

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Δημάκου Φωτεινή



Λάρισα, 2019

Αναγνώριση πεπτιδίων που αλληλεπιδρούν με μια shaggy-like κινάση με ρόλο στη φυματιογένεση στο φυτό *Lotus japonicus* μέσω του συστήματος δυο υβριδίων ζυμομύκητα

Identification of peptides interacting with a shaggy-like kinase with a role in nodulation in *Lotus japonicus* by yeast two-hybrid system



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

1. Παπαδοπούλου Καλλιόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2. Καρπούζας Δημήτριος

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

3. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την πολύτιμη βοήθειά της στην καθοδήγηση του πειράματος καθώς και για τις συμβουλές της, παρέχοντάς μου τα απαραίτητα εφόδια για την ολοκλήρωση του πειράματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Δρ Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθόλη την διάρκεια της πτυχιακής μου, για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές που μου έδωσε και φυσικά για τον χρόνο που διέθεσε. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Ιωάννα Ρήγου για την καλή συνεργασία μας κατά την διάρκεια του πειράματος και για την υπομονή και την επιμονή της, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και την βοήθειά τους, οποιαδήποτε στιγμή την χρειάστηκα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξή τους με κάθε δυνατό τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|-----------|
| Περίληψη..... | 6 |
| Abstract..... | 7 |
| 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 8 |
| 1.1.Η κινάση GSK3 (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3) στα θηλαστικά..... | 8 |
| 1.2.Οι κινάσες GSK στα φυτά..... | 10 |
| 1.3.Οι LSKs (Lotus-SHAGGY-like Kinase) στο <i>Lotus japonicus</i> | 13 |
| 1.4.LSK1 και ρόλος..... | 15 |
| 1.5.Πρόσβαση στο N2 - συμβιωτικές σχέσεις..... | 16 |
| 1.6.Φυματιογένεση..... | 17 |
| 1.7. Επικοινωνία κατά την συμβίωση-μοριακά μονοπάτια..... | 19 |
| 1.8. Autoregulation of nodulation (AON)..... | 21 |
| 1.9.Το φυτό-μοντέλο <i>Lotus japonicus</i> | 22 |
| 1.10.Ιστορική αναδρομή: Η ανακάλυψη του συστήματος των δύο υβριδίων..... | 23 |
| 1.11. Σήμερα: Πώς δουλεύει το σύστημα Y2H..... | 24 |
| 1.12.Προσεγγίσεις του συστήματος Y2H..... | 27 |
| 1.13.Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων..... | 28 |
| 1.14.Σκοπός..... | 29 |
| 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 30 |
| 2.1.Μετασχηματισμός των στελεχών ζύμης..... | 30 |
| 2.2.Μετασχηματισμός του <i>Escherichia coli</i> | 30 |
| 2.3.Απομόνωση πλασμιδίων με αλκαλική λύση..... | 31 |
| 2.4.Stock γλυκερόλης για αποθήκευση κυττάρων ζύμης..... | 31 |
| 2.5.Πλασμιδιακοί χάρτες..... | 31 |
| 2.6.Συζεύξεις..... | 33 |
| 2.7.Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA..... | 34 |
| 2.7.1.Ανάπτυξη φυτών <i>Lotus japonicus</i> και μόλυνση με το ριζόβιο <i>Mesorhizobium loti</i> | 34 |
| 2.7.2.Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA..... | 35 |
| 2.8.Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης..... | 37 |
| 2.9.Θρεπτικά μέσα και διαλύματα..... | 37 |
| 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 39 |
| 3.1.Κλωνοποίηση της LSK1 και έλεγχος της έκφρασής της στην ζύμη..... | 39 |
| 3.2.Πειράματα ελέγχου..... | 40 |
| 3.3.Έλεγχος αυτο-ενεργοποίησης και τοξικότητας της LSK1..... | 44 |
| 3.4.Πειράματα δοκιμής σύζευξης (pairwise mating)..... | 46 |
| 3.5.Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA..... | 50 |
| 3.6.Διαλογή (screening) αλληλεπιδράσεων από την βιβλιοθήκη cDNA..... | 52 |
| 3.7.Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης κλώνων στο στέλεχος Y187..... | 55 |
| 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 56 |
| 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 60 |

Περίληψη

Οι φυτικές κινάσες Shaggy-like kinases (SK) παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις ζωικές κινάσες GSK3 και αποτελούν μία καλά συντηρημένη οικογένεια πρωτεϊνών με μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία τους. Γενετικές και βιοχημικές προσεγγίσεις δείχνουν ότι οι φυτικές SK εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως η σηματοδότηση των ορμονών, η ανάπτυξη, οι αποκρίσεις στο στρες και η συμβίωση με ριζόβια βακτήρια του εδάφους. Βέβαια, λίγα υποστρώματα των φυτικών SK έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής. Στο *Lotus japonicus* βρέθηκε μία οικογένεια 6 γονιδίων που κωδικοποιούν για κινάσες SK, ανάμεσά τους και η LSK1 που ανήκει στην οικογένεια των κινασών GSK3-like (Glycogen Synthase Kinase 3). Η LSK1 εκφράζεται στις ρίζες του φυτού *Lotus japonicus* μία ώρα μετά από την μόλυνση με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* R7a και παίζει ρόλο στα πρωταρχικά στάδια της φυματογένεσης. Η LSK1 φαίνεται να αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της φυματογένεσης ο οποίος είναι απαραίτητος αλλά όχι επαρκής για την καταστολή της φυματογένεσης. Καθώς λίγα είναι γνωστά για τον ρόλο της LSK1 στο μονοπάτι σηματοδότησης της φυματογένεσης, στη μελέτη αυτή αναζητούνται πιθανοί παράγοντες αλληλεπίδρασης της LSK1 στο φυτό *Lotus japonicus* μετά από μόλυνση με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* R7a μέσω του συστήματος Yeast Two-Hybrid. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα σύζευξης (pairwise tests) με τις πιθανές αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες AtBAK1, LJSERK3, PUB13 και ERBB2 καθώς και στην διαλογή (screening) από μία βιβλιοθήκη κλώνων cDNA.

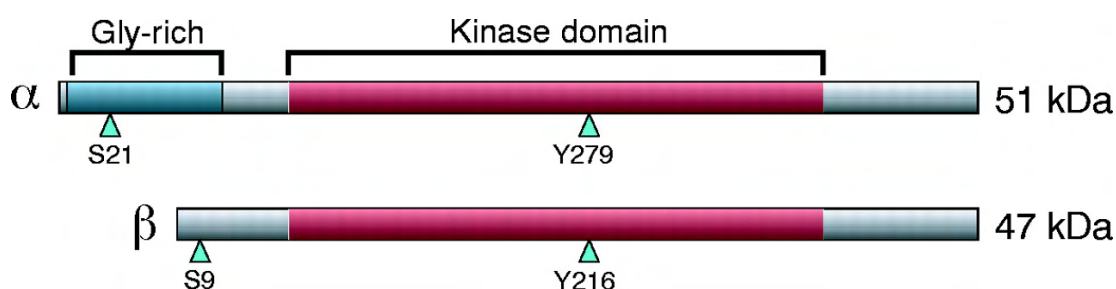
Abstract

Plant Shaggy-Like kinases (SK) share high similarity to GSK3 animal kinases and constitute a well-preserved family of proteins with high sequence similarity. Genetic and biochemical approaches indicate that plant SKs are involved in various processes such as hormone signaling, growth, stress responses and symbioses with rhizobial bacteria in soil. So far, only a few substrates of plant SK have been reported. Recently, a family of 6 genes encoding SK-kinases were identified in *Lotus japonicus*, including LSK1 which belongs to GSK3-like (Glycogen Synthase Kinase 3) family. LSK1 is expressed in the roots of *Lotus japonicus* one hour after infection with the rhizobium *Mesorhizobium loti R7a* and plays a role in the early stages of nodulation. LSK1 seems to be a negative regulator of nodulation which is necessary but not sufficient to suppress nodulation. As little is known about the role of LSK1 in the nodulation signaling pathway, this study looks for potential LSK1 interaction factors in *Lotus japonicus* after infection with *Mesorhizobium loti R7a* in roots through Yeast Two-Hybrid system. This system was used in pairwise tests with the hypothetical interacting proteins AtBAK1, LjSERK3, PUB13 and ERBB2 as well as in screening of a library of cDNA clones.

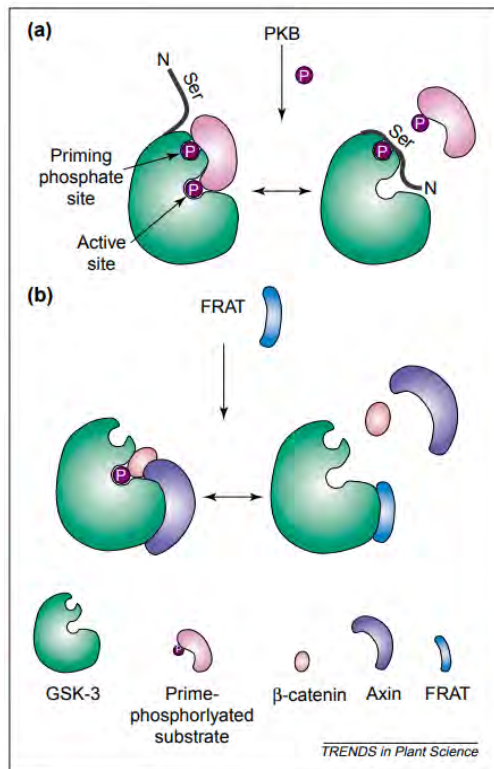
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η κινάση GSK3 (GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3) στα θηλαστικά

Η κινάση Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3), επίσης γνωστή και ως Shaggy Kinase (KS) στην *Drosophila* (Ruel et al., 1993) είναι μία κινάση υψηλά συντηρημένη σε όλους τους ευκαρυώτες (Saidi et al., 2012). Χαρακτηρίστηκε πρώτα ως μία κινάση σερίνης/θρεονίνης που παίζει ρόλο στο μονοπάτι σηματοδότησης της ινσουλίνης, φωσφορυλιώνοντας την συνθάση του γλυκογόνου (Cohen et al., 1982). Σήμερα, είναι γνωστό ότι η GSK3 επιτελεί διάφορες λειτουργίες όπως η κίνηση του κυτταροσκελετού, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (Frame & Cohen, 2001), η ομοίωση του μεταβολισμού, η ανάπτυξη του εμβρύου, η νευρωνική διαφοροποίηση και ο κίρκαδικός ρυθμός. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες GSK3 αποτελούν ρυθμιστές σε μονοπάτια σηματοδότησης όπως της ινσουλίνης, του Wnt, των υποδοχέων notch και το μονοπάτι σηματοδότησης hedgehog (Doble, 2003). Υπάρχουν δύο ισομορφές της GSK3 στα θηλαστικά που κωδικοποιούνται από δύο ξεχωριστά γονίδια, το GSK-3α και το GSK-3β (Εικόνα 1). Η GSK3α (51 kDa) και η GSK-3β (47 kDa) παρουσιάζουν 98% ομοιότητα στο τμήμα της κινάσης και η GSK3α περιέχει μία περιοχή πλούσια σε γλυκίνη (Doble, 2003).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των GSK-3α και GSK-3β των θηλαστικών. Με μπλε βέλη φαίνονται τα σημεία φωσφορυλίωσης στα κατάλοιπα σερίνης και τυροσίνης, με μωβ το συντηρημένο τμήμα της κινάσης και με μπλε η περιοχή πλούσια σε γλυκίνη στο N-τελικό τμήμα της GSK3α (Doble, 2003)



Εικόνα 2: Ρύθμιση της κινάσης 3 της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK-3). (a) Τα υποστρώματα που υφίστανται μία πρώτη φωσφορυλίωση προσδένονται στο "priming phosphate site" της GSK-3, που τοποθετεί το υπόστρωμα σε θέση για φωσφορυλίωση. Φωσφορυλίωση της GSK-3 από την PKB στην Ser9, καθιστά το N-τελικό άκρο ένα ψευδοϋπόστρωμα για την GSK-3 που ανταγωνίζεται τα υπόλοιπα υποστρώματα. (b) Η GSK-3 φωσφορυλιώνει την αξίνη και την β-κατενίνη σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η πρωτεΐνη FRAT εμποδίζει την φωσφορυλίωση της αξίνης και της β-κατενίνης, καθώς ανταγωνίζεται με την αξίνη για την πρόσδεση στην GSK-3. Η πρόσδεση της FRAT δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση των ήδη φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων.

Στα θηλαστικά, τα περισσότερα υποστρώματα των κινασών GSK3 περιέχουν ένα μοτίβο φωσφορυλίωσης Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr. Η αναγνώριση του υποστρώματος από την GSK3 απαιτεί μία πρωταρχική φωσφορυλίωση από μία άλλη κινάση σε ένα σημείο που ονομάζεται "priming phosphorylation site" (Εικόνα 2a) το οποίο βρίσκεται 4 αμινοξέα δίπλα από το σημείο φωσφορυλίωσης από την GSK3 (Claudia Jonak & Hirt, 2002). Πρόσφατα, βρέθηκαν τα τρία θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Arg94, Arg180 και Lys205) που καθορίζουν την δομή πρόσδεσης του υποστρώματος ώστε το ίδιο να τοποθετείται σε ευνοϊκή θέση για φωσφορυλίωση από την GSK-3 (Dajani et al., 2001). Όταν η πρωτεϊνική κινάση B (PKB) φωσφορυλιώνει την GSK-3 στην Ser9, το φωσφορυλιωμένο N-τελικό άκρο αλληλεπιδρά με την δομή πρόσδεσης του υποστρώματος και δρα σαν ένα ψευδοϋπόστρωμα που αποτρέπει την πρόσδεση ενός υποστρώματος για την GSK3, καθιστώντας την ανενεργή (Claudia Jonak & Hirt, 2002).

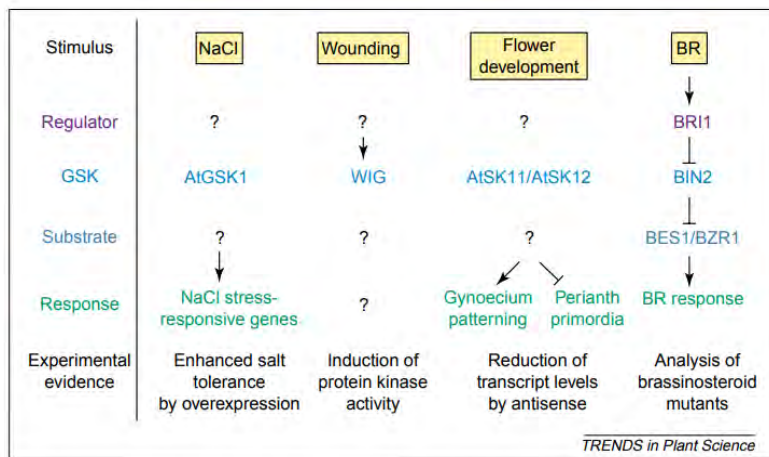
Η αναγνώριση του υποστρώματος από την GSK3 μπορεί να γίνει και μέσω αλληλεπίδρασης του υποστρώματος με πρωτεΐνες σκαλωσιάς όπως η Axin και η FRAT (Behrens et al., 1998), (Εικόνα 2b) με αποτέλεσμα η ικανότητα της GSK3 να φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες να αυξάνεται μέχρι και 1000 φορές (Thomas et al., 1999). Στο μονοπάτι, Wnt, η φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων της GSK3, όπως η β-κατενίνη, φαίνεται να βασίζεται στην υψηλή συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος και όχι στην πρωταρχική φωσφορυλίωση. Η ενεργή GSK-3 βρίσκεται σε σύμπλοκο με την β-κατενίνη, την πρωτεΐνη APC (adenomatous polyposis coli) και την αξίνη (μία πρωτεΐνη σκαλωσιάς). Παρουσία του Wnt, η GSK-3 απενεργοποιείται από ένα

σύμπλοκο GBP/FRAT καθώς η πρόσδεσή του στην GSK3 εμποδίζει την αλληλεπίδραση της GSK3 με την αξίνη και απομακρύνει την β-κατενίνη από το σύμπλοκο. [12,13]. Η GSK-3 απαιτεί και η ίδια φωσφορυλίωση για την ενεργοποίηση της λειτουργίας της στην Tyr216 του τμήματος κινάσης (Jonak & Hirt, 2002; Matthew et al., 1998).

1.2 Οι κινάσες GSK στα φυτά

Τα φυτά διαθέτουν επίσης πρωτεΐνες που μοιάζουν με τις GSK3 στο γονιδίωμα τους. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, οι φυτικές GSK κωδικοποιούνται από μεγάλες οικογένειες γονιδίων, των οποίων τα μέλη παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στην αλληλουχία τους (Dornelas et al., 1998). Οι φυτικές ισομορφές των GSK3 είναι περισσότερο πολύπλοκες (10 στο *Arabidopsis* και 9 στο ρύζι) (Yoo et al., 2006) και παρουσιάζουν 65-72% ομοιότητα με την κινάση GSK3β του ανθρώπου. Σε αντίθεση με το τμήμα κινάσης των GSK που είναι υψηλά συντηρημένο, το N-τελικό και το C-τελικό άκρο των φυτικών GSK διαφέρει σημαντικά, γεγονός που υποστηρίζει ότι οι φυτικές GSK εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Στην T-loop, όλες οι φυτικές GSK έχουν ένα κατάλοιπο τυροσίνης αντίστοιχο με το κατάλοιπο τυροσίνης της GSK3 των θηλαστικών. Επίσης, τα αμινοξέα Arg94, Arg180 και Lys205, που καθορίζουν το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος υπάρχουν και στις φυτικές GSK3 ενώ, στο N-τελικό άκρο το κατάλοιπο Ser9 δεν είναι παρόν σε καμία κινάση GSK των φυτών. Με βάση την αλληλουχία τους οι φυτικές GSK κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τάξεις (I-IV) (Claudia Jonak & Hirt, 2002).

Λίγα υποστρώματα έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής, ανάμεσά τους οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες αποκρινόμενοι στα βρασσινοστεροειδή, ο BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) και ο bri1 EMS SUPPRESSOR1, (BES1/BZR2) (He et al., 2011). Η BR-INSENSITIVE 2 (BIN2) ήταν η πρώτη φυτική κινάση GSK3 που χαρακτηρίστηκε (Li, et al., 2001). Βιοχημικές και γενετικές αναλύσεις απέδειξαν ότι η BIN2 παίζει αρνητικό ρόλο στην σηματοδότηση των βρασσινοστεροειδών, ρυθμίζοντας έτσι την κυτταρική ανάπτυξη.



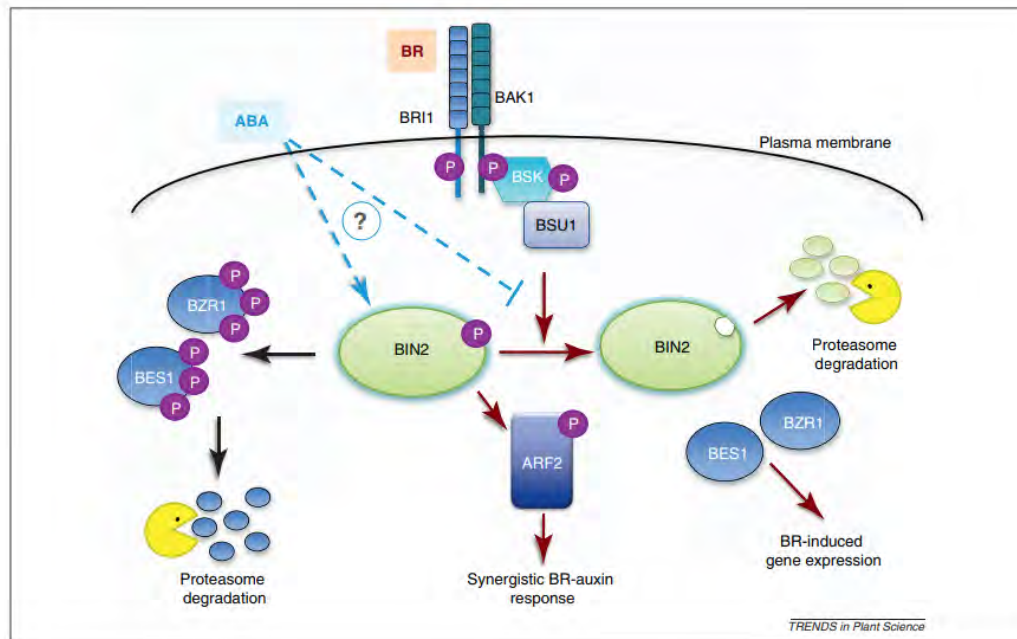
Εικόνα 3: Πιθανά μονοπάτια της GSK3 στα φυτά. Η AtGSK1 είναι ένας θετικός ρυθμιστής που αποκρίνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Ο WIG εμπλέκεται στην σηματοδότηση κατά τον τραυματισμό. Η AtSK11 και η AtSK12 εμπλέκονται στην ανάπτυξη του ανθού. Η BIN2 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της BRI1 στο μονοπάτι των βρασινοστεροειδών, που ελέγχει την συσσώρευση της BES1 και της BRZ1

Γενετικές και βιοχημικές προσεγγίσεις δείχνουν ότι οι φυτικές GSK εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως η σηματοδότηση των ορμονών, η ανάπτυξη και οι αποκρίσεις στο στρες (Claudia Jonak & Hirt, 2002), (Εικόνα 3). Όσον αφορά τις αβιοτικές καταπονήσεις, έχει βρεθεί ότι η παραγωγή της κινάσης AtGSK1 αυξάνεται από την παρουσία NaCl και αποκοπτικού οξέος (ABA). Η υπερπαραγωγή της AtGSK1 επάγει την έκφραση γονιδίων απόκρισης σε κατάσταση stress λόγω αλατότητας, αλλάζοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα κατιόντων, οδηγώντας σε ανθεκτικότητα στην ξηρασία και στην υψηλή αλατότητα (Piao et al., 2005). Στο *Medicago sativa*, η WIG (Wound-Induced GSK-3) ενεργοποιείται από τον τραυματισμό (Jonak et al., 2000). Στα υγιή φύλλα η δραστηριότητα της κινάσης WIG είναι πολύ χαμηλή, ενώ στην περίπτωση τραυματισμού ενεργοποιείται γρήγορα και παροδικά.

Όπως στα ζώα, έτσι και στα φυτά οι GSKs εμπλέκονται σε αναπτυξιακές διαδικασίες. Η AtSK11 και η AtSK12 φαίνεται να ρυθμίζουν την διαμόρφωση των λουλουδιών σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Dornelas et al., 2000). Τα δύο αυτά γονίδια εκφράζονται στα πρώιμα μεριστωματικά κύτταρα του ανθού. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης μέσω σίγησης οδηγεί στην διαταραγμένη κυτταρική διαίρεση στο μερίστωμα του ανθού, σε άνθη με αυξημένο αριθμό από σέπαλα και πέταλα και σε μη φυσιολογική ανάπτυξη των καρπόφυλλων.

Η σηματοδότηση των στεροειδών ορμονών εντοπίζεται σε φυτά, ζώα και μύκητες, αλλά οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται στα μονοπάτια σηματοδότησης ορμονών ανήκουν σε οικογένειες πρωτεϊνών που βρίσκονται μόνο στα φυτά, υποδεικνύοντας έτσι, την ξεχωριστή προέλευση της σηματοδότησης στεροειδών στα

φυτά (Saidi et al., 2012). Η σηματοδότηση μέσω βρασσινοστεροειδών (BR) ρυθμίζει την ανθοφορία, το πράσινισμα, την περίοδο άνθισης, την γονιμότητα κ.ά. Στο *Arabidopsis*, τα βρασσινοστεροειδή προσδένονται στον υποδοχέα BRI1 (Εικόνα 4) που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη (Clouse, 2011). Ο BRI1 αλληλεπιδρά με τον συνυποδοχέα BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) που ενεργοποιεί την τρανσ-φωσφορυλίωση των δύο υποδοχέων. Ο BRI1, έπειτα, φωσφορυλιώνει διάφορες κινάσες του μονοπατιού σηματοδότησης βρασσινοστεροειδών (BR-signalling kinases/BSKs) στην πλασματική μεμβράνη. Οι φωσφορυλιωμένες BSK προσδένονται και ενεργοποιούν τις φωσφατάσες BSU1, οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν το κατάλοιπο Tyr200 της BIN2, απενεργοποιώντας την δραστικότητα κινάσης της ίδιας (Kim et al., 2011) (Εικόνα 4). Η BIN2 κωδικοποιεί για μία κινάση GSK3 της οποίας η καταλυτική περιοχή παρουσιάζει περίπου 70% ομοιότητα με την ζωϊκή GSK3b. Σημειακές μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας και η υπερέκφραση της BIN2 προκαλούν τον ίδιο φαινότυπο μη ευαισθησίας στα BR, επιβεβαιώνοντας ότι η BIN2 δρα ως καταστολέας σηματοδότησης των BR (Saidi et al., 2012). Απουσία του σήματος από τα BR, η ενεργή BIN2 ρυθμίζει αρνητικά τους μεταγραφικούς παράγοντες BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR1) και bri1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1/BZR2). Η BIN2 φωσφορυλιώνει το BZR1/BES1 σε πολλά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, γεγονός που οδηγεί σε αποικοδόμησή του στα πρωτεοσώματα καθώς και σε αποικοδόμηση και της ίδιας της BIN2. Το αποκοπτικό οξύ (ABA) καταστέλλει την σηματοδότηση των BR, ενισχύει την φωσφορυλίωση του BES1 και επάγει την έκφραση γονιδίων BR-suppressed genes (Zhang et al., 2009). Παρόλα αυτά, παραμένει άγνωστο εάν το ABA έχει άμεση επιρροή στην φωσφορυλίωση της BIN2 ή εάν επηρεάζει το σύμπλοκο BSK/BSU. Η αυξίνη φαίνεται να μη έχει καμία επίδραση στην φωσφορυλίωση του BES1. Βέβαια, ο ARF2, ένα παράγοντας απόκρισης στην αυξίνη (auxin response factor/ARF) δρα ως μεταγραφικός αναστολέας και έχει πολλαπλά σημεία αναγνώρισης της GSK3. Μελέτες *in vitro* επίσης έδειξαν ότι η BIN2 είναι ικανή να φωσφορυλιώνει τον ARF2 και κατά συνέπεια να αναστέλλει τη δραστικότητα πρόσδεσης και καταστολής του DNA (Vert et al., 2008). Αυτά τα ευρήματα παρέχουν μια μοριακή εξήγηση για την επίδραση των BRs στην απόκριση της αυξίνης υποδηλώνοντας ότι η BIN2 διευκολύνει τη δέσμευση των πρωτεϊνών ARF του ενεργοποιητή με την απομάκρυνση των ARF καταστολέων από τα ρυθμιστικά στοιχεία στους προαγωγούς γονιδίων που αποκρίνονται σε αυξίνη (Saidi et al., 2012).



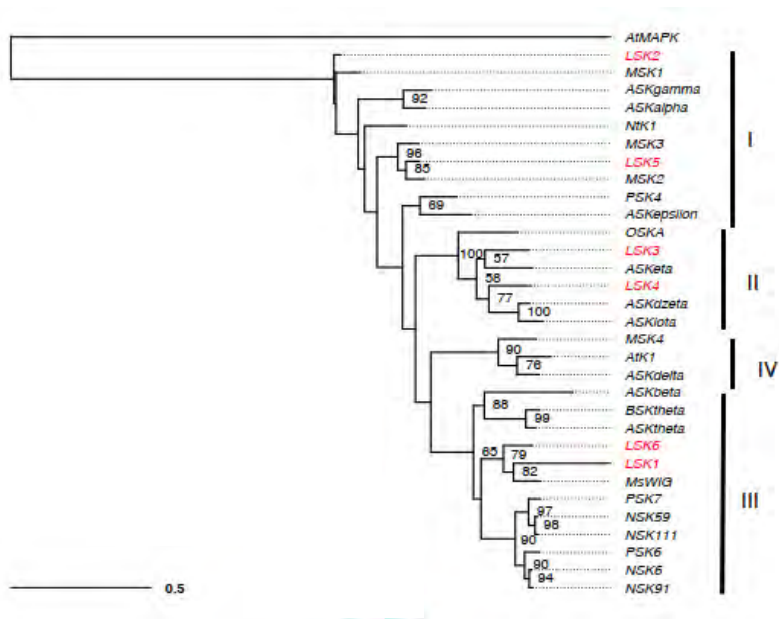
Εικόνα 4: Ο κεντρικός ρόλος της BIN2 στην σηματοδότηση βρασσινοστεροειδών. Απουσία σήματος BR η ενεργή μορφή της BIN2 (φωσφορυλιωμένη) φωσφορυλιώνει τους μεταγραφικούς παράγοντες BES1/BZR1 και τους σημαίνει για αποικοδόμηση στα πρωτεοσώματα. Τα BR ενεργοποιούν τον υποδοχέα BRI1 και τον συνυποδοχέα BAK1. Ακολουθεί η τρανσ-φωσφορυλίωση των δύο υποδοχέων. Ο ενεργός BRI1 φωσφορυλιώνει την κινάση BSK, η οποία αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί την φωσφατάση BSU1. Η BSU1 αποφωσφορυλιώνει την BIN2, οδηγώντας την στην αποικοδόμηση και επιτρέποντας στους μη φωσφορυλιωμένους BES1/BZR1 να μεταφερθούν στον πυρήνα και να επάγουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την σηματοδότηση των BR. Η BIN2 επίσης, φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα ARF2. Το ABA εμποδίζει την σηματοδότηση και ενισχύει την φωσφορυλιωμένη μορφή της BES1 (Saidi et al., 2012).

1.3 Οι LSKs (Lotus-SHAGGY-like Kinase) στο *Lotus japonicus*

Οι SKs είναι υποψήφιοι παράγοντες μεταγωγής σήματος σε μονοπάτια όπως η φυματογένεση, καθώς αποκρίνονται σε σήματα ορμονών και συνδυαστικά με περιβαλλοντικούς παράγοντες παίζουν ρόλο σε διάφορες διεργασίες της φυτικής ανάπτυξης (Youn & Kim, 2015). Η εμπλοκή τους στην ανάπτυξη των ανθών (Claisse, Charrier, & Kreis, 2007), των σωληναρίων γύρης (Tichtinsky et al., 1998), των ριζικών τριχιδίων (Cheng et al., 2014), των στομάτων (Casson & Hetherington, 2012), καθώς και η παρουσία τους στα φυμάτια των ψυχανθών τα καθιστά πιθανούς παράγοντες φυματογένεσης.

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα γύρω από τις φυτικές SKs έχει διεγείρει το ενδιαφέρον και έχει παρουσιάσει σημαντική πρόοδο. Συγκεκριμένα, 27 αλληλουχίες cDNA από τα φυτά *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, *Nicotiana*

tabacum, *Oryza sativa* και *Petunia hybrida* είναι διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων (Claudia Jonak & Hirt, 2002).



Εικόνα 5: Φυλογενετικό δέντρο μέγιστης πιθανοφάνειας των έξι πιθανών LSK και άλλων φυτικών κινασών τύπου SHAGGY όπως η MAPK ASK (*Arabidopsis thaliana*), BSK (*Brassicca napus*), MSK (*Medicago sativa*), NSK / Ntk (*Nicotiana tabacum*), OSK (*Oryza sativa*), MsWIG (*Medicago sativa*). Οι τιμές Bootstrap πάνω από 50 (υπολογιζόμενες από 1000 αντιγραφα) εμφανίζονται πάνω από κάθε κλάδο. Οι ομάδες I-IV αποδίδονται σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιευμένες φυλογενετικές αναλύσεις των φυτών SK (Jonak and Hirt, 2002, Youn and Kim, 2014), η κόκκινη γραμματοσειρά υποδηλώνει τις υποθετικές LSK (Garagounis et al., 2018).

Στο *Lotus japonicus* βρέθηκαν 164 κλώνοι cDNA που κωδικοποιούν κινάσες Ser/Thr (Kameshita et al., 2005). Οι κλώνοι αυτοί φαίνεται να προέρχονται από 15 διαφορετικά γονίδια του *L. japonicus* που δεν έχουν αναφερθεί ξανά. Οι κινάσες που βρέθηκαν κατηγοριοποιήθηκαν σε 5 ομάδες: την οικογένεια RLK που αποτελείται από κινάσες που συνδέονται με υποδοχείς της μεμβράνης (Satterlee & Sussman, 1998) την οικογένεια SnRK που ρυθμίζει μεταβολικά μονοπάτια αποκρινόμενη σε περιβαλλοντικές συνθήκες (Halford et al., 2003), την οικογένεια Ndr που εμπλέκεται στον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης (Tamaskovic et al., 2003), την οικογένεια GSK3 που εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην σηματοδότηση μέσω ορμονών (Claudia Jonak & Hirt, 2002) και την οικογένεια Ark της οποίας τα χαρακτηριστικά δεν είναι ακόμα γνωστά.

Πρόσφατα, βρέθηκαν 6 ανεξάρτητες κωδικές αλληλουχίες, (Garagounis et al., 2018) με μεγάλη ομολογία (περίπου 70%) με βάση τον κλώνο LN2020 που αντιστοιχεί στην αλληλουχία AB113573.1 (GenBank, GI:62857011), και παρουσιάζει ομολογία 76% με την AtSKθ κινάση του *A. thaliana* (Kameshita et al., 2005). Οι αλληλουχίες αυτές ονομάστηκαν LSK1-6 και περιέχουν το συντηρημένο τμήμα κινάσης των GSK3β, ένα

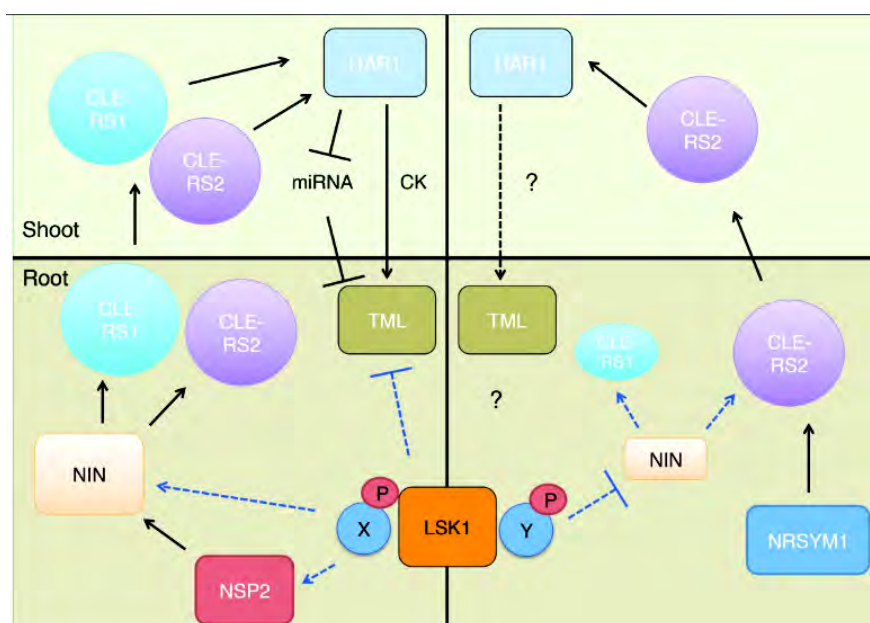
τμήμα πρόσδεσης του ATP και το αντίστοιχο κατάλοιπο Tyr216 της ανθρώπινης GSK3β. Όλες οι LSKs είχαν διαφορετικά N-τελικά και C-τελικά άκρα. Η LSK1 και η LSK6 είχαν σημαντικά μεγαλύτερο N-τελικό άκρο (περίπου 40 αμινοξέα) σε σχέση με τις υπόλοιπες LSKs. Με βάση την φυλογενετική ανάλυση των SKs στα φυτά σε τέσσερις ομάδες (Claudia Jonak & Hirt, 2002; Tichtinsky et al., 1998; Youn & Kim, 2015), η LSK1 και η 6 ανήκουν στην ομάδα III, ενώ η LSK2 και η LSK5 στην ομάδα I. Η LSK3 και η ανήκουν στην ομάδα II, αλλά καμία από αυτές δεν ανήκει στην ομάδα IV. Η LSK1 παρουσιάζει δραστηριότητα κινάσης και είναι ικανή να αυτό-φωσφορυλιώνεται (Garagounis et al., 2018).

1.4 LSK1 και ρόλος

Στην πρόσφατη έρευνα του Garagounis et al το 2018 αποδείχθηκε ότι η LSK1 παίζει ρόλο στα πρωταρχικά στάδια της φυματιογένεσης καθώς εκφράζεται στις ρίζες και σε μικρότερο βαθμό στα φύλλα μία ώρα μετά από την μόλυνση με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* R7a. Σίγηση του γονιδίου της LSK1 οδήγησε στην αύξηση του αριθμού των φυματίων στις ρίζες του φυτού. Αντίθετα, υπερέκφραση του γονιδίου της κινάσης δεν οδήγησε σε σημαντική αλλαγή του αριθμού των φυματίων υποδεικνύοντας ότι η LSK1 είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για την καταστολή της φυματιογένεσης.

Με βάση πειράματα έκφρασης γονιδίων του μονοπατιού AON που έγιναν σε φυτά *Lotus japonicus* μολυσμένα με το ριζόβιο βακτήριο, έχει προταθεί ένα υποθετικό μοντέλο της λειτουργίας της LSK1 σε καταστάσεις υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης νιτρικών στο έδαφος (Εικόνα 6). Σε έλλειψη νιτρικών, η έκφραση της LSK1 συμβαίνει μία ώρα μετά την μόλυνση με το ριζόβιο και επάγει την έκφραση του *NIN* και του *NSP2* μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης/απενεργοποίησης ενδιάμεσων πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων είναι η αυξημένη παραγωγή των πεπτιδίων CLE-RS1 και CLE-RS2 στην ρίζα και η μεταφορά τους στον βλαστό όπου ενεργοποιούν τον HAR1. Έπειτα, απελευθερώνεται ο καταστολέας της συμβίωσης *TOO MUCH LOVE (TML)* στις ρίζες υπό τον μετα-μεταγραφικό έλεγχο ενός miRNA, του miR2111 (Tsikou et al., 2018). Το μονοπάτι αυτό οδηγεί στην καταστολή της περαιτέρω φυματιογένεσης μέσω άγνωστων μηχανισμών. Σε υψηλή συγκέντρωση νιτρικών, τα μεταγραφικά επίπεδα της *LSK1*

παραμένουν τα ίδια αλλά η LSK1 πιθανώς να φωσφορυλιώνει μια διαφορετική πρωτεΐνη, με συνέπεια ο μεταγραφικός παράγοντας NIN να καταστέλλεται όπως και η παραγωγή των πεπτιδίων CLE. Υπό αυτές τις συνθήκες, ενεργοποιείται επίσης ο NRSYM1 (Nishida et al., 2018) και ενεργοποιεί την παραγωγή CLE-RS2, οδηγώντας σε καταστολή της φυματιογένεσης που δεν εξαρτάται από τον TML. Συμπερασματικά, μπορεί η LSK1 να μην αποτελεί μια πρωτεΐνη του μονοπατιού AON, αλλά μπορεί να επηρεάσει άμεσα ή έμμεσα τα διάφορα μέρη του μονοπατιού (Garagounis et al., 2018).



Εικόνα 6: Υποθετικό μοντέλο δράσης της LSK1 υπό συνθήκες χαμηλής (αριστερά) και υψηλής (δεξιά) συγκέντρωσης νιτρικών. Σε χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών η LSK1 επάγει την έκφραση του NIN και του NSP2 με αποτέλεσμα την παραγωγή των πεπτιδίων CLE-RS1 και CLE-RS2 στην ρίζα και έπειτα την μεταφορά τους στον βλαστό. Εκεί τα CLE-RS1 και CLE-RS2 ενεργοποιούν τον HAR1 ο οποίος ενεργοποιεί τον καταστολέα της συμβίωσης TML στις ρίζες υπό τον έλεγχο του miR2111. Σε υψηλή συγκέντρωση νιτρικών, η LSK1 δεν ενεργοποιεί τον NIN για την παραγωγή πεπτιδίων CLE, αλλά ενεργοποιείται ο NRSYM1 που και πάλι οδηγεί στην παραγωγή CLE-RS2, οδηγώντας σε καταστολή της φυματιογένεσης που δεν εξαρτάται από τον TML. (Garagounis et al., 2018)

1.5 Πρόσβαση στο N₂ - συμβιωτικές σχέσεις

Το άζωτο είναι από τα θρεπτικά που χρειάζονται στο φυτό σε μεγάλη αφθονία και στη γεωργία η διαθεσιμότητα αζώτου έχει σημαντική επίδραση τόσο στην απόδοση όσο και στην ποιότητα του προϊόντος (Stougaard, 2000).

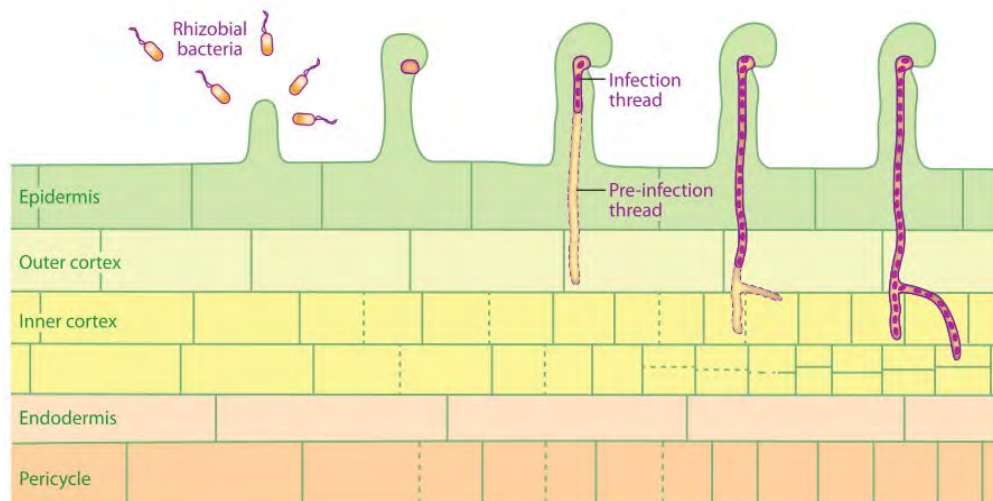
Για λόγους που δεν είναι ακόμα σαφείς, κανένα ευκαρυωτικό ένζυμο δεν μπορεί να διασπάσει τον τριπλό δεσμό του N_2 . Η αναγωγή του N_2 σε NH_3 (σταθεροποίηση αζώτου) περιορίζεται στους προκαρυώτες και καταλύεται από την νιτρογενάση. Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο μέρος του αζώτου που εισέρχεται στη βιόσφαιρα οφείλεται στη δράση των προκαρυωτικών οργανισμών, τα φυτά που συμβιώνουν με αζωτοδεσμευτικά βακτήρια του εδάφους έχουν σημαντικό πλεονέκτημα υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου στο έδαφος. (Downie, 2014).

Η συμβίωση μέσω του σχηματισμού φυματίων έχει υιοθετηθεί από λίγες οικογένειες φυτών, συμπεριλαμβανομένων των ψυχανθών, μαζί με τους συμβιωτικούς συνεργάτες τους, τα ριζόβια βακτήρια (Kouchi et al., 2010). Το φυτό αποκτά πρόσβαση στο άζωτο από τα ριζόβια βακτήρια, ενώ οι μικροοργανισμοί αποκτούν πρόσβαση σε πηγές άνθρακα που προέρχονται από τα φυτά (Desbrosses & Stougaard, 2011).

1.6 Φυματιογένεση

Γενικά, η οργανογένεση λειτουργικών φυματίων της ρίζας βασίζεται στη συγχρονισμένη ενεργοποίηση γονιδίων του ψυχανθούς και των ριζόβιων βακτηρίων. Το τμήμα της ρίζας που είναι επιδεκτική για μόλυνση βρίσκεται στην άκρη της ρίζας όπου τα ριζικά τριχίδια αναπτύσσονται (Εικόνα 7). Ως απόκριση στα προσκολλημένα βακτήρια, τα ριζικά τριχίδια παραμορφώνονται και κυρτώνουν, εγκαθιδρύοντας μια κλειστή κοιλότητα που αποτελεί την θέση της μόλυνσης. Στα περισσότερα μελετημένα ψυχανθή, η μόλυνση λαμβάνει χώρα μέσω ενός μολυσματικού νηματίου, μία δομή φυτικής προέλευσης που προέρχεται από την διάσπαση της πλασματικής μεμβράνης συνοδευόμενη από υλικό του κυτταρικού τοιχώματος. Το μολυσματικό νημάτιο μεταφέρει τα βακτήρια μέσω του ριζικών τριχιδίων στα κύτταρα του πρωτογενούς μεριστώματος (Stougaard, 2000). Τα βακτηριοειδή συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται στο μολυσματικό νημάτιο και το πρωτογενές φυμάτιο διευρύνεται για να συμπεριλάβει γειτονικά κύτταρα και κύτταρα της ενδοδερμίδας. Τα βακτήρια, έπειτα, απελευθερώνονται, ενδοκυτταρώνονται και μετατρέπονται σε βακτηριοειδή και ξεκινούν την διαδικασία μετατροπής του αζώτου σε αμμωνία (Kamboj, Kumar, Kumari, Kundu, & Pathak, 2008). Επίσης, τα βακτηριοειδή περιβάλλονται από την περιβακτηριοειδή μεμβράνη του συμβιοσώματος που εξασφαλίζει τον διαχωρισμό

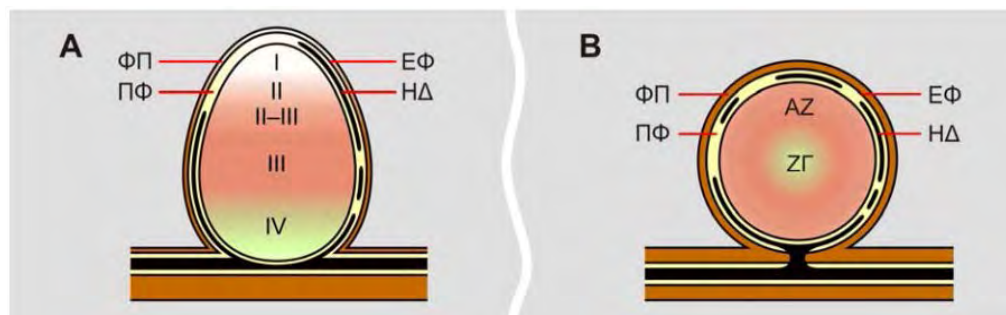
των βακτηριοειδών από το κυτταρόπλασμα του ξενιστή ενώ παράλληλα ελέγχει την κυκλοφορία των θρεπτικών μεταξύ τους (Clarke, Loughlin, Day, & Smith, 2014). Μετά το πέρας της αζωτοδέσμευσης, που είναι μια προσωρινή διαδικασία, τα βακτήρια σταματούν να πολλαπλασιάζονται και το φυμάτιο σταματά να αναπτύσσεται οδηγώντας στην γήρανση και τελικά στον θάνατο του φυματίου (Purro et al., 2005).



Εικόνα 7: Η φυματογένεση περιλαμβάνει τόσο την βακτηριακή μόλυνση όσο και την οργανογένεση του φυματίου. Τα ριζικά τριχίδια αλληλεπιδρούν με τα ριζόβια βακτήρια με αποτέλεσμα την κύρτωση των ριζικών τριχιδίων και την εγκόλπωση των ριζοβίων. Παράλληλα λαμβάνουν χώρα οι κυτταρικές διαιρέσεις και ο σχηματισμός του μολυσματικού νηματίου που μεταφέρει τα ριζόβια στον εσωτερικό φλοιό. (Προσαρμοσμένο από Oldroyd et al., 2011).

Το φυτό ξενιστής καθορίζει τον τύπο των φυματίων καθώς και το σχήμα και το μέγεθος τους. Με βάση την παρουσία ή απουσία μόνιμου μεριστώματος τα φυμάτια διακρίνονται σε καθορισμένα και μη-καθορισμένα. Στα καθορισμένα φυμάτια (Εικόνα 8B), το πρωτογενές μερίστωμα (primordium) προέρχεται από το εξωτερικό και το ενδιάμεσο τμήμα του φλοιού. Η ανάπτυξη του φυματίου σταματάει νωρίς και δεν σχηματίζεται μόνιμο μερίστωμα. Τα καθορισμένα φυμάτια δεν επιμηκύνονται αλλά μεγενθύνονται και ώστε τελικά να γίνουν σφαιρικά (Kamboj et al., 2008). Στα μη καθορισμένα φυμάτια (Εικόνα 8A), το πρωτογενές μερίστωμα προέρχεται από το εσωτερικό τμήμα του φλοιώδους παρεγχύματος της ρίζας. Οι κυτταρικές διαιρέσεις συνεχίζονται στην ακραία περιοχή του πρωτογενούς μεριστώματος προσθέτοντας νέα κύτταρα σε διαφορετικούς ιστούς του φυματίου. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται και μερικά από αυτά θα μολυνθούν από τα ριζόβια. Τα μη καθορισμένα φυμάτια είναι κυλινδρικά και διαχωρίζονται σε τέσσερις ζώνες ανάλογα με την φάση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα (ζώνη μόλυνσης, ενδιάμεση

ζώνη μεταξύ της ζώνης μόλυνσης και της αζωτοδεσμευτικής ζώνης, αζωτοδεσμευτική ζώνη, ζώνη γήρανσης)



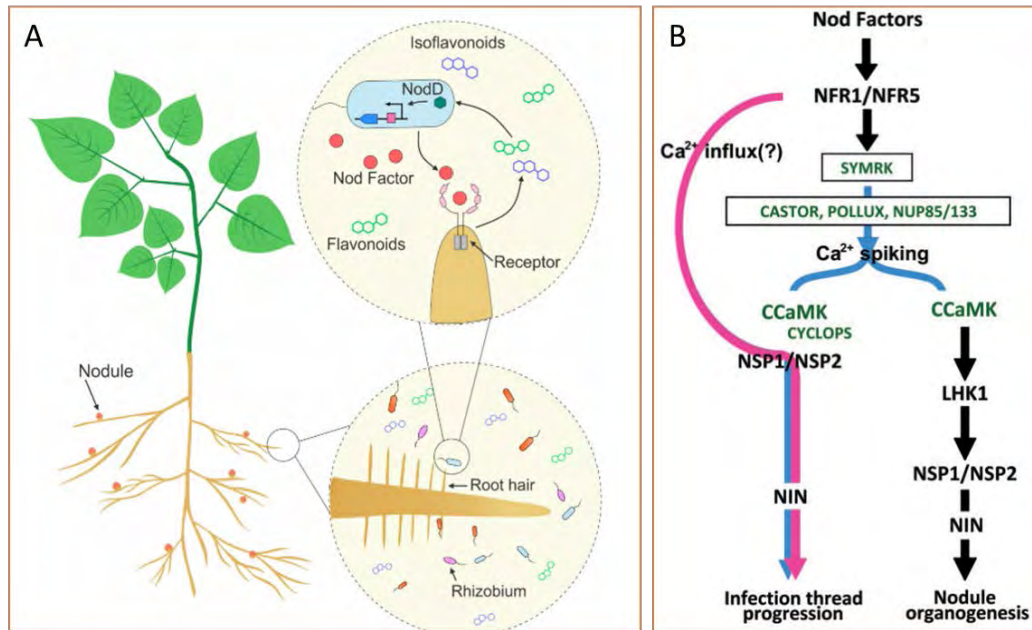
Εικόνα 8: Μορφολογία μη καθορισμένων (Α) και καθορισμένων φυματίων (Β). Οι ιστοί από τους οποίους αποτελούνται και οι δύο τύποι φυματίων είναι οι εξής: φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ), ενδοδερμίδα του φυματίου (ΕΦ), ημιαγγειώδης δεσμίδα του φυματίου (ΗΔ), παρέγχυμα του φυματίου (ΠΦ). Στα μη καθορισμένα φυμάτια οι διαδοχικές ζώνες του κεντρικού ιστού είναι: μεριστωματική ζώνη (I), ζώνη μόλυνσης (II), ενδιάμεση ζώνη μεταξύ της ζώνης μόλυνσης και της αζωτοδεσμευτικής ζώνης (II-III), αζωτοδεσμευτική ζώνη (III), ζώνη γήρανσης (IV), ενώ στα καθορισμένα φυμάτια είναι: αζωτοδεσμευτική ζώνη (AZ) και ζώνη γήρανσης (ZG) (Προσαρμοσμένο από Καλλονιάτη, 2016)

1.7 Επικοινωνία κατά την συμβίωση-μοριακά μονοπάτια

Η συμβιωτική αλληλεπίδραση ξεκινά μετά από μία ανταλλαγή σημάτων: όταν το άζωτο που υπάρχει στο έδαφος είναι λιγοστό, τα ψυχανθή εκκρίνουν μια σειρά φαινολικών ενώσεων στη ριζόσφαιρα, κυρίως φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή (Peters, N. K., Verma, D. P. S.), (Εικόνα 9Α). Τα μόρια αυτά ανιχνεύονται από τα βακτήρια, ενεργοποιώντας τον μεταγραφικό ρυθμιστή NodD (Nodulation protein D), ο οποίος με την σειρά του πυροδοτεί την μεταγραφή γονιδίων που απαιτούνται για την σύνθεση του παράγοντα Nod (D' Haeze & Holsters, 2002). Οι παράγοντες Nod είναι λιποχιτοολιγοσακχαρίτες που εκκρίνονται από τα ριζόβια και προσδέονται σε υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της ρίζας. Η αναγνώριση των παραγόντων Nod είναι απαραίτητη και συνήθως επαρκής για να προκαλέσει μοριακές και φυσιολογικές αποκρίσεις στο φυτό (πχ ενεργοποίηση μεταγραφής πρώιμων γονιδίων φυματιογένεσης, κύρτωμα της ρίζας και σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου), (Daniel J. Gage, 2004).

Το μονοπάτι Nod ξεκινάει με την αναγνώριση των παραγόντων Nod από τους υποδοχείς NFR (Nod factor receptors) οι οποίοι περιέχουν μία κυτταροπλασματική κινάση, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία εξωκυτταρική περιοχή με δύο ή τρεις

περιοχές LysM (Clúa, Roda, Zanetti, & Blanco, 2018). Στο *L. japonicus*, ο NFR1 και ο NFR5 σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές που ευθύνεται για την ειδική αναγνώριση παραγόντων φυματιογένεσης εκκρινόμενους από το *Mesorhizobium loti*. (Kouchi et al., 2010). Στο Lotus, αυτοί οι παράγοντες αναγνωρίζονται από τις περιοχές LysM των κινασών που βρίσκονται στην μεμβράνη των επιδερμικών κυττάρων και διακρίνουν τους διαφορετικούς σκελετούς των παραγόντων Nod που έχουν συντεθεί από διαφορετικά βακτήρια (Madsen et al., 2011). Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι ένα συγκεκριμένο ψυχανθές μπορεί να μολυνθεί από περιορισμένο αριθμό ριζοβιακών στελεχών (Desbrosses & Stougaard, 2011). Μία κινάση RLK με εξωκυτταρική δομή LRR (leucine-rich repeats) είναι γνωστή ως SYMRK (symbiosis receptor-like kinase) και είναι επίσης απαραίτητη για τον σχηματισμό των φυματίων (Stracke et al., 2002) παρόλα αυτά το πρόσδεμά της δεν είναι ακόμα γνωστό. Η διάσπαση της εξωκυτταρικής περιοχής του SYMRK προάγει την σύνδεσή του με τον υποδοχέα NFR5 (Nod factor receptor 5), (Antolín-Llovera, Ried, & Parniske, 2014). Η αναγνώριση των NF από τους NFR1 και NFR5 υποδοχείς ενεργοποιεί τη μεταγωγή σήματος που οδηγεί τόσο στον σχηματισμό του μολυσματικού νηματίου όσο και στην οργανογένεση του φυματίου (Madsen et al., 2011), (Εικόνα 9B). Η επακόλουθη επαγωγή του μονοπατιού βασίζεται στην σηματοδότηση μέσω ιόντων ασβεστίου στα κύτταρα της ρίζας. Στο *L. japonicus*, πέντε από τα επτά γονίδια που εμπλέκονται στο 'common symbiosis pathway' (CSP), SYMRK, CASTOR, POLLUX, NUP85 and NUP133 είναι απαραίτητα για την επαγωγή του ασβεστίου (Stracke et al. 2002, Imaizumi-Anraku et al. 2005, Kanamori et al. 2007, Saito et al. 2007). Η αυξημένη ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου (Ca^{2+} spiking) οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός κεντρικού ρυθμιστή, της κινάσης εξαρτώμενης από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CCaMK) και της πρωτεΐνης CYCLOPS που φωσφορυλιώνεται από την CCaMK. Στην συνέχεια, ενεργοποιούνται διάφορα γονίδια όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες GRAS, NSP1 και NSP2 (Heckmann et al., 2006), ο μεταγραφικός παράγοντας NIN (Desbrosses & Stougaard, 2011), και ένα μέλος της οικογένειας ERF (Asamizu et al. 2008; Middleton et al. 2007).



Εικόνα 9: Α) Η ανταλλαγή σημάτων μεταξύ ψυχανθούς και ριζοβίου. Οι ρίζες των ψυχανθών εκκρίνουν φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή τα οποία ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NodD. Ο NodD ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων nod που είναι απαραίτητα για την σύνθεση των παραγόντων Nod. Οι παράγοντες Nod αναγνωρίζονται από υποδοχείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων της ρίζας και ενεργοποιούν το μονοπάτι σηματοδότησης που χρειάζεται για την μόλυνση και την ανάπτυξη του φυματίου (Clúa et al., 2018). Β) Το μοντέλο της πρώιμης σηματοδότησης κατά την συμβίωση ψυχανθών-ριζοβίων. Η αναγνώριση των παραγόντων Nod από τους υποδοχείς NFR1/NFR5 παράγει ένα σήμα που οδηγεί στην ενεργοποίηση δύο μονοπατιών σηματοδότησης. Το ένα μονοπάτι (μπλε γραμμή) ακολουθεί το κοινό μονοπάτι της συμβίωσης (common symbiosis pathway) ενώ το άλλο (ροζ γραμμή) είναι απαραίτητο για την επιτυχή μόλυνση των ριζοβίων. Τα γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι CSP φαίνονται με πράσινα γράμματα. (Kouchi et al., 2010)

1.8 Autoregulation of nodulation (AON)

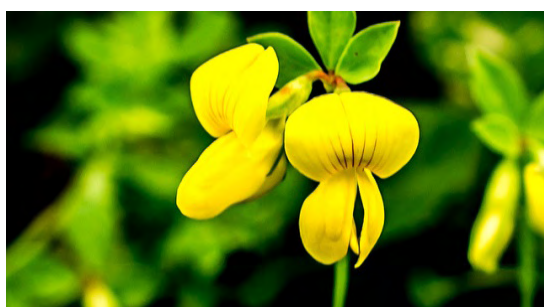
Παρόλου που οι συμβιωτικές σχέσεις είναι ωφέλιμες για τα ψυχανθή, η υπέρμετρη φυματιογένεση και αζωτοδέσμευση παρεμβαίνει στην ανάπτυξη του φυτού και έχει υψηλό ενεργειακό κόστος για το φυτό ξενιστή (Kouchi et al., 2010). Ο έλεγχος της φυματιογένεσης μεσολαβείται από ένα μονοπάτι αρνητικής ανατροφοδότησης γνωστό ως AON (Autoregulation Of Nodulation) (Kosslak & Bohlool, 1984; Reid, Ferguson, Hayashi, Lin, & Gresshoff, 2011).

Μετά την μόλυνση παράγονται στις ρίζες δύο πεπτίδια με παρόμοια δομή, τα οποία κωδικοποιούνται από τα γονίδια LjCLE-RS1 και LjCLE-RS2 (Okamoto et al., 2013) στην συνέχεια τροποποιούνται από το ένζυμο NOD3/RDN1 (Root Determined Nodulation1) (Ferguson et al., 2018). Η ρύθμιση των γονιδίων αυτών επιτελείται από τον μεταγραφικό παράγοντα NIN (Nodule INception) (Soyano, Hirakawa, Sato, Hayashi,

& Kawaguchi, 2014). Τα πεπτιδία CLE μεταφέρονται στον βλαστό όπου προσδένονται σε ένα σύμπλεγμα υποδοχέων LRR με δράση κινάσης Ser/Thr που περιλαμβάνει το γονίδιο HAR1 (Hypernodulation Aberrant Root Formation 1) ομόλογο του CLV1 του *Arabidopsis thaliana* (Okamoto et al., 2013).

Η λήψη του σήματος από την ρίζα οδηγεί στην παραγωγή ενός δεύτερου σήματος από τον βλαστό προς την ρίζα που καταστέλλει την περαιτέρω φυματιογένεση. Ο αναστολέας αυτός είναι ένα μορίο μικρού μοριακού βάρους που είναι η κυτοκινίνη (Sasaki et al., 2014). Άλλα στοιχεία του μηχανισμού AON περιλαμβάνουν το γονίδιο CLV2 (Krusell et al., 2011), το CORYNE (CRN) (Crook, Schnabel, & Frugoli, 2016), και το KLAVIER (KLV) (Miyazawa et al., 2010), που κωδικοποιούν υποδοχείς LRR οι οποίοι σχετίζονται με την πρόσδεση των πεπτιδίων CLE. Ακόμη, το γονίδιο TOO MUCH LOVE (TML), μία πρωτεΐνη F-Box, φαίνεται να παίζει ρόλο καθοδικά στο μονοπάτι σηματοδότησης από τον βλαστό στην ρίζα (Takahara et al., 2013).

1.9 Το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*



Εικόνα 10: Το φυτό-μοντέλο *Lotus japonicus*

Το *L. japonicus* (Εικόνα 11) είναι ένα διπλοειδές αυτογαμικό είδος που ανήκει στην τάξη των ψυχανθών. Είναι ένα φυτό με σχετικά μικρό γονιδίωμα (περίπου 450 MB), χρόνο αναπαραγωγής περίπου 3 μηνών και μεγάλο αριθμό σπόρων (Εικόνα 10). Ανήκει στην οικογένεια των Fabaceae και προτάθηκε

ως οργανισμός μοντέλο λόγω ορισμένων χαρακτηριστικών που το καθιστούν πολύ επιδεκτικό στην έρευνα. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν μικρά φυτά, μεγάλα και άφθονα άνθη, εύκολη επικονίαση, μεγάλη παραγωγή σπόρων, σύντομο χρονικό διάστημα αναπαραγωγής, εύκολη καλλιέργεια, δεκτικότητα στον μετασχηματισμό και αναγέννηση των φυτών από ιστοκαλλιέργεια (Handberg & Stougaard, 1992)

Όπως αναφέρθηκε πριν, τα ψυχανθή θεωρούνται «πρωτοπόρα» φυτά καθώς είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε εδάφη που είναι φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις με αζωτοδεσμευτικά

βακτήρια και με μύκητες του εδάφους. Αυτά τα φυσικά χαρακτηριστικά ευνόησαν την υιοθεσία των ψυχανθών στην γεωργία και αυτή τη στιγμή αποτελούν σημαντικό μέρος των αειφόρων γεωργικών συστημάτων. Οι συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσει το *Lotus japonicus* με ριζόβια βακτήρια αποτέλεσε σημαντικό πεδίο έρευνας και πιο συγκεκριμένα μια αρκετά μελετημένη συμβιωτική σχέση είναι αυτή του *Lotus japonicus* με το *Mesorhizobium loti*, γνωστό. Είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που βρίσκεται στα φυμάτια των ριζών σε πολλά είδη φυτών (Jarvis, Pankhurst, & Patel, 1982). Το *Lotus japonicus* συμβιώνει με το "fast-growing" *Mesorhizobium loti* και με το "slow-growing" *Bradyrhizobium sp.* Τα στελέχη που αναπτύσσονται γρήγορα (*Mesorhizobium loti*) επάγουν τον σχηματισμό λειτουργικών φυματίων ως προς την ικανότητα δέσμευσης αζωτού. Αντίθετα, το *Bradyrhizobium sp.* επάγει μόνο μη λειτουργικά φυμάτια (Márquez, 2005).

1.10 Ιστορική αναδρομή: Η ανακάλυψη του συστήματος των δύο υβριδίων

Το 1989, ο Fields και ο Song εφηύραν ένα επαναστατικό σύστημα για την ταυτοποίηση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών περιγράφοντας ένα γενετικό σύστημα το οποίο επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στη ζύμη (Fields & Song, 1989). Μέχρι τότε, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών ταυτοποιούνταν κυρίως μέσω βιοχημικών μεθόδων στις οποίες θα αναφερθούμε παρακάτω.

Αφορμή για την ανάπτυξη αυτού του καινούριου εργαλείου αποτέλεσε η μοριακή ανάλυση των ευκαρυωτικών μεταγραφικών παραγόντων και συγκεκριμένα του Gal4 στην ζύμη (Kakidani & Ptashne, 1988). Ο μεταγραφικός παράγοντας Gal4 προσδένεται στην ανοδική περιοχή ενεργοποίησης, UAS, των γονιδίων της οικογένειας Gal και έτσι ενεργοποιεί την μεταγραφή τους παρουσία γαλακτόζης/απουσία γλυκόζης. Όταν διαχωρίζεται σε δύο μέρη το N-τελικό τμήμα έχει την ικανότητα να προσδένει το DNA χωρίς όμως να ενεργοποιεί την μεταγραφή παρουσία γαλακτόζης, αφού αυτή η λειτουργία τελείται από το C-τελικό τμήμα. Βέβαια, και τα δύο τμήματα μπορούν να αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά και να συγκροτούν τον πλήρως λειτουργικό Gal4 (Keegan, Gill, & Ptashne, 1986). Έτσι δύο διαφορετικές περιοχές (N-τελικό DNA binding domain και C-τελικό activation domain)

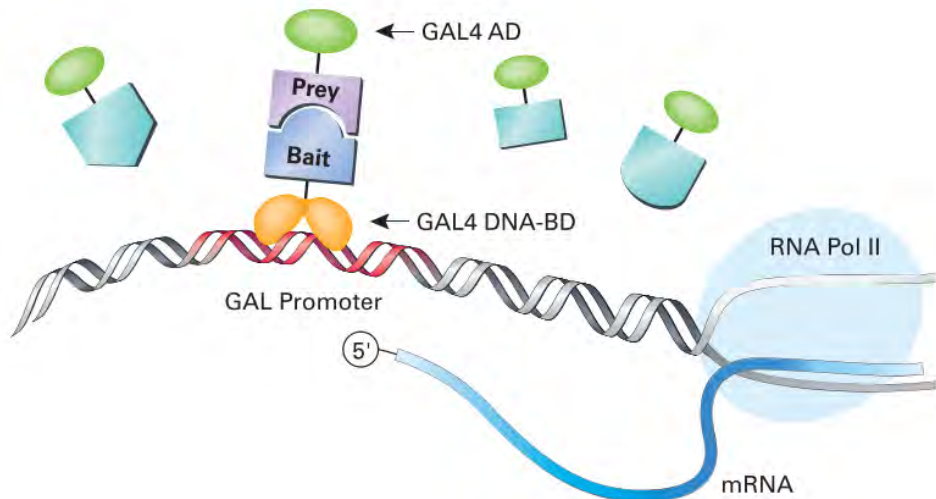
του Gal4 ταυτοποιήθηκαν και αποδείχθηκε ότι μπορούν να διατηρούν την λειτουργία τους ανεξάρτητα η μία από την άλλη (Brückner, Polge, Lentze, Auerbach, & Schlattner, 2009).

Εκμεταλλούμενοι τις ιδιότητες του Gal4 ο Fields και ο Song ξεκίνησαν τον έλεγχο αλληλεπίδρασης με την δημιουργία μιας κατασκευής όπου η πρωτεΐνη SNF1 συντήχθηκε στο N-τελικό άκρο του GAL4 που αποτελεί το τμήμα πρόσδεσης του DNA και η δεύτερη κατασκευή όπου η πρωτεΐνη SNF4 συντήχθηκε στο C-τελικό άκρο του GAL4. Η έκφραση και των δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών στην ζύμη και η αλληλεπίδραση των δύο κατασκευών όντως οδήγησε στην συγκρότηση του λειτουργικού Gal4. Στην συνέχεια, ο Gal4 στρατολογεί την RNA πολυμεράση II, οδηγώντας στη μεταγραφή του χιμαιρικού γονιδίου GAL1-lacZ. Αυτό το γονίδιο αναφοράς κωδικοποιεί το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση που σημαίνει το κύττατο ζύμης παρουσία ενός χρωματομετρικού υποστρώματος (Fields & Song, 1989).

Σήμερα, το σύστημα Y2H έχει αυτοματοποιηθεί για μελέτες μεγάλης κλίμακας (σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος) και έχει γίνει σε ιούς όπως ο βακτηριοφάγος T7 (Bartel et al., 1996) στον *Saccharomyces cerevisiae* (Ito et al., 2001; Uetz et al., 2000), στην *Drosophila melanogaster* (Formstecher et al., 2005), στον *Caenorhabditis elegans* (Obrdlik et al., 2004) και στον άνθρωπο (Stelzl et al., 2005).

1.11 Σήμερα: Πώς δουλεύει το σύστημα Y2H;

Το σύστημα Y2H επιτρέπει την ανίχνευση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών σε ζωντανά κύτταρα ζύμης (Fields & Song, 1989). Όπως αναφέρθηκε πριν, η βασική ιδέα (Εικόνα 11) όλων των συστημάτων δύο υβριδίων είναι ότι μία πρωτεΐνη διαχωρίζεται σε δύο μέρη, τα οποία δεν είναι λειτουργικά από μόνα τους, αλλά μόνο όταν βρεθούν πάλι μαζί συγκροτούν μία λειτουργική πρωτεΐνη. Ένας μεταγραφικός παράγοντας διασπάται σε δύο τμήματα: α) το τμήμα πρόσδεσης του DNA (DNA binding domain) και β) το τμήμα μεταγραφικής ενεργοποίησης (activation domain) και εκφράζονται ως χιμαιρικές πρωτεΐνες με δύο άλλες πρωτεΐνες που έχουν συγγένεια μεταξύ τους. Έτσι, τα δύο μέρη της διαχωρισμένης πρωτεΐνης έρχονται κοντά και η λειτουργία της πρωτεΐνης αποκαθίσταται. Η ανασυγκρότηση του μεταγραφικού παράγοντα ανιχνεύεται με την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς (Koegl & Uetz, 2007).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος Y2H (“Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual,” 2010). Δύο πρωτεΐνες εκφράζονται ξεχωριστά, η μία (πρωτεΐνη θήραμα) συντηγμένη με το DNA binding domain του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, και η άλλη (πρωτεΐνη δόλωμα) συντηγμένη με το activation domain του ίδιου μεταγραφικού παράγοντα. Στο στέλεχος Y2HGold, η ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς (AUR1-C, ADE2, HIS3, και MEL1) συμβαίνει μόνο σε κύτταρα που περιέχουν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν και καθιστούν τον μεταγραφικό παράγοντα ενεργό.

Το δικό μας σύστημα βασίζεται στον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 (Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για α) την ταυτοποίηση νέων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, β) επιβεβαίωση θεωρητικών αλληλεπιδράσεων και γ) τον καθορισμό των τμημάτων που αλληλεπιδρούν. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (bait-θήραμα) εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη με το τμήμα πρόσδεσης του DNA του Gal4 ενώ οι πρωτεΐνες προς εξέταση (preys-δολώματα) εκφράζονται ως χιμαιρικές με το τμήμα ενεργοποίησης του Gal4 (Fields & Song, 1989; Chien et al., 1991). Το σύστημα αυτό διαθέτει 4 γονίδια αναφοράς (Πίνακας 1), τα οποία μεταγράφονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο κάτω από τον έλεγχο 3 υποκινητών στα στελέχη Y2HGold και Y187 της Clontech, όπου προσδένεται ο Gal4. Τα γονίδια αναφοράς φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

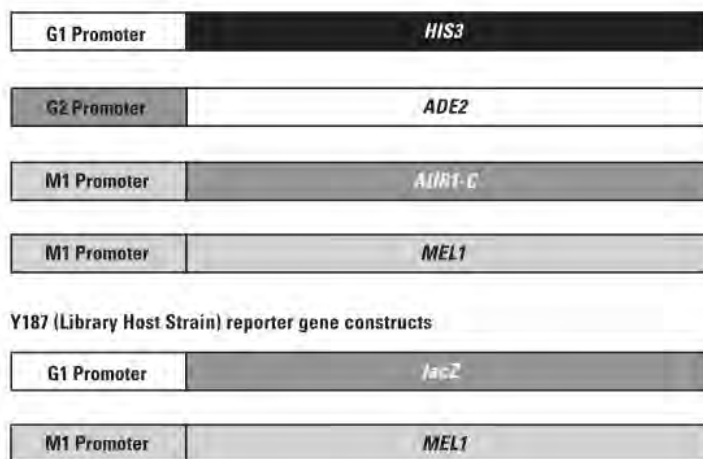
| Γονίδιο αναφοράς | Λειτουργία |
|-------------------------|---|
| Στέλεχος Y2HGold | |
| AUR1-C | Μετάλλαξη του AUR1 που κωδικοποιεί για το ένζυμο: inositol phosphoryl ceramide synthase, προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Aureobasidin |
| HIS3 | Το στέλεχος Y2HGold δεν είναι σε θέση να συνθέσει ιστιδίνη. Όταν |

| | |
|----------------------|--|
| | υπάρχει αλληλεπίδραση η έκφραση του His3 επιτρέπει στο κύτταρο να βιοσυνθέσει ιστιδίνη και να αναπτύσσεται στο θρεπτικό μέσο. |
| ADE2 | Το στέλεχος Y2HGold δεν μπορεί να αναπτυχθεί απουσία αδενίνης. Κατά την αλληλεπίδραση, ενεργοποιείται η έκφραση Ade2, επιτρέποντας σε αυτά τα κύτταρα την ανάπτυξη. |
| MEL1 | Το MEL-1 κωδικοποιεί την α-γαλακτοσιδάση, ένα ένζυμο που απαντάται φυσικά σε πολλά στελέχη ζύμης. Η αλληλεπίδραση προκαλεί έκφραση της MEL1 στις αποικίες των ζυμομυκήτων που γίνονται μπλε παρουσία του υποστρώματος X-a-Gal. |
| Στέλεχος Y187 | |
| MEL1 | -//- |
| lacZ | Κωδικοποιεί για την β-γαλακτοσιδάση που υδρολύει το X-α-gal όταν οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με αποτέλεσμα τον χρωματισμό των αποικιών που εκφράζουν το lacZ μπλε, παρουσία X-α-gal. |

Πίνακας 1: Τα γονίδια αναφοράς καθώς και οι λειτουργίες τους στο σύστημα Y2H (“Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual,” 2010)

Στις δοκιμασίες Y2H χρησιμοποιούνται παράλληλα περισσότερα από ένα γονίδια αναφοράς, ώστε να αυξηθεί αυστηρότητα της διαλογής. Στην πραγματικότητα, ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα του Y2H είναι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα εξαιτίας των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων. Η επιλογή περισσότερων γονιδίων αναφοράς απαιτεί μία πιο σταθερή ενεργοποίηση της μεταγραφής και αυξάνει την αυστηρότητα της μεθόδου, αλλά ταυτόχρονα μειώνει την πιθανότητα ανίχνευσης λιγότερο ισχυρών και παροδικών αλληλεπιδράσεων. (Brückner et al., 2009)

Τρεις υποκινητές (G1, G2 και M1), (Εικόνα 12) ελέγχουν τα γονίδια αναφοράς (AUR1-C, HIS3, ADE2, MEL1 και lacZ) στο Y2HGold και το Y187. Οι υποκινητές δεν σχετίζονται μεταξύ τους εκτός από την περιοχή UAS όπου προσδέεται ειδικά το τμήμα πρόσδεσης DNA του Gal4. Οι αλληλεπιδρώντες πρωτεΐνες με μη-σχετικές αλληλουχίες εκατέρωθεν ή μέσα στη UAS περιοχή (δηλαδή τα ψευδή θετικά σήματα), απορρίπτονται με αυτόν τον τρόπο αυτομάτως. Οι υποκινητές φαίνονται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Οι υποκινητές των γονιδίων αναφοράς στα στελέχη Y2HGold και Y187 (“Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual,” 2010). Στο στέλεχος Y2HGold, τα γονίδια αναφοράς HIS3, ADE2, και MEL1/AUR1-C βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο τριών ετερόλογων υποκινητών αποκρινόμενων στον Gal4, G1, G2, και M1, αντίστοιχα. (Giniger et al., 1985; Giniger & Ptashne, 1988).

1.12 Προσεγγίσεις του συστήματος Y2H

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις διαλογής (screening) πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω του συστήματος Y2H. Η κατηγοριοποίηση βασίζεται στην επιλογή των preys και διακρίνονται οι εξής προσεγγίσεις: α) η προσέγγιση matrix ή pair-wise tests (δοκιμή σύζευξης) και β) η διαλογή μέσα από μία cDNA βιβλιοθήκη. Κατά την προσέγγιση pair-wise χρησιμοποιούνται συλλογές μεμονωμένων κλωνοποιημένων cDNA που περιλαμβάνουν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης πλήρους μήκους (ORF) του mRNA μιας γνωστής πρωτεΐνης. (Brasch, Hartley, & Vidal, 2004). Τυπικά, κάθε κομμάτι της συλλογής cDNA ελέγχεται κατά ζεύγη για σήματα αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Η ταυτότητα της πρωτεΐνης είναι γνωστή και έτσι δεν είναι απαραίτητο να απομονωθεί και να αλληλουχηθεί το ένθεμα.
- Αποφυγή σημάτων αλληλεπίδρασης που οφείλονται σε συγχώνευση είτε μη κωδικοποιητικού DNA ή ενθέματος με λάθος πλαίσιο ανάγνωσης.
- Η συλλογή κανονικοποιείται, σε αντίθεση με τις βιβλιοθήκες cDNA, στις οποίες τα cDNAs των mRNA που εκφράζονται ισχυρά είναι σε περισσεια ενώ τα cDNA από mRNA με μικρότερη έκφραση είναι σπάνια με αποτέλεσμα την δυσκολία εύρεσης αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή έκφραση.

- Οι δοκιμασίες pair-wise είναι πιο ευαίσθητες σε σχέση με την διαλογή από μία βιβλιοθήκη, λογικά επειδή τα ασθενή σήματα μπορούν να αναγνωριστούν πιο εύκολα στο υπόβαθρο αυτό. (Koegl & Uetz, 2007).

Στην περίπτωση της βιβλιοθήκης cDNA χρησιμοποιούνται τυχαία τμήματα cDNA που προέκυψαν από το mRNA διαφόρων ιστών και κλωνοποιήθηκαν σε ένα πλασμίδιο κατάλληλο για διαλογή μέσω του συστήματος Y2H (Chevray & Nathans, 1992). Οι βιβλιοθήκες μπορεί να περιέχουν τόσο κομμάτια cDNA όσο και ολόκληρα αναγνωστικά πλαίσια, καλύπτοντας όλο το μεταγράψωμα και μειώνοντας τον αριθμό των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Brückner et al., 2009).

Το screening βιβλιοθηκών cDNA χρησιμοποιείται κατά κόρον στα ακαδημαϊκά εργαστήρια για την απομόνωση πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Ένα μειονέκτημα των βιβλιοθηκών που δημιουργείται είναι ο μη ελεγχόμενος τρόπος με τον οποίο οι κωδικές αλληλουχίες των ενθεμάτων συνδέονται με την κωδική αλληλουχία του διαχωρισμένου μεταγραφικού παράγοντα. Σε πολλές περιπτώσεις, η χιμαιρική πρωτεΐνη εκφράζεται σε λάθος αναγνωστικό πλαίσιο ή περιέχει τμήματα από τις αμετάφραστες περιοχές του mRNA. Οι προκύπτουσες μη φυσικές πρωτεΐνες παρέχουν μια πλούσια πηγή για μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, αυξάνοντας τον αριθμό των ψευδώς θετικών αλληλεπιδράσεων (Koegl & Uetz, 2007). Για τον λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες αλληλεπίδρασης μέσω colony PCR και αλληλούχισης, καθιστώντας την διαλογή πιο ακριβή και πιο χρονοβόρα. Ακόμη, ένας ακόμη λόγος που εξηγεί τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα είναι το γεγονός ότι στην ζύμη δεν υπάρχει ο μηχανισμός μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Σε αυτή την περίπτωση, πρέπει το τροποποιητικό ένζυμο να συνεκφραστεί στην ζύμη μαζί με το bait και το prey (Brückner et al., 2009).

1.13 Εναλλακτικές μέθοδοι ανίχνευσης αλληλεπιδράσεων

Γενικά συνίσταται η χρήση περισσότερων από μία μεθόδων για την επιβεβαίωση μιας αλληλεπίδρασης, και κατά προτίμηση ένας συνδυασμός βιοχημικών μεθόδων (ανοσοκατακρίμνηση, surface plasmon resonance) με μεθόδους in vivo/in situ

(συνεντοπισμός, ανοσοιστοχημεία, υβριδοποίηση in situ). Οι προηγούμενες μέθοδοι επιτρέπουν την μελέτη φυσικών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, αλλά οι δοκιμασίες ανοσοκατακρίμνυσης απαιτούν σταθερότητα του συμπλόκου των πρωτεϊνών και η SPR χρειάζεται απομονωμένους συνεργάτες αλληλεπίδρασης. Επίσης, με αυτές τις μεθόδους, είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν παροδικές αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις με διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι δοκιμασίες in vivo/in situ επιτρέπουν την ανίχνευση πιθανής συνέκφρασης ή συνεντοπισμού των πρωτεϊνών που εμπλέκονται, αλλά γενικά δεν παρέχουν τεκμηριωμένες ενδείξεις άμεσης αλληλεπίδρασης. Η μέθοδος FRET έχει αναπτυχθεί για να μελετήσει την χωροχρονική εμφάνιση της αλληλεπίδρασης και τη φυσιολογική της σημασία in vivo (Brückner et al., 2009).

Επίσης, συνδιασμένη με κλασικές βιοχημικές μεθόδους όπως ο καθαρισμός συγγένειας, η φασματοσκοπία μάζας έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο για την έρευνα αλληλεπιδράσεων μεγάλης κλίμακας. Μόνο ένας συνδυασμός διαφορετικών προσεγγίσεων που απαραίτητως περιλαμβάνει εργαλεία βιοπληροφορικής, θα οδηγήσει τελικά σε ένα αρκετά πλήρες χαρακτηρισμό φυσιολογικά σχετικών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης σε ένα δεδομένο κύτταρο ή οργανισμό. (Brückner et al., 2009).

1.14 Σκοπός

Για να κατανοήσουμε την λειτουργία μιας πρωτεΐνης, είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε ποιές άλλες πρωτεΐνες μπορεί να δεσμεύσει. Σε μία προσπάθεια για την εξιχνίαση του ρόλου της LSK1 στο μονοπάτι της φυματιογένεσης, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση πιθανών αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών της κινάσης LSK1 μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων στην ζύμη (Yeast Two Hybrid). Η εύρεση πρωτεϊνών με δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την LSK1 μπορεί να ρίξει φως στην ακριβή της θέση κατά την σηματοδότηση της φυματιογένεσης αλλά και να μας υποδείξει επιπλέον υποστρώματα που μπορεί να φωσφορυλιώσει τα οποία συμμετέχουν σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μετασχηματισμός των στελεχών ζύμης

Ο μετασχηματισμός του Y2H Gold και του Y187 έγινε με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Πιο συγκεκριμένα, τα πειράματα ελέγχου θετικού και αρνητικού control και τα πειράματα δοκιμής σύζευξης (pairwise mating) έγιναν με βάση το πρωτόκολλο “Small-scale LiAc Yeast Transformation Procedure” από το Yeast Handbook, Clontech Laboratories, Inc. Protocol No. PT3024-1. Για τα πειράματα της αυτο-ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς και της τοξικότητας της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο small scale από το “Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 User Manual” της Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT1172-1.

2.2 Μετασχηματισμός του *Esherichia coli*

Για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν 80μl διαλύματος κυττάρων στα οποία προστέθηκε 1μl πλασμιδίου γνωστής συγκέντρωσης. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 60 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε θερμικό σοκ στους 42oC για 65 δευτερόλεπτα. Αμέσως μετά, τα κύτταρα επώαστηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και έπειτα προστέθηκαν 900μl LB. Τα tube επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37oC/210rpm. Μετά την επώαση έγινε φυγοκέντρηση σε μέγιστες στροφές για λίγα δευτερόλεπτα ώστε τα κύτταρα να καθιζάνουν και αφαίρεση 800μl υπερκείμενου. Στην συνέχεια, έγινε επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων στο υπολοιπόμμενο υπερκείμενο και επίστρωση της καλλιέργειας σε τρυβλίο με θρεπτικό LB. Τα τρυβλία επώαστηκαν overnight στους 37oC. Την επόμενη μέρα, μεταφέρθηκαν αποικίες (με αποστειρωμένο tip πιπέτας) σε υγρό θρεπτικό υλικό LB 5ml με αντιβιοτικό και επώαστηκαν overnight (37oC/210 rpm).

2.3 Απομόνωση πλασμιδίων με αλκαλική λύση

Η απομόνωση των πλασμιδίων από τις υγρές καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων *E.coli* έγινε με αλκαλική λύση, ως εξής: ξεκινάει με την

φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10,000g 1,5ml υγρής καλλιέργειας σε tube των 1,5ml. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση άλλες δύο φορές. Ακολούθησε προσθήκη 300μl buffer P1 και 3μl RNάσης και έγινε μίξη με vortex. Προστέθηκαν 300μl buffer P2 και έγινε ήπια ανάδευση για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 300μl buffer P3 και πάλι αναδεύτηκαν ήπια. Το tube τοποθετήθηκε για 10 λεπτά στον πάγο και μετά φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 10,000g. Έπειτα, προστέθηκαν 600μl ισοπροπανόλης και έγινε ήπια ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις μέγιστες στροφές και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν 500μl 70% αιθανόλης και αναδεύτηκαν ήπια. Φυγοκεντρήθηκε και πάλι το μίγμα για 10 λεπτά στις 10,000g και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, έγινε στέγνωμα για 10 λεπτά στους 37°C και μετά επαναδιάλυση του pellet σε 30μl H₂O. Το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύτηκε στους -20°C.

Buffers:

- Το buffer P1 περιέχει 50mM Tris, 10mM EDTA και pH 8 HCl
- Το buffer P2 περιέχει 200mM NaOH και 1% SDS
- Το buffer P3 περιέχει 3M Potassium acetate και pH 5,5 glacial acetic acid

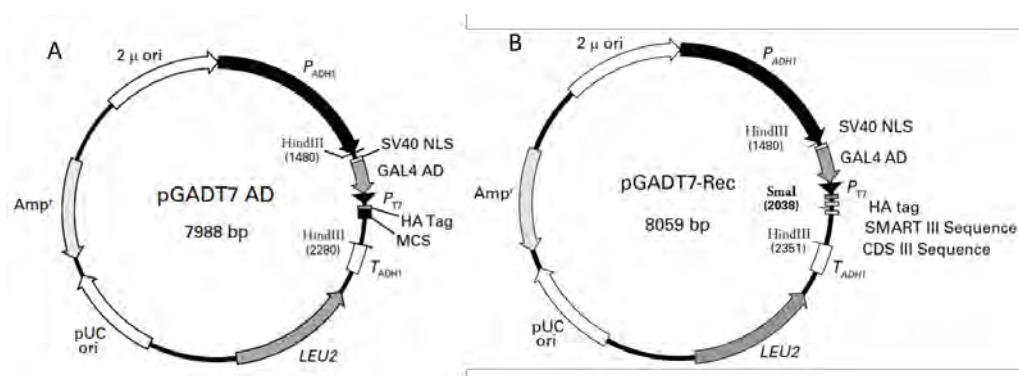
2.4 Stock γλυκερόλης για αποθήκευση κυττάρων ζύμης

Όλα τα stock γλυκερόλης των κυττάρων της ζύμης έγιναν με την εξής μέθοδο: σε αποστειρωμένο tube 1,5 ml προστέθηκαν 300μl γλυκερόλης και 700μl υγρής καλλιέργειας που είχε αναπτυχθεί overnight στους 30°C. Στη συνέχεια, μετά από ανάδευση, το tube ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2.5 Πλασμιδιακοί χάρτες

Ο φορέας pGADT7-AD (Clontech, Cat #630491) είναι σχεδιασμένος για την έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε σύντηξη με το τμήμα ενεργοποίησης του

μεταγραφικού παράγοντα GAL4 στη ζύμη (Εικόνα 13Α). Η μεταγραφή της χιμαιρικής πρωτεΐνης ελέγχεται από τον ιδιοσυστατικά ενεργό υποκινητή ADH1. Το τμήμα GAL4-AD περιέχει ένα HA Tag (hemagglutinin epitope tag), που βρίσκεται ανάμεσα στο GAL4 AD και στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και επιτρέπει στην πρωτεΐνη να είναι εύκολα ανιχνεύσιμη με αντισώματα που HA-tag. Ο υποκινητής T7 βρίσκεται ανοδικά του HA tag και επιτρέπει την μεταγραφή και την μετάφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με την ετικέτα HA. Ο φορέας pGADT7-AD αντιγράφεται αυτόνομα στο *E. coli* και στον *S. cerevisiae* από τα σημεία pUC και 2 μ ori, αντίστοιχα. Ο φορέας επίσης περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r) για επιλογή στο *E. coli* και το γονίδιο LEU2, απαραίτητο για την σύνθεση της λευκίνης, έναν δείκτη για την επιλογή σε θρεπτικό υλικό για την ζύμη.

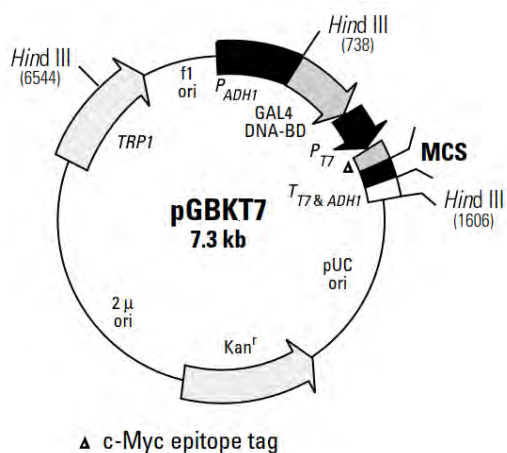


Εικόνα 13: Α) Ο πλασμιδιακός φορέας pGADT7-AD για την έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος περιέχει: τον ιδιοσυστατικά ενεργό υποκινητή ADH1 που ελέγχει την έκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης, ένα HA Tag (hemagglutinin epitope tag) στο τμήμα GAL4-AD, τον υποκινητή T7, τα σημεία έναρξης της αντιγραφής pUC και 2 μ ori στο *E. coli* και στον *S. cerevisiae* αντίστοιχα, το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη (Amp^r) για επιλογή στο *E. coli* και το γονίδιο LEU2, απαραίτητο για την σύνθεση της λευκίνης. Β) Ο πλασμιδιακός φορέας pGADT7-Rec χρησιμοποιείται για την κατασκευή της βιβλιοθήκης cDNA και περιέχει: ένα σημείο αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο SmaI, ομόλογα άκρα με το ολιγονουκλεοτίδιο SMART® III και με τον εκκινητή CDS III καθώς και τα υπόλοιπα στοιχεία που περιέχει ο φορέας pGADT7-AD.

Ο φορέας pGADT7-Rec (Clontech, Cat #630491) είναι σχεδιασμένος για την κατασκευή βιβλιοθήκης AD/cDNA μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού στη ζύμη (Εικόνα 13B). Διαθέτει ένα μοναδικό σημείο πέψης για το ένζυμο SmaI και είναι διαθέσιμος στην γραμμική μορφή του μετά από την πέψη ώστε να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την κλωνοποίηση των τμημάτων cDNA. Τα άκρα του είναι ομόλογα με το ολιγονουκλεοτίδιο SMART® III και με τον εκκινητή CDS III από το πρωτόκολλο κατασκευής της βιβλιοθήκης cDNA.

Ο φορέας pGBKT7 (Clontech, Cat # K1612-1) χρησιμοποιείται για την έκφραση πρωτεϊνών που έχουν συντηχθεί με το τμήμα πρόσδεσης του DNA του μεταγραφικού

παράγοντα GAL4 στη ζύμη (Εικόνα 14). Υποκινητής της χιμαιρικής πρωτεΐνης είναι ο ADH1 και η μεταγραφή σταματάει στα σημεία τερματισμού T7 και ADH1. Ο pGBKT7 περιέχει έναν υποκινητή T7, έναν επίτοπο c-Myc και έναν πολυσυνδέτη. Αντιγράφεται αυτόνομα τόσο στο *E. coli* όσο και στο *S. cerevisiae* από τα σημεία pUC και 2 μ ori αντίστοιχα. Ο φορέας αυτός περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη για επιλογή σε *E. coli* και το γονίδιο TRP1 απαραίτητο για την σύνθεση της τρυπτοφάνης, σαν δείκτη για επιλογή της ζύμης σε θρεπτικό υλικό. Η περιοχή του πολυσυνδέτη περιέχει μοναδικές θέσεις αναγνώρισης για ένζυμα περιορισμού ώστε η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος να μπει στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το GAL4 DNA-BD. Ο υποκινητής T7 χρησιμοποιείται για την μεταγραφή και μετάφραση in vitro της σημασμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης.



Εικόνα 14: Ο πλασμιδιακός φορέας pGBKT7 χρησιμοποιείται για την έκφραση πρωτεϊνών και περιέχει τον υποκινητή ADH1, τα σημεία τερματισμού της μεταγραφής T7 και ADH1, έναν υποκινητή T7, έναν επίτοπο c-Myc και έναν πολυσυνδέτη. Αντιγράφεται αυτόνομα τόσο στο *E. coli* όσο και στο *S. cerevisiae* από τα σημεία pUC και 2 μ ori αντίστοιχα. Επίσης, περιέχει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμικίνη για επιλογή σε *E. coli* και το γονίδιο TRP1 απαραίτητο για την σύνθεση της τρυπτοφάνης.

2.6 Συζεύξεις

Όσο αφορά τη σύζευξη στα πειράματα ελέγχου μεταξύ της p53 και του SV40 Large T-antigen (θετικό control) και της λαμινίνης με το SV40 Large T-antigen (αρνητικό control), καθώς και τα πειράματα δοκιμής σύζευξης, έγιναν με βάση το πρωτόκολλο "Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual", Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT4084-1. Για την σύζευξη του Y2H Gold-LSK1 με το Y187-βιβλιοθήκη cDNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Make Your Own "Mate & Plate™" Library System User Manual", Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT4085-1.

2.7 Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA

2.7.1 Ανάπτυξη φυτών *Lotus japonicus* και μόλυνση με το ριζόβιο *Mesorhizobium loti* R7A.

Η ανάπτυξη των φυτών του *Lotus japonicus* διαρκεί 15 ημέρες ώστε να έχει σχηματιστεί η ρίζα του φυτού και αμέσως μετά ακολουθεί η μόλυνση και η δειγματοληψία των ριζών. Την 1^η ημέρα έγινε η αποστείρωση 600 σπόρων του φυτού *L. japonicus* (Gifu). Οι σπόροι τοποθετούνται σε tube του 1,5ml και προστίθεται 1ml θειικού οξέος. Έπειτα, έγινε ήπια ανάδευση για 10 λεπτά και 4 πλύσεις με νερό ώστε να φύγει η ποσότητα του θειικού οξέος. Στην συνέχεια, προστέθηκε 1ml 20% χλωρίνης, 0,1% tween 20 και έγινε ήπια ανάδευση για 20 λεπτά μέχρι οι σπόροι να κιτρινίσουν λίγο εξωτερικά. Ακολούθησαν 6-7 πλύσεις με νερό, προστέθηκε 1 ml νερού και τα tubes αποθηκεύτηκαν για μία μέρα στους 4°C τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο. Την 2^η ημέρα, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 0,8% άγαρ και τα τρυβλία τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκαν στους 4°C. Την 3^η ημέρα τα τρυβλία μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 22°C. Την 5^η ημέρα αφαιρέθηκε το αλουμινόχαρτο και τα τρυβλία διατηρήθηκαν στον θάλαμο με θερμοκρασία 22°C και φωτοπερίοδο 16/8 ώρες φως/σκοτάδι. Τρεις μέρες μετά (την 8^η μέρα) τα φυτά μεταφέρθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία στρωμένα μέχρι την μέση με θρεπτικό Jensen.



Εικόνα 15: Μόλυνση των ριζών του *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *M.loti* R7A. Στο τρυβλίο με θρεπτικό Jensen, το οποίο έχει στρωθεί στο μισό τρυβλίο, έχει τοποθετηθεί ένα διηθητικό χαρτί και ακριβώς από πάνω τα φυτά ώστε να ακουμπάν οι ρίζες τους στο διηθητικό χαρτί.

Την 15^η ημέρα έγινε μόλυνση μόνο των ριζών με φρέσκια καλλιέργεια ριζοβίου *M.loti* R7A (που είχε αναπτυχθεί σε θρεπτικό YNB δύο μέρες πριν) με οπτική πυκνότητα $OD(600)=0,02$. Για τις ανάγκες την μόλυνσης όλα τα φυτά επανατοποθετήθηκαν πάνω στα τρυβλία με το θρεπτικό Jensen αλλά αυτή τη φορά ανάμεσα στο θρεπτικό και τα φυτά τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί με μέγεθος ίδιο με τον όγκο που καταλαμβάνει το θρεπτικό στο τρυβλίο (Εικόνα 15). Τρεις ώρες μετά την

μόλυνση ακολούθησε η δειγματοληψία όπου κόπηκαν με λεπίδα οι ρίζες των φυτών, συλλέχθηκαν σε tube των 1,5 ml, ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκαν στους

-80°C. Έπειτα, έγινε απομόνωση ολικού RNA σύμφωνα με το πρωτόκολλο “Purification of Total RNA from Plant Cells and Tissues and Filamentous Fungi” με το “RNeasy Plant Mini Kit” της Qiagen. Για την συμπύκνωση του RNA, μετά την απομόνωση αναμίξαμε τα διαφορετικά δείγματα σε δύο τελικά δείγματα και έγινε κατακρύμνιση του RNA ως εξής: Προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και έναν όγκο ισοπροπανόλη. Φυγοκέντρηση για 25 λεπτά στις μέγιστες στροφές και αφαίρεση υπερκευμένου. Έπειτα, προστέθηκαν 300μl αιθανόλης 70% και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις μέγιστες στροφές. Τέλος, έγινε αφαίρεση του υπερκευμένου, στέγνωμα του tube σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλυτοποίηση του pellet σε 20μl ddH₂O. Η συγκέντρωση του RNA μετρήθηκε με Qubit. Ακολούθησε αντίδραση DNάσης για την απομάκρυνση του γενωμικού υλικού από δύο δείγματα RNA με το kit της Thermo Scientific. Πιο συγκεκριμένα για κάθε αντίδραση προστέθηκαν:

- 7,5 μl RNA
- 1 μl 10x reaction buffer with MgCl₂
- 1 μl DNase I, RNase free (1 U)
- 0,5 μl RNase inhibitor (RNase out)

Για να διαπιστωθεί εάν η αντίδραση DNάσης έχει πετύχει και το DNA έχει απομακρυνθεί, πραγματοποιήθηκε μία PCR με εκκινητές για την ουβικιτίνη και χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από *L. japonicus* σαν θετικό control.

2.7.2 Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA

Για την κατασκευή της βιβλιοθήκης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο “Make Your Own “Mate & Plate™” Library System User Manual” , Clontech Laboratories, Inc Protocol No. PT4085-1. Αρχικά, έγινε σύνθεση cDNA χρησιμοποιώντας 4μl RNA (αντί για 1-2μl) και τον εκκινητή CDSIII (Oligo-dT). Πιο αναλυτικά, αναμίχθηκαν 4μl RNA με 1μl εκκινητή CDS III και έγινε επώαση στους 72oC για 2 λεπτά. Τα δείγματα ψύχθηκαν στον πάγο για 2 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα στις μέγιστες στροφές. Στην συνέχεια, προστέθηκαν 2.0 μl 5X First-Strand Buffer, 1.0 μl DTT (100 mM), 1.0 μl dNTP Mix (10 mM) και 1.0 μl SMART MMLV Reverse Transcriptase και έγινε επώαση στους 42oC για 10 λεπτά. Προστέθηκε 1 μl SMART III-modified oligo έγινε ανάμιξη και επώαση στους 42o C για 1 ώρα. Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν στους

75ο C για 10 λεπτά ώστε να σταματήσει η αντίδραση της σύνθεσης. Τέλος, προστέθηκαν 1.4μl 25mM NaOH και έγινε επώαση στους 68° C για 30 λεπτά. Τέλος, προστέθηκε 1 μl RNάσης H (2 units) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37° C για 20 λεπτά.

Ακολούθησε ενίσχυση των τμημάτων cDNA με Long Distance PCR (LD-PCR) και οι κύκλοι της αντίδρασης επιλέχθηκαν με βάση την ποσότητα του ολικού RNA. Αντί για την πολυμεράση Advantage 2 Polymerase επιλέχθηκε η Q5 που έχει επίσης την ικανότητα να ενισχύει μεγάλα τμήματα DNA. Η αντίδραση προσαρμόστηκε ως εξής:

- 2μL cDNA
- 50μL Q5 2x mix
- 2μL 5' primer
- 2μL 3' primer
- 10μL melting solution
- 34μL ddH₂O

Έγιναν 3 αντιδράσεις των 100μl η καθεμία.

Οι συνθήκες της αντίδρασης προσαρμόστηκαν ως εξής:

| <i>Στάδιο</i> | <i>Θερμοκρασία</i> | <i>Χρόνος</i> | |
|--------------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| <i>Αρχική αποδιάταξη</i> | 98° C | 30 sec | |
| <i>Αποδιάταξη</i> | 98° C | 10 sec | } x 24 κύκλους |
| <i>Υβριδοποίηση</i> | 72° C | 6 min + 5 sec/cycle | |
| <i>Επέκταση</i> | 72° C | 5 min | |

Οι αντιδράσεις ενισχυμένων δίκλωνων τμημάτων cDNA χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό του ds cDNA ώστε να απομακρυνθούν τμήματα που είναι μικρότερα από 200 bp. Η διαδικασία του καθαρισμού έγινε με το πρωτόκολλο "CHROMA SPIN™ Columns User Manual", Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT1300-1. Χρησιμοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις από την αντίδραση LD-PCR και η κατακρίμνηση έγινε με CH₃COONa (3M pH 4.8) και έπειτα με ισοπροπανόλη αντί για αιθανόλη.

Το τελευταίο βήμα της κατασκευής της βιβλιοθήκης, δηλαδή η κλωνοποίηση των τμημάτων cDNA στον φορέα pGADT7-Rec και ο μετασχηματισμός του Y187 με τον φορέα αυτό, έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο " Make Your Own "Mate & Plate™" Library System User Manual" , Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT4085-1.

2.8 Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης

Η τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης των ενθεμάτων cDNA έγινε παράλληλα με τη σύζευξη με το Y2H G.-LSK1 σύμφωνα με το πρωτόκολλο "Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual" Clontech Laboratories, Inc., Protocol No. PT4084-1 2.

2.9 Θρεπτικά μέσα και διαλύματα

1. Διαλύματα αμινοξέων: L-Histidine 200mg/L, L-Leucine 1000mg/L, L-Tryptophan 200mg/L.

2. Θρεπτικό YPDA (1L): 20 gr/L peptone, 10 gr/L yeast extract, 20 gr/L agar (μόνο για τρυβλία), 15ml 0,2% adenine sulfate. Συμπληρώνεται dH₂O μέχρι τα 950 ml. Αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Η γλυκόζη αποστειρώνεται μόνη της σε διάλυμα 20% και προστίθεται μετά το τέλος της αποστείρωσης των παραπάνω και όταν η θερμοκρασία έχει πέσει περίπου στους 55° C. Στο τέλος μπορεί να προστεθεί και καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50μg/ml.

3. Θρεπτικό SD (1L): 6,7 gr Yeast Nitrogen Base, 0,62 gr SD/-Leu/-Trp/-His, 20 gr agar (μόνο για τρυβλία), 100 ml από τα επιθυμητά διαλύματα αμινοξέων. Προσθήκη 700 ml dH₂O και αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Η γλυκόζη και πάλι προστίθεται στο τέλος (100ml).

4. Θρεπτικό DDO (1L): 6,7 gr Yeast Nitrogen Base, 0,62 gr SD/-Leu/-Trp/-His, 20 gr agar (μόνο για τρυβλία), 100 ml His (200 mg/L). Προσθήκη 800 ml dH₂O και αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Η γλυκόζη και πάλι προστίθεται στο τέλος (100ml).

5. Θρεπτικό QDO (1L): 6,7 gr Yeast Nitrogen Base, 0,62 gr SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, 20 gr agar (μόνο για τρυβλία), 900 ml dH₂O και αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Η γλυκόζη και πάλι προστίθεται στο τέλος (100ml).

6. 10 x LiAc: 1 M lithium acetate, ρυθμίσαμε το pH στο 7,5 και έγινε αποστείρωση στους 121° C.

7. 10 x TE buffer: 0,1 M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7,5 και αποστείρωση στους 121° C.

8. PEG/LiAc (10ml): 8 ml PEG 50%, 1 ml 10 x TE, 1ml 10 x LiAc

9. Jensen medium 0,1% (1L): 1ml διάλυμα 1 (10 gr/100 ml CaHPO₄, 2 gr/100 ml K₂HPO₄, 2 gr/100 ml MgSO₄ · 7H₂O, 2 gr/100 ml NaCl), 1 ml Fe-citrate (1 gr/ L), 2,5 µL διάλυμα 2 (2 gr/ 50 ml Na₂MoO₄·4H₂O), 2,5 µL διάλυμα 3 (0,175 gr/50 ml CuSO₄·5H₂O, 3,15 gr/50 ml MnSO₄·4H₂O, 0,49 gr/50 ml ZnSO₄·7H₂O, 25 µL διάλυμα 4 (1,27 gr/100 ml H₃BO₃, 250 µL KNO₃ 2M και άγαρ 0,8 %).

10. YNB: Mannitol 10gr/L, 0,5 gr/L K₂HPO₄, 0,2 gr/L MgSO₄, 0,1 gr/L NaCl, 0,5 gr/L Yeast Extract, 1,5% agar (μόνο για τρυβλία).

11. Freezing medium: 100 ml YPDA (αποστειρωμένο) και 50 ml 75% γλυκερόλη (αποστειρωμένη).

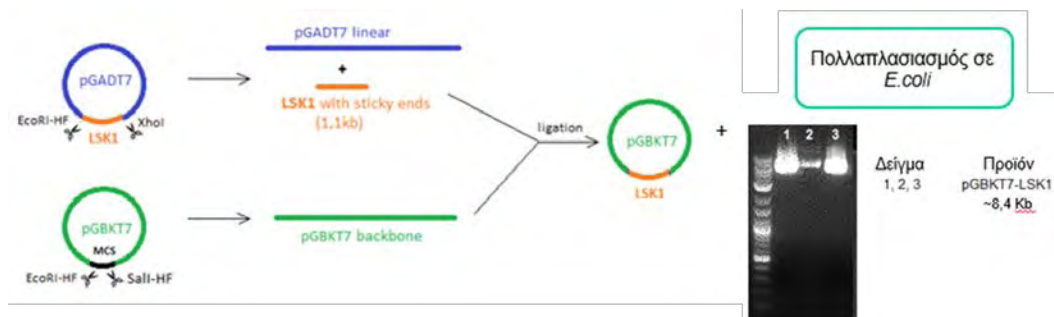
12. ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ CAT. NO. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ

| | | | |
|-----------------------|--------|-----------|-----------|
| AUREOBASIDIN A | 630466 | 500 µg/ml | 200 ng/ml |
| X-A-GAL | 630463 | 20 mg/ml | 0,4 mg/ml |

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κλωνοποίηση της LSK1 και έλεγχος της έκφρασής της στην ζύμη

Η LSK1 αρχικά ήταν κλωνοποιημένη στον φορέα pGADT7. Για τις ανάγκες των πειραμάτων, όμως, έπρεπε να κλωνοποιηθεί στον φορέα pGBKT7 στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το DNA binding domain του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Ο φορέας pGADT7-LSK1 κόπηκε με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI-HF και XhoI τα οποία αναγνωρίζουν τα άκρα της LSK1. Η πέψη, λοιπόν, αφήνει ελεύθερη την LSK1 με κολλώδη άκρα (1,1 Kb) και καθιστά τον φορέα pGADT7 γραμμικό. Έπειτα, κόπηκε και ο φορέας pGBKT7 με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI-HF και Sall-HF τα οποία αναγνωρίζουν αλληλουχίες μέσα στον πολυσυνδέτη του φορέα, καθιστώντας τον φορέα γραμμικό. Ακολούθησε αντίδραση λιγάσης μεταξύ του φορέα pGBKT7 και της LSK1 και μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* για τον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου pGBKT7-LSK1. Η αντίδραση πέψης επιβεβαιώθηκε μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης τόσο για τον φορέα pGBKT7 όσο και για την LSK1 και στην συνέχεια έγινε απομόνωση του φορέα και της LSK1 από την πηκτή αγαρόζης και εκ νέου επιβεβαίωση. Η κλωνοποίηση της LSK1 στον σωστό φορέα επιβεβαιώθηκε μέσω απομόνωσης πλασμιδίου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* και στο gel ηλεκτροφόρησης παρατηρήθηκε ότι για τρεις απομονώσεις πλασμιδίων είχαμε την επιθυμητή μπάντα περίπου στις 8,4 Kb (pGBKT7 + LSK1) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας κλωνοποίησης της LSK1 στον φορέα pGBKT7. Στο πρώτο βήμα γίνεται η πέψη με ένζυμα περιορισμού όπου και προκύπτουν οι γραμμικοί φορείς και η κωδική αλληλουχία της LSK1 (~1,1 Kb). Ακολουθεί η αντίδραση λιγάσης μεταξύ της LSK1 και του pGBKT7. Έπειτα, ο μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* και απομόνωση πλασμιδίων για επιβεβαίωση της κλωνοποίησης. Το προϊόν στο gel ηλεκτροφόρησης είναι περίπου 8,4 Kb (pGBKT7 + LSK1).

Εφόσον η κλωνοποίηση της LSK1 ήταν επιτυχής, το επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της έκφρασής της στο στέλεχος Y2H G. Για την επίτευξη του ελέγχου έγινε μετασχηματισμός του Y2H G. με τους φορείς pGBKT7-LSK1 και pGADT7-LSK1 παράλληλα και έπειτα έγινε επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων τόσο σε DDO όσο και σε DDO/A. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι εμφανίζονται αποικίες στα τρυβλία DDO, γεγονός που υποδεικνύει ότι και τα δύο πλασμίδια έχουν προσληφθεί από την ζύμη και ότι τα κύτταρα είναι βιώσιμα. Επίσης, αποικίες εμφανίστηκαν και στα τρυβλία DDO/A. Η ανάπτυξη στο θρεπτικό που περιέχει το αντιβιοτικό AbA υποδηλώνει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση της LSK1 με τον εαυτό της, κάτι που έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενα πειράματα όπου φαίνεται ότι η LSK1 διμερίζεται και αυτο-φωσφορυλιώνεται (Πίνακας 2). Με τον τρόπο αυτό, επιβεβαιώθηκε η έκφραση της LSK1 στην ζύμη.

| Strain | Transformation with | Selection on | Results | Interpretation |
|---------|---------------------|---------------------|---------|-----------------------|
| Y2HGold | pGBKT7-LSK1 | SD/-Trp,-Leu | + | both plasmids present |
| | + pGADT7-LSK1 | SD/-Trp, -Leu, +AbA | + | dimerization of LSK1 |

Πίνακας 2: Συνοπτική περιγραφή των μετασχηματισμών των δύο στελεχών μύκητα και η επιλογή των κυττάρων που περιέχουν και τα δύο πλασμίδια μετά από σύζευξη σε θρεπτικά με έλλειψη αμινοξέων.

3.2 Πειράματα ελέγχου

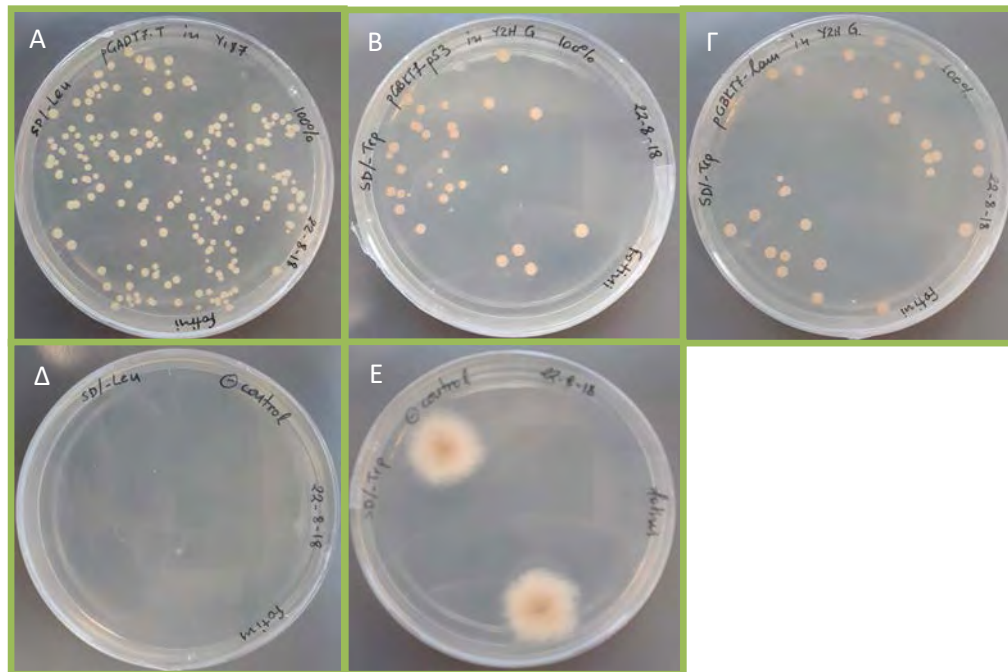
Για να ελέγξουμε ότι το δικό μας σύστημα Yeast Two Hybrid δουλεύει όπως αναμένεται, αρχικά εκτελέσαμε πειράματα ελέγχου μεταξύ δύο πρωτεϊνών με γνωστή αλληλεπίδραση (θετικό control) και δύο πρωτεϊνών που δεν αλληλεπιδρούν (αρνητικό control). Πιο συγκεκριμένα, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης p53 (καταστολέας όγκου) και του SV40 Large T-antigen (ογκοπρωτεΐνη του ιού SV40), μια αλληλεπίδραση που είναι γνωστή στη φύση. Όσον αφορά το αρνητικό control, ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ της λαμινίνης (γλυκοπρωτεΐνη των βασικών μεμβρανών) και του SV40 large T-antigen.

Αρχικά, έγινε μετασχηματισμός του στελέχους Y2H Gold με 1) τον φορέα pGBKT7-53 που κωδικοποιεί το τμήμα πρόσδεσης DNA του Gal4 που έχει συντηχθεί με την p53 και 2) με τον φορέα pGBKT7-lam που κωδικοποιεί το τμήμα πρόσδεσης DNA του Gal4 που έχει συντηχθεί με την λαμινίνη. Παράλληλα, έγινε μετασχηματισμός του στελέχους Y187 με τον φορέα pGADT7-T που κωδικοποιεί το τμήμα ενεργοποίησης του Gal4 που έχει συντηχθεί με το SV40 Large T-antigen (Πίνακας 3)

| Στέλεχος | Πλασμίδιο | Θρεπτικό |
|----------|------------|----------|
| Y2H Gold | pGBKT7-p53 | SD/-Trp |
| Y2H Gold | pGBKT7-lam | SD/-Trp |
| Y187 | pDADT7-T | SD/-Leu |

Πίνακας 3: Τα πλασμίδια με τα οποία μετασχηματίστηκαν τα δύο στελέχη μύκητα καθώς και το θρεπτικό στο οποίο έγινε η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 17 ο μετασχηματισμός των δύο στελεχών επιβεβαιώνεται από την ανάπτυξη τους στα επιλεκτικά θρεπτικά ανάλογα με το πλασμίδιο που έχει προσλάβει το καθένα. Πιο συγκεκριμένα, το Y187 έχει προσλάβει το πλασμίδιο pGADT7-T που του δίνει την ικανότητα να συνθέτει λευκίνη, ενώ το Y2H G. έχει προσλάβει στην μία περίπτωση το πλασμίδιο pGBKT7-p53 και στην άλλη περίπτωση το pGBKT7-lam. Και τα δύο αυτά πλασμίδια του δίνουν την ικανότητα να συνθέτει τρυπτοφάνη και έτσι να επιβιώνει στο θρεπτικό που η τρυπτοφάνη λείπει. Ως αρνητικά control χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά μη-μετασχηματισμένα κύτταρα Y187 και Y2H Gold. Δεν παρατηρήθηκε καμία αποικία εκτός από το τρυβλίο SD/-Trp στο οποίο υπάρχει μία επιμόλυνση που όμως δεν μοιάζει μορφολογικά ούτε με τον Y2H Gold ούτε με τον Y187.

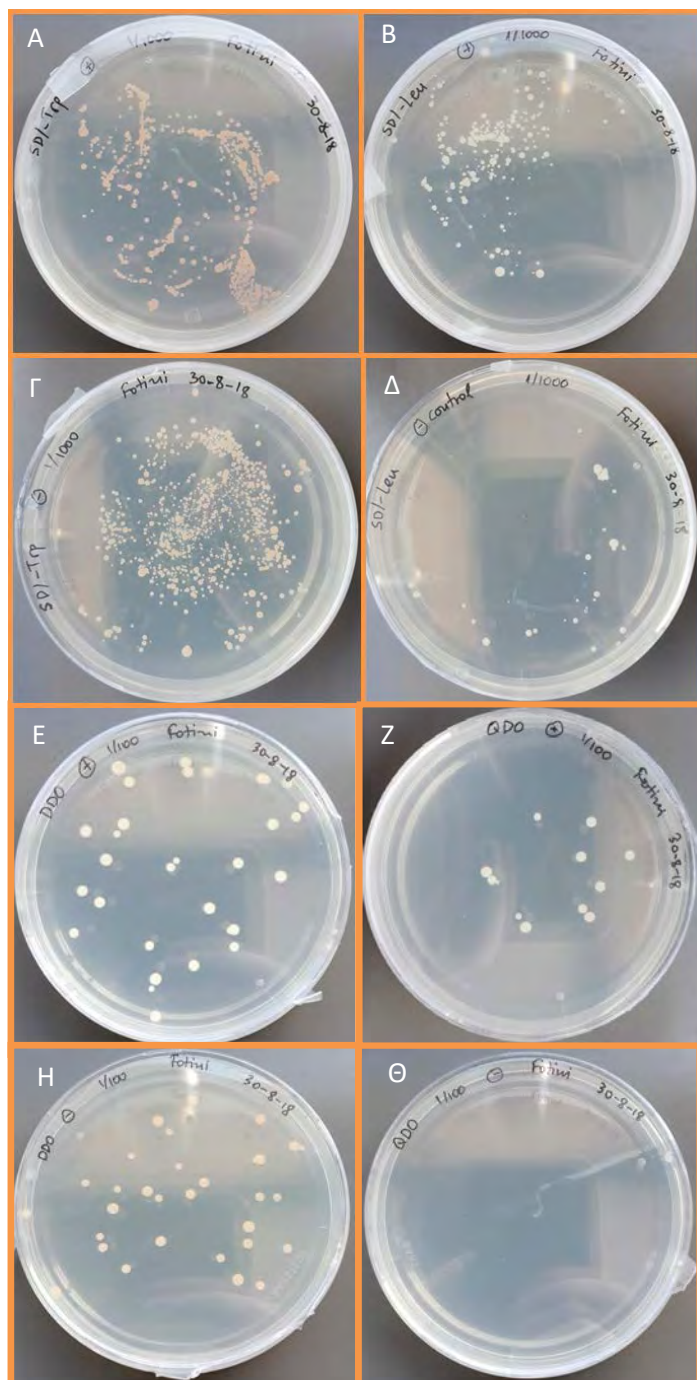


Εικόνα 17: Μετασηματισμένα κύτταρα ζύμης (Y187 και Y2H G.) σε επιλεκτικό θρεπτικό για την ανίχνευση των κυττάρων που έχουν προσλάβει το κατάλληλο πλασμίδιο. Α) Το Y187 μετασηματισμένο με τον φορέα pGADT7-T σε SD/-Leu. Β) και Γ) Το Y2H G. μετασηματισμένο με το pGBKT7-p53 και το pGBKT7-lam σε SD/-Trp. Δ) και Ε) Αρνητικά control-δεκτικά μη μετασηματισμένα κύτταρα σε SD/-Leu και SD/-Trp αντίστοιχα.

Ακολούθησε η σύζευξη μεταξύ του Y2H G / pGBKT7-p53 με το Y187 / pGADT7-T και του Y2H G / pGBKT7-lam και του Y187 / pGADT7-T. Η καλλιέργεια της σύζευξης επωάστηκε για 20 ώρες και έπειτα τοποθετήθηκε σε τρυβλία SD/-Leu, SD/-Trp και SD/-Leu/-Trp (DDO) και QDO με αραιώσεις 1/10, 1/100 και 1/1000 το καθένα. Για τα SDO απεικονίζονται τα τρυβλία με αραιώση 1/1000, για τα τρυβλία DDO τα τρυβλία με αραιώση 1/100 και για τα QDO τα τρυβλία με αραιώση 1/100.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 18 η καλλιέργεια των δύο συζεύξεων αναπτύσσεται σε SD/-Trp, SD/-Leu και σε DDO. Η ανάπτυξη σε SD/-Trp και SD/-Leu αντικατοπτρίζει τόσο τα κύτταρα που έχουν προσλάβει το ένα πλασμίδιο όσο και αυτά που έχουν προσλάβει και τα δύο. Δείκτης της αποτελεσματικότητας της σύζευξης αποτελούν τα τρυβλία DDO στα οποία αναπτύσσονται μόνο τα κύτταρα που έχουν προσλάβει και τα δύο πλασμίδια. Εφόσον η p53 και το large T-antigen αλληλεπιδρούν (Εικόνα 18Z), η σύζευξη μεταξύ του Y2H Gold και του Y187 οδηγεί στον σχηματισμό διπλοειδών κυττάρων που έχουν προσλάβει και τα δύο πλασμίδια και είναι ικανά να ενεργοποιήσουν και τα τέσσερα γονίδια αναφοράς. Αντίθετα, στη σύζευξη που αποτελεί το αρνητικό control (Εικόνα 18Θ) τα διπλοειδή κύτταρα αναπτύσσονται μεν στα SD/-Leu, SD/-Trp και SD/-Leu/-Trp (DDO) αλλά όχι στα QDO, καθώς τα διπλοειδή κύτταρα αδυνατούν να μεταγράψουν τα γονίδια αναφοράς και

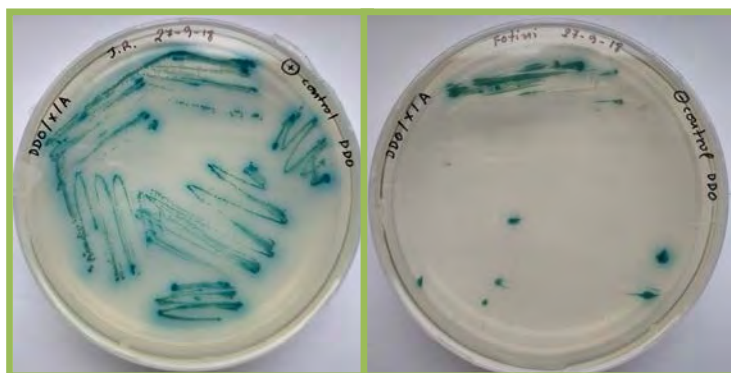
να επιβιώσουν απουσία ιστιδίνης και αδενίνης. Με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώσαμε ότι το σύστημά μας είναι αξιόπιστο ως προς την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 18: Κύτταρα ζύμης μετά από σύζευξη του Y187 και του Y2H G. Σύζευξη θετικού και αρνητικού control για την αλληλεπίδραση p53 / SV40 Large T-antigen και lam / SV40 Large T-antigen αντίστοιχα. Α) Αραίωση 1/1000 της καλλιέργειας + σύζευξης σε SD/-Trp. Β) Αραίωση 1/1000 της καλλιέργειας + σύζευξης σε SD/-Leu. Γ) Α) Αραίωση 1/1000 της καλλιέργειας - σύζευξης σε SD/-Trp. Δ) Αραίωση 1/1000 της καλλιέργειας - σύζευξης σε SD/-Leu. Ε) Αραίωση 1/100 της καλλιέργειας + σύζευξης σε DDO. Ζ) Αραίωση 1/100 της καλλιέργειας + σύζευξης σε DDO. Η) Α) Αραίωση 1/100 της καλλιέργειας + σύζευξης σε QDO. Θ) Αραίωση 1/100 της καλλιέργειας - σύζευξης σε QDO.

Για τα πειράματα θετικού control, σύμφωνα με το πρωτόκολλο θα πρέπει ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία DDO να είναι παρόμοιος ή να διαφέρει κατά 10-20% από τα τρυβλία QDO. Οι αποικίες, βέβαια, είναι λιγότερες στο QDO αλλά

θεωρούμε ότι οφείλεται στο γεγονός ότι το μέσο QDO δυσκολεύει πολύ περισσότερο τα κύτταρα σε σχέση με το μέσο DDO. Ακόμη επιβεβαιώσαμε την αποτελεσματική μεταγραφή και των υπόλοιπων γονιδίων αναφοράς (MEL1 και AUR1-C) με επίστρωση αποικιών από τρυβλία DDO θετικού και αρνητικού control σε τρυβλία DDO/X/A (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Επίστρωμένες αποικίες από τρυβλία DDO σε τρυβλία DDO/X/A για A) το θετικό control και B) το αρνητικό control.

Στο θετικό control εμφανίζονται πολλές και έντονες μπλε αποικίες ενώ στο αρνητικό λίγες μπλε. Αν και δεν θα έπρεπε να εμφανίζονται καθόλου αποικίες στο αρνητικό control, θεωρούμε ότι η παρουσία τους οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα που είναι πολύ συγκεντρωμένα σε ένα σημείο μπορούν να επιβιώσουν παρά την παρουσία του αντιβιοτικού και να χρωματιστούν μπλε καθώς το X-α-gal δεν είναι πολύ επιλεκτικός δείκτης. Η διαφορά μεταξύ των δύο τρυβλίων ως προς την ανάπτυξη αποικιών μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σύστημα Y2H μπορεί να ανιχνεύσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών.

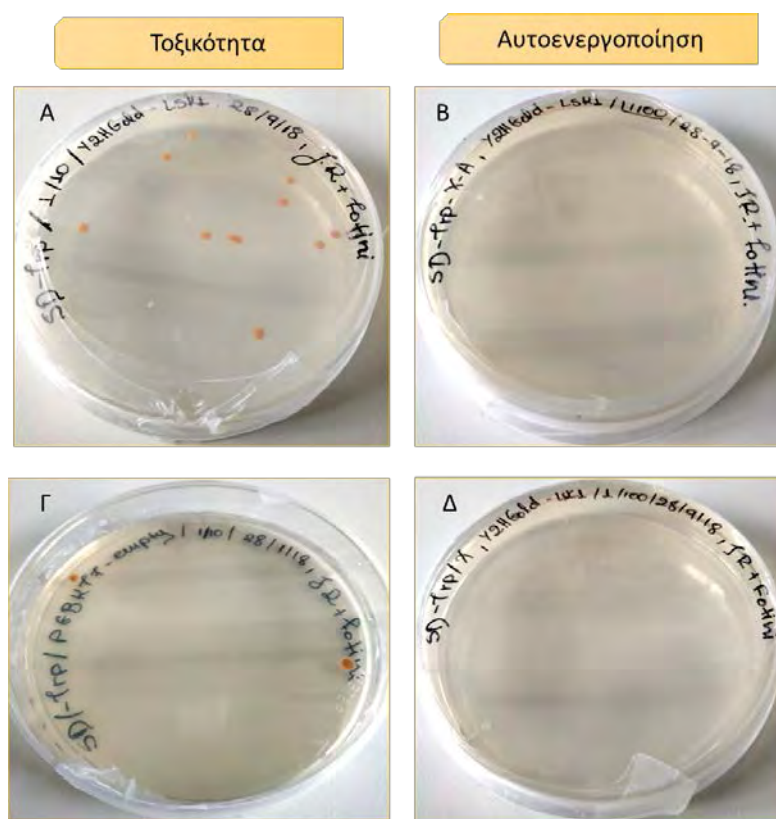
3.3 Έλεγχος αυτο-ενεργοποίησης και τοξικότητας της LSK1

Πριν ξεκινήσουμε οποιοδήποτε πείραμα ταυτοποίησης αλληλεπιδράσεων θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι πρώτον, η LSK1 δεν προκαλεί αυτοενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς αυτόνομα απουσία μιας πρωτεΐνης prey και δεύτερον, ότι η LSK1 δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα του Y2H Gold.

Για τον έλεγχο της αυτοενεργοποίησης μετασχηματίσαμε το Y2H Gold με τον φορέα pGBKT7-LSK1 και κάναμε επίστρωση της καλλιέργειας σε τρυβλία SD/-Trp, SD/-

Trp/X και SD/-Trp/X/A. Για τον έλεγχο της τοξικότητας μετασηματίσαμε το Y2H Gold με τον φορέα pGBKT7-LSK1 και το Y2H Gold με τον άδειο φορέα pGBKT7-empty και έπειτα στρώσαμε την καλλιέργεια σε τρυβλία SD/-Trp. Και για τα δύο πειράματα στρώθηκαν αραιώσεις 1/10 και 1/100 από την καλλιέργεια.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 20 το στέλεχος Y2H G. που περιέχει τον φορέα με την LSK1 αναπτύσσεται κανονικά και μάλιστα εμφανίζει πολύ περισσότερες αποικίες σε σχέση το Y2H G. που περιέχει τον άδειο φορέα. Θα ήταν αναμενόμενο να παρατηρήσουμε παρόμοιο αριθμό αποικιών, αλλά υποθέτουμε ότι οι δύο μετασηματισμοί είχαν διαφορετική αποτελεσματικότητα. Συμπερασματικά, η LSK1 δεν προκαλεί τοξικότητα στα κύτταρα της ζύμης.



Εικόνα 20: Τεστ τοξικότητας (Α,Β) και αυτο-ενεργοποίησης των γονιδίων αναφοράς (Γ,Δ).
Α) Μετασηματισμένα κύτταρα Y2H G. με το πλασμίδιο pGBKT7-LSK1 σε SD/-Trp, Β) Μετασηματισμένα κύτταρα Y2H G. με τον άδειο φορέα pGBKT7-empty σε SD/-Trp. Γ) και Δ) Μετασηματισμένα κύτταρα Y2H G. με το πλασμίδιο pGBKT7-LSK1 σε SD/-Trp/X/A και SD/-Trp/X αντίστοιχα. Για τα Α και Β απεικονίζεται η αραιώση 1/10 της καλλιέργειας των κυττάρων και για τα Γ και Δ η αραιώση 1/100.

Η ίδια καλλιέργεια επιστρώθηκε και στα τρυβλία SD/-Trp/X/A και SD/-Trp/X. Στις εικόνες...παρατηρούμε ότι καμία αποικία δεν αναπτύχθηκε παρουσία αντιβιοτικού Aba και X-α-gal γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η LSK1 δεν είναι ικανή από



Εικόνα 21: Θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) control αλληλεπίδρασης από τα πειράματα ελέγχου σε τρυβλίο DDO/X/A. Η επίστρωση έγινε από καλλιέργεια που ήταν αποθηκευμένη ως stock γλυκερόλης.

μόνη της να ενεργοποιήσει τα γονίδια αναφοράς MEL1 και AUR1-C. Control αποτέλεσε καλλιέργεια θετικού και αρνητικού control από το προηγούμενο πείραμα ελέγχου σε τρυβλίο DDO/X/A από stock γλυκερόλης (Εικόνα 21). Όπως ήταν αναμενόμενο ανιχνεύτηκε και πάλι η θετική αλληλεπίδραση της p53 με το T-antigen. Παρόλου που βλέπουμε μερικές μπλε αποικίες στο αρνητικό control, όπως εξηγήσαμε και παραπάνω, η ανάπτυξή τους οφείλεται στην μεγάλη συγκέντρωση της καλλιέργειας σε ένα σημείο, που επιτρέπει την ανάπτυξη παρά την

παρουσία αντιβιοτικού. Παράλληλα, το γεγονός ότι το X-α-gal δεν αποτελεί πάντοτε αξιόπιστο δείκτη προκαλεί τον μπλε χρωματισμό των αποικιών.

3.4 Πειράματα δοκιμής σύζευξης (pairwise mating)

Αρχικά, έγιναν πειράματα pairwise mating στα οποία επιλέχθηκαν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στο μονοπάτι σηματοδότησης των βρασσινοστεροειδών και της φυματιογένεσης. Καθώς γνωρίζουμε ότι οι πρωτεΐνες GSK3 εμπλέκονται στο μονοπάτι αυτό και καθορίζουν την διαδικασία της φυματιογένεσης (πχ BIN2), οι παρακάτω πρωτεΐνες αποτελούν πιθανούς παράγοντες αλληλεπίδρασης με την LSK1 : *A/BAK1*, *L/SERK3*, *PUB13* και *ERBB2*. Ο *A/BAK1*, επίσης γνωστός και ως *SERK3* (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE3), αποτελεί συνυποδοχέα BR μαζί με τον *BRI1*. Η πρόσδεση των BR στον υποδοχέα *BRI1* επιτρέπει την τρανς-φωσφορυλίωση των *BRI1* και *BAK1*, και συνεπώς την ενεργοποίηση του *BRI1* (Jianming Li, 2003). Ένας άλλος υποδοχέας της πλασματικής μεμβράνης των φυτικών κυττάρων είναι ο *FLS2* (FLAGELLIN-SENSING2) που αναγνωρίζει την βακτηριακή πρωτεΐνη flagellin (Boller, 2000). Τόσο ο *BRI1* και ο *FLS2* ανήκουν στις κινάσες LRR RLK (Belkhadir et al., 2014) και ετεροδιμερίζονται με άλλες κινάσες LRR RLK, κυρίως με τον συνυποδοχέα (*BAK1*) (Chinchilla et al., 2007; Jia et al., 2002). Ο *FLS2*, έπειτα, υφίσταται ουβικιτινυλίωση από δύο φυτικές U-box (*PUB*) E3 λιγάσες της

ουβικουιτίνης, την PUB12 και την PUB13 με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του FLS2 (Zhou et al., 2015). Πέρα από την αλληλεπίδρασή της με την FLS2, η PUB13 έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά και με τον υποδοχέα NFR5 και να τον ουβικιτινυλιώνει καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδά του. Έτσι καταλαμβάνει ένα σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης του *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *M.loti* (Daniela Tsikou et al., 2018). Όσο αφορά την SERK3, αποτελεί την ομόλογη πρωτεΐνη της BAK1 στο φυτό *Lotus japonicus*. Η ERBB2 (ERYTHROBLASTIC ONCOGENE B) αποτελεί έναν υποδοχέα κινάσης τυροσίνης στην πλασματική μεμβράνη των ανθρώπινων κυττάρων. Είναι ένα ογκογονίδιο με σηματοδοτικό ρόλο σε διάφορους τύπους επιθετικού καρκίνου. Το ομόλογο γονίδιο της στο *Lotus japonicus* χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σύζευξης με την LSK1.

Οι κωδικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών είναι κλωνοποιημένες σε πλασμιδιακούς φορείς pGADT7-AD (*A β BAK*, *L β SERK3-KD* και *ERBB2*) και σε pGBKT7 (PUB13).

Αρχικά, έγινε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli* με τα παραπάνω πλασμίδια ώστε να πολλαπλασιαστούν. Ο μετασχηματισμός με τον φορέα pGBKT7 επιστρώθηκε σε τρυβλίο με καναμυκίνη (50μg/ml) ενώ οι μετασχηματισμοί με pGADT7-AD σε τρυβλία με αμπικιλίνη (50μg/ml). Η επιλογή του αντιβιοτικού έγινε με βάση την ανθεκτικότητα που έχει το κάθε πλασμίδιο.

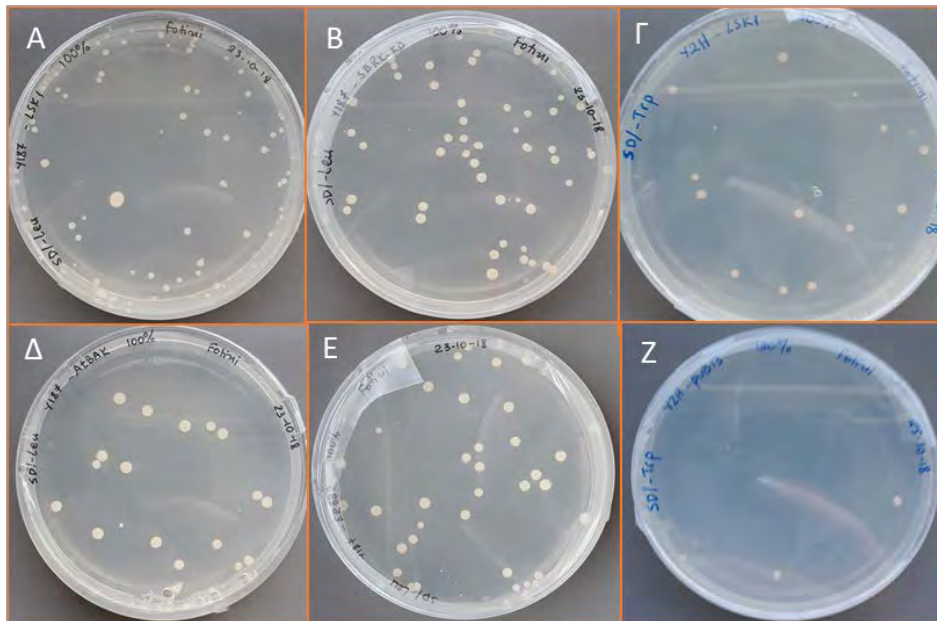
Ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίου και ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης 1% και επιβεβαίωση του σωστού ενθέματος σε κάθε πλασμίδιο με περιοριστικές πέψεις. Στην συνέχεια, έγινε ο μετασχηματισμός του Y187 με τους φορείς:

- pGADT7-LSK1
- pGADT7- *L β SERK3-KD*
- pGADT7-*A β BAK*
- pGADT7-ERBB2

και ο μετασχηματισμός του Y2H Gold με τους φορείς:

- pGBKT7-LSK1
- pGBKT7-PUB13

Οι μετασχηματισμένες καλλιέργειες επιστρώθηκαν σε επιλεκτικό θρεπτικό ανάλογο με τον φορέα σε συγκεντρώσεις 100%, 1/10 και 1/100. Εδώ παρουσιάζονται μόνο τα τρυβλία με συγκέντρωση 100% της μετασχηματισμένης καλλιέργειας (Εικόνα 22)



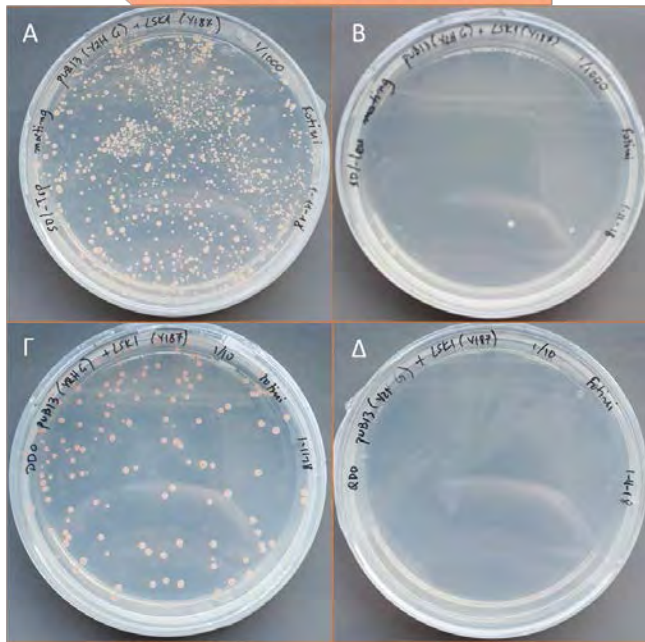
Εικόνα 2: Μετασηματισμένες καλλιέργειες συγκέντρωσης 100% επιστρωμένες σε επιλεκτικό θρεπτικό. Μετασηματισμοί: A) Y187-LSK1 σε SD/-Leu, B) Y187- LjSERK3-KD σε SD/-Leu, Γ) Y2H G.-LSK1 σε SD/-Trp, Δ) Y187-AtBAK σε SD/-Leu, E) Y187-ERBB2 σε SD/-Leu, Z) Y2H G.-PUB13 σε SD/-Trp.

Μετά τον επιτυχή μετασηματισμό, ακολούθησε η δοκιμή σύζευξης για να ελέγξουμε την πιθανή αλληλεπίδραση της LSK1 με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα ακολούθησαν οι εξής συζεύξεις:

- LSK1 (Y2H G.) + ERBB2 (Y187)
- LSK1 (Y2H G.) + AtBAK (Y187)
- LSK1 (Y2H G.) + LjSERK3-KD (Y187)
- LSK1 (Y187) + PUB13 (Y2H G.)

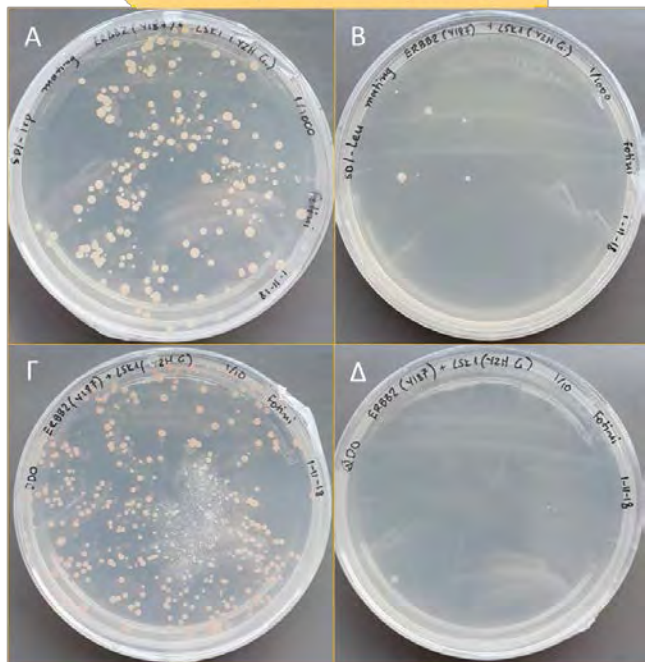
Οι καλλιέργειες των συζεύξεων στρώθηκαν σε τρυβλία : SD/-Trp, SD/-Leu, DDO και QDO με αραιώσεις 1/10, 1/100 και 1/1000. Ως control χρησιμοποιήθηκαν τα διπλοειδή κύτταρα από τη σύζευξη control σε τρυβλία DDO και QDO από stock γλυκερόλης. Για την σύζευξη PUB13 (Y2H G.) + LSK1 (Y187) και ERBB2 (Y187) + LSK1 (Y2H G.) απεικονίζονται τα τρυβλία SD/-Trp και SD/-Leu με αραιώση 1/1000 και τα τρυβλία DDO και QDO με αραιώση 1/10 (Εικόνα 23 και 24 αντίστοιχα).

PUB13 (Y2H G.) + LSK1 (Y187)



Εικόνα 3: Καλλιέργεια σύζευξης μεταξύ του Y2H G./PUB13 + Y187/LSK1 επιστρωμένη σε τρυβλία Α) SD/-Trp, 1/1000 Β) SD/-Leu 1/1000, Γ) DDO 1/10, Δ) QDO 1/10.

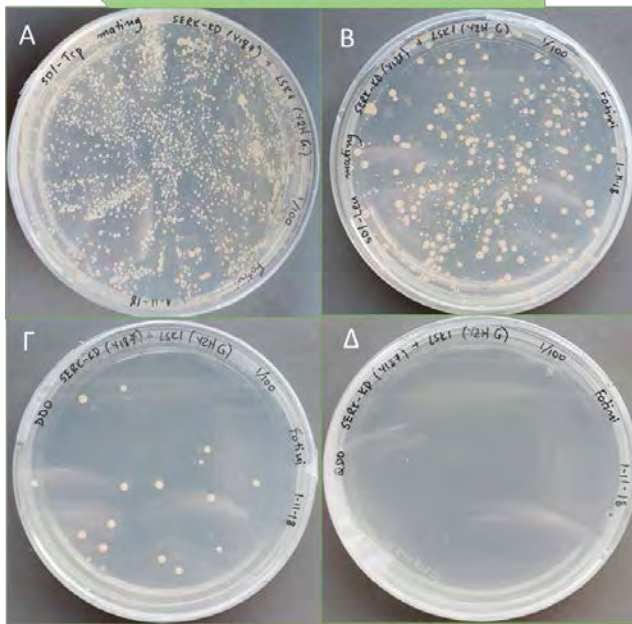
ERBB2 (Y187) + LSK1 (Y2H G.)



Εικόνα 24: Καλλιέργεια σύζευξης μεταξύ του Y2H G./LSK1 + Y187/ERBB2 επιστρωμένη σε τρυβλία Α) SD/-Trp, 1/1000 Β) SD/-Leu 1/1000, Γ) DDO 1/10, Δ) QDO 1/10.

Για τη σύζευξη της *L/SERK3-KD* (Y187) με την LSK1 (Y2H G.) απεικονίζονται τα τρυβλία SD/-Trp, SD/-Leu, DDO και QDO με αραιώση 1/100 καθώς είχαμε μία επιμόλυνση από μύκητα άλλου είδους σε ένα τρυβλίο SD/-Trp 1/1000 (Εικόνα 25).

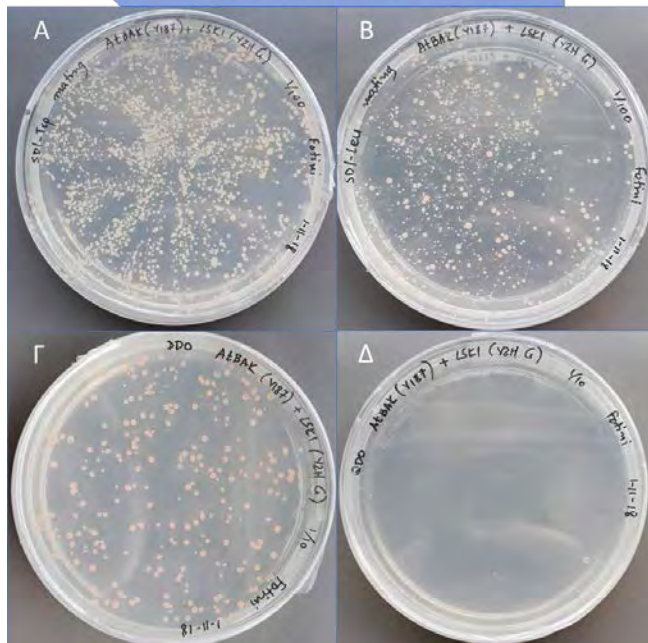
SERK-KD (Y187) + LSK1 (Y2H G.)



Εικόνα 25: Καλλιέργεια σύζευξης μεταξύ του Y2H G./LSK1 + Y187/ LjSERK3-KD επιστρωμένη σε τρυβλία Α) SD/-Trp, 1/100 Β) SD/-Leu 1/100, Γ) DDO 1/100, Δ) QDO 1/100.

Για τη σύζευξη μεταξύ της AtBAK (Y187) και της LSK1 (Y2H G.) απεικονίζονται τα τρυβλία SD/-Trp και SD/-Leu με αραιώση 1/100 και τα τρυβλία DDO και QDO με αραιώση 1/10 (Εικόνα 26).

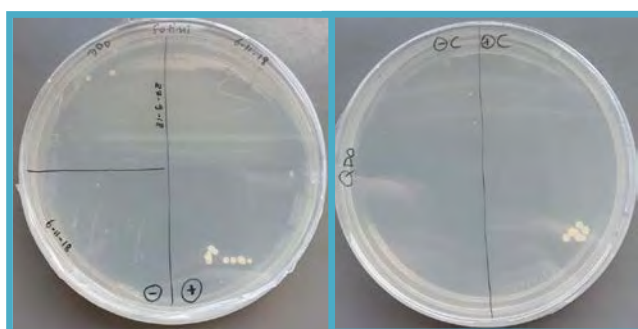
AtBAK (Y187) + LSK1 (Y2H G.)



Εικόνα 26: Καλλιέργεια σύζευξης μεταξύ του Y2H G./LSK1 + Y187/AtBAK επιστρωμένη σε τρυβλία Α) SD/-Trp, 1/100 Β) SD/-Leu 1/100, Γ) DDO 1/10, Δ) QDO 1/10.

Control αποτέλεσαν κύτταρα από stock γλυκερόλης των πειραμάτων control. Ένα τρυβλίο DDO χωρίστηκε σε τρία μέρη στα οποία έγινε streaking θετικού control από DDO τρυβλίο και δύο αρνητικών control που έχουν προκύψει από διαφορετικές

αποικίες. Τόσο το θετικό όσο και το πιο πρόσφατο stock αρνητικού control αναπτύχθηκαν στο DDO. Το τρυβλίο QDO χωρίστηκε σε 2 μέρη όπου στρώθηκαν επίσης το θετικό και το αρνητικό control από τα πιο πρόσφατα stock γλυκερόλης (Εικόνα 27). Ανάπτυξη παρατηρήθηκε μόνο στο θετικό control, επιβεβαιώνοντας ότι το σύστημα μας μπορεί να εντοπίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Όλες οι συζεύξεις έχουν πετύχει αφού βλέπουμε ανάπτυξη στα τρυβλία όπου απουσιάζει η τρυπτοφάνη και η λευκίνη, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα διπλοειδή κύτταρα περιέχουν και τους δύο πλασμιδιακούς φορείς. Στα τρυβλία, όμως, QDO δεν παρατηρήσαμε καμία ανάπτυξη. Αυτό σημαίνει ότι η LSK1 δεν αλληλεπιδρά με καμία από τις πρωτεΐνες που ελέγξαμε.

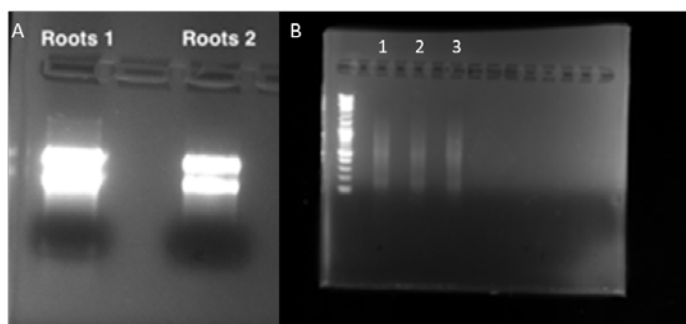


Εικόνα 27: Επίστρωση θετικού και αρνητικών control σε τρυβλία DDO (αριστερά) και QDO (δεξιά).

3.5 Κατασκευή βιβλιοθήκης cDNA

Για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της LSK1 κατά την διαδικασία της φυματιογένεσης, μολύνθηκαν φυτά *Lotus japonicus* αγρίου τύπου 15 ημερών με το ριζόβιο βακτήριο *Mesorhizobium loti* R7A. Εφόσον είναι γνωστό ότι η LSK1 εκφράζεται μία ώρα μετά την μόλυνση με το ριζόβιο, η δειγματοληψία των ριζών έγινε 3 ώρες μετά την μόλυνση, ώστε οι πιθανές αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες να έχουν μεταφραστεί και να είναι παρούσες στις ρίζες των φυτών. Αμέσως μετά, έγινε απομόνωση ολικού RNA, σύνθεση cDNA και ενίσχυση των τμημάτων cDNA με Long Distance PCR (LD-PCR). Έπειτα, έγινε καθαρισμός του cDNA μέσω στήλης ώστε να απομακρυνθούν τα τμήματα που ήταν μικρότερα από 200 bp. Στο αριστερό gel αγαρόζης της εικόνας 28 φαίνονται τα δύο δείγματα μετά την απομόνωση RNA από μολυσμένες ρίζες του *Lotus japonicus*. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η απομόνωση RNA. Στο δεξί τμήμα της εικόνας 28 απεικονίζεται η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης τριών δειγμάτων cDNA μετά από την LD-PCR. Παρατηρείται και στα τρία δείγματα ένα συνοθύλευμα από μπάντες που κυμαίνεται από 250 bp-4.000 bp περίπου. Οι ζώνες

αυτές αντικατοπτρίζουν τα διάφορα τμήματα του cDNA και κατ' επέκταση τα μεταγράφα mRNA που βρίσκονταν στις ρίζες του φυτού 3 ώρες μετά την μόλυνση. Στην συνέχεια, έγινε καθαρισμός του ds cDNA για την απομάκρυνση τμημάτων μικρότερων από 200 bp. Η τελική ποσότητα του cDNA είναι 1,2 μg. Τέλος, ακολούθησε η κατασκευή της βιβλιοθήκης με μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων Y187 με το ds cDNA και τον φορέα pGADT7-Rec.



Εικόνα 28: Δεξιά: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των δύο δειγμάτων RNA από τα οποία προέκυψε η βιβλιοθήκη cDNA. Αριστερα: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης τριών δειγμάτων μετά από LD-PCR.

3.6 Διαλογή (screening) αλληλεπιδράσεων από την βιβλιοθήκη cDNA

Στο σημείο αυτό, ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση της LSK1 με τα ενθέματα της βιβλιοθήκης cDNA. Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε 2 φορές. Μία καλλιέργεια του στελέχους Y2H G. αναμίχθηκε με την καλλιέργεια Y187 μετασχηματισμένη με τους κλώνους της βιβλιοθήκης και μετά από κοινή επώαση επιστρώθηκε σε τρυβλία SD/-Trp,SD/-Leu, DDO για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας της σύζευξης, και σε τρυβλία DDO/X/A (1^η επανάληψη) και SD/-Trp/-Leu/-His/Kan (2^η επανάληψη) για την ανίχνευση αλληλεπιδράσεων. Στην δεύτερη επανάληψη επιλέχθηκε το μέσο TDO/Kan ώστε η επιλογή να μην είναι τόσο αυστηρή εξ αρχής και με την προσθήκη καναμυκίνης εξασφαλίζεται η απουσία επιμολύνσεων. Κατά την διάρκεια της σύζευξης μετρήθηκε η κυτταρική πυκνότητα του Y2H G./LSK1 όχι μόνο μέσω φωτομέτρησης αλλά και με αιμοκυτταρόμετρο όπως προτείνει το πρωτόκολλο. Και στις δύο περιπτώσεις η κυτταρική πυκνότητα βρέθηκε ότι ήταν $>1 \times 10^8$, δηλαδή πάνω από το κατώτατο όριο που ορίζει το πρωτόκολλο. Στην πρώτη επανάληψη η καλλιέργεια της σύζευξης επώαστηκε περίπου 22 ώρες και έπειτα μία μικρή ποσότητα της καλλιέργειας (20μl) ελέγχθηκε κάτω από το μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X για την

ύπαρξη ζυγωτών κυττάρων (Εικόνα 29). Στην δεύτερη επανάληψη του πειράματος επιλέξαμε να αφήσουμε την καλλιέργεια να επωαστεί για 24 ώρες ώστε να αυξήσουμε την αποτελεσματικότητα της σύζευξης. Η παρουσία ζυγωτών με την μορφή ενός συσσωματώματος τριών κυττάρων παίρνει το σχήμα “Mickey Mouse” και αντικατοπτρίζει την επιτυχία της σύζευξης.



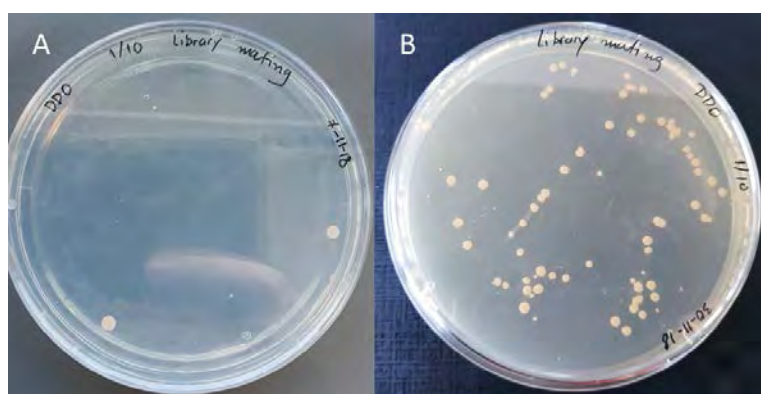
Εικόνα 29: Η καλλιέργεια της σύζευξης της LSK1 με την βιβλιοθήκη cDNA (1^η επανάληψη) κάτω από το μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 40X. Με τους κίτρινους κύκλους υποδεικνύονται στα ζυγωτά με τον φαινότυπο “Mickey Mouse”.

Μετά από τρεις μέρες, υπολογίστηκε η επιτυχία της σύζευξης με βάση τις αποικίες στα τρυβλία SD/-Trp, SD/-Leu και DDO. Η εξίσωση της αποτελεσματικότητας της σύζευξης είναι η εξής:

Mating Efficiency = (αριθμός αποικιών/ml των διπλοειδών/ αριθμός αποικιών/ml του limiting partner) x 100%

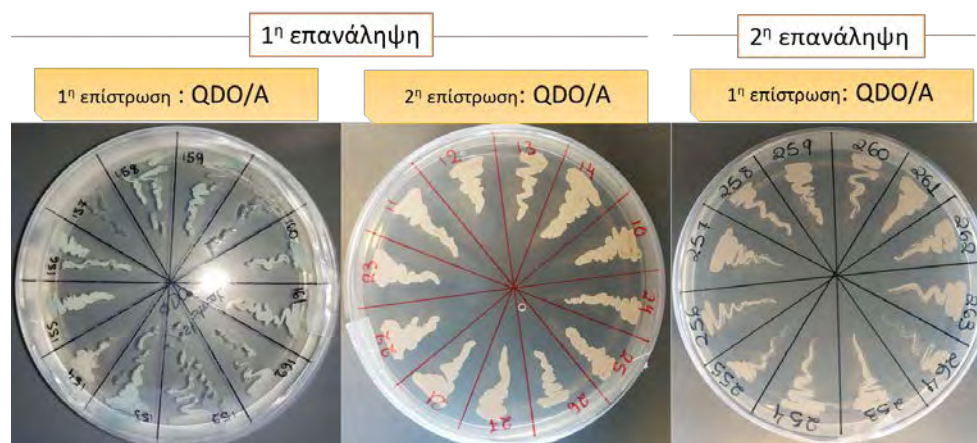
Με βάση την βιωσιμότητα των αποικιών στα τρυβλία SD/-Trp και SD/-Leu καθορίζεται ο limiting partner, δηλαδή το στέλεχος που έχει τις λιγότερες αποικίες στο επιλεκτικό του μέσο. Στην δική μας περίπτωση, και στις δύο επαναλήψεις παρατηρήσαμε ότι ο limiting partner ήταν ο Y187. Στην πρώτη επανάληψη του πειράματος παρατηρήθηκαν 2 αποικίες στο τρυβλίο DDO με αραιώση 1/10, δείγμα ότι η σύζευξη δεν ήταν αποτελεσματική και τα διπλοειδή κύτταρα στα οποία θα γίνει η διαλογή για αλληλεπιδράσεις είναι ελάχιστα, καθώς το πρωτόκολλο δίνει ενδεικτική τιμή 50 αποικίες στο DDO με αραιώση 1/1000. Στην δεύτερη επανάληψη της σύζευξης στο τρυβλίο DDO 1/10 εμφανίζονται 75 αποικίες. Ο υπολογισμός γίνεται ως εξής: $(75 \times 10 \times 10) / (131 \times 10 \times 1000) \times 100\% = 7500 / 1.310.000 \times 100\% = 0,57\%$ mating efficiency. Το πρωτόκολλο δίνει επιθυμητό εύρος για την αποτελεσματικότητα της σύζευξης 2-5%. Παρόλα αυτά, θεωρούμε ότι η διαφορά μίας τάξης μεγέθους είναι εύκολο να προκύψει καθώς ο υπολογισμός βασίζεται στην μέτρηση αποικιών μιας καλλιέργειας η ανάπτυξη της οποίας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες.

Επίσης, υπολογίστηκε ο αριθμός των κλώνων από τους οποίους θα γίνει το screening με βάση τα τρυβλία DDO (Εικόνα 30). Ο υπολογισμός έγινε με βάση τον όγκο επαναδιαλυτοποίησης των κυττάρων μετά τη σύζευξη (11,5 ml), του όγκου επίστρωσης (100μl) και των αποικιών σε ένα τρυβλίο συγκεκριμένης αραιώσης. Για την πρώτη επανάληψη υπολογίστηκε με βάση το DDO 1/10 : $11,5 \times 10 \times 2 \times 10 = 2.300$ κλώνοι ελέγχθηκαν για πιθανή αλληλεπίδραση με την LSK1. Ο αριθμός των κλώνων είναι πολύ μικρότερος από αυτόν που προτείνει το πρωτόκολλο (>1.000.000 κλώνοι), παρόλα αυτά συνεχίστηκε η διαλογή. Ο λόγος του μικρού αριθμού κλώνων οφείλεται στην χαμηλή αποτελεσματικότητα της σύζευξης που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στην δεύτερη επανάληψη της σύζευξης ο αριθμός των κλώνων είναι: $11,5 \times 10 \times 75 \times 10 = 86.250$ από τους οποίους θα γίνει screening των αλληλεπιδράσεων με την LSK1 .



Εικόνα 30: Τρυβλία DDO επιστρωμένα με την καλλιέργεια του πρώτου (A) και του δεύτερου (B) σύζευξη με αραιώση 1/10. Ο αριθμός των αποικιών αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα της σύζευξης.

Ακολούθησε επίστρωση των αποικιών σε τρυβλία TDO/X/A και μετά σε QDO/A (1^η επανάληψη) και σε τρυβλία QDO/A (2^η επανάληψη), (Εικόνα 31)

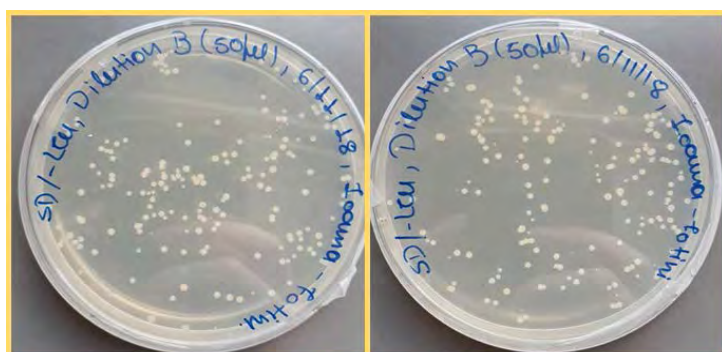


Εικόνα 31: Επίστρωση των αποικιών που προέκυψαν από τη σύζευξη σε πιο αυστηρό θρεπτικό μέσο. Απεικονίζονται ενδεικτικά 2 τρυβλία από την 1^η επίστρωση (DDO/X/A) και την δεύτερη (QDO/A) της 1^{ης} επανάληψης και 1 τρυβλίο από την 1^η επίστρωση (QDO/A) της 2^{ης} επανάληψης

Συνολικά, οι αποικίες που προέκυψαν από την 1^η επανάληψη της σύζευξης ήταν 83 και της 2^{ης} επανάληψης 1001 στα τρυβλία QDO/A. Οι αποικίες αυτές θα πρέπει να ελεγχθούν περαιτέρω για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης. Τα τρυβλία με τις αποικίες αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο στους 4°C.

3.7 Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης κλώνων στο στέλεχος Υ187

Παράλληλα με τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων της LSK1 με τα ενθέματα της βιβλιοθήκης έγινε και η τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης με βάση το πρωτόκολλο. Η αραιώση 1/100 (dilution A) στρώθηκε σε 2 τρυβλία SD/-Leu ενώ, η αραιώση 1/10.000 σε 10 τρυβλία SD/-Leu. Στην εικόνα 32 απεικονίζονται δύο αντιπροσωπευτικά τρυβλία SD/-Leu με αραιώση 1/10.000. Το μέγεθος των αποικιών ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος του ενθέματος.



Εικόνα 32: Τιτλοδότηση της βιβλιοθήκης cDNA με επίστρωση 50μl σε θρεπτικό SD/-Leu της αραιώσης 1/10.000.

Όλα τα τρυβλία που είχαν το Dilution B είχαν κατά μέσο όρο 200 αποικίες το καθένα. Έπειτα υπολογίσαμε:

$$\text{cfu/ml} = \frac{\text{Number of colonies}}{\text{plating volume (ml)} \times \text{dilution factor}} = \frac{200}{0,05\text{ml} \times 10^{-4}} = 4 \times 10^7$$

Το aliquot (1ml) της βιβλιοθήκης περιέχει $>2 \times 10^7$ αποικίες που συνιστά το πρωτόκολλο.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου ότι η βιοχημική απομόνωση συμπλεγμάτων πρωτεϊνών είναι μια κουραστική και απαιτητική διαδικασία, απαιτούνται εναλλακτικές μέθοδοι για την εύρεση πιθανών προσδετών. Το σύστημα δύο υβριδίων (Yeast Two-Hybrid) των Fields Stanley και Song Ok-kyu (1989) έχει αναδειχθεί ως η πιο επιτυχημένη από αυτές τις μεθόδους και έχει γίνει γρήγορα και ευρέως αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα. Η ταυτοποίηση των αλληλεπιδράσεων μέσω του συστήματος Yeast Two-Hybrid μπορεί να αποτελεί ένα εύκολο σύστημα ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αλλά παράλληλα απαιτεί αρκετά πρωταρχικά πειράματα για την μείωση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Το δικό μας πείραμα ξεκίνησε με την επιτυχή κλωνοποίηση της LSK1 στον φορέα pGBKT7 στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο με το DNA binding domain του μεταγραφικού παράγοντα GAL4. Η έκφραση της LSK1 επιβεβαιώθηκε στην ζύμη μέσω πειραμάτων συν-μετασχηματισμού του στελέχους Y2H Gold με τους πλασμιδιακούς φορείς pGBKT7-LSK1 και pGADT7-LSK1. Μέσω του πειράματος συν-μετασχηματισμού αποδείχθηκε ότι η LSK1, που αποτελεί μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια GSK3-like έχει την ικανότητα να εκφράζεται στην ζύμη αλλά και να αλληλεπιδρά με τον εαυτό της καθώς διμερίζεται, όπως έχει αποδειχθεί και σε προηγούμενη δουλειά του Garagounis το 2018. Το γεγονός αυτό μας δημιουργεί υποψίες για την αλληλεπίδραση της LSK1 με υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια RLK.

Τα πειράματα ελέγχου που ακολούθησαν είχαν ως στόχο τον έλεγχο της ικανότητας ανίχνευσης των αλληλεπιδράσεων του συστήματός μας (θετικό control) αλλά και την ικανότητά του να αποκλείει ψευδώς θετικές αλληλεπιδράσεις (αρνητικό control). Φυσικά, όμως, πριν γίνει οποιαδήποτε προσπάθεια ταυτοποίησης αλληλεπιδράσεων έπρεπε να ελεγχθεί ότι η LSK1 δεν προκαλεί τοξικότητα στην ζύμη και ότι δεν μπορεί από μόνη της και χωρίς την ύπαρξη πρωτεΐνης prey (θηράματος) να ενεργοποιήσει τα γονίδια αναφοράς. Η δοκιμασία αυτή επιτεύχθηκε με επιτυχία και αποδείχθηκε ότι η LSK1 ούτε προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων της ζύμης, ούτε ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς.

Όσον αφορά τα πειράματα pairwise mating (δοκιμές σύζευξης) επιλέχθηκαν δύο πρωτεΐνες υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των φυτικών κυττάρων, η BAK1 (SERK3) από το φυτό *Arabidopsis thaliana* και η ομόλογη πρωτεΐνη SERK3 από το

φυτό *Lotus japonicus*. Επίσης, ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση της LSK1 με την PUB13, φυτική U-box (PUB) E3 λιγάση της ουβικουιτίνης, και με την *LjERBB2*, την ομόλογη πρωτεΐνη-υποδοχέα κινάσης τυροσίνης ERBB2 του ανθρώπου.

Κανένα από τα πειράματα σύζευξης δεν ανέδειξε κάποια αλληλεπίδραση με την LSK1 γεγονός που δημιουργεί την υπόθεση ότι η LSK1 ίσως δεν εμπλέκεται στα πρώιμα στάδια του μονοπατιού σηματοδότησης των βρασσινοστεροειδών, δηλαδή ίσως δεν αλληλεπιδρά με κάποιον υποδοχέα που διμερίζεται με κάποιον συν-υποδοχέα για την πρωταρχική αναγνώριση των βρασσινοστεροειδών (πχ *AtBAK1-BIN2*). Επίσης, η μη αλληλεπίδραση της LSK1 με την PUB13 υποδεικνύει ότι τα επίπεδα της *LSK1* δεν βρίσκονται άμεσα υπό τον έλεγχο της PUB13, όπως έχει αποδειχθεί για τον υποδοχέα NFR5 και τον υποδοχέα FLS2. Τέλος, το γεγονός ότι η δεν υπάρχει αλληλεπίδραση με την *LjERBB2* μας προϊδεάζει ότι ίσως η LSK1 να μην να μην αλληλεπιδρά άμεσα με υποδοχείς κινάσης τυροσίνης. Βέβαια, καθώς τα πειράματα σύζευξης είναι πολύ εξειδικευμένα, τα αρνητικά αποτελέσματα αλληλεπίδρασης δεν υπονοούν ότι η LSK1 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες με παρόμοιο ρόλο με αυτές που εξετάστηκαν.

Η επιτυχής κατασκευή μιας βιβλιοθήκης cDNA που περιλαμβάνει όλα εκείνα τα μετάγραφα που εκφράζονται τρεις ώρες μετά την μόλυνση των ριζών του *Lotus japonicus* με το ριζόβιο *M.loti* ήταν απαραίτητη για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων της LSK1 σε ένα πείραμα μεγάλης κλίμακας. Οι δύο επαναλήψεις της σύζευξης ανέδειξαν 83 και 1001 αποικίες αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ του αριθμού των αποικιών οφείλεται στην απόδοση της σύζευξης διότι η δεύτερη αντίδραση σύζευξης επωάστηκε δύο ώρες παραπάνω. Συνολικά, οι 1084 αποικίες δεν αντικατοπτρίζουν 1084 διαφορετικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Το πιο πιθανό είναι ότι πολλές από αυτές περιέχουν το ίδιο ένθεμα cDNA που ίσως ήταν άφθονο στις ρίζες του φυτού.

Μέχρι στιγμής γίνονται προσπάθειες για την απομόνωση πλασμιδίου από τα κύτταρα της ζύμης με στόχο να διεξαχθεί colony PCR για τον έλεγχο των πολλαπλών ίδιων ενθεμάτων. Σε αντίθεση με τον μετασχηματισμό του *E.coli*, ο μετασχηματισμός του Y187 ενδέχεται να έχει σαν αποτέλεσμα την παρουσία περισσότερων από ένα πλασμιδίων στο ίδιο κύτταρο. Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει στην συνέχεια να γίνει αποκλεισμός των αποικιών που δεν περιέχουν το πλασμίδιο προς ταυτοποίηση μέσω διαδοχικών επιστρώσεων σε νέο θρεπτικό, διαδικασία που είναι γνωστή και ως segregation. Τέλος, αφού έχουν ανιχνευτεί μοναδικές αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητο να γίνει αποκλεισμός των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Το πείραμα

που προτείνεται είναι ο συν-μετασχηματισμός του στελέχους Y2H Gold με το πλασμίδιο pGBKT7-LSK1 και με το πλασμίδιο pGADT7-cDNA insert. Παράλληλα θα γίνει μετασχηματισμός του ίδιου στελέχους με τον άδειο φορέα pGBKT7 και με το πλασμίδιο pGADT7-cDNA insert για να αποδειχθεί ποιες πρωτεΐνες προκαλούν από μόνες τους την ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς.

Η LSK1 εκφράζεται στις ρίζες του *Lotus japonicus* ως απόκριση στην μόλυνση με το ριζόβιο βακτήριο *M. Loti*, υποδεικνύοντας τον ρόλο της στην διαμεσολάβηση της βακτηριακής μόλυνσης. Επιπλέον, το γεγονός ότι η σίγηση του γονιδίου της LSK1 αυξάνει τον αριθμό των φυματίων, επιβεβαιώνει τη συμμετοχή της LSK1 στον έλεγχο του τελικού αριθμού των φυματίων που θα σχηματιστούν. Βέβαια, ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την λειτουργία αυτή παραμένει άγνωστος. Η LSK1 φυσιολογικά συμμετέχει στην καταστολή της φυματιογένεσης σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης νιτρικών, πιθανών μέσω φωσφορυλίωσης ενός ή περισσότερων παραγόντων που οδηγούν στην σηματοδότηση μέσω των πεπτιδίων CLE-RS1/2 (Garagounis et al., 2018).

Οι ποικίλοι ρόλοι των κινασών GSK3 αναδύονται με την ταυτοποίηση των νέων υποστρωμάτων τους. Μέχρι στιγμής, παραμένουν αναπάντητα ερωτήματα όπως το αν οι φυτικές GSK3 αποτελούν έναν άμεσο συνδετικό κρίκο μεταξύ της σηματοδότησης κατά την ανάπτυξη και της δημιουργίας του κυτταροσκελετού καθώς και αν οι φυτικές GSK3 μοιράζονται κοινούς πρωτεϊνικούς στόχους και ρυθμιστές με τις ζωϊκές GSK3. Ο προσδιορισμός των ειδικών ρόλων των GSK ως απάντηση στα αναπτυξιακά και περιβαλλοντικά σήματα, καθώς και η διασταυρούμενη επικοινωνία τους με άλλες σηματοδοτικές οδούς, αποτελεί σημαντικό μελλοντικό πεδίο έρευνας. Η παρουσία της οικογένειας GSK3 σε φυτά σίγουρα υπόσχεται να δώσει πληροφορίες για διάφορες οδούς σηματοδότησης και να βελτιώσει την κατανόηση αυτών των φυσιολογικών διεργασιών σε μοριακό επίπεδο.

Φυσικά, η τεχνολογία που παρουσιάζεται εδώ είναι ένα σημείο εκκίνησης και όχι μια ολοκληρωμένη λύση για την αποσαφήνιση των δικτύων αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Η ανάπτυξη προσεγγίσεων υψηλής ακρίβειας σε κυτταρικό επίπεδο και η περαιτέρω πρόοδος στην βιοπληροφορική είναι απαραίτητες για να καταστήσουν την μελέτη των αλληλεπιδράσεων πλήρως αναπόσπαστο μέρος μιας προσέγγισης βιολογίας συστημάτων. Μόνο ένας συνδυασμός διαφορετικών προσεγγίσεων (π.χ.

Υ2Η, MS, βιοπληροφορικής) τελικά θα οδηγήσει σε ακριβή περιγραφή μεγάλων δικτύων αλληλεπίδρασης.

5. Βιβλιογραφία

1. Antolín-Llovera, M., Ried, M. K., & Parniske, M. (2014). Cleavage of the symbiosis receptor-like kinase ectodomain promotes complex formation with nod factor receptor 5. *Current Biology*, 24(4), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.053>
2. Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., ... BIRCHMEIER, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog conductin, with (B-catenin. *APC, and GSK3* (3. *Science*. 280: 596-599, 282(April), 24–27. Retrieved from [http://scholar.google.com/scholar?q=related:NE9jb-1Gvd0J:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5%5Cnfile:///Users/astocker/Library/Application Support/Papers2/Articles/1998/Behrens/APC and GSK3 \(3. *Science*. 280 596-599 Behrens 1998.pdf%5Cnpapers2://pu](http://scholar.google.com/scholar?q=related:NE9jb-1Gvd0J:scholar.google.com/&hl=en&num=20&as_sdt=0,5%5Cnfile:///Users/astocker/Library/Application%20Support/Papers2/Articles/1998/Behrens/APC%20and%20GSK3%20(3).%20Science.%20280%20596-599%20Behrens%201998.pdf%5Cnpapers2://pu)
3. Belkhadir, Y., Yang, L., Hetzel, J., Dangl, J. L., & Chory, J. (2014). The growth-defense pivot: Crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(10), 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.06.006>
4. Boller, L. G.-G. and T. (2000). FLS2: An LRR Receptor–like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in Arabidopsis, 5, 1003–1011. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80265-8)
5. Brasch, M. A., Hartley, J. L., & Vidal, M. (2004). ORFeome cloning and systems biology: Standardized mass production of the parts from the parts-list. *Genome Research*, 14(10 B), 2001–2009. <https://doi.org/10.1101/gr.2769804>
6. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2763–2788. <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>
7. Casson, S. A., & Hetherington, A. M. (2012). GSK3-like kinases integrate brassinosteroid signaling and stomatal development. *Science Signaling*, 5(233), 3–6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003311>
8. Cheng, Y., Zhu, W., Chen, Y., Ito, S., Asami, T., & Wang, X. (2014). Brassinosteroids control root epidermal cell fate via direct regulation of a MYB-BHLH-WD40 complex by GSK3-like kinases. *ELife*, 2014(3), 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.02525>
9. Chevray, P. M., & Nathans, D. (1992). Protein interaction cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Biochemistry*, 89(July), 5789–5793. <https://doi.org/10.1007/s11757-018-0477-0>
10. Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., ... Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05999>
11. Claisse, G., Charrier, B., & Kreis, M. (2007). The Arabidopsis thaliana GSK3/Shaggy like kinase AtSK3-2 modulates floral cell expansion. *Plant Molecular Biology*, 64(1–2), 113–124. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9138-y>
12. Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A., & Smith, P. M. C. (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Frontiers in Plant Science*, 5(December). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00699>
13. Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *The Plant Cell*, 23(4), 1219–1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
14. Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
15. COHEN, P., YELLOWLEES, D., AITKEN, A., DONELLA-DEANA, A., HEMMING, B. A., & PARKER, P. J. (1982). Separation and Characterisation of Glycogen Synthase Kinase 3, Glycogen Synthase Kinase 4 and Glycogen Synthase Kinase 5 from Rabbit Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, 124(1), 21–35. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05902.x>
16. Crook, A. D., Schnabel, E. L., & Frugoli, J. A. (2016). The systemic nodule number regulation kinase SUNN in *Medicago truncatula* interacts with MtCLV2 and MtCRN. *Plant Journal*, 88(1), 108–119. <https://doi.org/10.1111/tpj.13234>
17. D’Haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12(6), 79–105. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.6.79R>
18. Daniel J. Gage. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Department of Molecular and Cell Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut 06269*, 68(June), 203. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280>
19. Daniela Tsikou, Estrella E. Ramirez, Psarrakou, I. S., Wong, Jaslyn E., D. B., Jensen Isono, E., Radutoiu, S.,

- & Papadopoulou, K. K. (2018). A *Lotus japonicus* E3 ligase interacts with the Nod factor receptor 5 and positively 2 regulates nodulation, 37.
20. Desbrosses, G. J., & Stougaard, J. (2011). Root nodulation: A paradigm for how plant-microbe symbiosis influences host developmental pathways. *Cell Host and Microbe*, *10*(4), 348–358. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.005>
 21. Doble, B. W. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science*, *116*(7), 1175–1186. <https://doi.org/10.1242/jcs.00384>
 22. Dornelas, M. C., Lejeune, B., Dron, M., & Kreis, M. (1998). The Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK) gene family: Structure, organization and evolution. *Gene*, *212*(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00147-4)
 23. Dornelas, M. C., Van Lammeren, A. A. M., & Kreis, M. (2000). Arabidopsis thaliana SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *Plant Journal*, *21*(5), 419–429. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00691.x>
 24. Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology*, *24*(5), R184–R190. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.028>
 25. Ferguson, B. J., Mens, C., Hastwell, A. H., Zhang, M., Su, H., Jones, C. H., ... Gresshoff, P. M. (2018). Legume nodulation: The host controls the party. *Plant, Cell & Environment*, (April), 1–11. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
 26. Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., ... Daviet, L. (2005). Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. *Genome Research*, *15*(3), 376–384. <https://doi.org/10.1101/gr.2659105>
 27. Frame, S., & Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochemical Journal*, *359*, 1–16. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590001>
 28. Garagounis C., Tsikou D., Plitsi P.K., Psarrakou I.S., Avramidou M., Stedel C., Anagnostou M., Georgopoulou M.E., P. K. . (2018). Lotus Shaggy-like Kinase 1 is required to suppress nodulation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*.
 29. Gareth M. Thomas, Sheelagh Frame, Michel Goedert, Inke Nathke, Paul Polakis, P. C. (1999). A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of Axin and v-catenin. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01161-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01161-8)
 30. Hai Lan Piao, Jeong Hwa Lim, Soo Jin Kim, G.-W. C. and I. H. (2005). Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in *Arabidopsis* Hai, *27*, 305–314. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01099.x>
 31. Halford, N. G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M., & Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: Role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany*, *54*(382), 467–475. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg038>
 32. Handberg, K., & Stougaard, J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, *2*(4), 487–496. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00487.x>
 33. Heckmann, A. B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J. A., Bunnewell, S., Parniske, M., ... Downie, J. A. (2006). *Lotus japonicus* Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume. *Plant Physiology*, *142*(4), 1739–1750. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089508>
 34. Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., & Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(8), 4569–4574. <https://doi.org/10.5958/0974-0112.2017.00005.6>
 35. JARVIS, B. D. W., PANKHURST, C. E., & PATEL, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *32*(3), 378–380. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-3-378>
 36. Jia, L., Jianggi, W., Kevin, A. L., Jason, T. D., Franse, E. T., & John, C. W. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, *110*, 213–222. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00812-7)
 37. Jonak, C., Beisteiner, D., Beyerly, J., & Hirt, H. (2000). Wound-induced expression and activation of WIG, a novel glycogen synthase kinase 3. *The Plant Cell*, *12*(8), 1467–1475. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.8.1467>
 38. Jonak, C., & Hirt, H. (2002). Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: An emerging family with novel functions. *Trends in Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02331-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02331-2)
 39. Jun-Xian He, Joshua M. Gendron, Yanli Yang, Jianming Li, and Z.-Y. W. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Information*, *14*(7), 2293–2306. <https://doi.org/10.1073/pnas>
 40. Kakidani, H., & Ptashne, M. (1988). GAL4 activates gene expression in mammalian cells University, Cambridge, Massachusetts 02138. *Cell*, *52*(lane 1), 161–167.
 41. Kamboj, D., Kumar, R., Kumari, A., Kundu, B. S., & Pathak, D. (2008). *Rhizobia* , Nod Factors and

- Nodulation – a Review, 29(3), 200–206.
42. Kameshita, I., Nishida, T., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Umehara, Y., ... Tajima, S. (2005). Expression cloning of a variety of novel protein kinases in *Lotus japonicus*. *Journal of Biochemistry*, 137(1), 33–39. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi007>
 43. Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 231(4739), 699–704. <https://doi.org/10.1126/science.3080805>
 44. Koegl, M., & Uetz, P. (2007). Improving yeast two-hybrid screening systems. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 6(4), 302–312. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elm035>
 45. Kosslak, R. M., & Bohlool, B. B. (1984). Suppression of Nodule Development of One Side of a Split-Root System of Soybeans Caused by Prior Inoculation of the Other Side. *Plant Physiology*, 75(1), 125–130. <https://doi.org/10.1104/pp.75.1.125>
 46. Kouchi, H., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., Hakoyama, T., Nakagawa, T., Umehara, Y., ... Kawaguchi, M. (2010). How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1381–1397. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq107>
 47. Krusell, L., Sato, N., Fukuhara, I., Koch, B. E. V., Grossmann, C., Okamoto, S., ... Stougaard, J. (2011). The *Clavata2* genes of pea and *lotus japonicus* affect autoregulation of nodulation. *Plant Journal*, 65(6), 861–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04474.x>
 48. Li, J. (2003). Brassinosteroids signal through two receptor-like kinases. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 494–499. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00088-8)
 49. Li, J., Nam, K. H., Vafeados, D., & Chory, J. (2001). BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127(1), 14–22. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.14>
 50. Madsen, E. B., Antolín-Llovera, M., Grossmann, C., Ye, J., Vieweg, S., Broghammer, A., ... Parniske, M. (2011). Autophosphorylation is essential for the in vivo function of the *Lotus japonicus* Nod factor receptor 1 and receptor-mediated signalling in cooperation with Nod factor receptor 5. *Plant Journal*, 65(3), 404–417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04431.x>
 51. Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual. (2010). *Clontech*, 630499(630489), 1–41. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i4.890>
 52. Matthew J. Hart, Rico de los Santos, Iris N. Albert, B. R. and P. P. (1998). Downregulation of b-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, b-catenin and GSK3b. <https://doi.org/10.1109/TNSM.2017.2744807>
 53. Miyazawa, H., Oka-Kira, E., Sato, N., Takahashi, H., Wu, G.-J., Sato, S., ... Kawaguchi, M. (2010). The receptor-like kinase KLAVER mediates systemic regulation of nodulation and non-symbiotic shoot development in *Lotus japonicus*. *Development*, 137(24), 4317–4325. <https://doi.org/10.1242/dev.058891>
 54. Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y., Ito, M., Sakamoto, Y., Matsunaga, S., ... Suzuki, T. (2018). A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02831-x>
 55. Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., ... Frommer, W. B. (2004). K+ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12242–12247. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404467101>
 56. Okamoto, S., Shinohara, H., Mori, T., Matsubayashi, Y., & Kawaguchi, M. (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nature Communications*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms3191>
 57. Peters, N. K., Verma, D. P. S. (n.d.). Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions.
 58. Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., ... Foyer, C. H. (2005). Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*, 165(3), 683–701. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x>
 59. Rana Dajani, Elizabeth Fraser, S. Mark Roe, Neville Young, Valerie Good, T. C. D. and L. H. P. (2001). The Crystal Structures of Glycogen Synthase Kinase 3: Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) and Its Inhibitors: Drug Discovery and Development*, 105, 61–82. <https://doi.org/10.1002/0470052171.ch4>
 60. Reid, D. E., Ferguson, B. J., Hayashi, S., Lin, Y. H., & Gresshoff, P. M. (2011). Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation. *Annals of Botany*, 108(5), 789–795. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr205>
 61. Ruel, L., Bourouis, M., Heitzler, P., Pantesco, V., & Simpson, P. (1993). Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch. *Nature*, 362(6420), 557–560. <https://doi.org/10.1038/362557a0>
 62. Saidi, Y., Hearn, T. J., & Coates, J. C. (2012). Function and evolution of “green” GSK3/Shaggy-like kinases. *Trends in Plant Science*, 17(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.10.002>

63. Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., & Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms5983>
64. Satterlee, J. S., & Sussman, M. R. (1998). Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *Journal of Membrane Biology*, *164*(3), 205–213. <https://doi.org/10.1007/s002329900406>
65. Soyano, T., Hirakawa, H., Sato, S., Hayashi, M., & Kawaguchi, M. (2014). NODULE INCEPTION creates a long-distance negative feedback loop involved in homeostatic regulation of nodule organ production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(40), 14607–14612. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412716111>
66. Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., ... Wanker, E. E. (2005). A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell*, *122*(6), 957–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.029>
67. Stougaard, J. (2000). Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development. *Plant Physiology*, *124*(2), 531–540. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.531>
68. Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., ... Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, *417*, 959–962.
69. Tae-Wuk Kim, Shenheng Guan, Yu Sun, Zhiping Deng, Wenqiang Tang, Jian-Xiu Shang, Ying Sun, Alma L. Burlingame, Z.-Y. W. (2011). Brassinosteroid signal transduction from cell surface receptor kinases to nuclear transcription factors Shang3. *October*, *13*(10), 1208–1215. <https://doi.org/10.1038/ncb1970.Brassinosteroid>
70. Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., ... Kawaguchi, M. (2013). TOO MUCH LOVE, a novel kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the LEGUME-rhizobium symbiosis. *Plant and Cell Physiology*, *54*(4), 433–447. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct022>
71. Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., & Hemmings, B. A. (2003). NDR family of AGC kinases - Essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Letters*, *546*(1), 73–80. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00474-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00474-5)
72. Tichtinsky, G., Tavares, R., Takvorian, A., Schwebel-Dugué, N., Twell, D., & Kreis, M. (1998). An evolutionary conserved group of plant GSK-3/shaggy-like protein kinase genes preferentially expressed in developing pollen. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1442*(2–3), 261–273. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00187-0)
73. Tsikou, D., Yan, Z., Holt, D. B., Abel, N. B., Reid, D. E., Madsen, L. H., ... Markmann, K. (2018). Systemic control of legume susceptibility to rhizobial infection by a mobile microRNA. *Science*, *362*(6411), 233–236. <https://doi.org/10.1126/science.aat6907>
74. Uetz, P., Glot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., ... Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, *403*(6770), 623–627. <https://doi.org/10.1038/35001009>
75. Vert, G., Walcher, C. L., Chory, J., & Nemhauser, J. L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(28), 9829–9834. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803996105>
76. Vervoort, J., Vries, S. De, Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., ... de Vries, S. (2006). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 Protein Complex Includes. *The Plant Cell*, *18*(March), 626–638. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039412.1>
77. Yoo, M. J., Albert, V. A., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2006). Phylogenetic diversification of glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biology*, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-6-3>
78. Youn, J. H., & Kim, T. W. (2015). Functional insights of plant GSK3-like kinases: Multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways. *Molecular Plant*, *8*(4), 552–565. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.006>
79. Zhang, S., Cai, Z., & Wang, X. (2009). The primary signaling outputs of brassinosteroids are regulated by abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(11), 4543–4548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900349106>
80. Zhou, J., Lu, D., Xu, G., Finlayson, S. A., He, P., & Shan, L. (2015). The dominant negative ARM domain uncovers multiple functions of PUB13 in Arabidopsis immunity, flowering, and senescence. *Journal of Experimental Botany*, *66*(11), 3353–3366. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv148>