σε θερμοκρασία 4 °C

Το διάλυμα D περιέχει AgNO₃ που συνιστά φωτοευαίσθητη ένωση και συνεπώς φυλάσσεται σε σκοτεινό μέρος πριν τη χρήση.

3.2.7 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford εφαρμόζεται σε ένα δείγμα για την εύρεση της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών και βασίζεται στην αλλαγή της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από τα 465 στα 595 nm. Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη σύνδεση της χρωστικής με τα αμινοξέα λυσίνη, ιστιδίνη και αργινίνη, η οποία σταθεροποιεί την ανιοντική (μπλε) μορφή της χρωστικής. Η απορρόφηση στα 595 nm επιτρέπει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ολικής ποσότητας πρωτεϊνών, με βάση την εξίσωση που προέκυψε από πρότυπη καμπύλη που παρασκευάστηκε. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα BSA γνωστής συγκέντρωσης. Σε κάθε δείγμα προς φωτομέτρηση προστίθενται 200 μL αντιδραστήριου Bradford (5x), 780 μL dH₂O και 20 μL δείγματος με πρωτεΐνη. Τα δείγματα τοποθετούνται στο σκοτάδι για 10 min, καθώς το αντιδραστήριο Bradford είναι φωτοευαίσθητο και, έπειτα, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm.

3.2.8 Στήλες Χρωματογραφίας

Το δείγμα που προκύπτει μετά την λήψη του υπερκείμενου, έπειτα από τη φυγοκέντρηση στα 5000 g, περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος. Ωστόσο, για την κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης απαιτείται μεγάλος βαθμός καθαρότητας. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος για αυτό το σκοπό είναι η χρωματογραφία.

Στον όρο χρωματογραφία περιλαμβάνεται ένα σύνολο μεθόδων και τεχνικών για τον διαχωρισμό οργανομεταλλικών ενώσεων, οργανικών ή ανόργανων ουσιών από σύνθετα μείγματα. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των περιεχομένων του μείγματος μεταξύ μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Η διαφορετική κατανομή οφείλεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών (μέγεθος μορίων, ηλεκτρικό φορτίο, πολικότητα, σημείο ζέσεως κτλ.). Η κινητή φάση διέρχεται από τη στατική και τα συστατικά που εμφανίζουν ισχυρότερη κατακράτηση μετακινούνται πιο αργά και, συνεπώς, εμφανίζουν μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης. Ανάλογα με το μηχανισμό στον οποίο βασίζεται ο διαχωρισμός, η χρωματογραφία διακρίνεται σε διαφορετικές κατηγορίες (45). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν χρωματογραφία συγγένειας, ιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης.

Η κινητή φάση αποτελείται από το δείγμα που προστίθεται και ειδικά διαλύματα στήλης, που επιτυγχάνουν την επιλεκτική δέσμευση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Πριν την χρήση των διαλυμάτων στήλης τα διαλύματα φιλτράρονται με ειδικό χαρτί φιλτραρίσματος 0,45 μm και τοποθετούνται σε συσκευή απαέρωσης για τουλάχιστον 30 min. Οι φυσαλίδες μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση ανεπιθύμητων κορυφών στο χρωματογράφημα και αύξηση της πίεσης, με αποτέλεσμα να καθυστερεί και να αλλοιώνει τη διαδικασία. Το φιλτράρισμα και η απαέρωση πραγματοποιούνται σε όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται σε στήλες χρωματογραφίας.

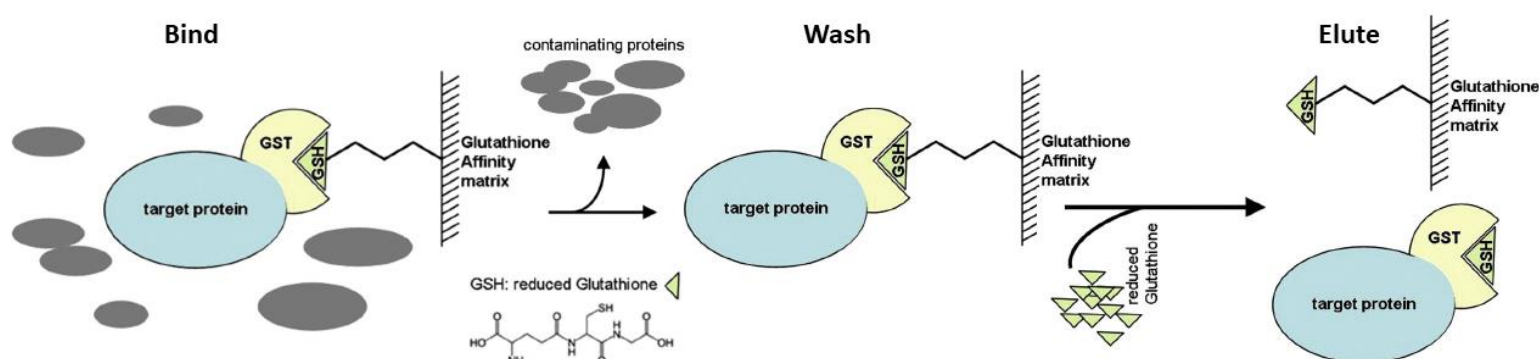
Οι στήλες χρωματογραφίας τοποθετήθηκαν σε αυτοματοποιημένη συσκευή καθαρισμού ÄKTA (ÄKTA Protein Purification Systems), που αποθηκεύεται σε αιθανόλη για συντήρηση. Για την απομάκρυνση της πριν τη χρωματογραφία πραγματοποιείται πλύση με WFI-0,1% NaN_3 και τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν για δέκα όγκους στήλης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εξισορρόπηση της στατικής φάσης με το κατάλληλο διάλυμα (συνήθως ονομάζεται Buffer A), ώστε οι επιθυμητές πρωτεΐνες να δεσμευθούν στο σύνολο τους στη στατική φάση και να απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες. Αφού επιτευχθεί η εξισορρόπηση εισάγεται το δείγμα στη στήλη (injection) και απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες. Για την έκλυση των πρωτεϊνών που έχουν δεσμευθεί από τη μήτρα χρησιμοποιείται διαφορετικό διάλυμα (συνήθως ονομάζεται Buffer B), που περιέχει τον παράγοντα έκλυσης. Για τον καθαρισμό της στήλης, πραγματοποιούνται πλύσεις με νερό και το επιθυμητό διάλυμα συντήρησης (πχ 20% αιθανόλη) για δέκα όγκους στήλης. Η διαδικασία αυτή είναι παρόμοια στις στήλες χρωματογραφίες με ορισμένες τροποποιήσεις, ανάλογα τη στήλη.

Για την παρακολούθηση και την επιβεβαίωση της σωστής λειτουργίας της διαδικασίας, το σύστημα περιλαμβάνει όργανο μετρήσεως αγωγιμότητας και μετρήσεως απορρόφησης. Η απορρόφηση που λαμβάνεται (280 nm) οφείλεται στα αμινοξέα φαινυλαανίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη. Η απορρόφηση ανιχνεύει μη ειδικά τις πρωτεΐνες, επομένως, είναι απαραίτητη η διενέργεια επιπρόσθετων τεχνικών για την επιβεβαίωση των συστατικών του κάθε δείγματος.

3.2.8.1 Χρωματογραφία συγγένειας (Στήλη GST)

Η χρωματογραφία συγγένειας ανήκει στην κατηγορία της υγρής χρωματογραφίας (η κινητή φάση είναι υγρή) και ως στατική φάση χρησιμοποιείται ουσία που εμφανίζει υψηλή χημική συγγένεια με το επιθυμητό μόριο (όπως η σχέση αντιγόνου-αντισώματος) και αναστρέψιμη πρόσδεση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμοστεί για ένα μεγάλο εύρος μορίων και εμφανίζει υψηλά επίπεδα επιλεκτικότητας, γεγονός που διευκολύνει και επισπεύδει την απομόνωση μορίων (46).

Το πρώτο βήμα για την απομόνωση της STBD1 περιλάμβανε τη χρήση στήλης GST. Η στατική φάση της στήλης αποτελείται από το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη, στην οποία συνδέεται ισχυρά και αποτελεσματικά η ετικέτα GST της παραγόμενης πρωτεΐνης. Καθώς ρέει η κινητή φάση, τα μη επιθυμητά συστατικά απομακρύνονται από τη στήλη, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνης-GST Tag παραμένει συνδεδεμένο στον προσδέτη, με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται η επιθυμητή πρωτεΐνη. Στη συνέχεια, προστίθεται περίσσεια ανηγμένης γλουταθειόνης, η οποία ανταγωνίζεται το GST Tag για την δέσμευση στον προσδέτη. Συνεπώς, το σύμπλοκο πρωτεΐνης-GST Tag εκλύεται. Ως αποτέλεσμα, λαμβάνονται δείγματα που περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά την πρωτεΐνη συνδεδεμένη με ετικέτα GST.



Εικόνα 8. Χρωματογραφία συγγένειας με Στήλη GST. Η στατική φάση αποτελείται από μόρια γλουταθειόνης (GSH). Καθώς ρέει η κινητή φάση, μόνο το σύμπλοκο πρωτεΐνης στόχου-ετικέτας GST συνδέεται στη GSH λόγω της χημικής της συγγένειας με την ετικέτα GST (Bind). Κατά την πλύση (wash) το σύμπλοκο πρωτεΐνης στόχου-ετικέτας GST παραμένει συνδεδεμένο στη στήλη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλύονται. Στη συνέχεια, προστίθεται περίσσεια ανηγμένης γλουταθειόνης που ανταγωνίζεται τη δέσμευση στη GSH. Ως αποτέλεσμα, το σύμπλοκο πρωτεΐνης στόχου-ετικέτας GST εκλύεται (Elute). (31)

Διαλύματα στήλης GST		
Συστατικά	Διάλυμα A ₁ pH=7,4	Διάλυμα B ₁ pH=7,4
HEPES	20 mM	20 mM
NaCl	0,15 M	0,15 M
DTT	5 mM	5 mM
EDTA	0,5 mM	0,5 mM
Reduced GSH	-	20 mM

Ο χειρισμός της στήλης GST περιλαμβάνει:

- Πλύση (rump wash) για δέκα όγκους στήλης με WFI-0,1% NaN₃ και μετά με διαλύματα A₁ και B₁
- Υπολογισμός της μέγιστης δυνατής πίεσης που υποστηρίζει το σύστημα

- Εξισορρόπηση με διάλυμα A₁ (100% A₁)
- Φόρτωση στήλης Superloop στην συσκευή ÄKTA και εισαγωγή δείγματος
- Όταν περάσει σχεδόν όλο το δείγμα, σταματάει η εισαγωγή του στη στήλη και συνεχίζεται η πλύση με διάλυμα A₁ έως τη μείωση της απορρόφησης. Συλλέγεται δείγμα που ονομάζεται Flow through και περιλαμβάνει ιδανικά πρωτεΐνες χωρίς ετικέτα GST
- Έκλουση με 100% Διάλυμα B₁ και συλλογή δειγμάτων
- Όταν μειωθεί η απορρόφηση, πραγματοποιείται πλύση με 10 όγκους στήλης από διάλυμα B₁, ύστερα A₁

3.2.8.2 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Στήλη Resource Q)

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα μόρια (47). Το επιφανειακό φορτίο μιας πρωτεΐνης εξαρτάται κυρίως από το pH και το ισοηλεκτρικό σημείο (pI), το οποίο εξαρτάται από την αλληλουχία της πρωτεΐνης. Το pI της CBM20, αλλά και της CBM20 μαζί με την ετικέτα GST ισούνται περίπου με 5,7 και τα διαλύματα των στηλών έχουν pH 7,4. Επομένως, και στις δύο περιπτώσεις οι επιθυμητές πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες και για την δέσμευση τους στην στατική φάση, είναι απαραίτητη η ύπαρξη κατιόντων.

Καθώς το δείγμα διαπερνάει τη στήλη, οι πρωτεΐνες με θετικό επιφανειακό φορτίο απομακρύνονται, ενώ οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται. Για την έκλουση των πρωτεϊνών, πρέπει είτε να μεταβληθεί το pH του διαλύματος, ώστε να αλλάξει και το φορτίο των πρωτεϊνών, είτε να προστεθούν άλατα, που ανταγωνίζονται τη δέσμευση των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης και οδηγούν στην έκλουση των πρωτεϊνών. Όσο χαμηλότερο είναι το καθαρό φορτίο μιας πρωτεΐνης, τόσο ευκολότερα θα αποδεσμεύεται από τη στήλη. Για να διαχωριστούν πιο αποτελεσματικά μόρια με διαφορετικό επιφανειακό φορτίο, η μεταβολή στο pH ή στην ιοντική ισχύ (συγκέντρωση άλατος) γίνεται σταδιακά. Στο συγκεκριμένο πείραμα, το διάλυμα για την έκλουση περιείχε άλας NaCl, όπως απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα.

Διαλύματα στήλης Resource Q		
Συστατικά	Διάλυμα A ₂	Διάλυμα B ₂
HEPES	20 mM	20 mM
NaCl	-	1 M
DTT	2 mM	2 mM
EDTA	0,5 mM	0,5 mM

Ο χειρισμός της στήλης Resource Q περιλαμβάνει:

- Πλύση (rump wash) για δέκα όγκους στήλης με WFI-0,1% NaN₃ και μετά με διαλύματα A₂ και B₂
- Υπολογισμός της μέγιστης δυνατής πίεσης που υποστηρίζει το σύστημα
- Εξισορρόπηση με διάλυμα A₂ (100% A₂)
- Φόρτωση στήλης Superloop στην συσκευή ÄKTA και εισαγωγή δείγματος
- Όταν περάσει σχεδόν όλο το δείγμα, σταματάει η εισαγωγή του στη στήλη και συνεχίζεται η πλύση με διάλυμα A₂ έως τη μείωση της απορρόφησης. Συλλέγεται δείγμα που ονομάζεται Flow through και περιλαμβάνει ιδανικά πρωτεΐνες με θετικό επιφανειακό φορτίο

- Σταδιακή αύξηση της αναλογίας διαλύματος B₂/διαλύματος A₂. Πρωτεΐνες με χαμηλότερο φορτίο, θεωρητικά, εκκλούνται σε χαμηλότερη συγκέντρωση διαλύματος B₂

3.2.8.3 2η στήλη GST με sepharose beads

Η στήλη GST με sepharose beads βασίζεται στην θεωρία που περιεγράφηκε στην υποενότητα 3.2.8.1. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν χρησιμοποιήθηκε έτοιμη στήλη, αλλά δημιουργήθηκε στήλη με ακινητοποιημένα σφαιρίδια σεφαρόζης, και διαφέρουν και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, όπως απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα

Διαλύματα 2ης στήλης GST με Sepharose beads		
Συστατικά	Διάλυμα A₃ pH=7,4	Διάλυμα B₃ pH=7,4
HEPES	20 mM	20 mM
DTT	5 mM	5 mM
Reduced GSH	-	20 mM
EDTA	0,5 mM	0,5 mM

Η δημιουργία και ο χειρισμός της στήλης περιλαμβάνουν:

- Προσθήκη 1 mL WFI-0,1% NaN₃ και 4 mL glutathione Sepharose 4B
- Προσθήκη 15 mL διαλύματος A₃
- Προσθήκη δείγματος και συλλογή κλασμάτων που περιέχουν πρωτεΐνες χωρίς ετικέτα GST
- Προσθήκη ποσότητας διαλύματος A₃ που ισούται με 10 όγκους στήλης
- Προσθήκη διαλύματος B₃ για την έκλυση πρωτεϊνών με ετικέτα GST
- Πλύση με διάλυμα A₃ για 10 όγκους στήλης και αποθήκευση στήλης στους 4 °C

3.2.8.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Superdex 75)

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης επιτυγχάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με κριτήριο το μοριακό τους μέγεθος. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες τεχνικές χρωματογραφίας που αναφέρθηκαν, στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης δεν προσδένονται μόρια στην στατική φάση, αλλά διέρχονται μέσω αυτής. Η στατική φάση αποτελείται από πορώδεις επιφάνειες διαφορετικής διαμέτρου, που πληρώνονται με το ρυθμιστικό διάλυμα της στήλης. Καθώς η κινητή φάση διέρχεται από την στατική, οι πρωτεΐνες με μικρό μέγεθος εισέρχονται στους πόρους και παραμένουν για μεγαλύτερο διάστημα στη στήλη, ενώ οι μεγαλύτερες δεν μπορούν να εισχωρήσουν και εκκλούνται γρηγορότερα. Η ποικιλία στο μέγεθος των πόρων εξασφαλίζει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών διαφορετικού μεγέθους, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να εκκλούνται σε αρχικά στάδια, ενώ οι μικρότερες αργότερα (48).

Διάλυμα στήλης Superdex 75	
Συστατικά	Διάλυμα A₄
HEPES	20 mM
DTT	5 mM
EDTA	0,5 mM

Ο χειρισμός της στήλης Superdex 75 περιλαμβάνει:

- Πλύση με διάλυμα A₄ για έναν όγκο στήλης και εξισορρόπηση
- Φόρτωση δείγματος με σύριγγα

- Περνάμε κατευθείαν το διάλυμα A4 για έναν όγκο στήλης και μαζεύουμε κλάσματα απευθείας.
- Όταν περάσουν 10 ml, περνάμε έναν όγκο στήλης WFI-0,1% NaN₃.

3.2.9 Διαπίδυση

Η διαπίδυση συνιστά μια τεχνική που εφαρμόζεται για την απομάκρυνση μικρών ανεπιθύμητων μορίων (πχ άλατα, GSH και DTT) από διαλύματα. Η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης, κατά την οποία μόρια διαχέονται μέσω ημιπερατής μεμβράνης από περιοχές με υψηλότερη συγκέντρωση της ουσίας προς χαμηλότερη, μέχρι την εξισορρόπησή τους. Μεγάλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, δεν διαχέονται λόγω του μικρού μεγέθους των πόρων. Τα άλατα και τα μικρά μόρια αφαιρούνται διότι παρεμποδίζουν επόμενες διεργασίες, όπως την κρυστάλλωση ή τη χρωματογραφία με στήλη Resource Q. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται δεν διαθέτει NaCl και είναι όμοιο με το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στην στήλη Resource Q.

Διάλυμα διαπίδυσης	
Συστατικά	Διάλυμα A ₂
HEPES	20 mM
DTT	2 mM
EDTA	0,5 mM

Η τεχνική της διαπίδυσης περιλαμβάνει:

- Εμβάπτιση της μεμβράνης σε WFI για τουλάχιστον 15 min
- Προσθήκη δείγματος στο εσωτερικό της μεμβράνης και προσεχτικό κλείσιμό της
- Προσθήκη διαλύματος A₂ σε δοχείο (πχ ογκομετρικό σωλήνα)
- Μεταφορά μεμβράνης στο δοχείο με το διάλυμα A₂
- Τοποθέτηση δοχείου στους 4 °C υπό ανάδευση
- Αντικατάσταση του διαλύματος A₂ με καινούριο ανά 2-4 h για 2-3 φορές
- Μεταφορά της μεμβράνης πάνω από falcon και ρήξη της με βελόνα για την μεταφορά του εσωτερικού της μεμβράνης στο falcon

3.2.10 Συμπύκνωση δείγματος

Η συμπύκνωση των δειγμάτων πραγματοποιείται για την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Η αύξηση αυτή διευκολύνει τις προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης.

3.2.10.1 Συμπύκνωση με υπερδιήθηση μέσω φυγοκέντρησης

Η υπερδιήθηση (ultrafiltration) συνιστά μια τεχνική για την συμπύκνωση πρωτεϊνών που βασίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης. Στην υπερδιήθηση χρησιμοποιούνται ημιπερατές μεμβράνες που έχουν πόρους με μέγεθος μικρότερο από αυτό της επιθυμητής πρωτεΐνης και επιτρέπουν την επιλεκτική απομάκρυνση διαλύματος και μικρών μορίων. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω της διαφοράς πίεσης που δημιουργείται κατά την φυγοκέντρηση (ή μέσω άλλων τεχνικών). Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικά φίλτρα συμπύκνωσης και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3500 g για 5 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι την συμπύκνωση στον τελικό επιθυμητό όγκο (49).

3.2.10.2 Συμπύκνωση μέσω στερεών απορροφητικών ουσιών

Η συμπύκνωση μέσω στερεών απορροφητικών ουσιών αποτελεί μια απλή και οικονομική εναλλακτική μέθοδο συμπύκνωσης. Το δείγμα τοποθετείται εντός ημιπερατής μεμβράνης (διαπίδυσης) και το εξωτερικό της καλύπτεται με στερεή απορροφητική ουσία (πχ PEG). Μικρά μόρια και νερό διαπερνούν την μεμβράνη και απορροφούνται από τη στερεή ουσία, μειώνοντας τον όγκο του δείγματος και διατηρώντας την ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης (49).

3.3 Προσδιορισμός επιπέδων έκφρασης mRNA της STBD1 μέσω ποσοτικής Real-Time PCR σε κύτταρα HepG2

Η τεχνική της RT-PCR (ή qPCR) εφαρμόζεται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης ενός γονιδίου σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR, με πρόσθετο χαρακτηριστικό την χρήση χρωστικών ουσιών για την παρακολούθηση της αντίδρασης. Αξιοποιούνται οι ικανότητες της χρωστικής να παράγει φως (φθορισμός) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και να προσδένεται επιλεκτικά στο DNA με τρόπο ανάλογο της ποσότητας του. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των επιπέδων DNA που έχουν προκύψει από το mRNA (50).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης mRNA της STBD1 σε κύτταρα HepG2 υπό συνθήκες πέψης και συνθήκες νηστείας.

3.3.1 Κυτταρική σειρά HepG2

Η HepG2 συνιστά μια καρκινική κυτταρική σειρά ήπατος που χρησιμοποιείται ως *in vitro* μοντέλο για μεγάλο εύρος μελετών (κυρίως δοκιμασίες κυτταροτοξικότητας και μεταβολισμού φαρμάκων). Τα κύτταρα HepG2 πολλαπλασιάζονται ταχύτατα χωρίς να σχηματίζουν όγκους, χαρακτηρίζονται από μορφολογία που ομοιάζει αυτή των επιθηλιακών κυττάρων και ασκούν πολλαπλές ηπατικές δράσεις, όπως ο μεταβολισμός λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών και η σύνθεση γλυκογόνου. Τα πλεονεκτήματα της κυτταρικής σειράς περιλαμβάνουν την ευκολία στον χειρισμό, κυτταρική αθανασία, υψηλή διαθεσιμότητα και σταθερό φαινότυπο ανεξάρτητα από τα χαρακτηριστικά του δότη (51).

3.3.2 Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειών

Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής, με πολύ προσεχτικές κινήσεις και με τα κατάλληλα μέτρα προστασίας. Κατά τους χειρισμούς με τα κύτταρα επιβεβαιώνεται τακτικά η κατάσταση των κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου.

3.3.2.1 Δημιουργία θρεπτικού μέσου

Για τη δημιουργία του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε προστέθηκε σε θρεπτικό DMEM:

- 1% του τελικού όγκου L-glutamine
- 1% του τελικού όγκου penicillin-streptomycin
- 10% του τελικού όγκου FBS

3.3.2.2 Απόψυξη κυττάρων

Για την διατήρηση των κυτταρικών σειρών, αυτές φυλάσσονται σε ειδικά φιαλίδια που ονομάζονται cryovial και καθιστούν εφικτή την αποθήκευση κυτταρικών σειρών σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες (-80 °C είτε -120 °C). Το πρώτο βήμα για πειράματα που περιλαμβάνουν κυτταρικές σειρές αποτελεί η απόψυξη των κυττάρων. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει:

- Μεταφορά cryovial από την κατάψυξη σε υδατόλουτρο (37 °C) μέχρι λίγο πριν ξεπαγώσει τελείως
- Μεταφορά cryovial στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής
- Προσθήκη σε falcon τετραπλάσιας - πενταπλάσιας ποσότητας θρεπτικού μέσου (DMEM) από τον όγκο του cryovial
- Μεταφορά περιεχομένου του cryovial στο falcon με το θρεπτικό μέσο
- Φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 min στους 25 °C και αφαίρεση υπερκείμενου
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος (περιέχει τα κύτταρα) με θρεπτικό μέσο μέχρι τον τελικό επιθυμητό όγκο
- Μεταφορά κυττάρων σε φλάσκα και συμπλήρωση με θρεπτικό μέσο μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο
- Επιβεβαίωση πως τα κύτταρα είναι ζωντανά σε μικροσκόπιο
- Μεταφορά φλάσκας σε επωαστικό κλίβανο υπό τις κατάλληλες συνθήκες (37 °C και επίπεδα CO₂ 5%)

3.3.2.3 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εντός πλαστικών φλασκών προσδένονται στην πλαστική επιφάνεια. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτή την προσκόλληση, προστίθεται θρυψίνη. Η θρυψίνη συνιστά μία πρωτεάση που στοχεύει το καρβοξυ-τελικό άκρο των αμινοξέων Λυσίνη και Αργινίνη με μέγιστη δραστηριότητα στους 37 °C. Ωστόσο, εκτός από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση, η παρατεταμένη δράση της θρυψίνης μπορεί να επιφέρει καταστροφή πρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η δράση της θρυψίνης πρέπει να κατασταλεί αμέσως μετά την επιτυχημένη αποκόλληση των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, προστίθεται θρεπτικό μέσο, το οποίο περιέχει α-αντιθρυψίνη και άλλες πρωτεάσες (52). Η θρυψινοποίηση συνιστά μια απαραίτητη διαδικασία για την μεταφορά, την ψύξη, τη συλλογή (harvest) και την ανακαλλιέργεια. Η μέθοδος περιλαμβάνει:

- Αφαίρεση του υπάρχοντος θρεπτικού μέσου
- Προσθήκη 3 mL θρυψίνης
- Μεταφορά φλάσκας στον επωαστήρα και τακτικός έλεγχος στο μικροσκόπιο για την αποκόλληση των κυττάρων
- Όταν τα κύτταρα έχουν ξεκολλήσει από τη φλάσκα και δεν παρατηρούνται συσσωματώματα προστίθεται τετραπλάσια ποσότητα θρεπτικού με FBS από τον όγκο της θρυψίνης
- Φυγοκέντρηση στα 150 rpm για 5 min στους 25 °C και αφαίρεση υπερκείμενου
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε σωστό όγκο θρεπτικού και κατάλληλο θρεπτικό μέσο

3.3.2.4 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τα κύτταρα που βρίσκονται σε φλάσκες στον επωαστικό κλίβανο πολλαπλασιάζονται ταχύτατα. Ως αποτέλεσμα, καταλήγουν να ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά και χώρο, οδηγώντας στη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και την ανάπτυξη συσσωματωμάτων. Για να βεβαιωθούμε ότι θα λάβουμε το μέγιστο αριθμό ζωντανών κυττάρων για το επερχόμενο πείραμα, τα κύτταρα θα πρέπει να βρίσκονται σε στάδιο εκθετικής ανάπτυξης. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιούνται τακτικά ανακαλλιέργειες. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας θέτει τα κύτταρα σε κατάσταση στρες και, επομένως, πραγματοποιείται για περιορισμένες φορές πριν την απόρριψή τους (53). Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

- Θρυψινοποίηση δείγματος (η τεχνική περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.3)
- Φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 min στους 25 °C και αφαίρεση υπερκείμενου
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε θρεπτικό μέσο (DMEM)
- Μεταφορά θρεπτικού με κύτταρα σε φλάσκα. Ο όγκος που μεταφέρεται εξαρτάται από την ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων και για καρκινικές σειρές ισούται περίπου με το 10-15 % του τελικού επιθυμητού όγκου
- Συμπλήρωση φλάσκας με θρεπτικό μέσο μέχρι τον τελικό επιθυμητό όγκο

3.3.2.5 Ψύξη κυττάρων

Η ποσότητα κυττάρων που ψύχεται ποικίλει ανάλογα με την κυτταρική σειρά. Η μεθοδολογία για την ψύξη περιλαμβάνει:

- Θρυψινοποίηση δείγματος (η τεχνική περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.3)
- Φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 min στους 25 °C και αφαίρεση υπερκείμενου
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε διάλυμα που περιέχει FBS (θρεπτικό μέσο) και DMSO 100% σε αναλογία 90/10. Ο τελικός όγκος εξαρτάται από το μέγεθος του cryovial.
- Άμεση φύλαξη στους -80 °C ή -120 °C λόγω τοξικότητας DMSO

3.3.2.6 Μέτρηση κυττάρων

Σε αρκετές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η γνώση του αριθμού των κυττάρων που περιέχονται σε ένα δείγμα για τον χειρισμό τους και την σωστή επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Για την μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται ειδική πλάκα που ονομάζεται αιμοκυτταρόμετρο ή πλάκα Neubauer, η οποία συνιστά μια αντικειμενοφόρο πλάκα με χαράξεις που διευκολύνουν την ποσοτικοποίηση των κυττάρων. Κάθε καλυπτρίδα υποδιαιρείται σε 9 τετράγωνα, τα οποία υποδιαιρούνται περαιτέρω. Η περιοχή που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των κυττάρων HepG2 είναι τα τέσσερα ακραία μεγάλα τετράγωνα (τεταρτημόρια Α, Β, Γ, Δ) και η μέτρηση πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο. Ο αριθμός των κυττάρων συμβολίζεται με α, β, γ, δ για τα αντίστοιχα τεταρτημόρια και χρησιμοποιείται ο τύπος $(\alpha+\beta+\gamma+\delta)/4$. Το αποτέλεσμα που βρέθηκε πολλαπλασιάζεται επί 10.000, ώστε να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός κυττάρων σε 1 mL (Νδιαθέσιμων κυττάρων = $\frac{\alpha+\beta+\gamma+\delta}{4} \times 10.000$). Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο αριθμός των επιθυμητών κυττάρων, πολλαπλασιάζοντας το πλήθος των κυττάρων που χρειαζόμαστε σε κάθε δείγμα επί τον αριθμό των δειγμάτων (Νεπιθυμητών κυττάρων = $\frac{N_{\text{κύτταρα}}}{\text{well}} \times N_{\text{well}}$). Τέλος, υπολογίζεται ο συνολικός όγκος που πρέπει να ληφθεί από την καλλιέργεια, διαιρώντας το πλήθος των επιθυμητών κυττάρων προς το πλήθος των διαθέσιμων κυττάρων (Νεπιθυμητών

κυττάρων = $\frac{\text{Νεπιθυμητών κυττάρων}}{\text{Νδιαθέσιμων κυττάρων}}$). Κατά το στρώσιμο των κυττάρων ο όγκος αυτός μοιράζεται ισόποσα στα δείγματα.

Η μέθοδος περιλαμβάνει:

- Θρυψινοποίηση δείγματος (η τεχνική περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.3)
- Φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκείμενου
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε θρεπτικό μέσο
- Μεταφορά 10 μL από το θρεπτικό με τα κύτταρα εντός της πλάκας Neubauer
- Τοποθέτηση πλάκας Neubauer στο μικροσκόπιο και μέτρηση κυττάρων σε κάθε μεγάλο ακραίο τετράγωνο
- Εύρεση μέσο όρου κυττάρων και του αριθμού κυττάρων ανά mL
- Υπολογισμός του όγκου θρεπτικού μέσου που περιέχει την επιθυμητή ποσότητα κυττάρων
- Μεταφορά ποσότητας σε νέο falcon και επιστροφή της περίσσειας στη φλάσκα
- Φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη υπερκείμενου
- Διαλυτοποίηση ιζήματος σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού και κατανομή επιθυμητής ποσότητας σε plates, τα οποία επωάζονται στις επιθυμητές συνθήκες.

3.3.2.7 Επαγωγή γλυκογονόλυσης

Για τον προσδιορισμό των διαφορών στα επίπεδα mRNA της STBD1 ανάμεσα σε κατάσταση πέψης και κατάσταση νηστείας ακολουθήθηκε το επακόλουθο πρωτόκολλο για την επαγωγή γλυκογονόλυσης (54). Αρχικά, στρώθηκαν 3 plates (60 X 15mm) με ποσότητα κυττάρων HepG2 $1,5 \times 10^6$ και θρεπτικό διάλυμα high glucose (25mM) DMEM που περιείχε 10% FBS, 1% αντιβιοτικό (πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη) και 1% L-glutamine. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 16-18 h ώστε να προσκολληθούν στην επιφάνεια των plates. Ύστερα, το θρεπτικό αντικαταστάθηκε με θρεπτικό διάλυμα high glucose DMEM με αντιβιοτικό αλλά χωρίς FBS και L-glutamine. Επιπλέον, προστέθηκαν dexamethasone (10 nM) και ινσουλίνη (100 nM) για την επαγωγή της σύνθεσης γλυκογόνου και έγινε επώαση για 16-18 h. Έπειτα το θρεπτικό αντικαταστάθηκε από θρεπτικό διάλυμα DMEM με αντιβιοτικό αλλά χωρίς FBS, L-glutamine, phenol red και γλυκόζη και προστέθηκε γλυκαγόνη (100 nM) για την επαγωγή της γλυκογονόλυσης. Τα plates επώαστηκαν για 3 h σε αυτές τις συνθήκες πριν την συλλογή τους.

3.3.2.8 Συλλογή Κυττάρων (Harvest)

Για τη συλλογή των κυττάρων, αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται πλύση με PBS 1X δύο φορές. Στη συνέχεια, το PBS αφαιρείται και προστίθεται ποσότητα TRI Reagent ανάλογη του όγκου του plate (1 mL ανά 10 cm^2). Πραγματοποιείται ομογενοποίηση και ανάδευση με τη χρήση πιπέτας για την επιτυχή αποκόλληση, λύση και συλλογή του συνόλου των κυττάρων, τα οποία μεταφέρονται σε κλειστά αποστειρωμένα Eppendorf που βρίσκονται εντός πάγου. Τα δείγματα μεταφέρονται ταχύτατα στους -80°C και διατηρούνται μέχρι 2 εβδομάδες.

3.3.3 Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA από τα δείγματα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε το Monarch Total RNA Miniprep Kit (New England Biolabs). Η απομάκρυνση των υπόλοιπων περιεχομένων του κυττάρου είναι απαραίτητη για την λήψη υψηλής ποιότητας RNA και την εξάλειψη λανθασμένης ενίσχυσης κατά την αντίδραση RT-PCR λόγω DNA.

Η μέθοδος περιλαμβάνει:

- Προσθήκη ποσότητας 1-βρωμο-3-χλωροπροπανίου, που ισούται με το 10% του όγκου των δειγμάτων, έντονη ανακίνηση και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min
- Φυγοκέντρηση στα 5000 g για 15 min στους 4 °C. Πραγματοποιείται διαχωρισμός των φάσεων. Η πάνω φάση (διάφανη) αντιστοιχεί στο RNA, η μεσαία και η κάτω στις πρωτεΐνες, το DNA και τα υπόλοιπα κυτταρικά οργανίδια.
- Προσεχτική λήψη και ογκομέτρηση μόνο της πάνω φάσης που περιέχει το RNA
- Προσθήκη ποσότητας αιθανόλης (καθαρότητα > 95 %) ίσης με την ποσότητα του δείγματος και ανάδευση
- Μεταφορά του δείγματος σε RNA Purification Column που τοποθετείται πάνω σε Collection Tube
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 30 sec και απόρριψη Flow Through
- Προσθήκη 500 μL RNA Wash Buffer
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 30 sec και απόρριψη Flow Through
- Προσθήκη 80 μL διαλύματος, που περιέχει 5 μL DNase I και 75 μL DNase I Reaction Buffer, και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 500 μL RNA Priming Buffer
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 30 sec και απόρριψη Flow Through
- Προσθήκη 500 μL RNA Wash Buffer
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 30 sec και απόρριψη Flow Through
- Προσθήκη 500 μL RNA Wash Buffer
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 2 min και μεταφορά στήλης σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 30-100 μL Nuclease-free H₂O
- Φυγοκέντρηση στα 16000 g για 30 sec για την έκλυση του RNA.
- Προσδιορισμός ποσότητας και ανάλυση καθαρότητας RNA με συσκευή Nanodrop
- Αποθήκευση δειγμάτων στους -20 °C για σύντομη χρήση (< 1 εβδομάδας) ή -80 °C για μακροχρόνια.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας σε συσκευή Nanodrop συνιστά απαραίτητο βήμα για την προσθήκη ίσων ποσοτήτων RNA κατά την σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA. Έναν ισχυρό δείκτη της καθαρότητας του RNA αποτελεί ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm. Η απορρόφηση στα 260 nm οφείλεται στα νουκλεϊκά οξέα, ενώ στα 280 nm σε πρωτεΐνες. Η ιδανική τιμή του λόγου ισούται με 2.

3.3.4 Αντίστροφη μεταγραφή

Η μετατροπή των mRNA σε cDNA συνιστά απαραίτητη διαδικασία για την πραγματοποίηση αντίδρασης PCR. Για το σκοπό αυτό, το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τον υβριδισμό εκκινητών (τυχαία εξαμερή) στο σύνολο των mRNA. Αρχικά, δημιουργείται ένα Template RNA Primer Mix, το οποίο περιέχει dNTPs, εκκινητές, το δείγμα RNA και RNase-free

H₂O με τελικό όγκο που ισούται με 10 μ L για κάθε δείγμα. Η ποσότητα του δείγματος RNA που προστίθεται πρέπει να είναι ίδια σε όλα τα δείγματα και υπολογίζεται πόση ποσότητα πρέπει να προστεθεί, ώστε η τελική ποσότητα του RNA να ισούται με 2 μ g. Ύστερα, πραγματοποιείται spin του μείγματος, επώαση στους 65 °C για 5 min και παραμονή δειγμάτων στους 4 °C μέχρι τη χρήση στο επόμενο βήμα.

Περιεχόμενα Template RNA Primer Mix			
Random hexamers	dNTP mix	RNA	RNase-free H ₂ O
2 μ L	1 μ L	Κατάλληλος όγκος ώστε m _{Τελικό} = 2 μ g	Συμπλήρωση μέχρι τελικό όγκο ίσο με 10 μ L

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA. Κάθε νέο δείγμα που δημιουργείται περιέχει Template RNA Primer Mix, Prime Script Buffer, RNase inhibitor, αντίστροφη μεταγραφάση (RTase) και RNase-free H₂O με τελικό όγκο ίσο με 20 μ L. Τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμικό κυκλοποιητή (MJ Mini Gradient Thermal Cycler) και επωάζονται στους 30 °C για 10 min, έπειτα στους 70 °C για 15 min και παραμένουν στους 4 °C μέχρι τη χρήση.

Περιεχόμενα αντίδρασης σύνθεσης πρώτου κλώνου cDNA				
Template RNA Primer Mix	5X Prime Script Buffer	RNase inhibitor (40 U/ μ L)	RTase	RNase-free H ₂ O
10 μ L	4 μ L	0,5 μ L	1 μ L	4,5 μ L

3.3.5 Σχεδιασμός εκκινητών (Primers)

Για να ενισχυθεί και να ανιχνευθεί μόνο η περιοχή και το γονίδιο που μας ενδιαφέρει, είναι απαραίτητος ο σωστός σχεδιασμός εκκινητών, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (55, 56). Τα κριτήρια για το σχεδιασμό Primers στη συγκεκριμένη περίπτωση περιλαμβάνουν:

- Μήκος ενισχυμένων τμημάτων 50 – 150 bp (ιδανικά 100-120)
- Μήκος εκκινητών 20 – 22 βάσεις
- Θερμοκρασία υβριδισμού (T_m) 58 – 60 °C (ιδανικά 59 °C)
- Ποσοστό GC 30 – 80 % (ιδανικά 50 – 60 %)
- Απουσία επαναλήψεων ίδιας βάσης (πχ 4 συνεχόμενες G)
- Οι εκκινητές ενισχύουν μόνο το επιθυμητό γονίδιο
- Επιπλέον στόχος στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν ο σχεδιασμός τουλάχιστον ενός εκκινητή που περιέχει βάσεις εκατέρωθεν του ιντρονίου. Επομένως, ο εκκινητής αυτός υβριδίζει μόνο στο cDNA και όχι στο DNA, αποφεύγοντας λανθασμένα αποτελέσματα λόγω ενίσχυσης γονιδιωματικού DNA.
- Απουσία υβριδισμού ανάμεσα στους δύο εκκινητές
- Απουσία σχηματισμών φουρκετών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε στην πιο πρόσφατη έκδοση της αλληλουχίας του mRNA της STBD1 που έχει κατατεθεί στην GenBank (NCBI Reference Sequence: NM_003943.5) (57). Ο σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Primer-Blast της βάσης NCBI (58), και η αποτελεσματικότητα επαληθεύτηκε με τη χρήση του προγράμματος UCSC In-Silico PCR (59). Το πρόγραμμα OligoCalc (60) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη πιθανών φουρκετών και το πρόγραμμα Multiple Primer Analyzer (61) για τον έλεγχο πιθανού σχηματισμού διμερών εκκινητών.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	GGTCACCAAACCAGAGCATC	Plus	20	244	263	58.83	55.00
Reverse primer	TCCCTGGAAGGATTCTGCAAT	Minus	21	354	334	59.07	47.62
Product length	111						
			Self complementarity			Self 3' complementarity	
			5.00			2.00	
Products on intended targets			4.00			3.00	

>NM_003943.5 Homo sapiens starch binding domain 1 (STBD1), mRNA

```

product length = 111
Forward primer 1  GGTCACCAAACCAGAGCATC  20
Template       244  ..... 263

Reverse primer 1  TCCCTGGAAGGATTCTGCAAT  21
Template       354  ..... 334
    
```

Εικόνα 9. Ζευγάρι εκκινητών για την στόχευση του cDNA της STBD1 και χαρακτηριστικά

3.3.6 Αντίδραση PCR

Για τον περιορισμό των σφαλμάτων, κάθε αντίδραση πραγματοποιείται σε τριπλές (το ίδιο δείγμα σε τρία διαφορετικά wells). Επιπλέον, για την κανονικοποίηση κάθε δείγματος προσδιορίζεται η ποσότητα ιδιοσυστατου γονιδίου (σε τριπλές). Τα ιδιοσυστατα γονίδια (πχ β-ακτίνη) συνήθως σχετίζονται με βασικές λειτουργίες του κυττάρου και, συνεπώς, είναι γονίδια με σταθερή έκφραση ανεξάρτητα από τις συνθήκες που επικρατούν (62). Επίσης, χρησιμοποιείται για κάθε τριπλέτα μάρτυρας αρνητικού ελέγχου, από τον οποίο απουσιάζει το υπόστρωμα DNA (NTC).

Αρχικά, προετοιμάζονται τα δείγματα, τα οποία περιέχουν SYBR Green I (φθορίζουσα χρωστική), το ζευγάρι εκκινητών, το cDNA και RNase-free H₂O με τελικό όγκο ίσο με 20 μL για κάθε αντίδραση.

Περιεχόμενα δειγμάτων για PCR				
2X SYBR Green I	Forward Primer (100 mM)	Reverse Primer (100 mM)	cDNA	RNase-free H ₂ O
10 μL	0,4 μL	0,4 μL	2 μL	7,2 μL

Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (StepOnePlus Real-Time PCR System). Η διαδικασία διακρίνεται σε 3 στάδια:

- το Holding Stage → πραγματοποιείται η αρχική αποδιάταξη των μορίων και απενεργοποιούνται οι νουκλεάσες λόγω της υψηλής θερμοκρασίας
- το Cycling Stage, κατά το οποίο γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων
- το Melt Curve Stage, που δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη επιμολύνσεων

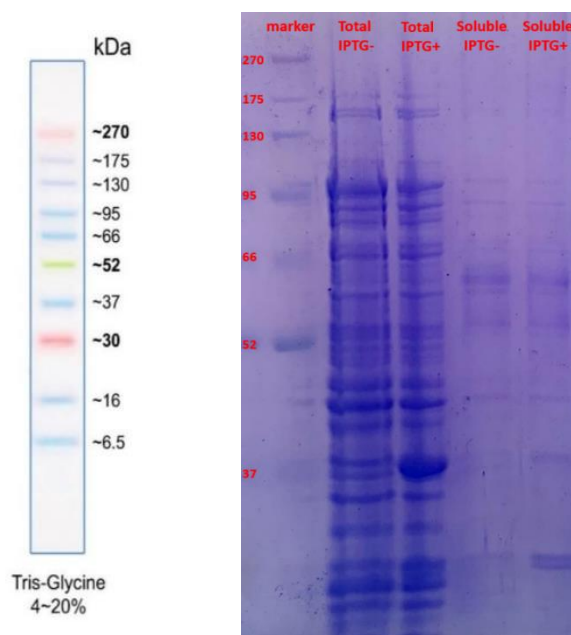
Διαδικασία PCR		
Στάδιο	Σύνολο Κύκλων	Βήμα
Holding Stage	1	1) 50 °C για 10 min
		2) 95 °C για 2 min
Cycling Stage	40	3) 95 °C για 15 sec
		4) 60 °C για 40 sec
Melt Curve Stage	1	5) 95 °C για 15 sec
		6) 60 °C για 1 min
		7) Σταδιακή αύξηση θερμοκρασίας κατά 0,3 °C
		8) 95 °C για 15 sec

4 Αποτελέσματα

4.1 Ετερόλογη έκφραση και απομόνωση της περιοχής CBM20 της STBD1

4.1.1 Αποτελέσματα expression test

Το expression test πραγματοποιήθηκε μέσω των μεθοδολογιών που περιγράφηκαν στις υποενότητες 3.2.3 και 3.2.4. Η συνθήκη που εξετάστηκε συνιστά αποτέλεσμα προγενέστερων πειραμάτων στο εργαστήριο ΔΛΒ. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 10.



Εικόνα 10. 1^{ος} Μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε στα gel.

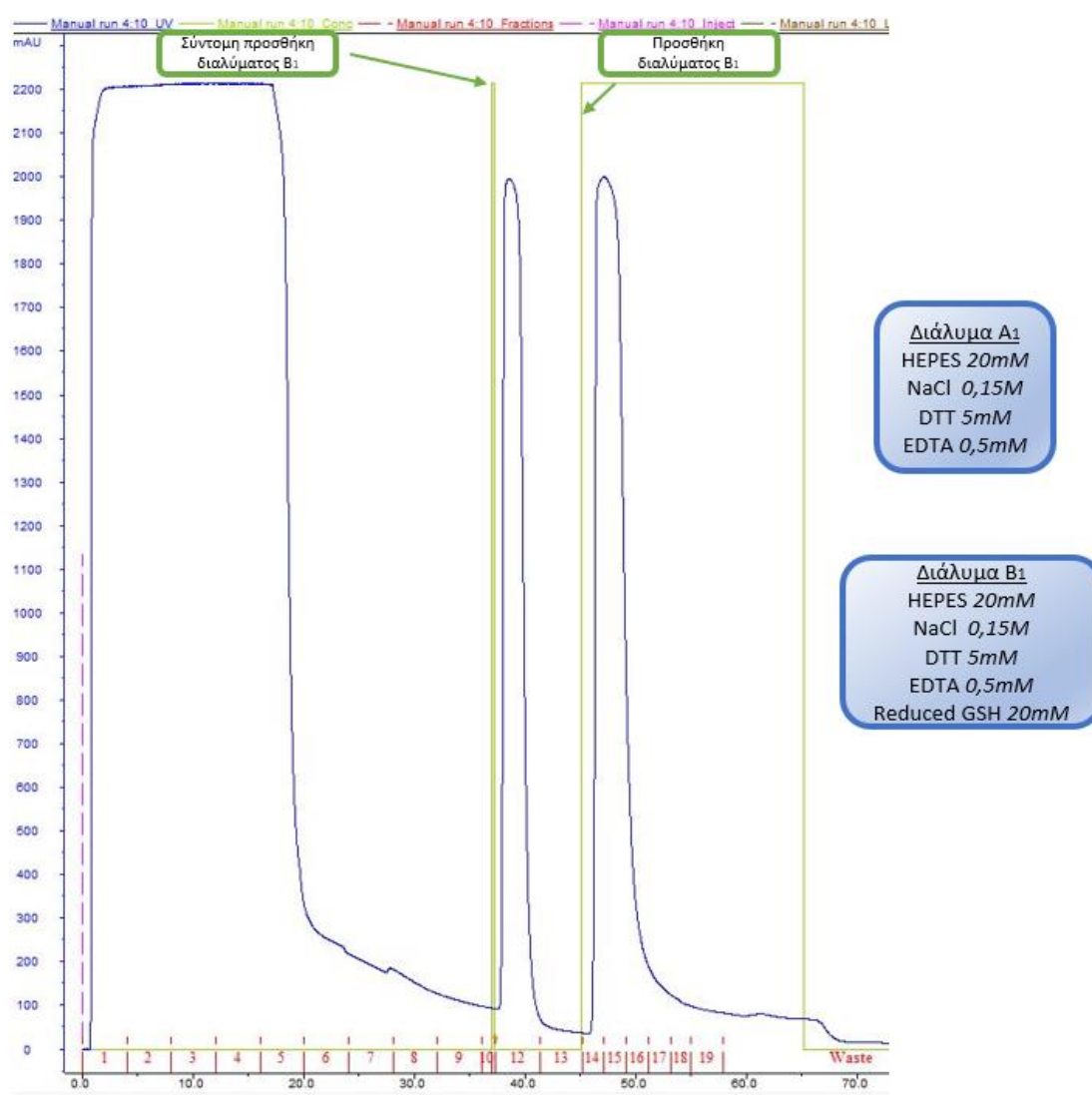
Εικόνα 11.1D SDS-PAGE ύστερα από expression test. Στην πηκτή φορτώθηκαν κατά σειρά: μάρτυρας μοριακού βάρους, δείγμα στο οποίο έχει προστεθεί IPTG και περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών (Total IPTG+), δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί IPTG και περιέχει το σύνολο των πρωτεϊνών (Total IPTG-), δείγμα στο οποίο έχει προστεθεί IPTG και περιέχει πρωτεΐνες που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος (Soluble IPTG+), δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί IPTG και περιέχει πρωτεΐνες που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος (Soluble IPTG-). Φορτώθηκαν 1 μ l από τον μάρτυρα και 15 από κάθε δείγμα.

Παρατηρούνται ενισχυμένες ζώνες στο ύψος των ≈ 26 (GST Tag) και ≈ 37 kDa (CBM20-GST Tag) στα δείγματα IPTG+ σε σχέση με τα δείγματα IPTG-, τόσο στα δείγματα Total, όσο και στα δείγματα Soluble. Το αποτέλεσμα αυτό, επιβεβαιώνει την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης στο διαλυτό μέρος και, επομένως, την επιτυχία του πρωτοκόλλου της ετερόλογης έκφρασης.

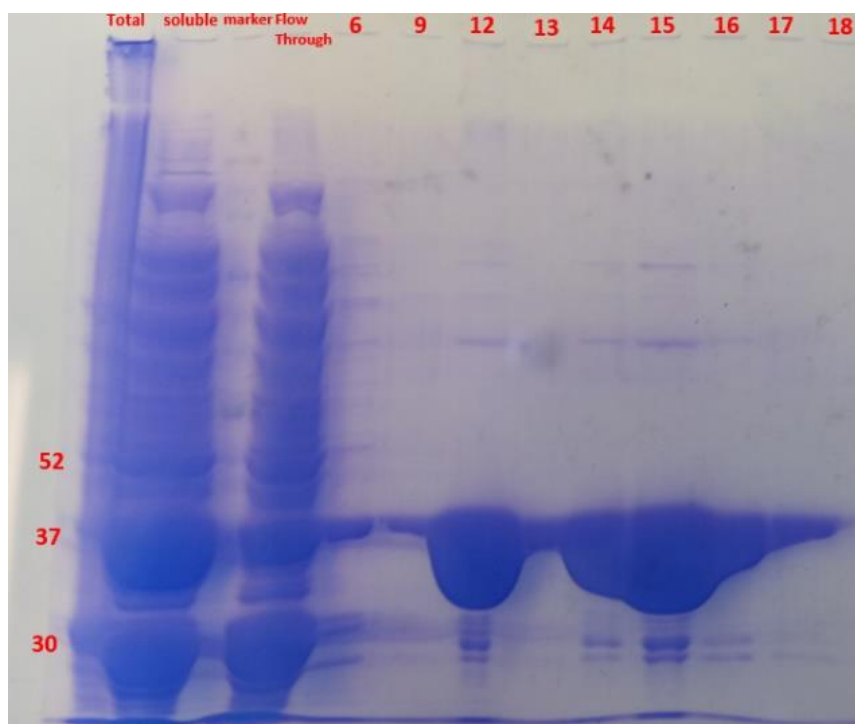
4.1.2 Αποτελέσματα στήλης GST/χρωματογραφίας συγγένειας

Η ετερόλογη έκφραση της STBD1 πραγματοποιήθηκε μέσω των μεθοδολογιών που περιγράφηκαν στην υποενότητα 3.2.3. Από τη διαδικασία αυτή, προέκυψε δείγμα που περιείχε το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος (soluble). Επίσης, λήφθηκε δείγμα για ηλεκτροφόρηση πριν την τελική φυγοκέντρηση, που περιέχει το σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών (total). Το δείγμα που περιέχει το σύνολο των διαλυτών πρωτεϊνών διαχωρίστηκε σε στήλη GST, όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.2.8.1 και, στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση για την ανάλυση της καθαρότητας της πρωτεΐνης. Τόσο στο χρωματογράφημα (Εικόνα 11), όσο και στην πηκτή πολυακρυλαμίδιου

(Εικόνα 12) παρατηρούνται υψηλές απορροφήσεις στα δείγματα 1-5 (Flow Through), 12, 14-17. Τα πρώτα δείγματα (1-5) αντιστοιχούν στο Flow Through και παρατηρείται απομάκρυνση της πλειοψηφίας των μη επιθυμητών πρωτεϊνών και μέρους της επιθυμητής πρωτεΐνης. Μετά την προσθήκη του διαλύματος B₁, που προκαλεί την έκλυση του συμπλόκου CBM20-GST Tag, εντοπίζεται υψηλή απορρόφηση που οφείλεται κυρίως στην επιθυμητή πρωτεΐνη, όπως φαίνεται στην ηχητή στο ύψος των ≈ 26 (GST Tag) και ≈ 37 kDa (CBM20-GST Tag). Ωστόσο, στα δείγματα αυτά εμφανίζονται ζώνες εκτός των δύο επιθυμητών και, συνεπώς, περιέχονται και μικρές ποσότητες άλλων πρωτεϊνών. Τα δείγματα 12-17 συνενώθηκαν, με αποτέλεσμα να προκύπτει δείγμα με όγκο 16 mL. Πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Bradford και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση ($\approx 3,957$ mg/mL) και η ποσότητα του συνόλου των πρωτεϊνών ($\approx 63,312$ mg)



Εικόνα 12. Χρωματογράφημα 1ης στήλης GST. Τα δείγματα 1-5 αποτελούν το Flow Through (διάλυμα A₁), στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πλύση με διάλυμα A₁ για περισσότερους από 10 όγκους στήλης και ακολουθεί έκλυση με το διάλυμα B₁. Η πρώτη κορυφή στα δείγματα του Flow through αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που δεν δεσμεύθηκαν στην μήτρα, ενώ οι δύο κορυφές μετά την έκλυση σε πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν είναι τα 12-17. Ο άξονας X αντιστοιχεί στον όγκο (mL) που διέρχεται από τη στήλη και άξονας Y στην απορρόφηση (mAU) στα 280 nm.



Εικόνα 13. 1D SDS-PAGE μετά από 1η χρωματογραφία στήλης GST. Η περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου ήταν 12%. Το δείγμα Total αντιστοιχεί στο σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται στα βακτηριακά κύτταρα, το δείγμα soluble στις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο διαλυτό μέρος, ο marker είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, το flow through στα δείγματα 1-5 και τα υπόλοιπα δείγματα στα αντίστοιχα κλάσματα της χρωματογραφίας όπως φαίνεται στην εικόνα 11. Στα πηγάδια φορτώθηκαν 15 μ L από κάθε δείγμα εκτός του μάρτυρα (1 μ L).

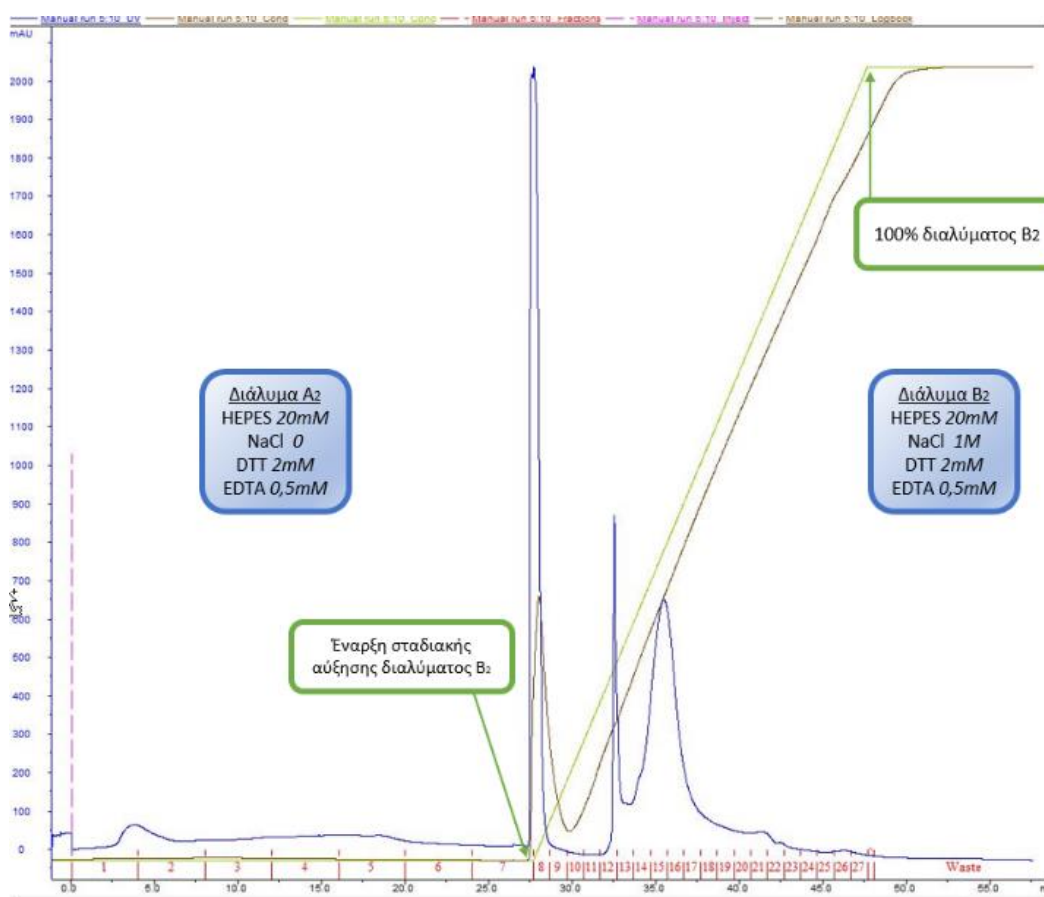
Από τα αποτελέσματα μετά την στήλη GST συμπεραίνουμε πως το πρωτόκολλο για την ετερόλογη έκφραση της CBM20 λειτουργεί και οδηγεί σε παραγωγή πολύ υψηλής ποσότητας πρωτεΐνης. Η στήλη GST καταφέρνει να καθαρήσει σε μεγάλο βαθμό την επιθυμητή πρωτεΐνη και αποτελεί ένα πολύ αποτελεσματικό πρώτο βήμα για την απομόνωση της CBM20. Ωστόσο, παραμένει μικρή, αλλά σημαντική ποσότητα ανεπιθύμητων πρωτεϊνών και, επομένως, είναι αναγκαίος ο περεταίρω καθαρισμός. Επιπλέον, χάνεται αρκετή ποσότητα επιθυμητής πρωτεΐνης στο Flow Through, που ενδεχομένως να οφείλεται στην υπερβολική ποσότητα GST Tag που υπάρχει στο δείγμα, με αποτέλεσμα να υπάρχει κορεσμός των προσδετών και η περίσσεια CBM20-GST Tag να μην μπορεί να δεσμευθεί στη μήτρα. Η πραγματοποίηση της ίδιας διαδικασίας σε δύο επαναλήψεις με τον μισή ποσότητα CBM20-GST Tag πιθανώς να περιορίσει τις απώλειες.

4.1.3 Αποτελέσματα 1ης στήλης Resource Q (Cation)/χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής

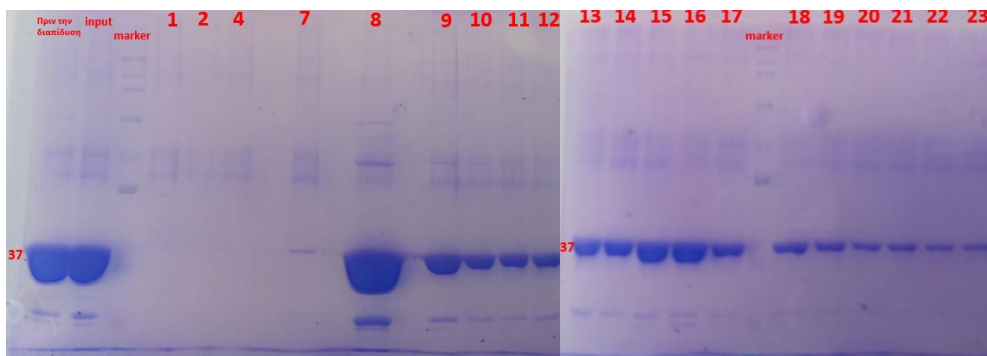
Πριν την πραγματοποίηση της στήλης Resource Q, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση για την απομάκρυνση του NaCl και της GSH που βρίσκεται στα διαλύματα A₁ και B₁. Το διάλυμα που προστέθηκε στο εξωτερικό της μεμβράνης περιείχε τα ίδια συστατικά με το διάλυμα B₁ χωρίς NaCl και GSH. Όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 3.2.8.2 η έκλυση πραγματοποιείται με αύξηση της ιοντικής ισχύος, δηλαδή με την προσθήκη άλατος. Συνεπώς, η ύπαρξη άλατος στο δείγμα θα προκαλούσε έκλυση πρωτεϊνών πριν το αντίστοιχο στάδιο και δεν θα πετύχαινε ο διαχωρισμός.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στήλη Resource Q για τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης. Η απορρόφηση στο Flow Through οφείλεται σε πρωτεΐνες με θετικό φορτίο στο διάλυμα στήλης, δηλαδή πρωτεΐνες με ισοηλεκτρικό σημείο μεγαλύτερο του 7,4. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με σταδιακή αύξηση της ποσότητας διαλύματος B₂ από 0% σε 100% σε 40 λεπτά (άρα αύξηση συγκέντρωσης NaCl κατά 25 mM ανά λεπτό και 50 mM ανά κλάσμα) και αντίστοιχη μείωση του διαλύματος A. Κατά τη διάρκεια της έκλυσης παρατηρούνται πολλαπλές κορυφές, ωστόσο, δεν γνωρίζουμε ποια αντιστοιχεί στην επιθυμητή. Επομένως, ακολούθησε SDS PAGE. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απέδειξαν πως το σύμπλοκο CBM20-GST Tag βρίσκεται σε όλα τα κλάσματα της έκλυσης και δεν διαχωρίστηκε επαρκώς από τις υπόλοιπες ανεπιθύμητες πρωτεΐνες. Τα δείγματα συνενώθηκαν ανάλογα με την κορυφή στην οποία βρίσκονταν. Έτσι δημιουργήθηκαν τρία δείγματα. Το Δ₁ περιλάμβανε τα κλάσματα 8 και 9, το Δ₂ τα 12 και 13 και το Δ₃ τα 15,16 και 17. Η συγκέντρωση των συνολικών πρωτεϊνών και η ολική ποσότητα προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία Bradford και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αποτελέσματα δοκιμασίας Bradford μετά από 1η Resource Q		
Δείγματα	Συγκέντρωση (mg/mL)	Συνολική ποσότητα (mg)
Δ ₁	5,5	11
Δ ₂	0,88	1,76
Δ ₃	1,3	3,9



Εικόνα 14. Χρωματογράφημα 1ης στήλης Resource Q . Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με σταδιακή αύξηση της ποσότητας διαλύματος B₂ από 0% σε 100%. Ο άξονας X αντιστοιχεί στον όγκο (mL) που διέρχεται από τη στήλη και άξονας Y στην απορρόφηση (mAU) στα 280 nm.



Εικόνα 15 και 16. Αποτελέσματα SDS PAGE ύστερα από την 1η στήλη Resource Q. Η περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου ήταν 12%. Στο gel προστέθηκαν δείγματα από πριν και μετά (input) την διαπίδυση (10 μ L), μάρτυρας μοριακού βάρους (1 μ L) (Εικόνα 9) και τα αντίστοιχα δείγματα του χρωματογραφήματος (10 μ L).

Η στήλη Resource Q όχι μόνο δεν κατάφερε να καθαρίσει περαιτέρω την επιθυμητή πρωτεΐνη, αλλά και οδήγησε σε τεράστια απώλεια συνολικής πρωτεΐνης (από \approx 63,3 mg σε \approx 16,7 mg). Επομένως, κρίνεται αναποτελεσματική και δεν προτείνεται για μελλοντικά πειράματα απομόνωσης CBM20.

4.1.4 Πέψη ετικέτας GST

Για την χρησιμοποίηση της καθαρής CBM20 σε επικείμενα πειράματα είναι απαραίτητη η απομάκρυνση της ετικέτας GST. Για το σκοπό αυτό, προστέθηκε στα δείγματα Δ_1, Δ_2 και Δ_3 πρωτεάση 3C και επώαστηκαν overnight στους 4 °C. Η μάζα της πρωτεάσης που προστέθηκε ισοδυναμεί με το 5% της μάζας της πρωτεΐνης που περιέχεται στο δείγμα, η οποία υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford. Η αποτελεσματικότητα της πέψης παρατηρείται στην 1D SDS PAGE (εικόνα 18) που πραγματοποιήθηκε ύστερα από την 2^η χρωματογραφία GST. Τα αποτελέσματα και η ανάλυσή τους εντοπίζονται συγκεντρωτικά στην επόμενη παράγραφο (4.1.5)

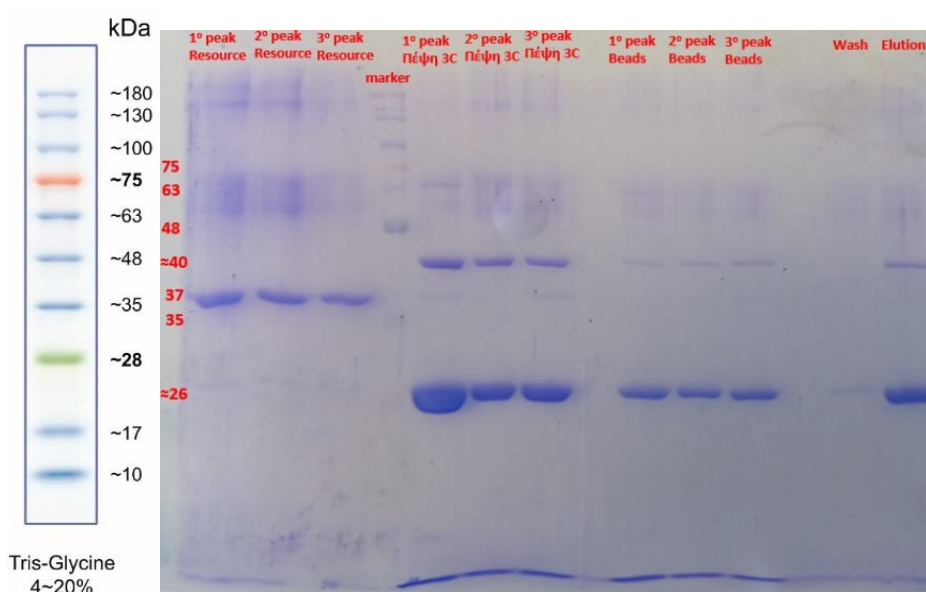
4.1.5 Αποτελέσματα 2ης στήλης GST με sepharose beads

Ταυτόχρονα με την πέψη της ετικέτας GST, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση για την απομάκρυνση άλατος από τα δείγματα (Το διάλυμα B₂ περιέχει NaCl σε συγκέντρωση 1 M, η συγκέντρωση NaCl στα δείγματα εξαρτάται από το σημείο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η έκλυση). Το διάλυμα που προστέθηκε στο εξωτερικό της μεμβράνης περιείχε τα ίδια συστατικά με το διάλυμα B₂ χωρίς NaCl. Τα δείγματα που περιέχουν και πρωτεάση μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης, τοποθετήθηκαν εντός διαλύματος και επώαστηκαν overnight στους 4 °C.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφία σε στήλη GST με sepharose beads. Για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε SDS PAGE. Μετά την πέψη δεν παρατηρείται ζώνη στα 37 kDa, επομένως η πέψη ήταν επιτυχής. Η ζώνη που παρατηρείται στα \approx 40 kDa πιθανώς οφείλεται σε σύμπλοκο που σχηματίζεται ανάμεσα στην πρωτεάση 3C και την ετικέτα GST. Οι ζώνες που εμφανίζονται σε πολύ χαμηλό σημείο πιθανότατα αντιστοιχούν στη CBM20. Στα δείγματα που προέκυψαν πριν την έκλυση παρατηρούνται ζώνες στο ύψος των \approx 25 kDa, η οποία ενδεχομένως οφείλεται τόσο στην ετικέτα GST όσο και στην πρωτεάση 3C (24 kDa). Η ζώνη είναι πολύ πυκνή για να οφείλεται

μόνο στην πρωτεάση. Στην έκλυση παρατηρείται πυκνή ζώνη στο αντίστοιχο ύψος. Επομένως, απομακρύνθηκε ποσότητα ετικέτας GST, αλλά όχι σε ικανοποιητικά επίπεδα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η δοκιμασία Bradford για την ποσοτικοποίηση των ολικών πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα της Bradford απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αποτελέσματα δοκιμασίας Bradford μετά από στήλη GST με Sepharose beads		
Δείγματα	Συγκέντρωση (mg/mL)	Συνολική ποσότητα (mg)
Δ'₁	0,46	5,06
Δ'₂	0,365	2,74
Δ'₃	0,35	2,62



Εικόνα 17. 2ος Μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε στα gel.

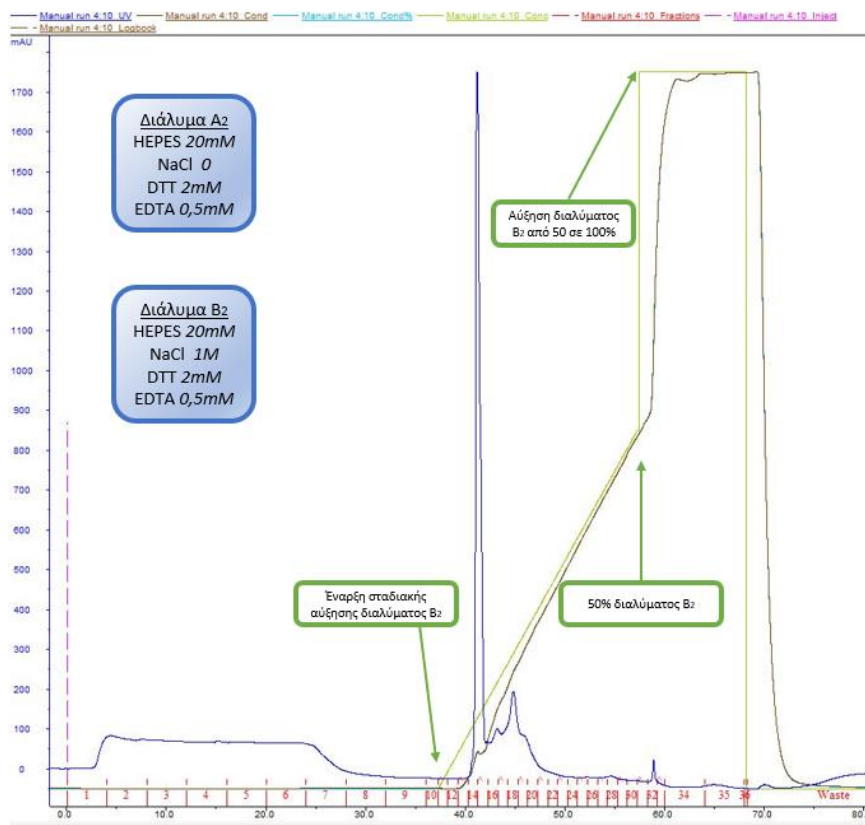
Εικόνα 18. 1D SDS-PAGE ύστερα από στήλη GST με Sepharose beads. Η περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου ήταν 15%. Η πρώτη τριάδα αντιστοιχεί στα δείγματα που συνενώθηκαν μετά από τη Resource (Δ₁-Δ₃), η δεύτερη στα δείγματα Δ₁-Δ₃ μετά την πέψη με πρωτεάση 3C και η τελευταία τριάδα στα δείγματα μετά την στήλη (Δ'₁-Δ'₃). Τα δείγματα wash και elution αντιστοιχούν στα κλάσματα της πλύσης και της έκλυσης αντίστοιχα. Φορτώθηκαν 1 μL από τον μάρτυρα και 10 μL από τα δείγματα.

Συμπερασματικά, η πέψη του συμπλόκου CBM20 – GST Tag με την πρωτεάση ήταν σχεδόν απόλυτα αποτελεσματική. Ωστόσο, η στήλη λειτούργησε μερικώς και δεν κατάφερε να απομακρύνει το σύνολο της ετικέτας GST. Για αυτό το λόγο, προτείνεται στην επόμενη απομόνωση να χρησιμοποιηθεί έτοιμη στήλη GST, όπως στην αρχική χρωματογραφία.

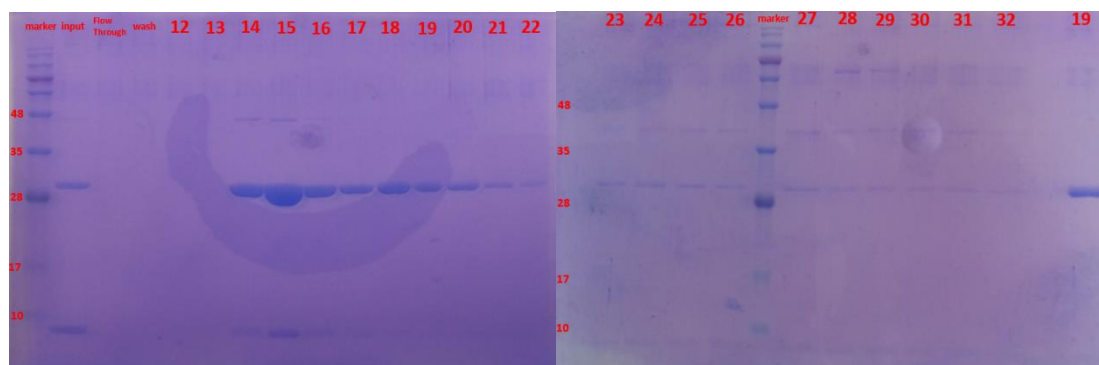
4.1.6 Αποτελέσματα 2ης στήλης Resource Q (Cation)/χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής

Στη συνέχεια τα τρία δείγματα (Δ₁, Δ₂, Δ₃) συνενώθηκαν και εισήχθησαν σε στήλη Resource Q. Η διαδικασία είναι όμοια με αυτήν που περιγράφεται στην υποενότητα 4.1.3, με τις διαφορές ότι σε αυτή τη περίπτωση έχει πραγματοποιηθεί πέψη της ετικέτας GST και πως έκλυση πραγματοποιήθηκε με σταδιακή αύξηση της ποσότητας διαλύματος B₂ από 0% σε 50% σε 40 λεπτά (άρα αύξηση συγκέντρωσης NaCl κατά 12,5 mM ανά λεπτό και 25 mM ανά

κλάσμα) και, έπειτα, απευθείας αύξηση διαλύματος Β στο 100%. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε SDS PAGE για την ανάλυση των περιεχομένων του κάθε κλάσματος. Από την πηκτή αποδείχθηκε ότι η CBM20 συνυπάρχει με την ετικέτα GST, η οποία βρίσκεται σε σχεδόν όλα τα κλάσματα μετά την έκλουση. Τελικά, τα δείγματα 14-19 συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με υπερδιήθηση μέσω φυγοκέντρησης όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.10.1 μέχρι τελικό όγκο $\approx 0,5$ mL. Χρησιμοποιήθηκε φίλτρο με cutoff 3 kDa. Ακολούθησε η δοκιμασία Bradford και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση (4,68 mg/mL) και η συνολική ποσότητα (2,84 mg) των ολικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 19. Χρωματογράφημα 2ης στήλης Resource Q. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με σταδιακή αύξηση της ποσότητας διαλύματος B₂ από 0% σε 50% και έπειτα απευθείας στο 100%. Ο άξονας X αντιστοιχεί στον όγκο (mL) που διέρχεται από τη στήλη και άξονας Y στην απορρόφηση (mAU) στα 280 nm.

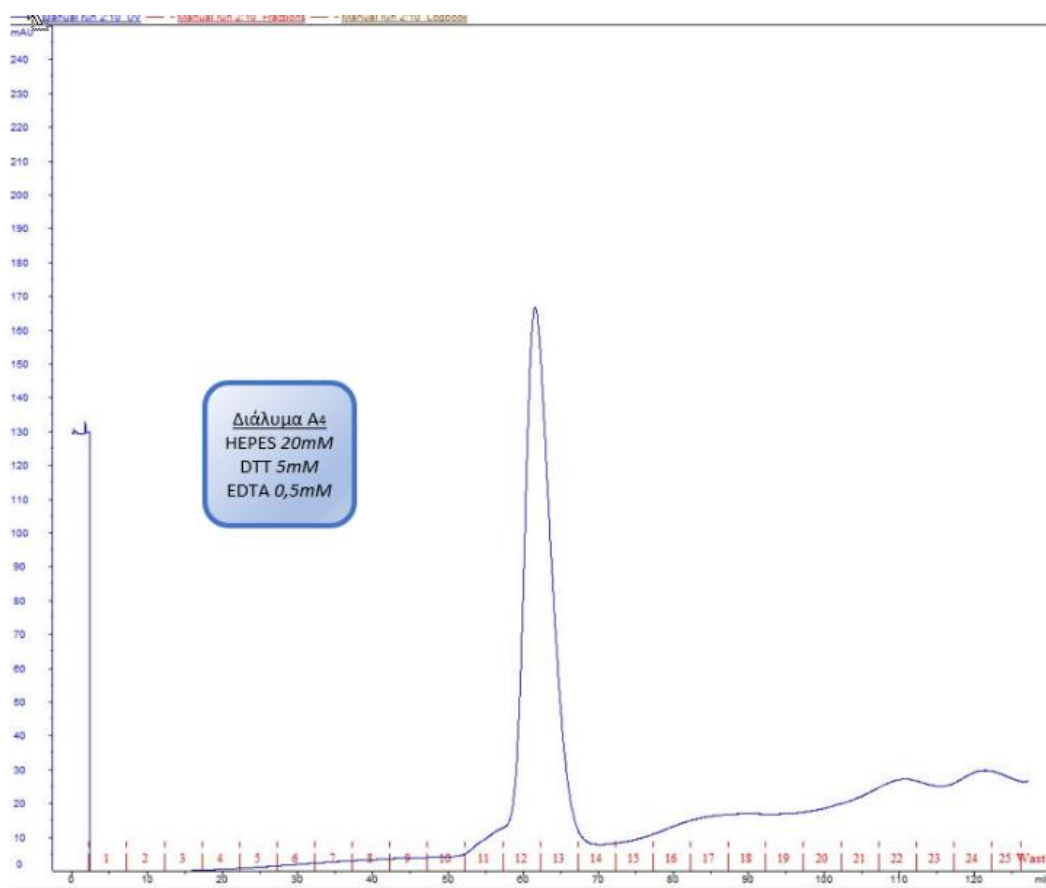


Εικόνα 20 και 21. 1D SDS-PAGE μετά από τη 2η στήλη Resource Q. Η περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου ήταν 18%. Στην πηκτή προστέθηκαν μάρτυρας μοριακού βάρους (1 μ L), δείγμα που συλλέχθηκε αμέσως πριν από τη χρωματογραφία (input) (8 μ L) και τα αντίστοιχα κλάσματα από το χρωματογράφημα (8 μ L) (Εικόνα 18).

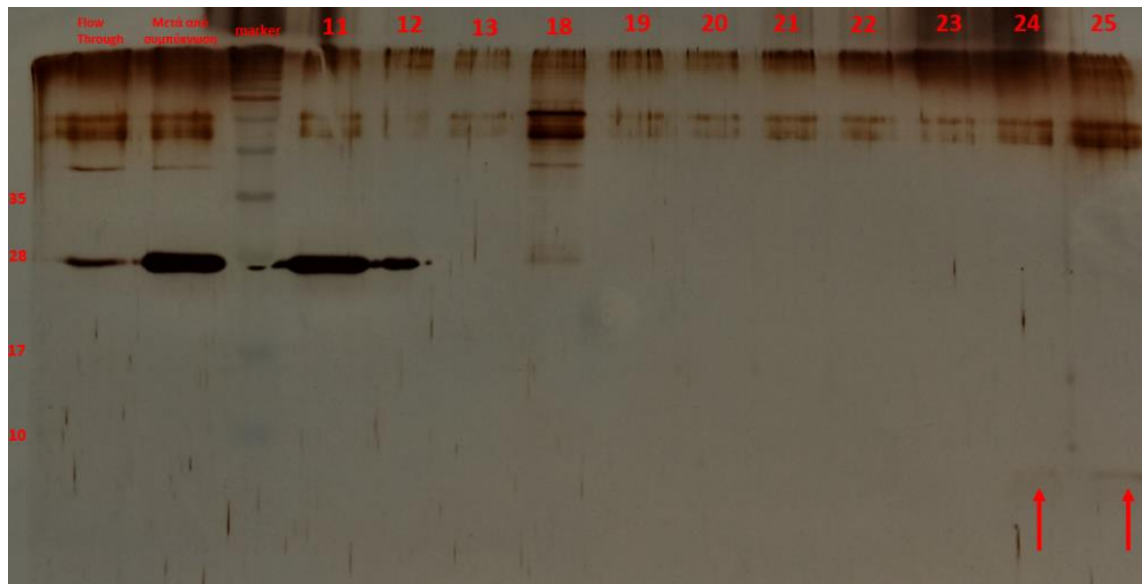
Συνεπώς, η στήλη Resource Q ήταν πλήρως αναποτελεσματική, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση (υποενότητα 4.1.3) και δεν προτείνεται για την απομόνωση της CBM20.

4.1.7 Αποτελέσματα στήλης Superdex 75/χρωματογραφίας μοριακής διήθησης

Υστερα το συμπυκνωμένο δείγμα διαχωρίστηκε μέσω χρωματογραφίας με στήλη Superdex 75. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με βάση το μέγεθός τους, με τις μεγαλύτερες πρωτεΐνες να εκλύονται πρώτες. Επομένως η CBM20 ($\approx 11,7$ kDa) αναμένεται να βρίσκεται στα τελευταία κλάσματα, ενώ η ετικέτα GST σε προηγούμενα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε SDS PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. Ωστόσο, η συγκέντρωση πρωτεϊνών δεν επαρκούσε για την ανίχνευση τους. Για αυτό το λόγο, επαναλήφθηκε η ηλεκτροφόρηση και η χρώση έγινε μέσω της τεχνικής Silver Staining, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.6.2.2. Στα τελευταία δείγματα (24,25) της πηκτής παρατηρούνται μόνο μια πολύ αραιή ζώνη στο κατάλληλο ύψος, ενώ παρατηρούνται ζώνες στο ύψος των ≈ 26 kDa (μοριακή μάζα ετικέτας GST) σε διαφορετικά δείγματα. Τα δείγματα 24 και 25 συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν μέσω στερεών απορροφητικών ουσιών (PEG) όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.10.2. Η δοκιμασία Bradford έδωσε πολύ χαμηλές τιμές απορρόφησης που δεν επιτρέπουν τον αξιόπιστο υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.



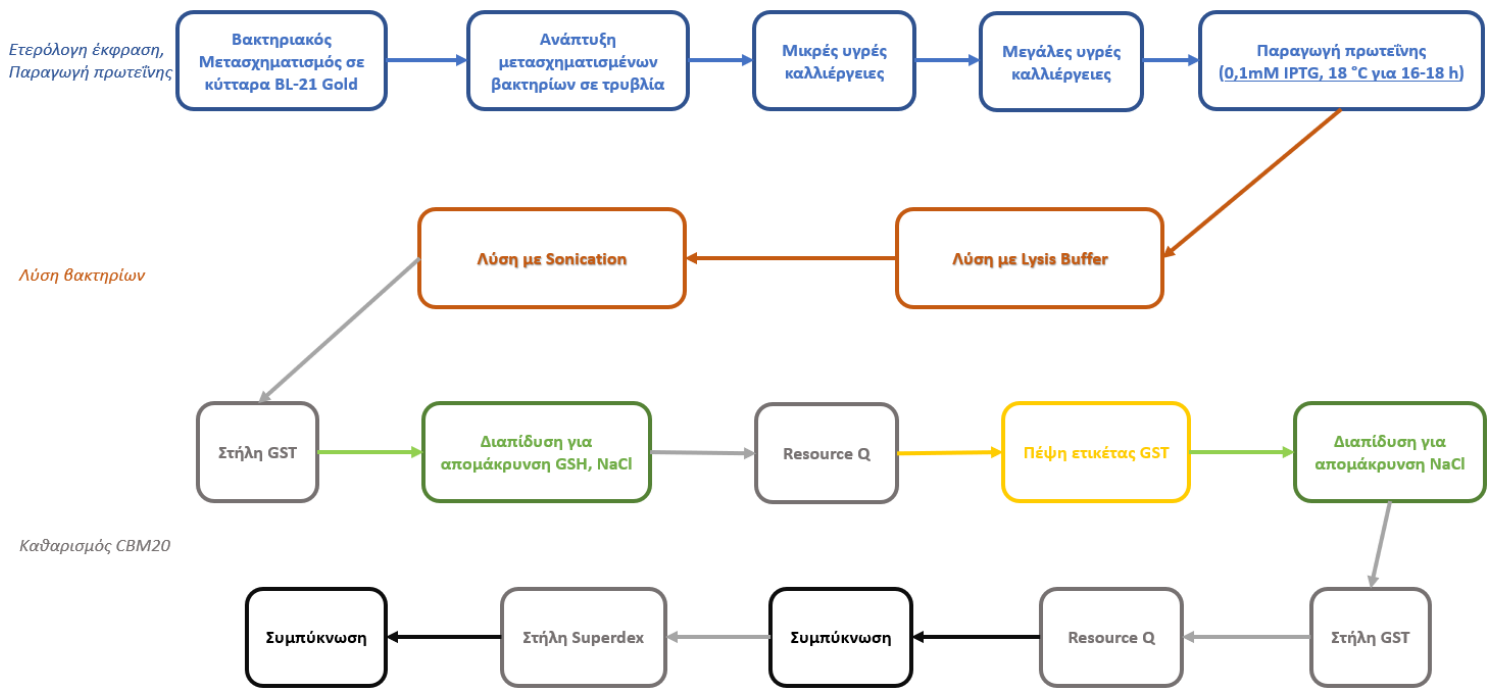
Εικόνα 22. Χρωματογράφημα στήλης Superdex 75. Ο άξονας X αντιστοιχεί στον όγκο (mL) που διέρχεται από τη στήλη και άξονας Y στην απορρόφηση (mAU) στα 280 nm.



Εικόνα 23. SDS PAGE μετά από στήλη Superdex 75. Η περιεκτικότητα πολυακρυλαμιδίου ήταν 18%. Η χρώση πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής Silver Staining. Στην πηκτή προστέθηκαν 2 μ L από τον marker, 3 μ L από το δείγμα μετά τη συμπύκνωση και 8 μ L από τα υπόλοιπα δείγματα.

Επομένως, η στήλη Superdex 75 πιθανότητα κατάφερε να απομονώσει αποτελεσματικά την CBM20. Ωστόσο, ύστερα από τόσες στήλες έχει χαθεί μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης και έχει αραιωθεί το τελικό δείγμα, οπότε το δείγμα αυτό δεν επαρκεί για προσπάθειες κρυστάλλωσης.

Συγκεντρωτική παρουσίαση συγκέντρωσης και ποσότητας πρωτεΐνης ύστερα από κάθε βήμα				
Διαδικασία <u>ύστερα</u> από την οποία πήραμε μέτρηση	Δείγματα	Συγκέντρωση (mg/mL)	Ποσότητα (mg)	Συνολική ποσότητα (mg)
1 ^η Στήλη GST		3,957	63,31	63,31
1 ^η Στήλη Resource Q	Δ_1	5,5	11	16,66
	Δ_2	0,88	1,76	
	Δ_3	1,3	3,9	
2 ^η στήλη GST	Δ'_1	0,46	5,06	10,42
	Δ'_2	0,365	2,74	
	Δ'_3	0,35	2,62	
Συνένωση δειγμάτων, 2η στήλη Resource Q, Συμπύκνωση με υπερδιήθηση μέσω φυγοκέντρησης		4,68	2,84	2,84
Superdex 75, Συμπύκνωση με PEG	Πολύ χαμηλή συγκέντρωση για να μετρηθεί			



Εικόνα 24. Συγκεντρωτική παρουσίαση μεθοδολογίας καθαρισμού ανθρώπινης CBM20

4.2 Αποτελέσματα ποσοτικής Real-Time PCR

Για τον προσδιορισμό των ποσοτικών επιπέδων του mRNA της STBD1 κατά την γλυκογένεση και την γλυκογονόλυση ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.2.7. Από τη διαδικασία αυτή, συλλέχθηκαν τρία δείγματα:

- Control
- Δείγμα που αντιστοιχεί στη γλυκογένεση (Δείγμα «DEX»)
- Δείγμα που αντιστοιχεί στη γλυκογονόλυση (Δείγμα «GLUCAGON»)

Οι διαδικασίες στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν από τον κ. Σεραφείμ Αλεξόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

4.2.1 Αποτελέσματα απομόνωσης RNA

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από τα τρία δείγματα που συλλέχθηκαν, όπως περιγράφεται στην υποενότητα 3.3.3. Μετά την απομόνωση, έγινε προσδιορισμός της ποσότητας RNA και έλεγχος καθαρότητας του RNA. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αποτελέσματα Nanodrop μετά την απομόνωση RNA		
Δείγματα	Συγκέντρωση RNA (ng / μ L)	A_{260}/A_{280}
Control	451,4	2,05
DEX	503,5	1,91
GLUCAGON	468,6	2,01

Η εύρεση της ποσότητας RNA σε κάθε δείγμα επέτρεψε την ισόποση προσθήκη RNA στο στάδιο υβριδισμού των τυχαίων εκκινητών. Όσον αφορά τον λόγο A_{260}/A_{280} , οι τιμές όλων των δειγμάτων είναι κοντά στην τιμή 2, γεγονός που αποτελεί μία ένδειξη επιτυχίας της απομόνωσης RNA.

4.2.2 Αποτελέσματα αντίδρασης Real-Time PCR

Τα τρία δείγματα μελετήθηκαν σε τριπλέτες και για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αντίδραση με εκκινητές για την ποσοτικοποίηση β-ακτίνης εις τριπλούν. Κάθε τριπλέτα ελέγχθηκε με μάρτυρα αρνητικού ελέγχου που δεν περιέχει υπόστρωμα cDNA.

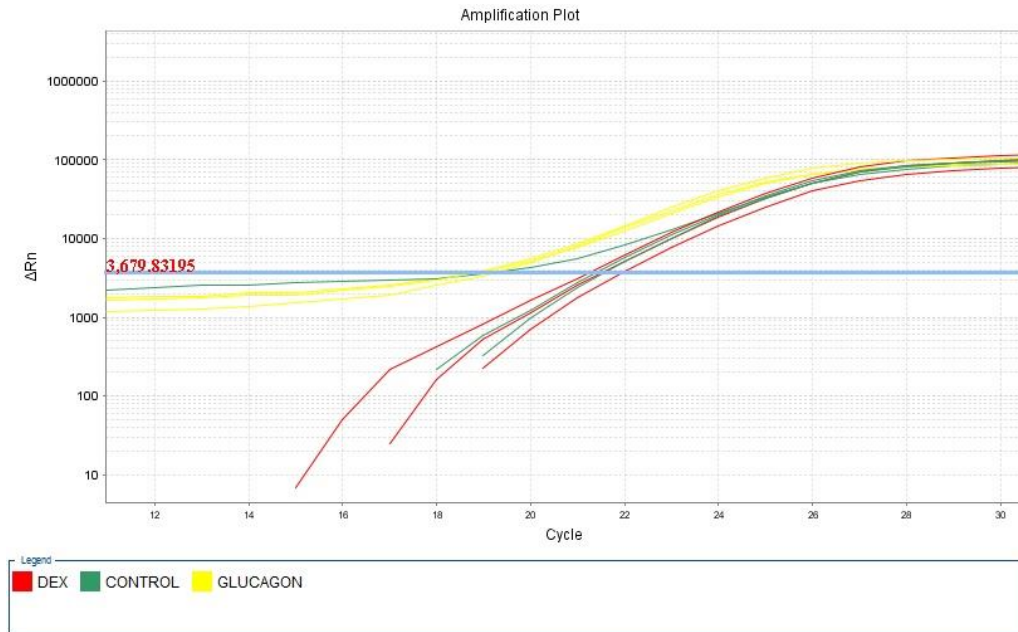
	1	2	3	4	5	6
A	CONTROL U STBD1	DEX U STBD1	GLUCAGON U STBD1	CONTROL U b-actin	DEX U b-actin	GLUCAGON U b-actin
B	CONTROL U STBD1	DEX U STBD1	GLUCAGON U STBD1	CONTROL U b-actin	DEX U b-actin	GLUCAGON U b-actin
C	CONTROL U STBD1	DEX U STBD1	GLUCAGON U STBD1	CONTROL U b-actin	DEX U b-actin	GLUCAGON U b-actin
D						
E						
F	CONTROL N STBD1	DEX N STBD1	GLUCAGON N STBD1	CONTROL N b-actin	DEX N b-actin	GLUCAGON N b-actin

Εικόνα 25. Διάταξη δειγμάτων που εισήχθησαν στον θερμικό κυκλοποιητή. Σε κάθε well, η πρώτη γραμμή αντιστοιχεί στο δείγμα (διαφορετικά cDNA) και η δεύτερη γραμμή στον στόχο ενίσχυσης (διαφορετικοί εκκινητές). Το γράμμα U στην δεύτερη γραμμή αντιστοιχεί σε δείγματα, ενώ το γράμμα N σε μάρτυρες αρνητικού ελέγχου.

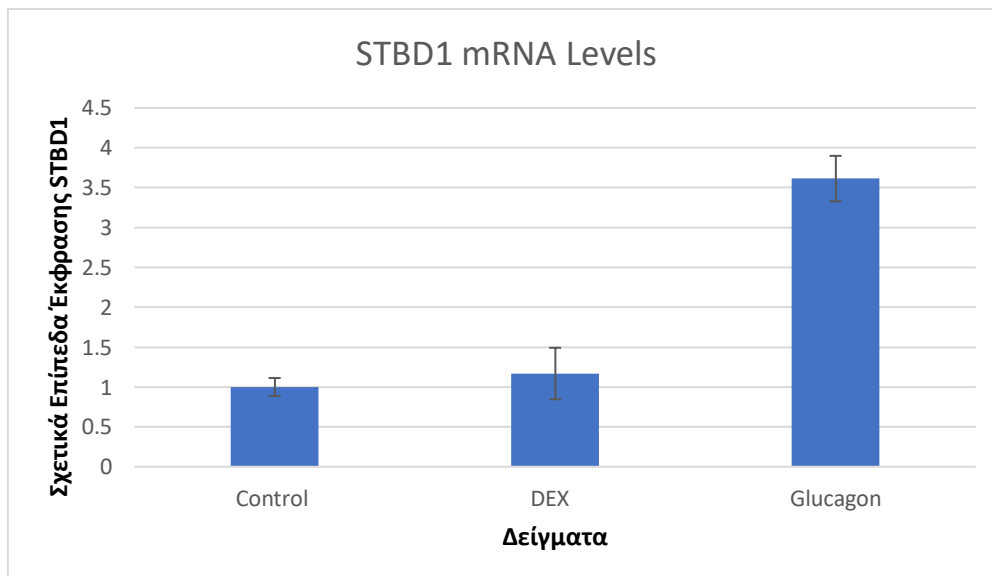
Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης πολλαπλασιάζονται συνεχώς τα αντίγραφα του γονιδίου στόχου και, συνεπώς, αυξάνεται ο φθορισμός. Η τιμή του κύκλου, όταν ο φθορισμός ξεπερνάει το επίπεδο «θορύβου», ονομάζεται C_T και χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Η τιμή του C_T διαφέρει για κάθε δείγμα και είναι ενδεικτικός της αρχικής ποσότητας cDNA. Όσο μικρότερη είναι η τιμή C_T , τόσο μεγαλύτερη ήταν η αρχική ποσότητα. Το «κατώφλι», που πρέπει να ξεπεράσει ο φθορισμός, τοποθετήθηκε αυτόματα από το λογισμικό του κυκλοποιητή.

Ο συγκριτικός υπολογισμός των επιπέδων mRNA στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου Livak (ή $\Delta\Delta C_T$) (63). Αρχικά, υπολογίστηκε ο μέσος όρος (μ.ο.) των δειγμάτων (κάθε τριπλέτας). Για την κανονικοποίηση, από τον μ.ο. των δειγμάτων με στόχο την STBD1 αφαιρέθηκε ο μ.ο. των αντίστοιχων δειγμάτων με στόχο τη β-ακτίνη και η τιμή αυτή ονομάζεται ΔC_T . Από τις τιμές ΔC_T για τα δείγματα DEX και GLUCAGON αφαιρέθηκε

ξεχωριστά η τιμή ΔC_T του δείγματος control και προέκυψαν οι τιμές $\Delta\Delta C_T$. Οι τιμές αυτές εισάγονται στον τύπο $2^{-\Delta\Delta C_T}$, το αποτέλεσμα του οποίου ισούται με τη διαφορά στα επίπεδα έκφρασης. Επιπλέον, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση και προστέθηκαν οι γραμμές σφάλματος στο διάγραμμα της εικόνας 27.



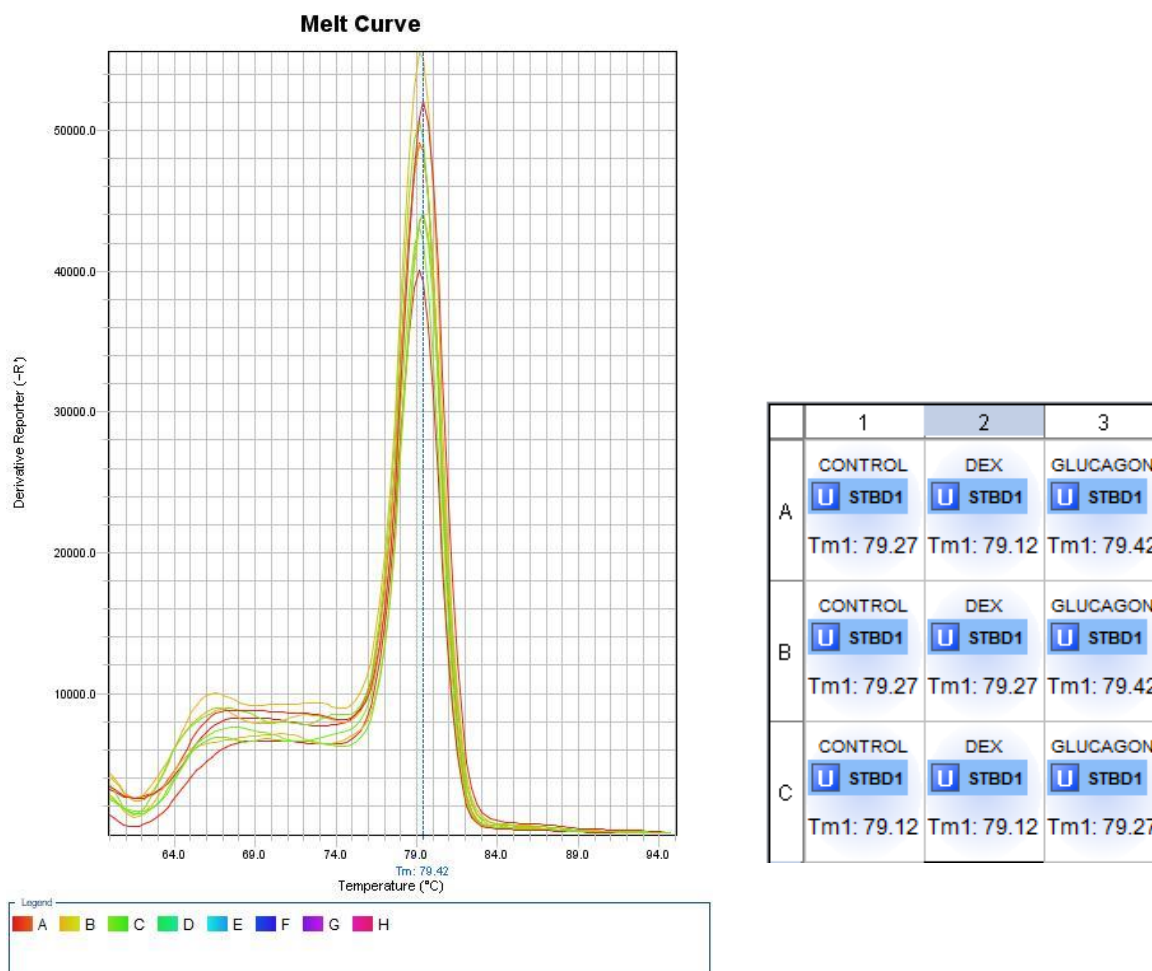
Εικόνα 26. Καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στα δείγματα control, το κόκκινο στα δείγματα DEX και το κίτρινο στα δείγματα GLUCAGON. Στο σχήμα παρατηρείται ότι τα δείγματα GLUCAGON (κίτρινο) ξεπερνούν νωρίτερα το κατώφλι από τα άλλα δείγματα, τα οποία δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στην εικόνα απεικονίζονται μόνο τα δείγματα που στοχεύουν την *STBD1*. Στον άξονα x απεικονίζεται ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης, στον άξονα Y η ποσότητα φθορισμού και η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο κατώφλι.



Εικόνα 27. Διάγραμμα που συγκρίνει τα σχετικά επίπεδα έκφρασης ανάμεσα στα δείγματα Control, DEX και GLUCAGON. Στον άξονα x εμφανίζονται τα δείγματα, ενώ στον άξονα y τα σχετικά επίπεδα έκφρασης της *STBD1*.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η *STBD1* εκφράζεται 3,6 φορές περισσότερο κατά τη γλυκογονόλυση (υπό τις συνθήκες του πειράματος) σε σχέση με το control, ενώ κατά τη γλυκογένεση (υπό τις συνθήκες του πειράματος) 1,2 φορές αντίστοιχα. Ωστόσο, δεν είναι δυνατή η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων, χωρίς την διεξαγωγή επαναληπτικών και περεταίρω πειραμάτων.

Ακολούθησε η καμπύλη τήξης, η οποία προσφέρει πληροφορίες για πιθανά παραπροϊόντα της αντίδρασης.



Εικόνα 28. Καμπύλη αποδιάταξης προϊόντων μέσω θέρμανσης (Melt Curve). Στον άξονα Χ απεικονίζεται η θερμοκρασία, ενώ στον άξονα Υ η απορρόφηση. Στο διάγραμμα περιέχονται τα δείγματα που στοχεύουν την *STBD1*.

Εικόνα 29. Θερμοκρασία τήξης των προϊόντων της RT-PCR στα δείγματα με στόχο την *STBD1*.

Από τις παραπάνω εικόνες παρατηρούμε πως υπάρχει μόνο μία κύρια κορυφή σε θερμοκρασία $\approx 79,3$ °C. Η απουσία σήματος στους 70-75 °C υποδεικνύει ότι δεν σχηματίζονται διμερή ανάμεσα στους εκκινητές. Επιπλέον, η έλλειψη σήματος στους 75-80 °C, εκτός της κύρια κορυφής, αποδεικνύει πως οι εκκινητές ενισχύουν ειδικά το επιθυμητό γονίδιο. Τέλος, η ύπαρξη μιας κορυφής σε πολύ στενό εύρος (0,3 °C) επιβεβαιώνουν την απουσία παραπροϊόντων της αντίδρασης.

Επίσης, τα σχετικά επίπεδα mRNA της *STBD1* είναι αυξημένα κατά τη γλυκογονόλυση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, όπως παρατηρείται από τα παραπάνω δεδομένα.

5. Συζήτηση

Οι μελέτες για την λειτουργία της πρωτεΐνης STBD1 βρίσκονται ακόμα σε αρχικό στάδιο, αλλά υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την αποκάλυψη των πολλαπλών ρόλων της. Η STBD1 συμμετέχει στην υδρολυτική διάσπαση του γλυκογόνου στα λυσοσώματα, λειτουργώντας ως μεταφορέας του γλυκογόνου, ωστόσο, συνεχώς έρχονται στην επιφάνεια πολλαπλές διαφορετικές δράσεις της. Η CBM20 περιοχή της STBD1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη δράση της πρωτεΐνης, καθώς συμμετέχει στη σύνδεση της πρωτεΐνης με το γλυκογόνο και πιθανώς με άλλα μόρια που συμμετέχουν στον μεταβολισμό γλυκογόνου. Η κρυστάλλωση της CBM20 θα συνεισφέρει στην διαλεύκανση του τρόπου μεταφοράς του γλυκογόνου στα λυσοσώματα και στην εύρεση μορίων που προσδένει. Απαραίτητη προϋπόθεση για αυτό το σκοπό αποτελεί η παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη ποσότητα, η απομόνωση της και η εύρεση κατάλληλων συνθηκών για την επίτευξη κρυστάλλωσης.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός πρωτοκόλλου καθαρισμού της CBM20. Καταρχάς, αποδείχθηκε πως η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την υπερέκφραση της CBM20 στο διαλυτό μέρος (επώαση μετασηματισμένων βακτηρίων για 16 h στους 18 °C, συγκέντρωση IPTG= 0,1 mM) ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική (\approx 63 mg ολικής πρωτεΐνης). Στη συνέχεια, κατά την χρωματογραφία συγγένειας (στήλη GST) διαχωρίστηκε σε μεγάλο βαθμό το σύμπλοκο CBM20-GST Tag από υπόλοιπες πρωτεΐνες, αλλά όχι σε επαρκή βαθμό για κρυστάλλωση, ενώ υπήρξε και ορισμένη απώλεια στο Flow Through. Αντίθετα, η επακόλουθη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (στήλη Resource Q) δεν κατάφερε να διαχωρίσει το σύμπλοκο και επέφερε μεγάλη απώλεια πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας στήλης GST με Sepharose beads έδειξαν ιδιαίτερα αποτελεσματική πέψη της ετικέτας GST, αλλά μερικώς επιτυχημένος διαχωρισμός της ετικέτας από τη CBM20 στα δείγματα που λήφθηκαν. Η επόμενη στήλη Resource Q με πιο σταδιακή έκλυση παρουσίασε παρόμοια προβλήματα με την πρώτη και ήταν πλήρως αναποτελεσματική. Αντίθετα, η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (στήλη Superdex 75) φαίνεται να κατάφερε να απομονώσει αποτελεσματικά την CBM20, όμως, η τελική ποσότητα της πρωτεΐνης δεν ήταν επαρκής για περαιτέρω πειράματα κρυστάλλωσης.

Επομένως, συνίσταται η μερική τροποποίηση της παραπάνω διαδικασίας για την απομόνωση της CBM20, κυρίως μέσω της παράλειψης των χρωματογραφιών ιοντοανταλλαγής (Resource Q), αλλά και την βελτιστοποίηση άλλων παραγόντων, όπως πραγματοποίηση της 1^{ης} στήλης GST σε δύο επαναλήψεις (2 runs) και χρήση στήλης FPLC αντί για Beads για τον διαχωρισμό της ετικέτας GST από την CBM20.

Επιπλέον, επιχειρήθηκε ο σχεδιασμός εκκινητών για την στόχευση της STBD1 και ο σχεδιασμός πρωτοκόλλου για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων mRNA της μέσω Real-Time PCR κατά τη γλυκογένεση και τη γλυκογονόλυση.

Σχετικά με τους εκκινητές, από το Amplification Plot συμπεραίνεται ότι πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου. Το melting curve υποδεικνύει πως δεν σχηματίζονται διμερή ανάμεσα στα μόρια του εκκινητή και δεν ενισχύονται αλληλουχίες εκτός της επιθυμητής. Επομένως, το ζευγάρι εκκινητών που σχεδιάστηκε κρίνεται αποτελεσματικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικά πειράματα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπάρχει μία ένδειξη πως τα επίπεδα mRNA της STBD1 είναι αυξημένα κατά τη γλυκογονόλυση κατά 3,6 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, γεγονός

που συμβαδίζει με τον ρόλο της στην αποικοδόμηση γλυκογόνου. Αντίστοιχα, τα επίπεδα της STBD1 είναι ελαφρώς αυξημένα κατά τη γλυκογένεση κατά 1,2 φορές σε σχέση με τον μάρτυρα, που είναι στα όρια του στατιστικού λάθους. Η αύξηση που παρατηρήθηκε συνιστά ακόμη μία ένδειξη της αποτελεσματικότητας του πρωτοκόλλου για την επαγωγή γλυκογονόλυσης στα κύτταρα HepG2. Επιπλέον, ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την απορρόφηση στα 280 nm υποδεικνύει πως το πρωτόκολλο για την απομόνωση RNA είναι αποδοτικό. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν υποδεικνύουν πως το πρωτόκολλο συνολικά ήταν σε μεγάλο βαθμό αποτελεσματικό. Η επανάληψη και η διενέργεια του πρωτοκόλλου με περισσότερα δείγματα θα συμβάλει στον περιορισμό των λαθών και θα συνεισφέρει στην εξαγωγή ουσιαστικότερων συμπερασμάτων.

6. Βιβλιογραφικές αναφορές

1. Bouju S, Lignon MF, Piétu G, Le Cunff M, Léger JJ, Auffray C, et al. Molecular cloning and functional expression of a novel human gene encoding two 41-43 kDa skeletal muscle internal membrane proteins. *Biochem J.* 1998;335 (Pt 3)(Pt 3):549-56.
2. Janecek S. A motif of a microbial starch-binding domain found in human genethonin. *Bioinformatics.* 2002;18(11):1534-7.
3. Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, DePaoli-Roach AA, et al. Starch binding domain-containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem.* 2010;285(45):34960-71.
4. Han Z, Zhang W, Ning W, Wang C, Deng W, Li Z, et al. Model-based analysis uncovers mutations altering autophagy selectivity in human cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):3258-.
5. Consortium TU. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research.* 2020;49(D1):D480-D9.
6. Jiang S, Wells CD, Roach PJ. 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413(3):420-5.
7. Zhu Y, Zhang M, Kelly AR, Cheng A. The carbohydrate-binding domain of overexpressed STBD1 is important for its stability and protein-protein interactions. *Biosci Rep.* 2014;34(4).
8. Koutsifeli P, Varma U, Daniels LJ, Annandale M, Li X, Neale JPH, et al. Glycogen-autophagy: Molecular machinery and cellular mechanisms of glycophagy. *J Biol Chem.* 2022;298(7):102093.
9. Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:379-406.
10. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 2013;36(10):587-97.
11. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2011;27:441-64.
12. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med.* 2016;48(3):e218.
13. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *The Biochemical journal.* 2012;441(3):763-87.
14. Adeva-Andany MM, González-Lucán M, Donapetry-García C, Fernández-Fernández C, Ameneiros-Rodríguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin.* 2016;5:85-100.
15. Prats C, Graham TE, Shearer J. The dynamic life of the glycogen granule. *The Journal of biological chemistry.* 2018;293(19):7089-98.
16. Zhao H, Tang M, Liu M, Chen L. Glycophagy: An emerging target in pathology. *Clin Chim Acta.* 2018;484:298-303.
17. Hu YX, Han XS, Jing Q. Autophagy in Development and Differentiation. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:469-87.
18. Luo L, Qin Z-H. Autophagy, Aging, and Longevity. In: Qin Z-H, editor. *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 509-25.
19. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010;221(1):3-12.

20. Kliinsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, et al. Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 2021;40(19):e108863-e.
21. Kotoulas OB, Kalamidas SA, Kondomerkos DJ. Glycogen autophagy in glucose homeostasis. *Pathol Res Pract.* 2006;202(9):631-8.
22. Byrnes K, Blessinger S, Bailey NT, Scaife R, Liu G, Khambu B. Therapeutic regulation of autophagy in hepatic metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 2022;12(1):33-49.
23. Demetriadou A, Morales-Sanfrutos J, Nearchou M, Baba O, Kyriacou K, Tate EW, et al. Mouse *Stbd1* is N-myristoylated and affects ER-mitochondria association and mitochondrial morphology. *J Cell Sci.* 2017;130(5):903-15.
24. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94.
25. Lytridou AA, Demetriadou A, Christou M, Potamiti L, Mastroiannopoulos NP, Kyriacou K, et al. *Stbd1* promotes glycogen clustering during endoplasmic reticulum stress and supports survival of mouse myoblasts. *J Cell Sci.* 2020;133(20).
26. Yi H, Fredrickson KB, Das S, Kishnani PS, Sun B. *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.* 2013;109(3):312-4.
27. Sun T, Yi H, Yang C, Kishnani PS, Sun B. Starch Binding Domain-containing Protein 1 Plays a Dominant Role in Glycogen Transport to Lysosomes in Liver. *J Biol Chem.* 2016;291(32):16479-84.
28. Metzendorf C, Wineberger K, Rausch J, Cigliano A, Peters K, Sun B, et al. Transcriptomic and Proteomic Analysis of Clear Cell Foci (CCF) in the Human Non-Cirrhotic Liver Identifies Several Differentially Expressed Genes and Proteins with Functions in Cancer Cell Biology and Glycogen Metabolism. *Molecules.* 2020;25(18).
29. Han Z, Zhang W, Ning W, Wang C, Deng W, Li Z, et al. Model-based analysis uncovers mutations altering autophagy selectivity in human cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):3258.
30. Smyth DR, Mrozkiewicz MK, McGrath WJ, Listwan P, Kobe B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* 2003;12(7):1313-22.
31. Schäfer F, Seip N, Maertens B, Block H, Kubicek J. Purification of GST-Tagged Proteins. *Methods Enzymol.* 2015;559:127-39.
32. Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol.* 2011;681:259-80.
33. Toullos A. Heterologous expression of the C-terminal domain (CBM20) of the human Starch binding domain-containing protein 1 (STBD1). 71st panhellenic conference of EEBMB. 2021.
34. BL21-Gold Competent Cells, BL21-Gold(DE3) Competent Cells, and BL21-Gold(DE3)pLysS Competent Cells, Instruction Manual [Internet]. 2015. Available from: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230130.pdf>.
35. Ryan KJ, Needham GM, Dunsmoor CL, Sherris JC. Stability of antibiotics and chemotherapeutics in agar plates. *Appl Microbiol.* 1970;20(3):447-51.
36. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007(6):253-.
37. Panja S, Aich P, Jana B, Basu T. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol.* 2008;25(5):411-22.
38. Lessard JC. Growth media for *E. coli*. *Methods Enzymol.* 2013;533:181-9.
39. Muinao T, Pal M, Boruah HPD. Cytosolic and Transmembrane Protein Extraction Methods of Breast and Ovarian Cancer Cells: A Comparative Study. *J Biomol Tech.* 2018;29(3):71-8.
40. Ferdous S, Dopp JL, Reuel NF. Optimization of *E. Coli* Tip-Sonication for High-Yield Cell-Free Extract using Finite Element Modeling. *AIChE J.* 2021;67(10).
41. Chrambach A, Rodbard D. Polyacrylamide gel electrophoresis. *Science.* 1971;172(3982):440-51.
42. Brunelle JL, Green R. Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining. In: Lorsch J, editor. *Methods in Enzymology.* 541: Academic Press; 2014. p. 161-7.
43. Kavran JM, Leahy DJ. Chapter Fourteen - Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. In: Lorsch J, editor. *Methods in Enzymology.* 541: Academic Press; 2014. p. 169-76.
44. Brunelle JL, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol.* 2014;541:151-9.
45. John M. Jr Clark RLS. Πειραματική βιοχημεία: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης; 2005.

46. Rodríguez EL, Poddar S, Iftekhhar S, Suh K, Woolfork AG, Ovbude S, et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2020;1157:122332.
47. Jungbauer A, Hahn R. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol.* 2009;463:349-71.
48. Ó'Fágáin C, Cummins PM, O'Connor BF. Gel-Filtration Chromatography. *Methods Mol Biol.* 2017;1485:15-25.
49. Zumstein L. Dialysis and ultrafiltration. *Curr Protoc Mol Biol.* 2001;Appendix 3:Appendix 3C.
50. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39(1):75-85.
51. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods Mol Biol.* 2015;1250:77-93.
52. Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *Altex.* 2011;28(4):305-16.
53. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol.* 2012;806:1-13.
54. Drakou CE, Gardeli C, Tsialtas I, Alexopoulos S, Mallouchos A, Koulas SM, et al. Affinity Crystallography Reveals Binding of Pomegranate Juice Anthocyanins at the Inhibitor Site of Glycogen Phosphorylase: The Contribution of a Sugar Moiety to Potency and Its Implications to the Binding Mode. *J Agric Food Chem.* 2020;68(37):10191-9.
55. SYBR® Select Master Mix [Internet]. 2013. Available from: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4472919_4473367_SYBR_Select_MasterMix_UG.pdf.
56. Primer Express Software 3.0 Getting Started Guide [Internet]. 2005. Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_041902.pdf.
57. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR, Ciuffo S, Haddad D, McVeigh R, et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D733-45.
58. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
59. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002;12(6):996-1006.
60. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W43-6.
61. Multiple Primer Analyzer [Internet]. 2021. Available from: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>.
62. Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen.* 2010;18(5):460-6.
63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.