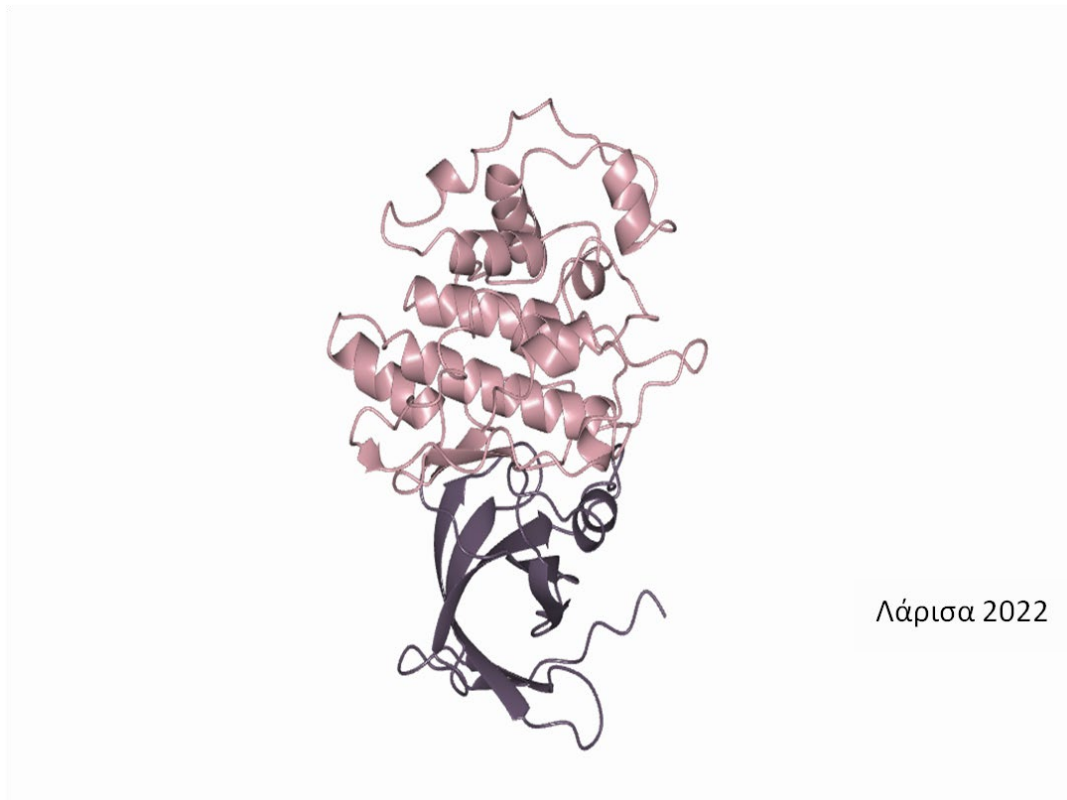




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΘΕΟΔΩΡΑ ΣΟΛΟΒΟΥ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ *GSK3β-like* ΚΙΝΑΣΗ *LjSK1* ΑΠΟ ΤΟ *Lotus japonicus*



«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ *GSK3β-like* ΚΙΝΑΣΗ
LjSK1 ΑΠΟ ΤΟ *Lotus japonicus***

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων):

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Καλλιόπη Παπαδοπούλου:

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Βασιλική Σκαμνάκη:

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων):

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Καλλιόπη Παπαδοπούλου:

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Βασιλική Σκαμνάκη:

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας-μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Νικόλαος Μπαλατσός:

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Γεώργιος Παπαδόπουλος:

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοφυσικής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

Σπυρίδων Ζωγράφος:

Ερευνητής Α', Εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, Ελλάδα

Γεώργιος Κοντοπίδης:

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα

ΘΕΟΔΩΡΑ ΣΟΛΟΒΟΥ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ *GSK3β-like* ΚΙΝΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ
Lotus japonicus

ΘΕΟΔΩΡΑ ΣΟΛΟΒΟΥ

2022

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ *GSK3β-like* ΚΙΝΑΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΦΥΤΟ

Lotus japonicus

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 11

Συνολικός αριθμός σελίδων: 224

Αριθμός πινάκων: 6

Αριθμός εικόνων: 90

Αριθμός παραρτημάτων: 1

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 289

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιαστεί στην παρακάτω δημοσίευση

Solovou T.G.A., Garagounis C., Kyriakis E., Bobas C., Papadopoulos G.E., Skamnaki V.T., Papadopoulou K.K., Leonidas D.D., Mutagenesis of a Lotus japonicus GSK3 β /Shaggy-like kinase reveals functionally conserved regulatory residues. *Phytochemistry*. 2021 Jun;186:112707. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112707. Epub 2021 Mar 13.

Δημοσιεύσεις σε συναφές αντικείμενο

Lawson C, Ahmed Alta TB, Moschou G, Skamnaki V, **Solovou TGA**, Topham C, Hayes J, Snape TJ., Novel diarylamides and diarylureas with N-substitution dependent activity against medulloblastoma. *Eur J Med Chem*. 2021 Dec 5;225:113751. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113751. Epub 2021 Aug 9.

Kyriakis E, Karra AG, Papaioannou O, **Solovou T**, Skamnaki VT, Liggri PGV, Zographos SE, Szennyes E, Bokor É, Kun S, Psarra AG, Somsák L, Leonidas DD., The architecture of hydrogen and sulfur σ -hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C- β -d-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N- β -d glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase and offer new insights to structure-based design. *Bioorg Med Chem*. 2020 Jan 1;28(1):115196. doi: 10.1016/j.bmc.2019.115196. Epub 2019 Nov 14.

Kyriakis E*, **Solovou TGA***, Kun S, Czifrák K, Szócs B, Juhász L, Bokor É, Stravodimos GA, Kantsadi AL, Chatzileontiadou DSM, Skamnaki VT, Somsák L, Leonidas DD., Probing the β -pocket of the active site of human liver glycogen phosphorylase with 3-(C- β -d-glucopyranosyl)-5-(4-substituted-phenyl)-1, 2, 4-triazole inhibitors. *Bioorg Chem*. 2018 Apr;77:485-493. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.02.008. Epub 2018 Feb 12. (* equally contributed).

Bokor É, Kyriakis E, **Solovou TGA**, Koppány C, Kantsadi AL, Szabó KE, Szakács A, Stravodimos GA, Docsa T, Skamnaki VT, Zographos SE, Gergely P, Leonidas DD, Somsák L., Nanomolar Inhibitors of Glycogen Phosphorylase Based on β -d-Glucosaminy Heterocycles: A Combined Synthetic, Enzyme Kinetic, and Protein Crystallography Study. *J Med Chem*. 2017 Nov 22;60(22):9251-9262. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01056. Epub 2017 Oct 3.

Stravodimos GA, Kantsadi AL, Apostolou A, Kyriakis E, Kafaski-Kanelli VN, **Solovou T**, Gatzona P, Liggri PGV, Theofanous S, Gorgogietas VA, Kissa A, Psachoula C, Lemonakis A, Chatzileontiadou DSM, Psarra AG, Skamnaki VT, Haroutounian SA, Leonidas DD., Affinity Crystallography Reveals the Bioactive Compounds of Industrial Juicing Byproducts of *Punica granatum* for Glycogen Phosphorylase. *Curr Drug Discov Technol.* 2018;15(1):41-53. doi: 10.2174/1570163814666170619091736.

Kantsadi AL, Stravodimos GA, Kyriakis E, Chatzileontiadou DSM, **Solovou TGA**, Kun S, Bokor É, Somsák L, Leonidas DD., van der Waals interactions govern C-β-d-glucopyranosyl triazoles' nM inhibitory potency in human liver glycogen phosphorylase. *J Struct Biol.* 2017 Jul;199(1):57-67. doi: 10.1016/j.jsb.2017.05.001. Epub 2017 May 5.

Ευχαριστίες

Πάντα οι ευχαριστίες με δυσκόλευαν πολύ, άλλωστε είναι δύσκολο να χωρέσεις σε λίγες γραμμές όλα όσα θα ήθελες να πεις στους ανθρώπους που βρίσκονται δίπλα σου και σε στηρίζουν σε κάθε σου βήμα. Και ελπίζεις, πως μέσα στην πάροδο του χρόνου και εν μέσω όλων των καταστάσεων που ζήσατε και συνεχίζετε να ζείτε μαζί, να έχεις καταφέρει με τις πράξεις σου να τους αποδείξεις την ευγνωμοσύνη σου και τον σεβασμό σου προς αυτούς. Να τους έχεις γυρίσει πίσω έστω και το ελάχιστο από αυτό που πρόσφεραν. Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής πέρα από τον ενθουσιασμό και την αγάπη για μάθηση, κρύβει δυσκολίες, αποτυχίες και πολλές μα πάρα πολλές στιγμές αμφισβήτησης. Η στήριξη λοιπόν των ανθρώπων γύρω σου, αποτελεί κινητήριο δύναμη να ξεπερνάς τα εμπόδια και να πλησιάζεις όλο και περισσότερο τον στόχο σου.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής, Καθ. Δημήτριο Λεωνίδα για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου ώστε να φέρω εις πέρας αυτό το εγχείρημα. Ίσως να είδε κάτι σε εμένα πολύ πριν το εντοπίσω εγώ για τον ίδιο μου τον εαυτό και ήταν πάντα παρών να με καθοδηγήσει, να με στηρίξει και να μου υπενθυμίσει πού ανήκω και για τι προορίζομαι. Ερχόμενη από μία διαφορετική σχολή και άρα με την αίσθηση πολλές φορές ότι βρίσκομαι 'έξω από τα νερά μου', η επίβλεψή του και η επιμονή του με έκαναν να συνειδητοποιώ ότι έχω μπροστά μου όλες τις κουκίδες και απλά πρέπει να βρω τρόπο να τις ενώσω. Μου έδωσε λοιπόν, το βασικότερο μάθημα όλων, ότι η παραίτηση δεν είναι επιλογή καθώς η λύση είναι πάντα παρούσα αρκεί να ξέρω πώς να την αναζητήσω.

Αντίστοιχα σημαντική, ήταν και η συνεισφορά της Επικ. Καθ. Βασιλικής Σκαμνάκη καθώς ήταν η πρώτη καθηγήτρια που με ανέλαβε μετά τον ερχομό μου από το τμήμα Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων και εκπόνησα το μεταπτυχιακό μου δίπλωμα υπό την επίβλεψή της. Θα μπορούσα να πω, πως ήταν η αρχή των πάντων, καθώς η συνεργασία μας άνοιξε την πόρτα του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και έθεσε τα πάντα σε τροχιά ώστε να είμαι σε αυτή τη θέση τώρα και να γράφω τις ευχαριστίες της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης θερμά θα ευχαριστήσω και το τρίτο μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, Καθ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, που εμπιστεύτηκε τη συγκεκριμένη ερευνητική δουλειά σε εμένα και το εργαστήριο μας, πιστεύοντας στις ικανότητές μου και έχοντας πάντα την αυτοπεποίθηση ότι θα το φέρω εις πέρας. Την ευχαριστώ επίσης και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο της και να εντρυφήσω σε νέες τεχνικές, διευρύνοντας τις γνώσεις μου και στηρίζοντας με πάντα με τα σωστά λόγια.

Επιπλέον ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθ. Γεώργιο Κοντοπίδη, Ερευνητή Α' Δρ. Σπύρο Ζωγράφο (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών), Επικ. Καθ. Νικόλαο Μπαλατσό και Αν. Καθ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για το χρόνο που διέθεσαν να διαβάσουν και να κρίνουν τη διδακτορική διατριβή. Πιο ειδικά, ευχαριστώ τον Αν. Καθ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για τη συνεισφορά του και τη συνεργασία του στη δημοσιευμένη εργασία σε διεθνές επιστημονικό περιοδικό. Ευχαριστώ επίσης, τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Αν. Καθ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επικ. Καθ. Περσεφόνη Γιαννούλη και Επικ. Καθ. Μαρία Κοντού για τη συνεργασία τους.

Για τα απαραίτητα χαλαρωτικά διαλείμματα, την ψυχολογική τους στήριξη αλλά και τις πολύτιμες συμβουλές τους θα ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες μου: Ραφαηλία Μπέτα, Ευθύμιος Κυριάκης, Ιωάννης Τσιάλτας, Γεώργιος Στραβοδήμος, Συμεών Κούλας και Αναστασία Τσαγκαράκου. Είτε στα γέλια, είτε στα κλάματα ήσασταν πάντα εκεί και με τον τρόπο σας καταφέρνατε πάντα να ελαφρύνετε το φορτίο. Γνωρίζω ότι αυτές οι γραμμές δεν είναι αρκετές αλλά θα αφήσω ένα Ζωναράδικο ή έναν Ικαριώτικο που θα χορέψουμε μαζί, να πει τα υπόλοιπα. Μέσα από την καρδιά μου ευχαριστώ επίσης και τους υπόλοιπους φίλους και συνεργάτες που διασταυρώθηκαν οι ζωές μας όλα αυτά τα χρόνια: Χριστίνα Δράκου, Θάνος Κυρίτης, Χαρά Ψαχούλα, Αναστασία Γκούσκου, Όλγα Παπαϊωάννου, Σέφης Αλεξόπουλος, Αχιλλέας Γεωργαντόπουλος, Διονύσης Αντωνόπουλος, Ζωή Αρσενόπουλου, Ειρήνη Παπαναστάση, Φωτεινή Καλούση και Κατερίνα Καρρά. Η καθημερινότητα στο εργαστήριο γινόταν όλο και πιο όμορφη χάρη στη συναναστροφή μας και την άριστη παρέα σας. Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα τον Δρ. Κωνσταντίνο Καραγκούννη που με υπέμεινε και με βοήθησε σε ότι και αν

χρειάστηκα. Η στήριξή του αποτελούσε πάντα οδηγό και η φιλία του είναι ανεκτίμητη.

Ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χορήγηση υποτροφίας για την υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής.

Σημαντικό κομμάτι της πορείας μου κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής αποτέλεσαν και οι αγαπημένοι μου φίλοι εκτός εργαστηρίου. Για τις ατελείωτες ώρες γέλιου και για την ψυχική ανάταση που μου προσφέρουν εδώ και πολλά χρόνια ευχαριστώ τους: Γεωργία Λαμπρογιάννη, Δήμητρα Σακελλαρίου, Αλεξάνδρα Νάρη, Κωστή Γκριζιώτη, Μάριο Παπανικολάου, Δημήτριο Λειβαδιώτη, Μαργαρίτα Τσιρογιάννη, Διονυσία Βατσάκη, Ελένη Κατσιβελου, Ελευθερία Πίτσα και Ματίνα Καρακώστα.

Χωρίς την στήριξη της οικογένειάς μου, δεν θα είχα καταφέρει να φτάσω το στόχο μου. Είναι πάντα εκεί, έτοιμοι να θυσιάσουν και να υποστούν το οτιδήποτε, αρκεί να εξασφαλίσουν ένα χαμόγελο στο πρόσωπό μου. Για το λόγο αυτό νιώθω ευγνωμοσύνη για τα αδέρφια μου Βασιλική Σολοβού, Αλέξανδρος Σολοβός, Χρήστος Σολοβός και Γεώργιος Ράπτης, τη θεία μου Αικατερίνη Σαμούρη και τους γονείς μου Γεώργιο Σολοβό και Αλεξάνδρα Σαμούρη, που με στήριζαν σε κάθε βήμα, οικονομικά και ηθικά, και δεν με άφησαν ποτέ να απογοητευτώ και να παραιτηθώ. Και τέλος φυσικά, οι μικρές ανιψιές μου Έλενα και Αλεξάνδρα Ράπτη των οποίων η αγνή αγάπη με ωθεί να κατακτήσω το άπειρο επαναλαμβάνοντάς τους πάντα «να τολμάς να μαθαίνεις».

Αφιερώνεται στις ανιψιές μου,

Έλενα & Αλεξάνδρα Ράπτη

“Sapere aude”

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	- 6 -
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 8 -
1.1. Κινάσες	- 8 -
1.1.1. Φωσφορυλίωση	- 15 -
1.1.2. Κινάση της Συνθάσης του Γλυκογόνου GSK3	- 17 -
1.1.2.1. Ισομορφές	- 18 -
1.1.2.2. Έκφραση	- 19 -
1.1.2.3. Δομή	- 20 -
1.1.2.4. Ρύθμιση	- 24 -
1.1.2.5. Σηματοδότηση.....	- 26 -
1.1.2.6. Ασθένειες	- 28 -
1.1.3. Καλμοδουλίνη	- 29 -
1.2. GSK3 στα φυτά	- 32 -
1.2.1. Βιολογικές λειτουργίες των φυτικών GSK.....	- 33 -
1.2.1.1. Ανάπτυξη φυτών	- 35 -
1.2.1.2. Ανάπτυξη αναπαραγωγικών οργάνων.....	- 37 -
1.2.2. Πολλαπλές λειτουργίες των GSK3 ως απόκριση σε στρες.....	- 39 -
1.2.2.1. Αβιοτικές καταπονήσεις και συμμετοχή των GSK3	- 39 -
1.2.2.2. Βιοτικές καταπονήσεις και συμμετοχή των GSK3.....	- 41 -
1.2.2. GSK3 των φυτών και σηματοδοτικά μονοπάτια	- 43 -
1.2.3. Δομή	- 45 -
1.3. Το φυτό <i>Lotus japonicus</i>	- 47 -
1.3.1. Συμβιωτικές σχέσεις.....	- 50 -
1.3.1.1. Συμβιωτική καθήλωση αζώτου (SNF)	- 51 -
1.3.1.2. <i>Lotus japonicus</i> και συμβιωτικοί εταίροι	- 54 -

1.3.2. Ο ρόλος του <i>Lotus japonicus</i> πέρα από την καθήλωση αζώτου	- 55 -
1.4. Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών	- 57 -
1.4.1. Κρύσταλλοι πρωτεϊνών	- 58 -
1.4.1.1. Στάδια κρυστάλλωσης και διάγραμμα φάσης	- 60 -
1.4.1.2. Μέθοδοι κρυστάλλωσης	- 62 -
1.4.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση	- 64 -
1.4.2. Περίθλαση ακτίνων-Χ.....	- 65 -
1.4.2.1. Δείκτες <i>Miller h, k, l</i>	- 68 -
1.4.2.2. Ο νόμος του Bragg.....	- 69 -
1.4.2.3. Μετασχηματισμοί <i>Fourier</i>	- 71 -
1.4.2.4. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας	- 73 -
1.4.2.5. Αξιολόγηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	- 74 -
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	- 76 -
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	- 77 -
3.1. Χαρακτηρισμός <i>LjSK1</i>	- 77 -
3.1.1. Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών <i>E. coli</i>	- 77 -
3.1.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης <i>LjSK1</i>	- 78 -
3.1.3. Υπερέκφραση της <i>LjSK1</i> στο ετερόλογο σύστημα <i>E.coli</i>	- 80 -
3.1.4. Λύση βακτηριακών κυττάρων	- 81 -
3.1.5. Έλεγχος πρωτεόλυσης της διαλυτής <i>LjSK1</i>	- 82 -
3.1.6. Καθαρισμός της <i>LjSK1</i> με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (<i>FPLC</i>).....	- 83 -
3.1.6.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>LjSK1 No. 1</i>	- 85 -
3.1.6.2. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>LjSK1 No. 2</i>	- 88 -
3.1.6.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>LjSK1 No. 3</i>	- 89 -
3.1.6.4. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>LjSK1 No. 4</i>	- 90 -
3.1.7. Ανοσοαποτύπωση <i>Western blot</i>	- 92 -
3.1.8. Στοχευμένες σημειακές μεταλλάξεις	- 93 -
3.1.9. Καθαρισμός των μεταλλαγμάτων με <i>FPLC</i>	- 94 -

3.1.10. Κατασκευή περικεκομμένης <i>LjSK1</i> ₁₃₉₋₄₆₇	- 95 -
3.1.11. Καθαρισμός των περικεκομμένων <i>LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ και <i>LjSK1</i> ₁₃₉₋₄₆₇	- 96 -
3.1.12. Κινητικές μελέτες	- 96 -
3.1.12.1. Θερμοκρασία και <i>pH</i>	- 97 -
3.1.12.2. Διοσθενές ιόν	- 98 -
3.1.12.3. Κινητικές παράμετροι	- 99 -
3.1.12.4. <i>IC</i> ₅₀	- 101 -
3.1.13. Κρυσταλλογραφία	- 102 -
3.1.13.1. Σχηματισμός πρωτεϊνικών κρυστάλλων	- 103 -
3.1.13.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων περίθλασης ακτίνων-Χ	- 104 -
3.2. <i>In planta</i> πειράματα της <i>LjSK1</i>	- 107 -
3.2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων ειδικών για μετασχηματισμό φυτών	- 107 -
3.2.2. Μετασχηματισμός φυτών	- 110 -
3.2.3. Ανάπτυξη φυτών και σχηματισμός φυματίων	- 112 -
3.2.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	- 113 -
3.3. Παραγωγή συνθετικής πρωτεΐνης <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 113 -
3.3.1. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα	- 115 -
3.3.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης <i>CjALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 118 -
3.3.3. Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 119 -
3.3.4. Έλεγχος δραστηριότητας της <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ παρουσία <i>Ca</i> ²⁺	- 121 -
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 122 -
4.1. Χαρακτηρισμός <i>LjSK1</i>	- 122 -
4.1.1. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης	- 122 -
4.1.1.1. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης <i>LjSK1</i>	- 122 -
4.1.1.2. Δοκιμή έκφρασης στο μετάλλαγμα <i>LjSK1 Arg178Ala</i>	- 123 -
4.1.1.3. Δοκιμή έκφρασης στο μετάλλαγμα <i>LjSK1 Lys278Ala</i>	- 124 -
4.1.2. Έλεγχος πρωτεόλυσης της διαλυτοποιημένης <i>LjSK1</i>	- 125 -
4.1.3. Καθαρισμός της <i>LjSK1</i> με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (<i>FPLC</i>)	- 126 -

4.1.3.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>LjSK1 No. 4</i>	- 127 -
4.1.4. Σύγκριση της πρωτοταγούς δομής της <i>LjSK1</i>	- 131 -
4.1.5. Στοχευμένες σημειακές μεταλλάξεις	- 132 -
4.1.6. Υπερέκφραση και απομόνωση μεταλλαγμάτων.....	- 133 -
4.1.7. Κατασκευή του πλασμιδίου για την έκφραση της περικεκομμένης μορφή <i>LjSK1₁₃₉₋₄₆₇</i> . -	136 -
4.1.8. Υπερέκφραση και απομόνωση <i>LjSK1₉₀₋₄₆₇</i>	- 137 -
4.1.9. Υπερέκφραση και απομόνωση <i>LjSK1₁₃₉₋₄₆₇</i>	- 142 -
4.1.10. Ανοσοαποτύπωση <i>Western blot</i>	- 144 -
4.1.11. Κινητικές μελέτες	- 145 -
4.1.11.1. Θερμοκρασία και <i>pH</i>	- 146 -
4.1.11.2. Διοθενές κατιόν	- 147 -
4.1.11.3. Κινητικές παράμετροι	- 148 -
4.1.11.3.1. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1</i>	- 149 -
4.1.11.3.2. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1₉₀₋₄₆₇</i>	- 150 -
4.1.11.3.3. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1 Ser9Ala</i>	- 151 -
4.1.11.3.4. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1 Arg178Ala</i>	- 152 -
4.1.11.3.5. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1 Tyr298Ala</i>	- 153 -
4.1.11.3.6. Κινητικές παράμετροι <i>LjSK1 Lys167Ala</i>	- 153 -
4.1.11.3.7. Σύγκριση κινητικών παραμέτρων	- 154 -
4.1.11.4. <i>IC₅₀</i>	- 156 -
4.1.11.4.1. <i>IC₅₀ Lupeol</i> για την <i>LjSK1</i>	- 158 -
4.1.11.4.2. <i>IC₅₀ Betulinic acid</i> για την <i>LjSK1</i>	- 159 -
4.1.11.4.3. <i>IC₅₀ Hederacoside C</i> για την <i>LjSK1</i>	- 160 -
4.1.11.4.4. % δραστικότητα της <i>LjSK1₉₀₋₄₆₇</i> με <i>Lupeol</i>	- 160 -
4.1.11.4.5. <i>IC₅₀ Betulinic acid</i> για την <i>LjSK1₉₀₋₄₆₇</i>	- 161 -
4.1.11.4.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων <i>IC₅₀</i>	- 162 -
4.1.12. Κρυσταλλογραφία	- 165 -

4.1.12.1. Ανάπτυξη κρυστάλλων	- 165 -
4.1.12.2. Επίλυση κρυσταλλικής δομής <i>LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 166 -
4.1.12.3. Υπέρθεση κρυσταλλικής δομής <i>LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ και ανθρώπινης <i>GSK3β</i>	- 173 -
4.2. <i>In planta</i> πειράματα της <i>LjSK1</i>	- 178 -
4.2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων ειδικών για μετασχηματισμό φυτών	- 178 -
4.2.2. Ανάπτυξη φυτών και σχηματισμός φυματίων	- 179 -
4.2.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	- 180 -
4.2.4. Ερμηνεία αποτελεσμάτων	- 182 -
4.3. Παραγωγή συνθετικής πρωτεΐνης <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 184 -
4.3.1. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα	- 184 -
4.3.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 185 -
4.3.3. Υπερέκφραση και απομόνωση της <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇	- 186 -
4.3.3.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ No.1	- 187 -
4.3.3.2. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ No.2.....	- 189 -
4.3.3.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ No.3.....	- 193 -
4.3.4. Έλεγχος δραστηριότητας της <i>CALM-LjSK1</i> ₉₀₋₄₆₇ παρουσία Ca^{2+}	- 194 -
Summary.....	- 196 -
Παράρτημα.....	- 198 -
Βιβλιογραφία	- 201 -

Περίληψη

Η οικογένεια των κινασών συνθάσης του γλυκογόνου 3, παραμένει συντηρημένη σε όλη την ευκαρυωτική εξέλιξη, από τις ζύμες στα φυτά και τα θηλαστικά. Μελετήσαμε την κινάση *LjSK1* του φυτού *Lotus japonicus* που ομοιάζει με τις *GSK3* των θηλαστικών και είχε προηγουμένως αποδειχτεί η συμμετοχή της στην ανάπτυξη φυματίων. Ο καθαρισμός και η απομόνωση του ενζύμου βασίστηκε σε κλασικές μεθόδους υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών και με σκοπό να συγκριθεί η *LjSK1* με τις ομόλογες κινάσες των θηλαστικών, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ενζυμικής κινητικής και μεταλλαξιογένεσης. Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα προ-φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο, η *LjSK1* επέδειξε βέλτιστη δραστικότητα κινάσης σε τιμή pH 8.0 στους 20 °C, ακολουθώντας κινητική *Michaelis-Menten* και με κινητικές παραμέτρους K_m και V_{max} ως προς *ATP*, 8.2 μM και 111.6 $nmol/min/mg$ αντίστοιχα.

Επιλέχθηκαν να πραγματοποιηθούν στοχευμένες μεταλλάξεις στα αμινοξικά κατάλοιπα *Ser9*, *Tyr298*, *Arg178*, *Lys287* και *Lys167* τα οποία αντικαταστάθηκαν από *Ala*. Μέσω κινητικών μελετών, αποδείχθηκε ο συντηρημένος ρόλος του καταλοίπου *Lys167* ως κύριο αμινοξύ της καταλυτικής τριάδας του ενζύμου, ενώ παράλληλα αποσαφηνίστηκε πως τα αντίστοιχα κατάλοιπα που σχετίζονται με την εξειδίκευση του υποστρώματος στο ανθρώπινο ένζυμο, δεν έχουν τον αντίστοιχο σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εξειδίκευσης της *LjSK1*. Επιπρόσθετες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φορέα που εκφράζει την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ υπέδειξαν ένα διαφορετικό μηχανισμό ρύθμισης της *LjSK1*, μέσω της πρωτεόλυσης τμήματος του *N*-τελικού άκρου της αρχικής πρωτεΐνης καθώς η απομάκρυνση 89 αμινοξέων αύξησε την καταλυτική ικανότητα σχεδόν δύο φορές. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η επίδραση των τριτερπενίων *Lupeol*, *Betulinic acid* και *Hederacoside C* στη δραστικότητα της *LjSK1* αποκαλύπτοντας ισχυρή αναστολή.

Επιλύθηκε η τρισδιάστατη δομή της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ σε ευκρίνεια 2.90 Å, παρέχοντας για πρώτη φορά πληροφορίες και δεδομένα που αφορούν μία κινάση που προέρχεται από τα φυτά και ομοιάζει με τις *GSK3* των θηλαστικών. Οι σημαντικότερες διαφορές

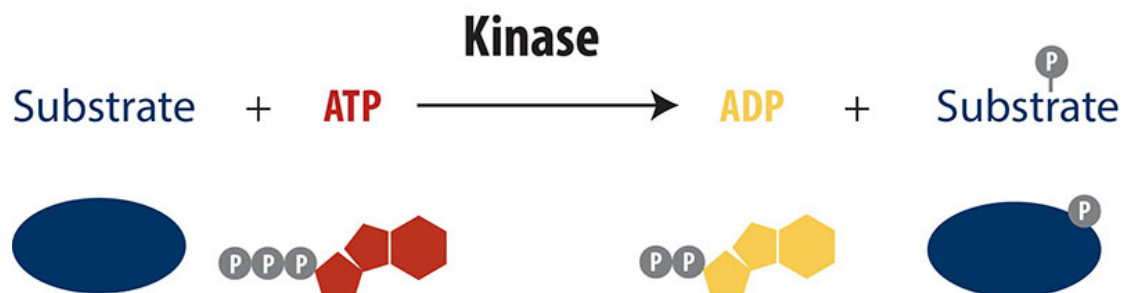
με την ανθρώπινη ομόλογη *GSK3β* παρατηρήθηκαν στο *N*- και *C*-λοβό της *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ύπαρξης ενός διαφορετικού μηχανισμού ρύθμισης των φυτικών *GSK3*. Παράλληλα, οι ομοιότητες στην αρχιτεκτονική σημαντικών λειτουργικών περιοχών, όπως το καταλυτικό κέντρο και η θέση πρόσδεσης της *ATP* εξηγούν τις κοινές λειτουργίες που εμφανίζουν οι δύο πρωτεΐνες.

Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε ο βιολογικός ρόλος των μεταλλαγμένων μορφών της *LjSK1*, *K167A* και *Y298A*, καθώς και της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇* στο ίδιο το φυτό και αποκαλύφθηκε ο φαινότυπος τους στην ανάπτυξη των φυματίων και των πλευρικών ριζών. Τέλος, μέσω τεχνικών συνθετικής βιολογίας παράχθηκε μία νέα συνθετική ασβεστοεξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, η *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*, η οποία φέρει στοιχεία της *LjSK1* και της ανθρώπινης καλμοδουλίνης. Σκοπός ήταν η νέα πρωτεΐνη να εμφανίζει προστατευτική δράση έναντι προσβολής φυτών από έντομα. Έλεγχος μέσω κινητικών μελετών απέδειξε αύξηση της δραστηριότητας της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* παρουσία Ca^{2+} .

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κινάσες

Διάφορες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως η φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, ουβικιτινίωση, νιτροζυλίωση, ακυλίωση, μεθυλίωση, λιπιδίωση και πρωτεόλυση, είναι υπεύθυνες για την αύξηση της ποικιλομορφίας του πρωτεώματος [1, 2]. Μία από τις πλέον διαδεδομένες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση, μία αντίδραση που καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τις κινάσες. Οι κινάσες πρωτεϊνών είναι βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας και αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και λειτουργικά πιο διαφοροποιημένες οικογένειες πρωτεϊνών. Παρότι τα γονίδια των κινασών πρωτεϊνών αποτελούν μόλις το 2% του γονιδιώματος των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών, οι κινάσες φωσφορυλιώνουν περισσότερο από το 30% των κυτταρικών πρωτεϊνών [3]. Καταλύοντας την μεταφορά μιας γ-φωσφορικής ομάδας από ένα υψηλής ενέργειας μόριο όπως η *ATP* σε ποικιλία υποστρωμάτων [Εικόνα 1], ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία έχουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών [4, 5].



Εικόνα 1. Ο μηχανισμός λειτουργίας των κινασών. Μεταφορά φωσφορικής ομάδας από ένα μόριο *ATP* στο αντίστοιχο υπόστρωμα με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση του υποστρώματος και την δημιουργία ενός μορίου *ADP* [6].

Οι δύο βασικοί τρόποι ταξινόμησης των κινασών βασίζονται στην εξειδίκευση του υποστρώματος και στην αμινοξική αλληλουχία της καταλυτικής επικράτειας [7]. Η εξειδίκευση του υποστρώματος αφορά τα αμινοξικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνει η εκάστοτε κινάση. Για το λόγο αυτό υπάρχουν οι κινάσες *Tyr* και οι κινάσες *Ser/Thr* που φωσφορυλιώνουν τα αντίστοιχα αμινοξέα, καθώς επίσης και οι κινάσες διπλής εξειδίκευσης που είναι ικανές να φωσφορυλιώνουν είτε κατάλοιπα *Thr* είτε *Tyr*. Έχουν αναγνωριστεί επίσης κινάσες που φωσφορυλιώνουν τα αμινοξέα *His* και *Asp/Glu* και απαντώνται κυρίως στους προκαρυώτες ενώ στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς συμμετέχουν ελάχιστα στη σηματοδότηση. Και στις τρεις κύριες κατηγορίες, ο καταλυτικός πυρήνας παραμένει καλά συντηρημένος και περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης της *ATP* (*ATP-binding pocket*) η οποία είναι πλούσια σε γλυκίνες που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο [8]. Στην ταξινόμηση με βάση την αμινοξική αλληλουχία του καταλυτικού κέντρου, το ανθρώπινο Κίνομα [9] χωρίζεται στις εξής επτά κύριες οικογένειες: 1) *AGC* που αποτελείται από τις κινάσες πρωτεϊνών *A*, *G* και *C*, 2) *CAMP* που περιλαμβάνει *Ca²⁺/CAM*-εξαρτώμενες κινάσες, 3) *CK1* κινάση καζεΐνης 1, 4) *CMGC* που περιέχει τις *CDK*, *MAPK*, *GSK3* και *CLK* κινάσες, 5) *STE*, 6) *TK* κινάσες *Tyr* και 7) *TKL* κινάσες *Tyr-like* [7].

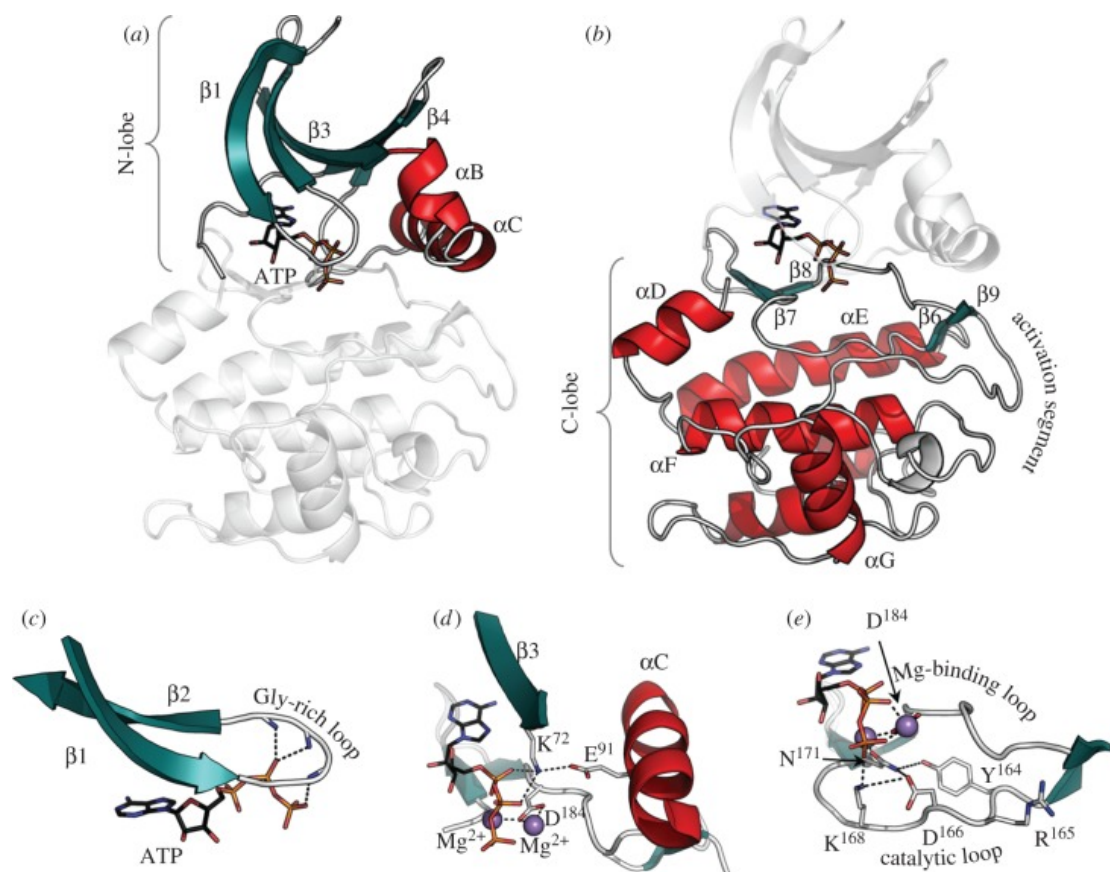
Οι κινάσες λειτουργούν ως υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης ή ως μεσολαβητές ενδοκυτταρικού σήματος. Η ενεργοποίηση των κινασών από κάποιον προσδέτη είτε από κάποιο άλλο ερέθισμα ξεκινά μια αλυσίδα ενδοκυτταρικών αλληλεπιδράσεων που οδηγεί σε αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων καθώς και στην απόκριση των κυττάρων [7]. Ανεξέλεγκτη δραστηριότητα των κινασών σχετίζεται με ποικιλία διαταραχών που κυμαίνονται από καρκίνο έως φλεγμονώδεις ασθένειες, διαβήτη, μολυσματικές ασθένειες, καρδιαγγειακές διαταραχές, ανάπτυξη κυττάρων και επιβίωση [3, 10-12]. Υπό κανονικές συνθήκες ο προσδέτης συνδέεται στην εξωτερική περιοχή ενός υποδοχέα μιας κινάσης πρωτεϊνών, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής επικράτειας της κινάσης, αυτοφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση επιδράσεων σε επόμενα στάδια ή μονοπάτια [13].

Καθίσταται λοιπόν προφανές ότι η μελέτη των κινασών και ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής τους αποτελεί κλειδί στην εύρεση νέων και βελτιωμένων

φαρμακευτικών στόχων, καθώς μπορούν να παρέχουν και ουσιαστικές πληροφορίες για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση άλλων ενζύμων. Η καλά διατηρημένη θέση πρόσδεσης της *ATP* στις κινάσες πρωτεϊνών καθώς και ο μεγάλος αριθμός κινάσων στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα έχει οδηγήσει την τελευταία εικοσαετία σε εκτίναξη του αριθμού των επιλεκτικών αναστολέων κινάσων πρωτεϊνών [14]. Συχνά τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τις κινάσες πρωτεϊνών είναι κινάσες και τα ίδια, δημιουργώντας έτσι ένα περίπλοκο δίκτυο σηματοδότησης και συνεπώς η εύρεση επιλεκτικών αναστολέων και σε συγκεκριμένους σηματοδοτικούς κόμβους είναι απαραίτητη για να υπάρξει θεραπευτικό όφελος [4].

Εξετάζοντας τη δομή των ευκαρυωτικών κινάσων πρωτεϊνών παρατηρούμε ότι μοιράζονται έναν συντηρημένο καταλυτικό πυρήνα που αποτελείται από μια μικρή περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων και μια μεγαλύτερη περιοχή που περιλαμβάνει το κύριο μέρος των αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν άμεσα στην αναγνώριση πεπτιδίων και στην κατάλυση [8, 15]. Καθώς είναι πολύ εύκαμπτα ένζυμα παρατηρούνται μεγάλες περιστροφικές κινήσεις μεταξύ αυτών των περιοχών/λοβών [16] όπως επίσης και κινήσεις εύκαμπτων βρόχων και επικρατειών. Οι κινήσεις αυτές έχουν σαν επακόλουθο την πρόσδεση υποστρωμάτων, συμπαραγόντων, περιοχών που σχετίζονται με αυτό-αναστολή ή ακόμα και την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες κατά την κατάλυση ή την ρύθμιση [17]. Οι ιδιότητες αυτές αναπτύχθηκαν κατά την διάρκεια της εξέλιξης των κινάσων, καθώς απέκτησαν έναν ρόλο μοριακών διακοπών οι οποίοι υφίστανται μετασχηματισμούς μεταξύ ενεργών και ανενεργών καταστάσεων [18, 19]. Η εσοχή ανάμεσα στις δύο περιοχές του N-τελικού και C-τελικού λοβού, διαθέτει την περιοχή πρόσδεσης της *ATP*. Το C-τελικό άκρο περιλαμβάνει μία περιοχή αποτελούμενη από 20-35 αμινοξικά κατάλοιπα που εντοπίζονται μεταξύ ενός καλά συντηρημένου μοτίβου DFG και ενός λιγότερο καλά συντηρημένου μοτίβου APE [20, 21]. Στην ενεργή διαμόρφωση η έλικα C παίρνει θέση απέναντι από το N-τελικό άκρο και το *Asp* του μοτίβου DFG σχηματίζει χηλικό σύμπλοκο με ένα ιόν Mg^{+2} προσανατολίζοντας έτσι το υπόστρωμα *ATP* [Εικόνα 2]. Στην ανενεργή διαμόρφωση, αυτή η αλληλεπίδραση διακόπτεται και η *Phe* του ίδιου μοτίβου στρέφεται προς το

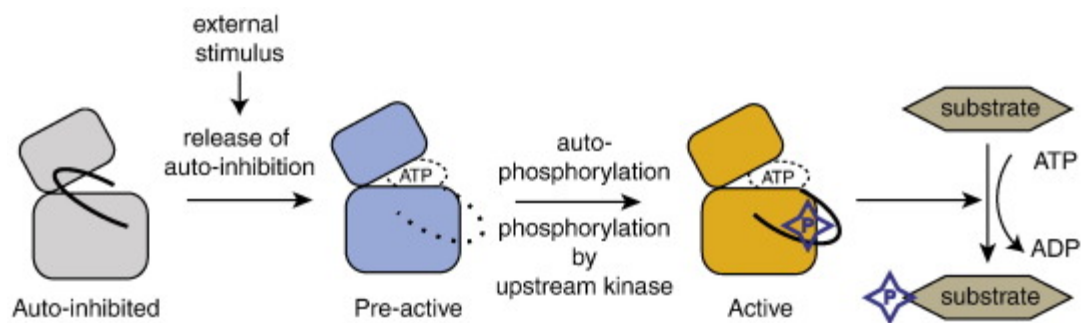
σημείο πρόσδεσης της *ATP*. Συχνά παρατηρούμε ότι σε ορισμένες κινάσες η καταλυτική επικράτεια πλαισιώνεται από επεκτάσεις του C-τελικού και N-τελικού άκρου υποδηλώνοντας έτσι ανάμιξη τους στη ρύθμιση [22].



Εικόνα 2. Διατηρημένη καταλυτική επικράτεια των ευκαρυωτικών κινασών. Απεικόνιση της PKA ως πρωτότυπο. Οι έλικες εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα και τα β-πτυχωτά φύλλα με σκούρο πράσινο. (a) Ο N-λοβός αποτελείται από β-πτυχωτά φύλλα και μία μεγάλη α-έλικα. (b) Ο C-λοβός είναι κυρίως ελικοειδής και περιέχει ένα μεγάλο τμήμα της περιοχής ενεργοποίησης. Η *ATP* προσδένεται στην εσοχή που σχηματίζεται μεταξύ των δύο λοβών. (c) Η φωσφορική ομάδα της *ATP* κατευθύνεται και τοποθετείται από έναν καλά συντηρημένο βρόχο πλούσιο σε γλυκίνες. (d) Αμινοξικά κατάλοιπα του μοτίβου DFG που σχηματίζουν χηλικό σύμπλοκο με ιόν Mg^{2+} (μωβ) προσανατολίζοντας το υπόστρωμα. (e) Ο καταλυτικός βρόχος που περιέχει ένα σύνολο σημαντικών για την κατάλυση καταλοίπων, Asp166, Lys168, Asn171 [18].

Η σημασία της ρύθμισης των κινασών αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι η φωσφορυλίωση αποτελεί κύριο μηχανισμό της κυτταρικής ρύθμισης επηρεάζοντας

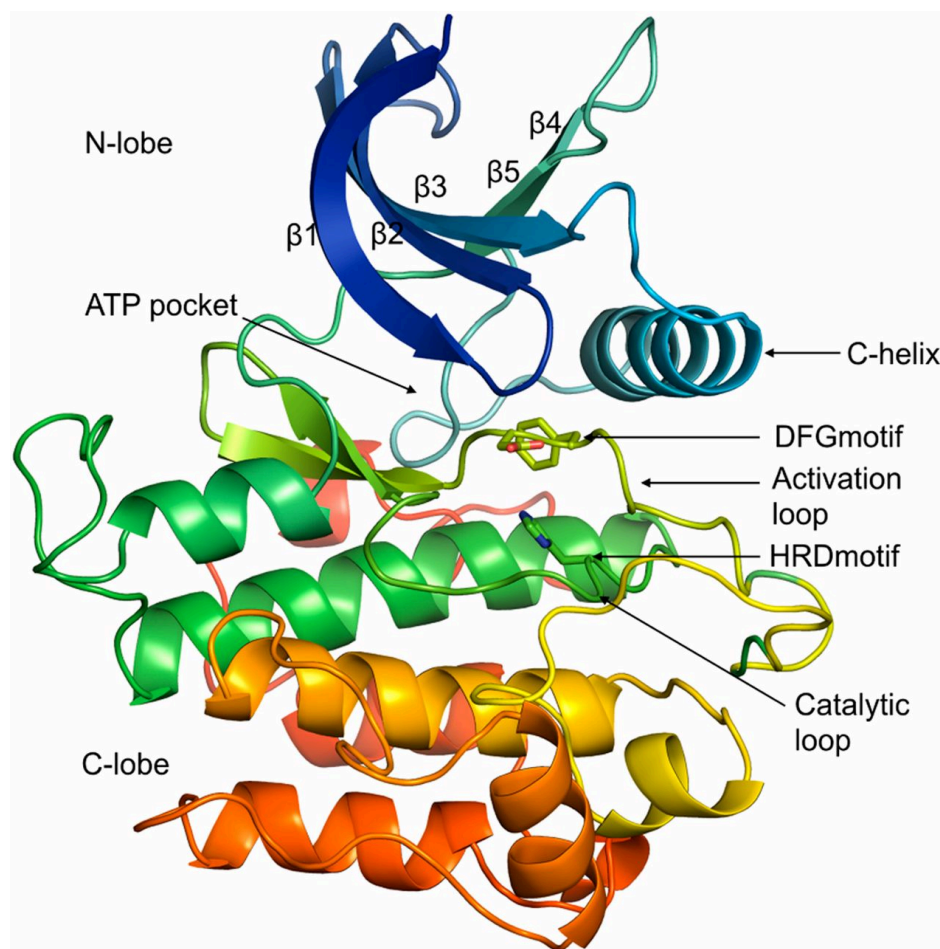
ουσιαστικά κάθε κυτταρική διαδικασία, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Για να λειτουργούν λοιπόν ως διακόπτες ελέγχου σε όλες αυτές τις ποικίλες διαδικασίες, οι κινάσες θα πρέπει να ρυθμίζονται αυστηρά. Οι μηχανισμοί ρύθμισης των κινασών ποικίλουν μεταξύ αλλοστερικών και ενδοστερικών [23] και έχουν σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση διάφορων διαμορφώσεων όπως του βρόχου A, την πρόσβαση σε θέσεις σύνδεσης της *ATP* και του υποστρώματος καθώς επίσης και τον σχετικό προσανατολισμό των λοβών [24]. Κατά την αλλοστερική ρύθμιση το μόριο τελεστής προσδένεται σε ρυθμιστικές περιοχές διαφορετικές από το ενεργό κέντρο, προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση και επηρεάζοντας έτσι τη δραστηριότητα του ενζύμου [25]. Κατά την ενδοστερική ρύθμιση πραγματοποιείται στην ουσία αυτό-ρύθμιση των κινασών από αλληλουχίες του ίδιου του ενζύμου που ομοιάζουν με τα υποστρώματα, τα φερόμενα ως ψευδο-υποστρώματα, και δρουν απευθείας στο ενεργό κέντρο [26]. Η ενδοστερική ρύθμιση αφορά αλληλεπιδράσεις που οδηγούν συνήθως σε αναστολή της πρωτεϊνικής λειτουργίας ενώ για την ενεργοποίηση χρησιμοποιούνται διάφοροι άλλοι μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένου πρωτεϊνών που δρουν ως ενεργοποιητές, προσδέτες, φωσφορυλίωση, πρωτεόλυση, μείωση δισουλφιδικών δεσμών ή και συνδυασμό των παραπάνω [24] [Εικόνα 3]. Παραδείγματα ενδοστερικής ρύθμισης αποτελούν η Κινάση της Συνθάσης του Γλυκογόνου(GSK3) η οποία αυτό-αναστέλλεται από ένα φωσφορυλιωμένο N-άκρο το οποίο δρα ως ψευδοϋπόστρωμα [27, 28], όπως και η οικογένεια των κινασών C και cGMP-εξαρτώμενων κινασών στις οποίες η ενδοστερική αλληλουχία αυτό-ρύθμισης (*Intrasteric Autoregulatory Sequences, IARseq*) βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της καταλυτικής περιοχής και οι ενεργοποιητές είναι φωσφολιπίδια, διακυλογλυκερόλη και cGMP αντίστοιχα [29].



Εικόνα 3. Ενεργοποίηση κινάσης. Σε κατάσταση αυτό-αναστολής(γκρι) το ένζυμο είναι καταλυτικά ανενεργό και δεν μπορεί να φωσφορυλιώσει το ίδιο ή και άλλα υποστρώματα. Ένα εξωτερικό ερέθισμα προκαλεί απελευθέρωση από την κατάσταση αυτό-αναστολής και οδηγεί σε πρώιμη ενεργή κατάσταση(μπλε) ικανή να φωσφορυλιώσει τον εαυτό της αλλά όχι κάποιο άλλο υπόστρωμα. Η αυτό-φωσφορυλίωση της κινάσης οδηγεί σε μία πλήρως ενεργή κατάσταση (πορτοκαλί) ικανή να δρα πλέον στα υποστρώματα [30].

Η μεταβίβαση από την ανενεργή στην ενεργή κατάσταση καθορίζεται από διάφορες ρυθμιστικές περιοχές των κινασών, όπως ο βρόχος ενεργοποίησης (*activation loop*, *A-loop*), η α C-έλικα (*C-helix*), ο P-βρόχος (*P-loop*), η περιοχή πρόσδεσης της ATP, η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος και διάφορα πλευρικά τμήματα [Εικόνα 4]. Ο βρόχος ενεργοποίησης ακολουθεί το C-τελικό άκρο στο μοτίβο DFG που σχετίζεται με τον συντονισμό της ATP και του Mg^{2+} και αποτελεί τον πλέον πολύπλοκο δομικό στοιχείο των κινασών καθώς εμφανίζει μεγάλη ποικιλία ως προς την συμπεριφορά. Ο βρόχος έχει αναπτύξει την εξαιρετική ικανότητα να αναδιατάσσεται ως απόκριση στη φωσφορυλίωση καθώς χρειάζεται να βρίσκεται σε ανοιχτή και εκτεταμένη διαμόρφωση ώστε να επιτρέπεται η πρόσδεση του υποστρώματος [24]. Η α C-έλικα συμμετέχει στη ρύθμιση της λειτουργίας του ενζύμου καθώς είναι συζευγμένη τόσο με την περιοχή δέσμευσης της ATP όσο και με το βρόχο ενεργοποίησης. Το αποτέλεσμα της απόκρισης σε ένδο- και διαμοριακούς ρυθμιστές είναι η μετακίνησή της έλικας ως ένα άκαμπτο σώμα [24]. Το καλύτερο παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της CDK2, όπου η κυκλίνη συνδέεται άμεσα στην έλικα και η γειτνίασή της προάγει μια περιστροφή που ανασυνθέτει τη θέση πρόσδεσης της ATP [31]. Ο P-βρόχος που βρίσκεται στον N-λοβό σταθεροποιεί

τα φωσφορικά ιόντα του δεσμευμένου μορίου *ATP* κατά την κατάλυση [32]. Η αμινοξική αλληλουχία του συγκεκριμένου βρόχου μπορεί να διαφέρει αρκετά μεταξύ των κινασών αλλά συνήθως ακολουθεί ένα κλασικό μοτίβο GXGXXG που του προσδίδει σημαντική ευκαμψία ώστε να μπορεί να ανταποκρίνεται, παρά τις αλλαγές, στον προσανατολισμό μεταξύ των δύο λοβών [33]. Ο αποκλεισμός της περιοχής πρόσδεσης της *ATP* αποτελεί έναν επιπλέον τρόπο ρύθμισης των κινασών. Ο αποκλεισμός αυτός προκαλείται είτε από επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών είτε από πιο σύνθετες ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Αντίστοιχα και η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος μπορεί να αποκλειστεί μέσω ενδοστερικών μηχανισμών και λόγω της θέσης της, τοποθετείται στη σχισμή ανάμεσα στον N- και C-λοβό, ρυθμίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ενεργότητα του ενζύμου. Τέλος τα διάφορα πλευρικά τμήματα που πλαισιώνουν την επικράτεια της κινάσης μπορούν να είναι υπεύθυνα για την αυτό-αναστολή της μέσω ενδοστερικών ρυθμίσεων, είτε κατευθυνόμενα προς το ενεργό κέντρο είτε αναστέλλοντας την καταλυτική δραστηριότητα αλλοστερικά μέσω αλλαγών στην διαμόρφωση [24].



Εικόνα 4. Κλασική δομή επικράτειας πρωτεϊνικής κινάσης. Επισημαίνονται το σημείο πρόσδεσης της *ATP* και λοιπές περιοχές που είναι καλά συντηρημένες μεταξύ των κινασών[32].

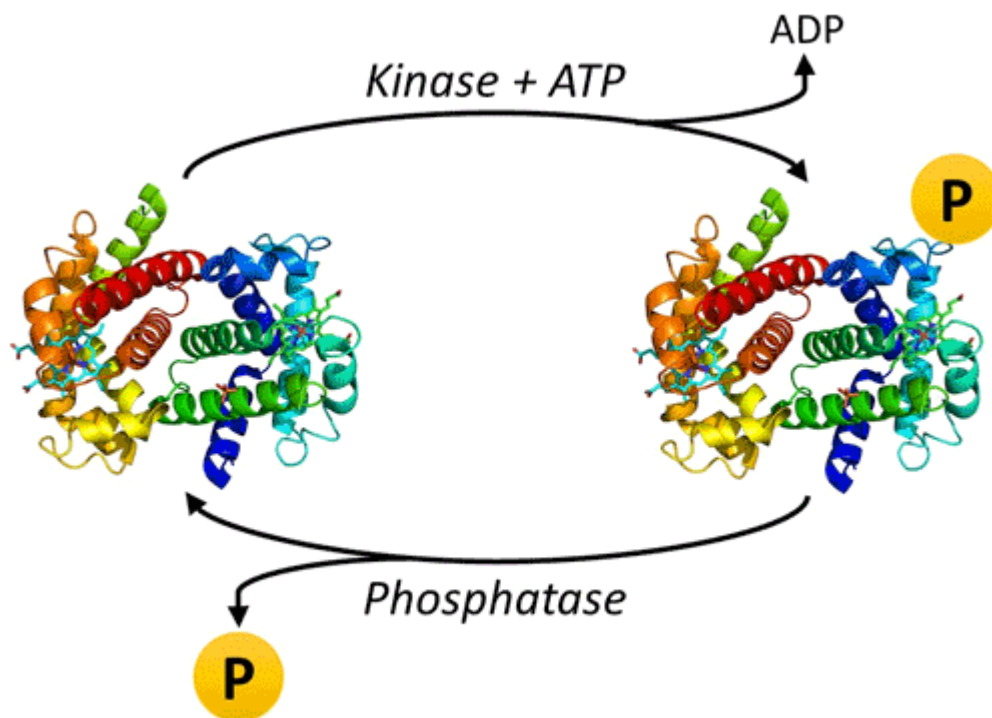
1.1.1. Φωσφορυλίωση

Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών έχει θεμελιώδη σημασία στην βιολογική ρύθμιση καθώς είναι ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου η λειτουργία των πρωτεϊνών οργανώνεται ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Κατά την διάρκεια της εξέλιξης εγκαθιδρύθηκε ως ένας πολύ σημαντικός τύπος μετα-μεταφραστικής τροποποίησης χάρη στην ευελιξία της και στην αντιστρεπτότητά της [34]. Ο μηχανισμός αυτός στηρίζεται στην προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας(PO_4) στην πολική ομάδα R διάφορων αμινοξέων. Η προσθήκη αυτή έχει ως συνέπεια την τροποποίηση της πρωτεΐνης από υδρόφοβη μη πολική σε υδρόφιλη πολική, επιτρέποντας έτσι στην

πρωτεΐνη να αλλάξει διαμόρφωση και να μπορέσει να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια[35]. Επακόλουθα ένα φωσφορυλιωμένο αμινοξύ μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες και να οδηγήσει στην δημιουργία ή και στον διαχωρισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων [36].

Η προτίμηση ως προς την φωσφορική ομάδα μπορεί να εξηγηθεί από δύο δεδομένα. Αρχικά τα φωσφορικά άλατα βρίσκονται σε αφθονία στη Γη και λόγω της υδατοδιαλυτότητάς τους είναι άμεσα διαθέσιμα κατά την εξέλιξη της ζωής ενώ ο φώσφορος έχει σχεδόν ιδανικές ιδιότητες για τον σχηματισμό βιολογικών πολυμερών και για τροποποίηση των πρωτεϊνών. Το μοναδικό μέγεθος του ιονικού κελύφους και το φορτίο ενός ομοιοπολικά προσαρτημένου φωσφόρου επιτρέπουν την ειδική αναγνώριση των φωσφοπρωτεϊνών επάγοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών [34].

Η φωσφορυλίωση ευνοείται από ένα καλό ενεργειακό ισοζύγιο και για το λόγο αυτό παρατηρείται συνεχής ισορροπία μεταξύ της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης [37, 38] [Εικόνα 5]. Οι φωσφατάσες πρωτεϊνών καταλύουν το αντιστρεπτό τμήμα της αντίδρασης της φωσφορυλίωσης, αφαιρώντας μία φωσφορική ομάδα από φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες μέσω υδρόλυσης μονοεστέρων φωσφορικών οξέων σε μια φωσφορική ομάδα και σε μόριο με ελεύθερη υδροξυλομάδα [39, 40]. Οι φωσφατάσες πρωτεϊνών θεωρούνται περισσότερο παθητικά ένζυμα σε σύγκριση με τις κινάσες πρωτεϊνών και η διαφορετική δομή τους τις καθιστά πιο δύσκολες στην αναγνώριση και πολλές φορές έχουν μικρότερη βαρύτητα ως προς τον ρόλο τους [41]. Πιο συγκεκριμένα θεωρούνταν μη ειδικά στοιχειώδη ενεργά ένζυμα, ενώ οι κινάσες είναι οι κύριοι καθοριστές της φωσφορυλίωσης [42]. Για το λόγο αυτό, παρότι οι έρευνες και οι βάσεις δεδομένων απαριθμούν μεγάλο αριθμό κινασών, όσον αφορά τις φωσφατάσες έχουν ταυτοποιηθεί περίπου μόλις 226 [43] οι οποίες ταξινομούνται σε τρεις οικογένειες: φωσφοπρωτεϊνικές φωσφατάσες (PPP), μεταλλο-εξαρτώμενες φωσφατάσες (PPM) και φωσφατάσες Τυροσίνης (PTP) [44].



Εικόνα 5. Ισορροπία μεταξύ της φωσφορυλίωσης και της απο-φωσφορυλίωσης. Προσθήκη και απομάκρυνση φωσφορικής ομάδας με τη δράση κινασών και φωσφατασών[45].

1.1.2. Κινάση της Συνθάσης του Γλυκογόνου GSK3

Η οικογένεια της Κινάσης της Συνθάσης του Γλυκογόνου (GSK3) αποτελεί μία εξαιρετικά συντηρημένη οικογένεια κινασών. Στον άνθρωπο συναντάται με η μορφή δύο ισομερών, GSK3α και GSK3β, που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Τα δύο ισομερή παρουσιάζουν 84% ομοιότητα στο γενικό σύνολο και 98% ομοιότητα στην πρωτοταγή δομή της καταλυτικής περιοχής. Η κύρια διαφορά τους οφείλεται στην ύπαρξη μίας περιοχής πλούσιας σε *Gly* στο N-τελικό άκρο της GSK3α. Παρά την εκπληκτική ομοιότητα που παρουσιάζουν έχει αποδειχθεί ότι το κάθε ισομερές διαθέτει μοναδικό ρόλο και δεν μπορούν να εναλλαχθούν ενεργειακά. Μέχρι και κάποια χρόνια πριν, θεωρούταν πως η λειτουργία της αφορούσε μόνο το μεταβολισμό του γλυκογόνου. Σήμερα όμως, είναι γνωστό πως έχει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου της σηματοδότησης μέσω ινσουλίνης, της

εξειδίκευσης των εμβρυονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, του ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης, της απόπτωσης καθώς και της λειτουργίας των μικροσωληναρίων [46].

Η ύπαρξη της GSK3 αποκαλύφθηκε πρώτη φορά το 1980 [47] ύστερα από μελέτες που πραγματοποιούνταν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου όπου και αναγνωρίστηκε ως ένα ένζυμο που παρουσίαζε υψηλή εκλεκτικότητα προς τη συνθάση του γλυκογόνου. Για αρκετά χρόνια θεωρούνταν ένα αρκετά περίεργο ένζυμο κατά πολλούς τρόπους, αλλά όχι ένζυμο κάποιας ιδιαίτερης σημασίας [48, 49]. Κατά τα τελευταία χρόνια όμως το ενδιαφέρον για την GSK3 και για τις δράσεις της στράφηκε στον αντίθετο πόλο, τραβώντας την προσοχή πολλών ερευνητών καθώς και φαρμακευτικών εταιρειών, αποδεικνύοντας ότι η GSK3 αγγίζει σχεδόν κάθε πτυχή της κυτταρικής σηματοδότησης και εμπλέκεται σε έναν απaráμιλλο αριθμό διεργασιών που οδηγούν σε ασθένειες [50].

Η GSK3 αποτελεί μία από της πιο πολυάσχολες κινάσες καθώς είναι γνωστό ότι σχετίζεται με περισσότερα από 100 υποστρώματα και παρόλα αυτά καταφέρνει να διατηρεί τον έλεγχο της εκλεκτικής φωσφορυλίωσης του κάθε υποστρώματος [50]. Αυτή η εκλεκτικότητα προκύπτει από διάφορα χαρακτηριστικά της GSK3 που την καθιστούν ικανή να προσαρμόζεται και να ενσωματώνεται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, ξεπερνώντας τους περιορισμούς που μπορεί να διέπουν την πολυπλοκότητα του θέματος. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και άλλα αντισυμβατικά χαρακτηριστικά της GSK3, όπως το ότι είναι ιδιοσυστατικά ενεργή, προτιμάει τα περισσότερα υποστρώματά της να είναι προ-φωσφορυλιωμένα από άλλη κινάση και τέλος ότι κυρίως αναστέλλεται αντί να ενεργοποιείται ως απάντηση στη διέγερση των σηματοδοτικών μονοπατιών που την επηρεάζουν [50].

1.1.2.1. Ισομορφές

Όπως αναφέρθηκε η GSK3 απαντάται σε δύο ισομορφές α και β που κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια, με την ισομορφή α να έχει

μεγαλύτερο μοριακό βάρος από την β λόγω ενός επιπλέον τμήματος στο N-τελικό της άκρο [51, 52]. Παρότι οι δύο ισομορφές μοιράζονται σημαντική ομολογία ειδικά ως στην επικράτεια κινάσης και είναι λογικό να έχουν παρόμοιες λειτουργίες, λειτουργικά η ύπαρξη τους δεν είναι πλεονασμός όπως έχει αποδειχθεί ύστερα από μελέτες αποσιώπησης γονιδίων [53]. Η διαγραφή της GSK3 β οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα [54] υποδηλώνοντας ότι η GSK3 α δεν μπορεί να αντισταθμίσει την απουσία ισομορφής β . Ένα ομόλογο της GSK3 που έχει βρεθεί στην *Drosophila melanogaster* εκφράζεται ως ισομορφή β αλλά όχι ως α υποδηλώνοντας διαφορετικές λειτουργίες [55], όπως επίσης έχει αποδειχθεί ότι οι δύο ισομορφές έχουν ξεχωριστό ρόλο κατά την καρδιογένεση των ψαριών ζέβρα (*zebrafish*) [56, 57]. Με βάση τα παραπάνω παραδείγματα γίνεται ξεκάθαρο ότι παρά την ομοιότητά τους και τις παρόμοιες λειτουργίες τους, η μία ισομορφή δεν μπορεί να αντικαταστήσει την άλλη καθιστώντας τις διακριτές και απαραίτητες για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών. Τέλος, πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μία παραλλαγή της GSK3 β η οποία ονομάζεται GSK3 β 2 και περιέχει μία πρόσθετη αλληλουχία δεκατριών αμινοξέων στην καταλυτική επικράτεια [58] και αν και δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως ήδη έχουν εντοπιστεί αρκετές διαφορές με την GSK3 β .

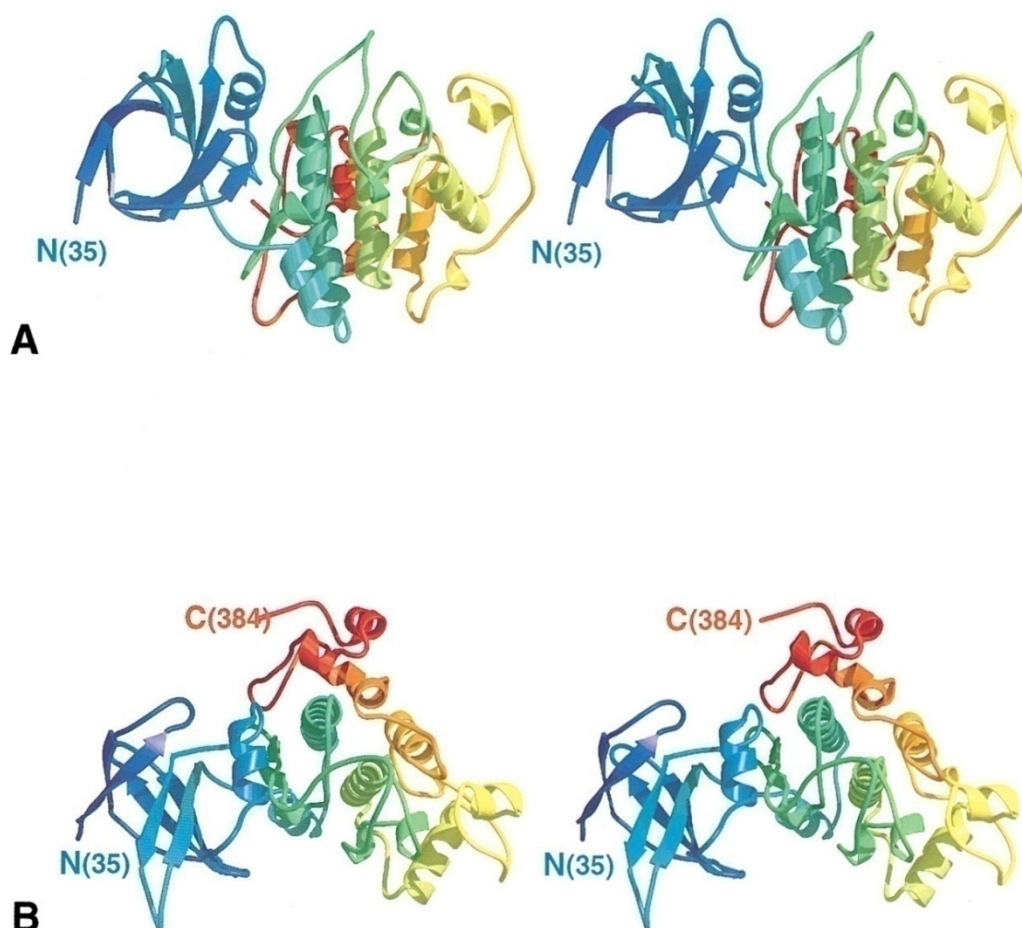
1.1.2.2. Έκφραση

Η συμμετοχή της GSK3 σε αναπτυξιακούς ρόλους έγινε γρήγορα αντιληπτή μέσα από μελέτες σε απλούς ευκαρυώτες όπως η *Drosophila melanogaster* και το βακτηρίδιο *Dictyostelium*. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο ομόλογο γονίδιο της *Drosophila* (*Zeste-white3/Shaggy* γονίδιο) έδειξαν συμμετοχή στη ρύθμιση της πολικότητας των τμημάτων και της οργάνωσης των πτερυγίων. Ενώ ομόλογα μεταλλάγματα της GSK3 του ορθόλογου γονιδίου είχαν έλλειψη σε διαφοροποιημένες δομές που εμφανίζονται στο πιο πρόσθιο μέρος των τμημάτων [59]. Επιπλέον μελέτες για τον σχηματισμό ραχιαίου-κοιλιακού άξονα στην *Drosophila* όπως και πειράματα επίστασης χαρακτήρισαν το γονίδιο *Shaggy* ως βασικό διαμεσολαβητή στο αναπτυξιακό μονοπάτι *Wingless (Wg)* [60], το οποίο

παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ανάπτυξης των ιστών, της πολικότητας καθώς και του σχηματισμού μοτίβων [61].

1.1.2.3. Δομή

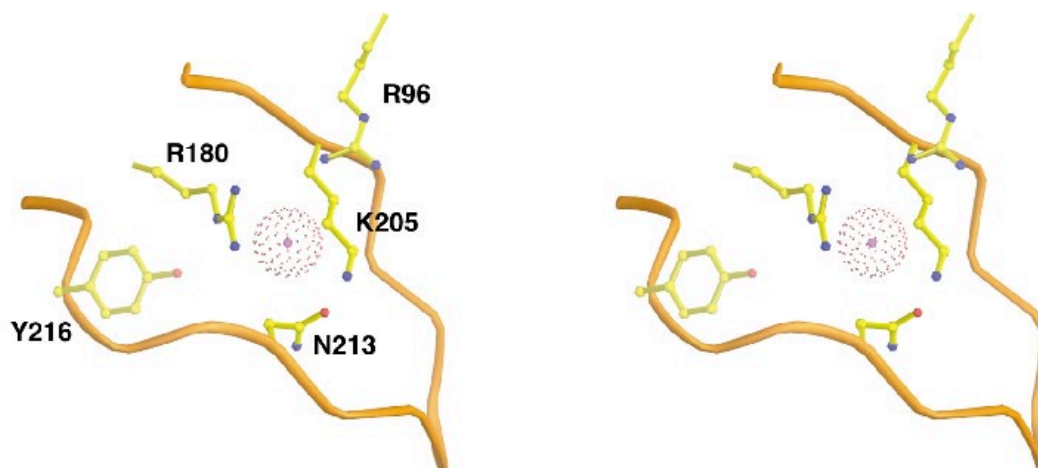
Ομόλογα της GSK3 έχουν διατηρηθεί σε όλη την εξελικτική πορεία των ευκαρυωτών, από τις ζύμες μέχρι τα φυτά και τα θηλαστικά [62], εμφανίζοντας τρομερές ομοιότητες ως προς τη δομή του. Όπως αναμένεται από μία τυπική κινάση *Ser/Thr*, η GSK3β διαθέτει μία μικρή N-τελική περιοχή και μία μεγαλύτερη C-τελική περιοχή. Η περιοχή του N-τελικού άκρου όμως, περιλαμβάνει επτά αντιπαράλληλα β-ελάσματα που είναι καμπυλωμένα και σχηματίζουν μια διαμόρφωση ορθογώνιου κλειστού βαρελιού [27] [Εικόνα 6]. Αυτό είναι κάτι που διαφέρει σε σχέση με τις κινάσες *Ser/Thr* και ομοιάζει περισσότερο με το N-τελικό άκρο των κινασών *Tyr*, όπως η κινάση υποδοχέας της ινσουλίνης ή και οι κινάσες της οικογένειας *Src* [63-65]. Το 5^ο και 6^ο έλασμα του βαρελιού συνδέονται από μία μικρή έλικα που απαντάται και στη δομή της *cAMP*-εξαρτώμενης κινάσης [8], η οποία συγκριτικά με άλλες κινάσες είναι πολύ μικρή καθώς αποτελείται μόνο από δύο στροφές. Το N-τελικό άκρο συνδέεται με την υπόλοιπη πρωτεΐνη μέσω μίας έλικας που εκτείνεται ύστερα από το τέλος του 7^{ου} ελάσματος [27]. Αυτή η ελικοειδής περιοχή τοπολογικά ομοιάζει με την αντίστοιχη περιοχή των *MAP* κινασών όπως η *ERK2* και η *p38* [66, 67]. Το C-τελικό άκρο της GSK3β αποτελείται κυρίως από α-έλικες ενώ 39 αμινοξικά κατάλοιπα (κατάλοιπα 344-382) βρίσκονται έξω από τον πυρήνα της πτυχής της κινάσης και σχηματίζουν μια μικρή περιοχή που στοιβάζεται έναντι της α-ελικοειδούς περιοχής [28].



Εικόνα 6. Α. Στερεο-απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της ανθρώπινης κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου β3, χρώματος μπλε-κόκκινο από τα αμινοξικά κατάλοιπα 35 μέχρι το 384. Το ορθογώνιο βαρέλι β που σχηματίζεται στο Ν-τελικό άκρο βρίσκεται στα αριστερά. **Β.** ίδια εικόνα με Α αλλά περιστραμμένη κατά 90° γύρω από τον οριζόντιο άξονα [27].

Το τμήμα ενεργοποίησης των GSK3 ξεκινάει με το μοτίβο *DFG*, τελειώνει με το μοτίβο *APE* και γενικά η δομή τους ομοιάζει περισσότερο με τις κινάσες *MAPK*, όπου απαιτείται φωσφορυλίωση δύο αμινοξικών καταλοίπων μέσα στον Τ-βρόχο για την ενεργοποίησή τους [60]. Πιο ειδικά, το σημείο πρόσδεσης της *ATP* βρίσκεται στο σημείο που έρχονται σε επαφή οι α-ελικοειδής και β-πτυχωτές περιοχές και οριοθετείται από ένα βρόχο πλούσιο σε *Gly* και το σημείο σύνδεσης των δύο λοβών. Ο βρόχος ενεργοποίησης (κατάλοιπα 200-226) βρίσκεται στην επιφάνεια κατά μήκος του σημείου πρόσδεσης του υποστρώματος. Η *Arg96* εμπλέκεται στην ευθυγράμμιση του Ν- και C- λοβού [Εικόνα 7]. Το *Glu97* στην ενεργή διαμόρφωση

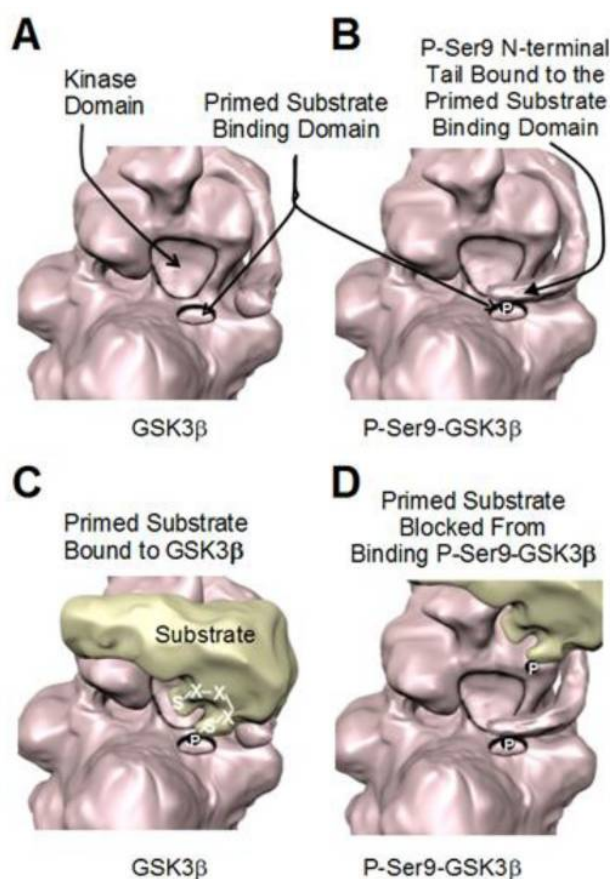
τοποθετείται με τέτοιο τρόπο που σχηματίζει γέφυρα άλατος με το κατάλοιπο *Lys85*, κατάλοιπο ουσιαστικό για την κατάλυση. Τέλος η *GSK3β* διαθέτει δύο σημεία φωσφορυλίωσης που επηρεάζουν τη δραστηριότητα της [28]. Φωσφορυλίωση της *Ser9* οδηγεί σε αναστολή του ενζύμου και φωσφορυλίωση της *Tyr216* οδηγεί σε αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου προς την πλήρη ενεργοποίηση [Εικόνα 7].



Εικόνα 7. Βρόχος ενεργοποίησης της *GSK3β*. Απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων Arg96, Arg180 και Lys205, η θέση του φωσφορικού ιόντος και η θέση φωσφορυλίωσης της Tyr216 η οποία οδηγεί σε πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου [28].

Σημαντικό χαρακτηριστικό της *GSK3β*, είναι ότι προτιμά τα υποστρώματά της να είναι προ-φωσφορυλιωμένα σε ένα κατάλοιπο *Ser/Thr*, μεσολαβώντας τουλάχιστον τέσσερα άλλα κατάλοιπα μετά από ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο *Ser/Thr*, ακολουθώντας το μοτίβο *S/T-X-X-X-S/T(P)* [50] [Εικόνα 8]. Ο αριθμός των καταλοίπων που μεσολαβούν μεταξύ της θέσης στόχου φωσφορυλίωσης της *GSK3β* και της αρχικής θέσης, μπορεί παρ' όλα αυτά να διαφέρει και να είναι είτε μεγαλύτερος [68] είτε μικρότερος [69] από τέσσερα κατάλοιπα. Αυτό αποτελεί έναν εκπληκτικό μηχανισμό ρύθμισης της δράσης της *GSK3β*, καθώς εάν το υπόστρωμα δεν είναι προ-φωσφορυλιωμένο τότε δεν αναγνωρίζεται από το ένζυμο και θα πρέπει να ενεργοποιηθούν άλλα μονοπάτια σηματοδότησης ώστε κάποια άλλη

κινάση να φωσφορυλιώσει το υποστρώμα που προορίζεται για την *GSK3β*. Αυτό, σε συνδυασμό με την απαραίτητη προϋπόθεση ότι το προ-φωσφορυλιωμένο υποστρώμα και η *GSK3β* θα πρέπει να συν-εντοπιστούν, οδηγεί σε πρόληψη ψευδών ενεργειών και άρα καλύτερη και αυστηρότερη ρύθμιση της *GSK3β* [50]. Στην ανακάλυψη αυτού του μηχανισμού συνέβαλλε η ταυτοποίηση δύο βασικών λειτουργικών περιοχών της *GSK3β* [Εικόνα 8], μία περιοχή δέσμευσης του προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος η οποία συλλέγει τα υποστρώματα και μία περιοχή κινάσης η οποία προχωράει σε περαιτέρω φωσφορυλίωση του υποστρώματος [27, 28, 70]. Η προ-φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων είναι ουσιαστική σε δύο μηχανισμούς που σχετίζονται με την δραστικότητα της *GSK3β*, στην αναστολή του ενζύμου μέσω φωσφορυλίωσης ενός καταλοίπου *Ser* ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο και την διαθεσιμότητα του υποστρώματος και στην φωσφορυλίωση της *Ser9* για την *GSK3β*, *Ser21* για την *GSK3α*, που οδηγεί σε φαινόμενα ψευδοϋποστρώματος [70].

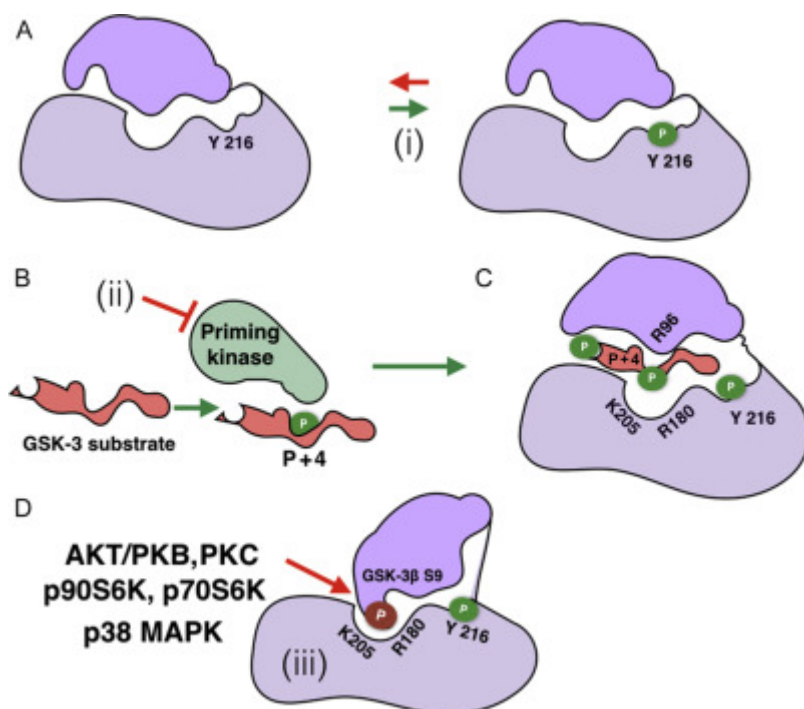


Εικόνα 8. Α) Απεικόνιση της *GSK3 β* [71] επισημαίνοντας την επικράτεια της κινάσης και την περιοχή δέσμευσης του προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος (PDB ID: 4nm0). **Β)** Το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο *Ser9* δρα ως ψευδοϋπόστρωμα και καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης των προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων (PDB ID: 4nm3). **Γ)** Ένα προ-φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα αλληλεπιδρά με την θέση πρόσδεσης και τοποθετείται δίπλα στην επικράτεια της κινάσης επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω φωσφορυλίωση. **Δ)** Το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο *Ser9* δρα ως ψευδοϋπόστρωμα και καταλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης των προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων αναστέλλοντας την δράση της *GSK3 β* [50].

1.1.2.4. Ρύθμιση

Μία σημαντική διαφορά της *GSK3* από τις περισσότερες κινάσες είναι ότι είναι ιδιοσυστατικά ενεργή και απαιτείται εξωκυτταρική σηματοδότηση για την απενεργοποίησή της. Οι κύριοι μηχανισμοί που διέπουν αυτή τη ρύθμιση [Εικόνα 9] μπορεί να είναι (α) αναστολή μέσω φωσφορυλίωσης των καταλοίπων *Ser21* ή *Ser9*

για την *GSK3α* και την *GSK3β* αντίστοιχα, από άλλες κινάσες, οδηγώντας έτσι σε φαινόμενα ψευδοϋποστρώματος όπως αναφέραμε και παραπάνω, (β) αλλαγές στην υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της *GSK3α* και *GSK3β*, (γ) αλλαγές στην φωσφορυλίωση των καταλοίπων *Tyr279* ή *Tyr216* για την *GSK3α* και *GSK3β* αντίστοιχα και (δ) αναστολή μέσω άλλων κινασών που δρουν στα προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα της *GSK3* [72].



Εικόνα 9. Μηχανισμοί ρύθμισης της *GSK3*. **A.** Η *GSK3β* φωσφορυλιώνεται ιδιοσυστατικά στο κατάλοιπο *Tyr216* προωθώντας την αύξηση της προσβασιμότητας στην περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος, με κόκκινο βέλος (i) υποδηλώνεται ο μηχανισμός αναστολής όπου η απουσία της φωσφορυλίωσης του συγκεκριμένου καταλοίπου μειώνει την πρόσβαση υποστρωμάτων. **B.** Απεικονίζεται η προτίμηση της *GSK3* σε προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα που ακολουθούν το μοτίβο S/T-X-X-X-S/T(P), με κόκκινο βέλος (ii) υποδηλώνεται ο μηχανισμός αναστολής κατά τον οποίο εάν η κινάση που φωσφορυλιώνει τα υποστρώματα της *GSK3* δεν δράσει τότε δεν μπορεί το υπόστρωμα να τηρήσει το επιθυμητό μοτίβο. **C.** Απεικονίζεται η δέσμευση του προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος και η σωστή τοποθέτησή του ώστε να μπορεί να φωσφορυλιωθεί περαιτέρω. **D.** Φωσφορυλίωση του καταλοίπου *Ser9* της *GSK3β* οδηγεί σε αναδίπλωση της κινάσης στην δική της περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος, λειτουργώντας ως ψευδοϋπόστρωμα και εμποδίζοντας την πρόσδεση άλλων υποστρωμάτων, με κόκκινο βέλος (iii) απεικονίζεται ο μηχανισμός αναστολής κατά τον οποίο κινάσες όπως η *AKT/PKB* μπορούν να φωσφορυλιώσουν την *GSK3β* στο κατάλοιπο *Ser9* και να λειτουργήσει σαν ψευδοϋπόστρωμα [72].

Επιπλέον από τους παραπάνω μηχανισμούς και λόγω ότι απαιτείται περισσότερος έλεγχος ώστε η *GSK3* να μπορεί να διακρίνει ανάμεσα στα αναρίθμητα υποστρώματα και να ρυθμίζεται μοναδικά από συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια, υπήρχε η υποψία ότι η *GSK3* θα έπρεπε να ρυθμίζεται και μέσω άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων [73]. Η επιβεβαίωση προέκυψε ύστερα από ανακάλυψη ότι η *GSK3* πρωτεολύεται σε ενεργά τμήματα από την καλπαΐνη [74, 75] και από την μεταλλοπρωτεΐνάση *MMP2* [76], επηρεάζοντας έτσι την εκλεκτικότητά της ως προς τα υποστρώματα. Επιπλέον μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί που έχουν ρυθμιστική επίδραση έναντι της δραστικότητας της *GSK3* αποτελούν η ακετυλίωση [77], η μονο-*ADP*-ριβοζυλίωση [78] που οδηγεί σε αναστολή, καθώς και η κιτρολίωση [79]. Τέλος, άλλοι μηχανισμοί που είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την δραστικότητα της *GSK3* σε σπάνιες περιπτώσεις είναι τα επίπεδα της έκφρασης [80, 81], οι πολυμορφισμοί μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (*SNPs*) [82] και το εναλλακτικό μάτισμα [82, 83].

1.1.2.5. Σηματοδότηση

Η *GSK3* αποτελεί ρυθμιστικό “διακόπτη” για πολυάριθμα σηματοδοτικά μονοπάτια και συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα από καταρράκτες μεταγωγής σήματος. Παρίσταται στις κυτταρικές αποκρίσεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι *Wnt*, σε αυξητικούς παράγοντες, στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, στις κινάσες Τυροσίνης (*RTK*), στο μονοπάτι *Hedgehog* καθώς και στο σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch*. Πιο συγκεκριμένα, το μονοπάτι *Wnt* ελέγχει τις διαδικασίες στο κύτταρο που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την κυτταρική πολικότητα καθώς και τον προσδιορισμό της μοίρας των κυττάρων [84]. Η συμμετοχή της *GSK3* στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι έχει αποδειχθεί τόσο από μελέτες στη *Drosophila melanogaster* όσο και σε μελέτες στον βάτραχο *Xenopus laevis* στο οποίο έχει βρεθεί ότι ισχυρά αρνητικά μεταλλάγματα της *GSK3* προκαλούν διπλασιασμό του άξονα, μία παθολογική κατάσταση [85, 86]. Κατά το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης έχει βρεθεί ότι οι θέσεις που έχουν φωσφορυλιωθεί από την *GSK3* έχουν

στην συνέχεια από-φωσφορυλιωθεί ως απόκριση στην παρουσία ινσουλίνης [87] και αυτό συμβαίνει γιατί κατά την εξέλιξη του μονοπατιού προκύπτει μία πιο ενεργοποιημένη κινάση *Akt/PKB* η οποία επακόλουθα φωσφορυλιώνει την *GSK3* στα κατάλοιπα *Ser9* ή *Ser21*, για την *GSK3β* και *GSK3α* αντίστοιχα, οδηγώντας σε αναστολή του ενζύμου και επιτρέποντας τις φωσφατάσες να δρουν στη συνθάση του γλυκογόνου μετατρέποντάς την στην ενεργοποιημένη κατάστασή της [72]. Όπως και το *Wnt* έτσι και το μονοπάτι σηματοδότησης *Hedgehog* παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μεταζώων. Το γονίδιο *Hedgehog* εντοπίστηκε πρώτη φορά στη *Drosophila melanogaster* [88] και η σηματοδότηση ξεκινάει με τη σύνδεση ενός προσδέτη σε έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα πρωτεΐνης τον *Patched (Ptc)* [89, 90], ο οποίος λειτουργεί ως αναστολέας μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης της *Smoothed (Smo)*. Η *GSK3* αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, όπου κατά την παρουσία της αναστέλλονται οι ανασταλτικές επιδράσεις του *Ptc* στο *Smo* με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το σηματοδοτικό σύμπλεγμα *Hedgehog (HSC)* [91]. Το σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* είναι επίσης καλά διατηρημένο ανάμεσα στα μετάρια και παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των ιστών, στην πολικότητα των κυττάρων καθώς επίσης και στην μοίρα τους. Στην ουσία είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας μονής διέλευσης που λειτουργεί ως παράγοντας μεταγραφής [60]. Ο ρόλος της *GSK3* στο σηματοδοτικό μονοπάτι *Notch* δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα όταν αναφερόμαστε σε όρους ενεργοποίησης και απενεργοποίησης [92].

Παρά την συμμετοχή της *GSK3* σε μεγάλο αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών, μέσω διάφορων μηχανισμών καταφέρνει να διατηρεί την εκλεκτικότητά της και την ακεραιότητα του σήματος. Διάφορες μελέτες έχουν παράσχει ενδείξεις πως όλα τα μόρια της *GSK3* δεν είναι ισοδύναμα μέσα σε ένα κύτταρο. Υπάρχουν μικρά υποσύνολα που συνδέονται με διακριτούς αγωγούς σηματοδότησης, μπορεί να υπάρχει ανταλλαγή μεταξύ διαμερισμάτων ή και συμπλεγμάτων μέσα στο χρονικό πλαίσιο της σηματοδότησης ή επίσης μπορεί και να αποτελούν διακριτά μόρια μεταξύ τους [60].

1.1.2.6. Ασθένειες

Αναλύοντας παραπάνω το μέγεθος της συμμετοχής της *GSK3* με τόσους ποικίλους και μοναδικούς τρόπους στα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια και κατά συνέπεια σε τόσες πτυχές της αναπτυξιακής διαδικασίας γίνεται αντιληπτό ότι οποιαδήποτε αλλαγή της μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις ή αντίστοιχα ρύθμισή της μέσω αναστολέα μπορεί να ωφελήσει τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Για το λόγο αυτό αποτελεί και έναν πολύ ισχυρό φαρμακευτικό στόχο για μεγάλο αριθμό ασθενειών. Εντούτοις, υπάρχουν σημαντικές δυσκολίες στη φαρμακευτική ρύθμιση της δράσης μιας και αυτή εμπλέκεται και σε άλλα μονοπάτια τα οποία δεν σχετίζονται με παθολογικές καταστάσεις. Μερικές από τις πιο μελετημένες παθολογικές καταστάσεις που σχετίζεται η *GSK3* είναι οι διάφορες ψυχιατρικές ασθένειες όπως η διπολική διαταραχή, η κατάθλιψη [93], η αγχώδης διαταραχή [94] καθώς και η σχιζοφρένεια [95]. Σχετικά με τη διπολική διαταραχή εδώ και πολλά χρόνια ασθενείς χρησιμοποιούν λίθιο το οποίο είναι αποδεδειγμένος αναστολέας της *GSK3* καθώς έχει δείχθει ότι προσδένεται άμεσα και ανταγωνίζεται τα ιόντα Mg^{+2} στην αντίστοιχη θέση πρόσδεσης [96, 97]. Επίσης έχουν υπάρξει σημαντικές αποδείξεις ότι αναστολή της *GSK3* μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για διάφορες νευρολογικές ασθένειες, κυρίως για τη νόσο Αλτσχάιμερ [98]. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι η *GSK3* συμμετέχει και προάγει κάθε σημαντική διαδικασία που οδηγεί σε παθολογία, όπως η παραγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου [99] καθώς και η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ταυ [100] που αποτελούν τις δυο πιο χαρακτηριστικές παθολογικές αιτίες της νόσου Αλτσχάιμερ, αμυλοειδείς πλάκες και νευροϊνιδιακά δεμάτια αντίστοιχα. Επίσης μέσω διάφορων δράσεων η *GSK3* μπορεί να προάγει την απόπτωση συμβάλλοντας έτσι στην απώλεια νευρώνων που διέπει την δεδομένη νόσο [101]. Άλλες νευρολογικές ασθένειες που πιθανώς να μπορούν να αντιμετωπιστούν με αναστολή της *GSK3* αποτελούν το σύνδρομο εύθραυστου χ (*FXS*) [102], η αυτοάνοση νόσος πολλαπλή σκλήρυνση [103], όπως και η νόσος του Πάρκινσον καθώς έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός της *GSK3 β* που μεταβάλλει την μεταγραφή και το μάτισμα του ενζύμου [82]. Οι αναστολείς της *GSK3* μπορούν να αξιοποιηθούν και απέναντι σε διάφορες φλεγμονώδεις παθήσεις καθώς έρευνες σε μοντέλα τρωκτικών έχουν

αποδείξει ότι μειώνουν τη φλεγμονή και την παθολογία του άσθματος, της αρθρίτιδας, της κολίτιδας και της περιτονίτιδας [104].

Όσον αφορά τον καρκίνο, η *GSK3* αποτελεί πιθανό θεραπευτικό στόχο αλλά τα πράγματα περιπλέκονται εξαιτίας της διττής λειτουργίας του ενζύμου καθώς ευρήματα έχουν δείξει ότι μπορεί να δρα κατασταλτικά για κάποιους όγκους αλλά μπορεί και να προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε άλλους τύπους καρκίνου. Η κατασταλτική δράση έναντι των όγκων έχει παρατηρηθεί σε μερικούς καρκίνους του δέρματος [105] και του στήθους [106], ενώ στον αντίποδα τα αυξημένα επίπεδα της *GSK3* σε ορισμένους τύπους όγκων όπως στον καρκίνο του παγκρέατος [107] υποδεικνύουν τις προωθητικές δράσεις της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αυτές οι διαφορές στις δράσεις της *GSK3* ως προς τον καρκίνο μπορούν να ξεπεραστούν και να οδηγήσουν στην ανάπτυξη θεραπειών εφόσον μελετηθούν καλά και διαχωριστούν οι μηχανισμοί που διέπουν αυτές τις ενέργειες ωφελώντας έτσι τον εντοπισμό των ασφαλέστερων οδών για την χορήγηση κάποιου αναστολέα της *GSK3*.

1.1.3. Καλμοδουλίνη

Η καλμοδουλίνη (*CaM*) αποτελεί την πιο καλά μελετημένη ασβεστοεξαρτώμενη κινάση, οι οποίες είναι γνωστό ότι λειτουργούν ως ενδοκυτταρικοί αισθητήρες ασβεστίου, ενεργοποιούνται και μεταφέρουν τη γ φωσφορική ομάδα της *ATP* σε μια σερίνη/θρεονίνη ή τυροσίνη ενός πρωτεϊνικού υποστρώματος. Το Ca^{2+} είναι ένα στοιχείο κρίσιμο για πολλές βιολογικές λειτουργίες, καθώς τις περισσότερες φορές δημιουργεί σύμπλοκο με φωσφορικά άλατα, σχηματίζοντας εξω- ή ενδοσκελετούς που χρησιμεύουν όχι μόνο ως δομικά ικρίωματα αλλά και ως ρυθμιστές των επιπέδων Ca^{2+} στα εξωκυτταρικά υγρά [108]. Οι βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζονται αυστηρά από τις αλλαγές της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} στο κυτοσόλιο, μπορούν να αφορούν τη μυϊκή σύσπαση, τη γονιμοποίηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ακόμα και την απόπτωση και πολλές από αυτές

ρυθμίζονται από την *CaM* [109]. Η *CaM*, είναι μία πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους (16,7 *kDa*), και ανήκει σε μία οικογένεια ομόλογων πρωτεϊνών που δεσμεύουν το Ca^{2+} μέσω παρόμοιων δομικών περιοχών και συναντάται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα [110]. Η *CaM*, έχει τέσσερις θέσεις πρόσδεσης του Ca^{2+} με διαμόρφωση έλικας-βρόχου-έλικας, ή αλλιώς γνωστό ως *EF-hand* [111], δομικού μοτίβου καλά συντηρημένο στις κινάσες αυτής της οικογένειας. Η δέσμευση του Ca^{2+} προκαλεί έντονες διαμορφωτικές αλλαγές στην *CaM* και αυτές οι διαμορφωτικές αλλαγές, με τη σειρά τους, είναι που της επιτρέπουν να αλληλεπιδρά και να ρυθμίζει μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων, μέσω έκθεσης υδρόφοβων περιοχών που είναι σημαντικές για την πρόσδεση ενζύμων-στόχων [112].

Οι τρισδιάστατες δομές της *CaM* [113] [Εικόνα 10] αλλά και άλλων ασβεστοεξαρτώμενων κινασών είναι γνωστές εδώ και αρκετά χρόνια. Η επικράτεια κινάσης που φέρει το καταλυτικό κέντρο είναι ισχυρώς συντηρούμενη ανάμεσα στα είδη. Αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή αποτελούμενη από 100 κατάλοιπα που σχηματίζουν β πτυχωτές επιφάνειες και μία α έλικα, καθώς και από μία καρβοξυτελική περιοχή από 200 περίπου κατάλοιπα αποτελούμενη από α έλικες. Μεταξύ τους σχηματίζεται μια καταλυτική εσοχή που περιλαμβάνει τα κέντρο σύνδεσης της *ATP* και του πρωτεϊνικού υποστρώματος και βάση κρυσταλλογραφικών μελετών έχουν αναγνωρισθεί τα επιμέρους δομικά χαρακτηριστικά που μεταφέρουν το σήμα ενεργοποίησης από τη σύνδεση ασβεστίου στο καταλυτικό κέντρο.

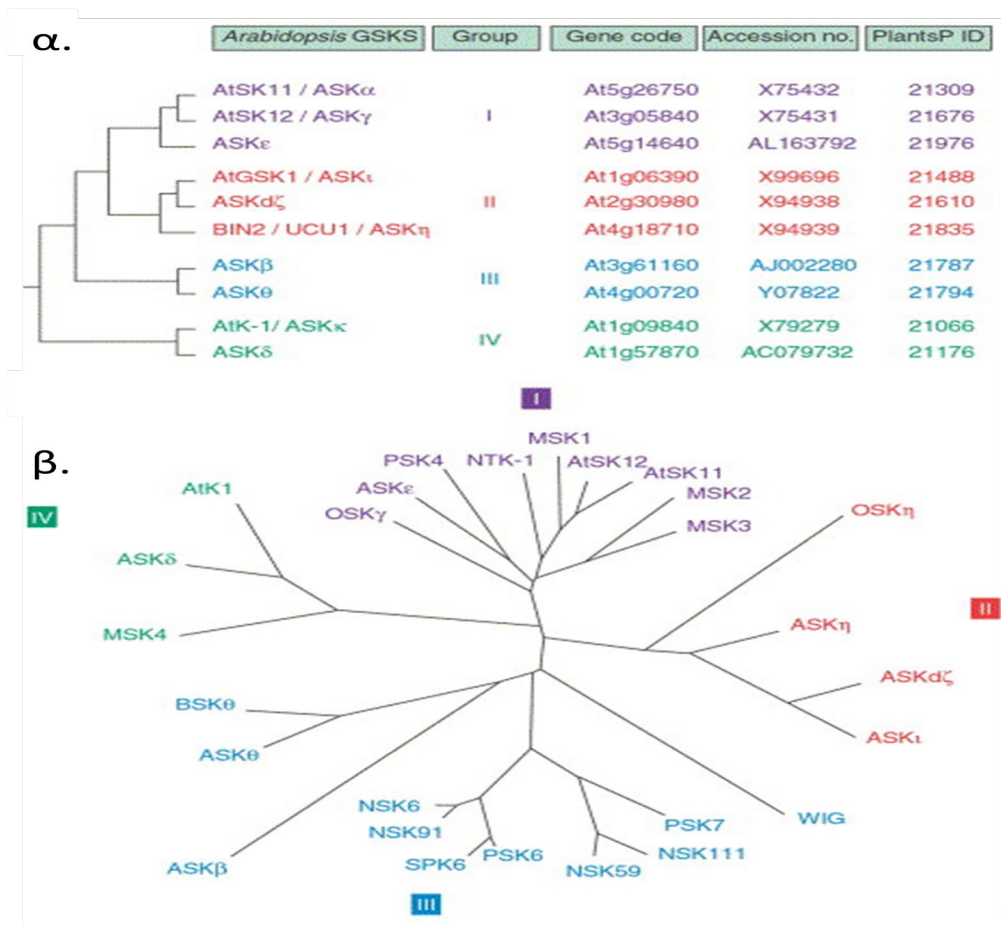


Εικόνα 10. Τρισδιάστατη δομή της ασβεστοεξαρτώμενης κινάσης, καλμοδουλίνη (*CaM*) του *Paramecium tetraurelia* [114].

Η οικογένεια της *CaM*, απαντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συνεπώς την συναντάμε και στα φυτά. Είναι αξιοσημείωτο όμως να τονιστεί ότι αρκετά χαρακτηριστικά της είναι μοναδικά για τα φυτά. Συνεχώς ταυτοποιούνται πρωτεΐνες που δεσμεύουν το Ca^{2+} και πολλές από αυτές χαρακτηρίζονται ως αποκλειστικά φυτοειδικές πρωτεΐνες ενώ παράλληλα τα φυτά διαθέτουν ένα συγκεκριμένο σύνολο ισομορφών *CaM* και πρωτεϊνών τύπου *CaM* (*CML*) [115]. Είναι γνωστό ότι ο λειτουργικός τους ρόλος στα φυτά εμπλέκεται σε διάφορες διεργασίες όπως η ρύθμιση της ανάπτυξης του φυτού καθώς και σε μηχανισμούς αντοχής έναντι βιοτικών ή αβιοτικών καταπονήσεων. Συμμετέχουν δηλαδή σε μηχανισμούς για την αναγνώριση της επίθεσης εντόμων, μηχανισμοί που βασίζονται όχι μόνο στη μηχανική καταστροφή που προκαλούν τα έντομα αλλά και στις εκκρινόμενες από τα έντομα ενώσεις [116].

1.2. GSK3 στα φυτά

Ενώ οι GSK3 των θηλαστικών είναι καλά μελετημένες και γνωρίζουμε πλέον έναν τεράστιο όγκο πληροφορίας που τις αφορούν, για τις GSK3 των φυτών λίγα είναι γνωστά. Τα γονίδια που κωδικεύουν για την GSK3 είναι παρόντα σε όλα τα χερσαία φυτά, την άλγη και τα πρώτιστα και σε αντίθεση με τα θηλαστικά που περιέχουν μόνο δύο γονίδια, τα φυτά διέπονται από μία πολυγονιδιακή οικογένεια της οποίας τα μέλη παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία τους. Τα μέχρι τώρα στοιχεία υποδεικνύουν συμμετοχή σε διάφορες διαδικασίες όπως εμπλοκή σε δίκτυα ορμονικής σηματοδότησης, βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και αντίδραση σε διάφορα στρες. Μία πρωτοοική μελέτη έχει εντοπίσει δέκα διαφορετικές πρωτεΐνες στο φυτό *Arabidopsis thaliana* με φερόμενες θέσεις φωσφορυλίωσης της GSK3 [117] [Εικόνα 11.α] και αυτό που παρατηρείται είναι ότι οι αμινοξικές αλληλουχίες των μελών διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την επικράτεια της κινάσης. Όλες διαθέτουν το κατάλοιπο Tyr που ισοδυναμεί με το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο Tyr216 της GSK3 των θηλαστικών, ενώ επίσης παραμένουν συντηρημένα και τα αντίστοιχα κατάλοιπα των Arg94, Arg180 και Lys205 που σχηματίζουν τη θέση πρόσδεσης των προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων [118]. Διαφορές παρατηρούνται στα N-τελικά και C-τελικά άκρα τους υποδεικνύοντας συμμετοχή των GSK των φυτών σε διαφορετικές βιολογικές διεργασίες. Και πιο ειδικά παρατηρείται σε πολλές περιπτώσεις στις GSK των φυτών, η απουσία του καταλοίπου Ser9, του οποίου η φωσφορυλίωση οδηγεί σε απενεργοποίηση του ενζύμου. Βασισμένη στη σύγκριση της ομολογίας των αμινοξικών αλληλουχιών από cDNA που βρίσκονται διαθέσιμα σε δημόσιες βάσεις δεδομένων από τα φυτά *Arabidopsis*, *Brassica napus*, *Medicago sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* και *Petunia hybrida*, μπορεί να γίνει ομαδοποίηση των φυτικών GSK σε τέσσερις κατηγορίες (I-IV) [Εικόνα 11.β] [118].

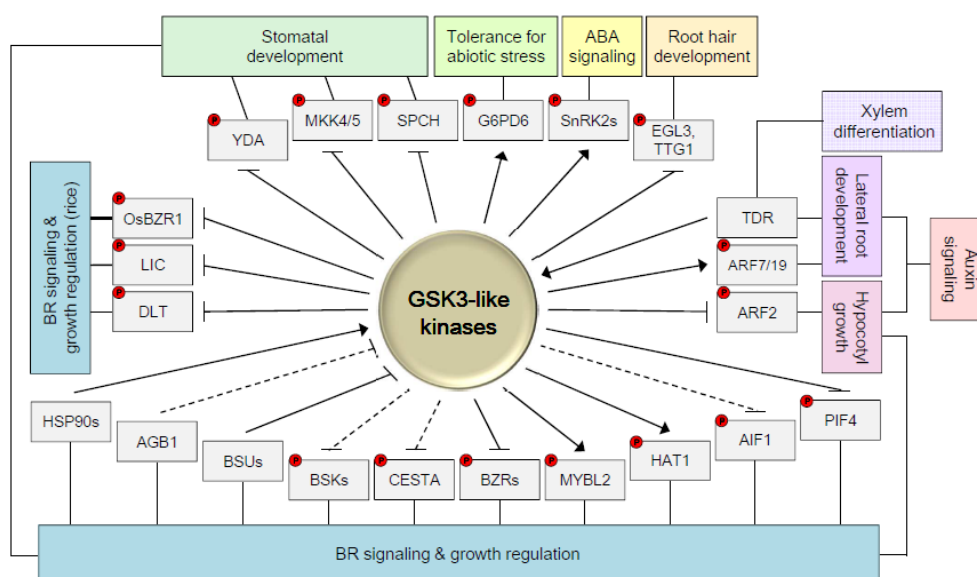


Εικόνα 11. α) Φυλογενετική ανάλυση των δέκα πρωτεϊνών *GSK3* του φυτού *Arabidopsis thaliana*. **β)** Φυλογενετικό δέντρο *cDNA* από διάφορα είδη φυτών και η ταξινόμησή τους σε 4 υποομάδες (I-IV) ύστερα από αλληλούχισή τους με το πρόγραμμα *Clustal X*. *Brassica napus*, BSK θ (Y12674), *Medicago sativa*, MSK1 (X68411), MSK2 (X68410), MSK3 (X68409), MSK4 (AF432225), WIG (AJ295939), *Nicotiana tabacum*, NSK6 (Y08607), NSK59 (AJ002315), NSK91 (AJ224163), NSK111 (AJ002314), NTK-1 (X77763), *Oryza sativa*, OSK γ (AB59612), OSK η (Y13437), *Petunia hybrida*, PSK4 (X83619), PSK6 (AJ224164), PSK7 (AJ224165), SPK6 (X83620) [118].

1.2.1. Βιολογικές λειτουργίες των φυτικών *GSK*

Μέχρι σήμερα έρευνες στις φυτικές *GSK* έχουν αποκαλύψει ότι εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες όπως η σηματοδότηση μέσω ορμονών, η ανάπτυξη του φυτού και οι αποκρίσεις σε στρες. Μελέτες έχουν δείξει ότι συμμετέχουν ακόμα και στην άμυνα των φυτών έναντι παθογόνων μικροβίων, στο στάδιο μετά την αναγνώριση

των παθογόνων και αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της ανοσολογικής σηματοδότησης [119]. Εξερευνώντας τους μοριακούς μηχανισμούς των *GSK* στα φυτά αναδεικνύονται πιθανές λειτουργίες τους κατά τις οποίες δεσμεύουν και φωσφορυλιώνουν διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα συμπεριλαμβανομένου υποδοχείς, κινάσες, λιγάσες της ουβικουΐτινης, μεταβολικών ενζύμων, κυκλινών και μεταγραφικών παραγόντων [120]. Το εύρος της εμπλοκής των φυτικών *GSK* [Εικόνα12] στις διάφορες βιολογικές διεργασίες είναι τεράστιο και οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε φυτά μοντέλα όπως το *Arabidopsis thaliana* και το *Oryza sativa*, αποσαφηνίζουν με σταθερό ρυθμό το ρόλο της τόσο πολυάσχολης κινάσης.



Εικόνα 12. Δίκτυο σηματοδότησης στο οποίο εμπλέκονται κινάσες τύπου *GSK3* στο *Arabidopsis thaliana* και στο *Oryza sativa*. Τα βέλη και οι μπάρες απεικονίζουν την ενεργοποίηση και την αναστολή, αντίστοιχα, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές την υποθετική ρύθμιση. Τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνονται από τις *GSK3* επισημαίνονται με κόκκινους κύκλους που περιέχουν το γράμμα P [120].

1.2.1.1. Ανάπτυξη φυτών

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι γνωστό ότι οι GSK των φυτών εμπλέκονται σε διάφορες αναπτυξιακές διαδικασίες του φυτού, όπως η ανάπτυξη στομάτων, η ανάπτυξη ριζών, η διαφοροποίηση αγγείων και η ανάπτυξη των ανθών. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων γίνεται αυτή η συμμετοχή μπορεί να περιλαμβάνουν ρύθμιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης, υποκυτταρικούς εντοπισμούς, δράσεις πρόσθετων μεταγραφικών παραγόντων και πρωτεϊνών σηματοδότησης [121]. Η πρόσληψη CO_2 και η απελευθέρωση οξυγόνου και νερού στα φυτά, πραγματοποιείται μέσω των στομάτων που βρίσκονται στην επιφάνεια των φύλλων και συνεπώς είναι απαραίτητα για την επιβίωση και την ανάπτυξη τους. Η συμμετοχή των GSK3 των φυτών στην ανάπτυξη των στομάτων προκύπτει από μελέτες που έχουν αποδείξει ότι αλληλεπιδρούν με διάφορους συντελεστές του εξαρτώμενου από MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) καταρράκτη σηματοδότησης [122, 123] που είναι γνωστό ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη των στομάτων [124]. Ο συγκεκριμένος σηματοδοτικός καταρράκτης αποτελείται από YODA (*YDA*, επίσης γνωστή ως MAPKKK4 για MAPK Kinase Kinase4), τέσσερις κινάσες MAPK (*MKK4*, *MKK5*, *MKK7* και *MKK9*), δύο MAPK (*MPK3* και *MPK6*) και μια βασική έλικα-βρόχου (*bHLH*) ως παράγοντας μεταγραφής *SPEECHLESS* (*SPCH*) που ξεκινά τη διαφοροποίηση των στομάτων [125]. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη *BIN2/AtSK21* του *Arabidopsis* που ομοιάζει με την GSK3 μπορεί να φωσφορυλιώσει και να αναστείλει το *YDA* και το *MKK4/MKK5* με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του *SPCH* στον πυρήνα και τον σχηματισμό στομάτων σε κοτυληδόνες που έχουν αναπτυχθεί σε σκοτάδι αλλά και σε φύλλα που έχουν αναπτυχθεί στο φως [125]. Όπως επίσης έχει αποδειχθεί ότι η *BIN2/AtSK21* μπορεί να φωσφορυλιώνει άμεσα το *SPCH* για να προωθήσει την αποδόμηση του που προκαλείται από το πρωτεάσωμα 26S, εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό των στομάτων στα υποκοτύλια [126]. Η αντίθεση που παρατηρείτε πιθανώς να οφείλεται στο ότι η *BIN2/AtSK21* καλείται στο κυτταρόλυμα από το μηχανισμό *POLAR* (*Polar Localization during Assymetric division and Redistribution*) και πολώνεται πολλαπλά με το μηχανισμό *BASL* (*Breaking of Assymetry*) εξασθενίζοντας

έτσι τον καταρράκτη *MAPK* και άρα ενεργοποιεί το *SPCH*, ενώ η πυρηνικά εντοπισμένη *BIN2/AtSK21* φωσφορυλιώνεται και ρυθμίζει αρνητικά το *SPCH* [127].

Όσων αφορά την ανάπτυξη των ριζών, σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι *GSK* εμπλέκονται στο μέγιστο βάθος που θα αποκτήσουν οι ρίζες (*rooting depth*), στα ριζικά ινίδια (*root hairs*), και στη διακλάδωση των ριζών (*root branching*). Έχειδειχθεί ότι η *BIN2/AtSK21* συμμετέχει στη ρύθμιση της ανάπτυξης του μεριστώματος των ριζών αναστέλλοντάς την [128] καθώς φωσφορυλιώνει έναν άτυπο παράγοντα μεταγραφής τον *UPB1* που είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής διαίρεσης και της διαφοροποίησης στο μερίστωμα της ρίζας [129]. Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι η ίδια πρωτεΐνη *BIN2/AtSK21* εμπλέκεται και στην ανάπτυξη των ριζικών ινιδίων [130, 131], όπως επίσης έχει βρεθεί ότι ένα πεπτίδιο του *Arabidopsis arabinogalactan*, γνωστό ως *AGP21*, επηρεάζει τη μοίρα των ριζικών ινιδίων μέσω ενός τρόπου εξαρτώμενου από τη *BIN2/AtSK21* καθιστώντας πιο ισχυρή την σύνδεση της *BIN2/AtSK21* στην ανάπτυξη τους [132]. Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η *BIN2/AtSK21* φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον παράγοντα απόκρισης *ARF7* και *ARF19*, επηρεάζοντας τον σχηματισμό των πλευρικών ριζών [133] αποδεικνύοντας έτσι ότι οι *GSK3* των φυτών μπορούν να εμπλακούν και στις πλευρικές ρίζες.

Η συμμετοχή των *GSK3* έχει αποδειχθεί και κατά τη διαφοροποίηση των ξυλωμάτων (*xylem differentiation*) όπως επίσης και στη ρύθμιση της αναλογίας μεταξύ διαφόρων στοιχείων στο φλώμα [134], τον ιστό δηλαδή ο οποίος μεταφέρει οργανικές ενώσεις που παρασκευάζονται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης. Η εμπλοκή τους στη διαφοροποίηση του ξυλώματος συμβαίνει μέσω αλληλεπιδράσεων με το σηματοδοτικό μονοπάτι *TDIF* (*Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor*) [135]. Έχει αποδειχθεί λοιπόν, ότι οι περισσότερες κινάσες *GSK3* των φυτών αναστέλλουν τη διαφοροποίηση ξυλώματος μέσω αδρανοποίησης του *BES1* [135, 136], ενός βασικού παράγοντα μεταγραφής του σηματοδοτικού μονοπατιού των βρασινοστεροειδών (*BR signaling*), πέραν της *AtSK23/BIL1* η οποία φαίνεται να φωσφορυλιώνει τον παράγοντα απόκρισης *ARF5* αυξάνοντας την ανασταλτική του δράση έναντι της δραστηριότητας του αγγειακού κάμπιου (*Vascular cambium*) μέσω της ρύθμισης των παραγόντων ρύθμισης

απόκρισης *ARR7* και *ARR15* [136] οι οποίοι αποτελούν αρνητικούς ρυθμιστές της σηματοδότησης της κυτοκίνης [137], γνωστής ορμόνης για την προαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης στις ρίζες και στους βλαστούς των φυτών.

Μελέτες ακόμα, υποστηρίζουν εμπλοκή των *GSK3* των φυτών και κατά τη διαδικασία της φωτομορφογένεσης, μιας αναπτυξιακής διαδικασίας μεσολαβούμενη από το φως κατά την οποία τα φυτά ανταποκρίνονται στο φάσμα φωτός και αποτελεί τελείως ξεχωριστή διαδικασία από τη φωτοσύνθεση κατά την οποία το φως χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας. Μεταλλάγματα που παρουσιάζουν ανεπάρκεια ως προς το σηματοδοτικό μονοπάτι *BR* απέδειξαν τη συμμετοχή του στη φωτομορφογένεση μέσω μειωμένης επιμήκυνσης του υποκοτυλίου, βιοσύνθεση χλωροφυλλών και ανθοκυανινών, ανάπτυξη χλωροπλαστών και αληθινών φύλλων [138]. Σε συνδυασμό με το βασικό ρυθμιστικό ρόλο που παίζει η *BIN2* στο συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι, είναι εύκολο να θεωρηθεί δεδομένη η ανάμειξη των *GSK3* των φυτών στη διαδικασία της φωτομορφογένεσης.

1.2.1.2. Ανάπτυξη αναπαραγωγικών οργάνων

Γνωρίζοντας τη συμμετοχή των *GSK3* σε τόσες αναπτυξιακές διαδικασίες είναι εύκολο να θεωρήσουμε δεδομένη και τη συμμετοχή τους στην αναπαραγωγική ανάπτυξη. Ήδη μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο *Arabidopsis* έχουν δείξει ότι η εμπλοκή αυτών των πρωτεϊνών που ομοιάζουν με την *GSK3* είναι μεγάλη και ιδιαιτέρως σημαντική. Έχει βρεθεί ότι η *AtSK41* εκφράζεται κυρίως σε ταξιανθίες που περιέχουν άνθη διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων [139] ενώ η *AtSK11* όσο και η *AtSK12* εκφράζονται έντονα σε ανθικά όργανα [140]. Η αποσιώπηση των *AtSK11* και *AtSK12* προκαλεί ανώμαλη ανάπτυξη των ανθών, συγκεκριμένα αυξημένο αριθμό πετάλων και σέπαλων και αλλοίωση του μοτίβου του *gynoecium* [140] (συλλογικός όρος για τα μέρη ενός λουλουδιού που παράγουν ωάρια και τελικά εξελίσσονται σε καρπό και σπόρους), αποκαλύπτοντας το λειτουργικό ρόλο των

GSK3 στην ανάπτυξη των ανθών των φυτών. Για τις δύο αυτές πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί επίσης ότι φωσφορυλιώνουν την *TTG1* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA1*) μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει τον σχηματισμό τριχώματος στα φύλλα και των ριζικών ινιδίων στις ρίζες καθώς και την ανάπτυξη των σπόρων [141]. Επίσης έχει δειχθεί ότι η *AtSK12* δεσμεύει και φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο *Tyr119* την πρωτεΐνη *CONSTANS*, μιας πρωτεΐνης που έχει κεντρικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι της φωτοπερίόδου, οδηγώντας σε καθυστερημένη ανθοφορία [142]. Υπερέκφραση ενός μεταλλάγματος της *AtSK32* στο οποίο καταργείται η θέση πρόσδεσης του προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος, προκαλεί ανάπτυξη μικρότερων ανθικών οργάνων υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων για την ανάπτυξη των λουλουδιών [143]. Τέλος, γνωρίζοντας ότι η *BIN2/AtSK21* και τα ομόλογά της μπορούν να δράσουν ανασταλτικά στο *BES1/BZR1* είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι μπορούν να παίξουν ρόλο στην έκφραση αρκετών βασικών μεταγραφικών παραγόντων της ανθοφορίας [144].

Έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλα φυτά πέρα από το *Arabidopsis* και σε πιο γενικό πλαίσιο είχαν αποκαλύψει κυρίαρχη έκφραση πολλών *GSK3* φυτικών πρωτεϊνών σε ανθήρες και ώριμες γύρες [145-147] υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο τους στη ρύθμιση της ανδρικής γαμετογένεσης και την ανάπτυξη της γύρης. Σε αναπτυσσόμενα άνθη του *Medicago sativa* και του *Petunia hybrida* έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρία και ένα γονίδιο, αντίστοιχα, που κωδικεύουν για φυτικές *GSK3*, χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί ακόμα ο ρόλος τους στην ανάπτυξη των ανθών [145, 148]. Στο ρύζι (*Oryza sativa*) πιο συγκεκριμένα, η *OsSK41* και η *OsGSK5* έχει δειχθεί ότι ρυθμίζουν το μέγεθος και το βάρος των κόκκων μέσω φωσφορυλίωσης του *OsARF4* (*Oryza sativa Auxin Response Factor4*) [149], ενώ η *OsSK22/GSK2* μπορεί να φωσφορυλιώσει τον μεταγραφικό παράγοντα *OsGRF4* και να αναστείλει τη μεταγραφική του δραστηριότητα, μειώνοντας έτσι το μέγεθος και την απόδοση των κόκκων [150]. Αντίστοιχα στο ινδικό σιτάρι *Triticum sphaerococcum*, οι αλλαγές σε ένα μόνο αμινοξύ στο διατηρημένο μοτίβο *TREE* (*Thr-Arg-Glu-Glu*) ευθύνονται για το μοναδικό ημισφαιρικό σχήμα του κόκκου [151]. Τέλος, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι υπερέκφραση της *VnSK7* του *Vitaceae* σε ντομάτες, καθυστέρησε την ωρίμανση

των φρούτων [152], υποδεικνύοντας έτσι πιθανή εμπλοκή των φυτικών *GSK3* και στη ρύθμιση της διαδικασίας ωρίμανσης των καρπών.

1.2.2. Πολλαπλές λειτουργίες των *GSK3* ως απόκριση σε στρες

Όπως είναι φυσικό, τα φυτά στο περιβάλλον εκτίθενται συνεχώς σε διάφορες δυσμενείς συνθήκες. Καθώς δεν διαθέτουν ένα ισχυρό εξειδικευμένο ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν αναπτύξει περίπλοκους μηχανισμούς για να προσαρμόζονται και να επιβιώνουν από διάφορους τύπους καταπονήσεων. Το στρες λοιπόν στα φυτά, αναφέρεται σε εξωτερικές συνθήκες που επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη ή την παραγωγικότητά τους [153]. Οι καταπονήσεις οδηγούν σε ένα ευρύ φάσμα αποκρίσεων από το φυτό, που αυτό σημαίνει ενεργοποίηση διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών με αποτέλεσμα τον μαζικό μεταγραφικό επαναπρογραμματισμό που θα καταστήσει το φυτό ανθεκτικό σε αυτές τις συνθήκες. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να αφορούν τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, κυτταρικό μεταβολισμό, αλλαγές στο ρυθμό ανάπτυξης ακόμα και αλλαγές στην απόδοση μιας καλλιέργειας [154]. Το στρες στα φυτά μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο κύριες ομάδες, το αβιοτικό και το βιοτικό. Το αβιοτικό στρες αφορά καταπονήσεις που οφείλονται στην αλατότητα, την έλλειψη νερού, στις πλημμύρες, στις ακραίες θερμοκρασίες, στα βαρέα μέταλλα, στην ακτινοβολία κ.α., ενώ το βιοτικό στρες αναφέρεται σε επιθέσεις από παθογόνα όπως μύκητες, βακτήρια, φυτοφάγα ζώα κλπ. [153]. Και οι δύο περιπτώσεις αποτελούν πρωταρχικούς παράγοντες για την απώλεια της απόδοσης καλλιεργειών παγκοσμίως και η ανθεκτικότητα των φυτών έναντι αυτών είναι ζωτικής σημασίας για την επιτυχή ολοκλήρωση του κύκλου ζωής.

1.2.2.1. Αβιοτικές καταπονήσεις και συμμετοχή των *GSK3*

Η πρώτη σύνδεση των *GSK3* με αποκρίσεις έναντι αβιοτικών καταπονήσεων, προέκυψε ύστερα από μία μελέτη του 1999 κατά την οποία η υπερέκφραση της

AtGSK1/AtSK22 διέσωσε τον υπερευαίσθητο στο άλας φαινότυπο μεταλλαγμάτων του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, τα οποία είχαν έλλειψη καλσινευρίνης ή *GSK3-like* πρωτεΐνης [155]. Επιπρόσθετα, το 2001, αποδείχθηκε ότι η υπερέκφραση της ίδιας πρωτεΐνης στο *Arabidopsis* είχε σαν αποτέλεσμα την ιδιόσυστατη ενεργοποίηση γονιδίων που ανταποκρίνονται στο άλας και το αποτέλεσμα είναι να εμφανίζουν αυξημένη ανοχή [156]. Άλλες μελέτες που ήρθαν να προστεθούν και να υποστηρίξουν την εμπλοκή των *GSK3* στις αβιοτικές καταπονήσεις, εντόπισαν και τρία άλλα γονίδια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της τάσης άλατος και κωδικεύουν για τις πρωτεΐνες *AtSK13*, *AtSK31* και *ATSK42* στο *Arabidopsis* [157]. Πιο ειδικά, όταν φυτά *Arabidopsis* αντιμετωπίστηκαν με έναν γνωστό αναστολέα των *GSK3*, την μπικινίνη, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανοχή ως προς το άλας επιβεβαιώνοντας το ρόλο τους στη ρύθμιση του στρες [158]. Επίσης, εξακριβώθηκε και η λειτουργική συμμετοχή της πρωτεΐνης *AtSK11* του *Arabidopsis* στις αποκρίσεις έναντι αβιοτικού στρες καθώς ενισχύει την ανοχή του φυτού στο άλας φωσφορυλιώνοντας άμεσα μια κυτοσολική ισομορφή της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (*G6PD*) [159], του πρώτου ενζύμου απαραίτητου για την ανοχή του φυτού στο στρες [160].

Γνωρίζοντας την καλά διατηρημένη λειτουργία των *GSK3* ανάμεσα στα είδη, ήταν αναμενόμενο να βρεθούν τέτοιες πρωτεΐνες με αντίστοιχο ρόλο έναντι των αβιοτικών καταπονήσεων και σε άλλα είδη φυτών. Ανοχή έναντι της αλατότητας έχουν βρεθεί να παρέχουν και οι *OsSK41/OsGSK5* και η ομόλογή της *MsK4*, στο ρύζι και στο τριφύλλι αντίστοιχα [161, 162]. Στη σόγια η *GmGSK*, μια ομόλογη πρωτεΐνη της *AtSK11* επάγεται ύστερα από διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις [163], ενώ έχουν εντοπιστεί και δύο πρωτεΐνες στο σιτάρι, οι *TaGSK1* και *TaSK5*, των οποίων η υπερέκφραση στο φυτό *Arabidopsis* προσδίδει αντοχή στο άλας και την ξηρασία [164]. Παρόλα τα παραπάνω δεδομένα, ο ρόλος των *GSK3* των φυτών στις καταπονήσεις μπορεί να είναι αμφίρροπος και η έκφρασή τους να λειτουργεί ανασταλτικά ως προς την ανοχή τους στο στρες. Μελέτες αποσιώπησης αρκετών γονιδίων των *GSK3* κινάσων έδειξαν ότι τα φυτά αυτά μπορούν να παρουσιάσουν αυξημένη ανοχή σε ποικιλία αβιοτικών καταπονήσεων όπως η ξηρασία, οι ακραίες θερμοκρασίες και το αλάτι. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η αποσιώπηση της

OsSK21/OsGSK1, πρωτεΐνης ομόλογης της *BIN2/AtSK21* [165]. Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται και από μία έρευνα κατά την οποία η υπερέκφραση μιας *GSK3-like* πρωτεΐνης της πατάτας, της *StSK21*, στο *Arabidopsis* οδήγησε σε αυξημένη ευαισθησία έναντι του άλατος [166]. Παρότι δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί με ποιον μηχανισμό οι συγκεκριμένες κινάσες μειώνουν την αντοχή στην αλατότητα, κάποιες μελέτες εικάζουν ότι ίσως να οφείλεται στην φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της *SOS2*, μιας πρωτεϊνικής κινάσης *Ser/Thr* που είναι γνωστό ότι παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της απόκρισης του στρες από αλάτι [167].

Μελέτες έχουν αποδείξει επίσης τον ρόλο των *GSK3-like* πρωτεϊνών των φυτών στην απόκριση στο στρες που επάγεται από τη ξηρασία. Πιο συγκεκριμένα, στο φυτό *Arabidopsis*, έχει βρεθεί ότι η *BIN2* μεσολαβεί στη σηματοδότηση που επάγεται από τη ξηρασία μέσω της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων *RD26* (*Responsive to Desiccation26*) και *DSK2* (*DOMINANT SUPPRESSOR* του *KAR2*), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων της ουβικουϊτίνης [168]. Επίσης έχειδειχθεί ότι η *BIN2* φωσφορυλιώνει και σταθεροποιεί τον *TINY*, έναν παράγοντα μεταγραφής του *Arabidopsis* τύπου *AP2/ERF* (*Apetala2/Ethylene Response Factor2*), ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τις αποκρίσεις έναντι της ξηρασίας [158]. Πέρα από το *Arabidopsis*, *GSK3-like* πρωτεΐνη που σχετίζεται με την απόκριση στην ξηρασία έχει εντοπιστεί και στο φυτό *Morus alba*, η *MmSK*. Η *MmSK* επάγεται ύστερα από διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις και η αποσιώπηση της οδήγησε σε μειωμένη ανοχή στην ξηρασία [169].

1.2.2.2. Βιοτικές καταπονήσεις και συμμετοχή των *GSK3*

Ο ρόλος των *GSK3-like* κινασών των φυτών έχει αρχίσει να αποσαφηνίζεται και ως προς την συμμετοχή τους σε αποκρίσεις βιοτικού στρες. Γνωρίζουμε πλέον ότι εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων μικροβίων καθώς και στην συμβιωτική σχέση του φυτού με κάποιο ριζόβιο βακτήριο. Παράδειγμα αυτών των ευρημάτων αποτελεί η *CaSK23*, μία *GSK3-like* πρωτεΐνη του φυτού *Capsicum*

anhuum, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσία του φυτού ρυθμίζοντας το σαλικυλικό οξύ, το ιασμονικό οξύ και εξαρτώμενες από το αιθυλένιο πρωτεΐνες που σχετίζονται με παθογένεση [170]. Ομοίως η *MsK1* του τριφυλλιού, συντελεί σημαντικό παράγοντα στην ρύθμιση της ανοσίας του φυτού καθώς έχει βρεθεί ότι η ποσότητα και η δράση της μειώθηκαν σημαντικά ως απόκριση σε έναν παθογόνο διεγέρτη και ότι η υπερέκφραση της σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis* ενίσχυσε την ευαισθησία έναντι του *Pseudomonas syringae*, ενός από τα πιο γνωστά παθογόνα των φυτών [171]. Επιπρόσθετα, η *AtSK11* του *Arabidopsis* επάχθηκε ταχύτατα μετά την μόλυνση με παθογόνο και η απώλεια της στο φυτό ισοδυναμεί με αύξηση της ευαισθησίας έναντι του *Pseudomonas syringae* [172].

Η συμμετοχή των *GSK3-like* κινασών στη δημιουργία συμβιοτικής σχέσης μεταξύ του φυτού και ενός ριζόβιου βακτηρίου, έχει αποδειχθεί ύστερα από έρευνα που αποκάλυψε ότι οι *LjSK1* και *LjSK2*, μέλη της οικογένειας των *GSK3-like* κινασών του *Lotus japonicus*, επάγονται μετά την μόλυνση του φυτού με το αντίστοιχο συμβιοτικό του βακτήριο. Πιο συγκεκριμένα, αποσιώπηση της *LjSK1* οδήγησε σε αυξημένη δημιουργία οζιδίων, αποκαλύπτοντας τον ρόλο της στην αρνητική ρύθμιση του σχηματισμού οζιδίων κατά την συμβιοτική σχέση του φυτού με το βακτήριο [173]. Αντίστοιχα *GSK3-like* κινάσες της σόγιας, πιθανόν φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες που ομοιάζουν με την *GmNSP1* (*Glycine max Nodulation Signaling Pathway1*) και αποτελούν βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι στη δημιουργία των οζιδίων κατά τη συμβιοτική σχέση [174].

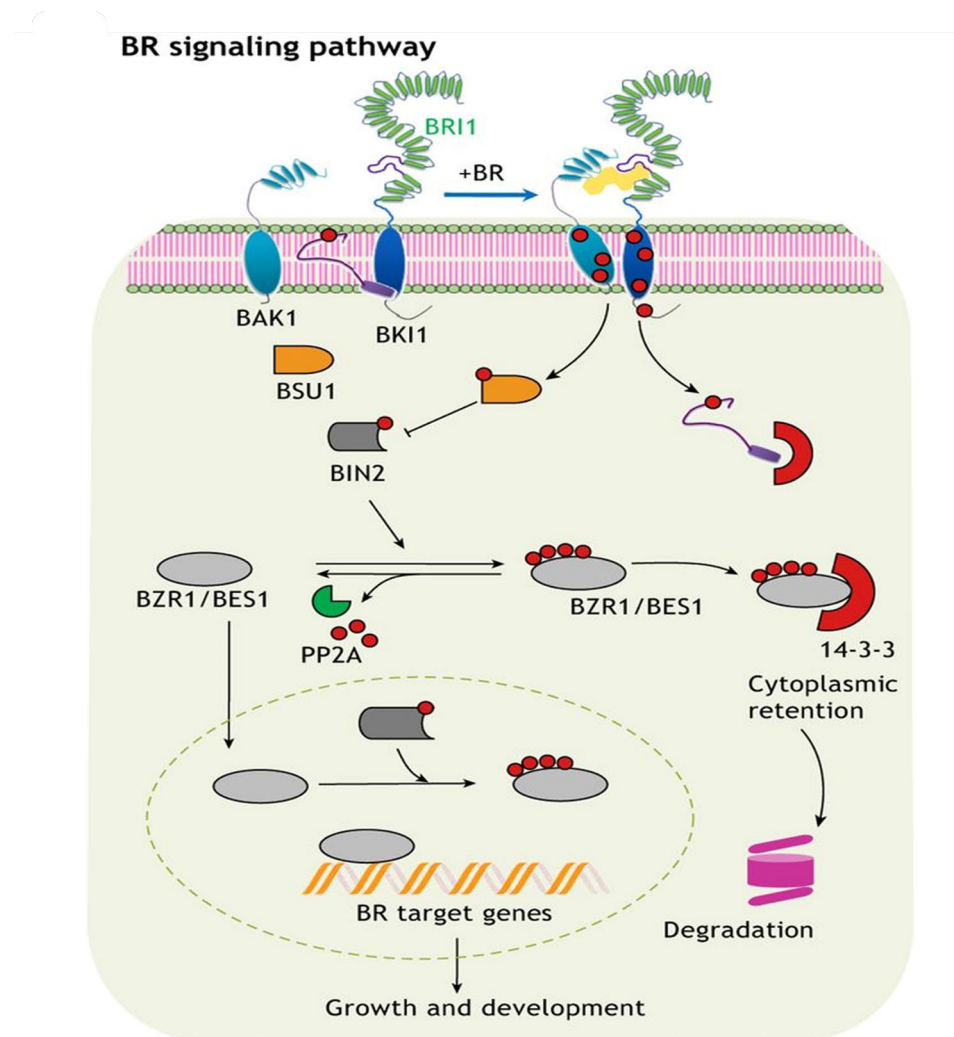
Τέλος, είναι γνωστό ότι οι *GSK3-like* πρωτεΐνες εμπλέκονται και στην ανάπτυξη συμπτωμάτων σε φυτά που έχουν μολυνθεί από ιούς και πιο συγκεκριμένα από την οικογένεια των ιών *Geminiviridae*, που αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα φυτικών ιών και είναι υπεύθυνοι για καταστροφικές απώλειες σε πολλές σημαντικές καλλιέργειες [121]. Δυστυχώς όμως, μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στη δεδομένη διαδικασία και συχνά εμφανίζονται αντικρουόμενα στοιχεία σχετικά με την επίδραση διαφορετικών *GSK3-like* κινασών στην απόκριση των φυτών έναντι στις μολύνσεις από ιούς.

1.2.2. GSK3 των φυτών και σηματοδοτικά μονοπάτια

Μέχρι στιγμής έχει αποκαλυφθεί ο ρόλος των *GSK3-like* πρωτεϊνών των φυτών στη ρύθμιση της ανάπτυξης του φυτού, της ανάπτυξης των στομάτων και των ανθέων καθώς και στις αποκρίσεις έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων. Αυτή η πολύπλευρη συμμετοχή τους σε αυτό το ευρύ φάσμα φυσιολογικών και αναπτυξιακών διαδικασιών, υποδηλώνει καθοριστική εμπλοκή των *GSK3-like* στη συνεργατική συνύπαρξη πολλών διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Η συμμετοχή τους έχει μελετηθεί καλύτερα σε δύο βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια, το σηματοδοτικό μονοπάτι των βρασινοστεροειδών (*BR signaling*) και στο μονοπάτι *TDIF/TDR*. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι *TDIF/TDR*, το οποίο αποτελεί ένα σύστημα διακυτταρικής σηματοδότησης και σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των κυττάρων [175], έχει αποδειχθεί ότι έξι μέλη των *GSK3-like* κινασών του *Arabidopsis* αλληλεπιδρούν έντονα με την καταλυτική επικράτεια της κινάσης *TDR* σε κύτταρα ζυμομύκητα και μελέτες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή μειώνεται όταν υφίσταται υπερέκφραση ή αντιμετώπιση με *TDIF* [120].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι των βρασινοστεροειδών (*BR*) ρυθμίζει μια σειρά φυσιολογικών αποκρίσεων στα ανθοφόρα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής επέκτασης, του πρασινίσματος, του χρόνου ανθοφορίας, της γονιμότητας και της διαφοροποίησης του αγγειακού ιστού [176, 177]. Γενικά η σηματοδότηση μέσω ορμονών διέπεται από αρχαία εξελικτική προέλευση καθώς απαντάται τόσο σε φυτά, σε ζώα και σε μύκητες [178], αλλά πιο συγκεκριμένα στα φυτά οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ορμονική σηματοδότηση προέρχονται από μία ειδική οικογένεια προτείνοντας έτσι μια ξεχωριστή προέλευση. Σε αντίθεση με τα στεροειδή των ζώων που αναγνωρίζονται κυρίως από πυρηνικούς υποδοχείς στεροειδών, οι στεροειδείς ορμόνες των φυτών αναγνωρίζονται στην κυτταρική επιφάνεια από μέλη της οικογένειας των *BRI1* (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1*), κινασών πλούσιων σε *Leu* που ομοιάζουν με υποδοχέα (*LRR-RLK* οικογένεια) [179].

Η δέσμευση της βρασινοστεροειδούς ορμόνης *BR* στην *BRI1* προάγει το σχηματισμό ενός ετεροδιμερούς *BRI1-BAK1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1*), το οποίο ενεργοποιεί με τη σειρά του έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη φωσφορυλίωσης [180]. Ο καταρράκτης προωθεί τη δραστικότητα και την σταθεροποίηση των ειδικών στα φυτά παραγόντων μεταγραφής *BZR1* (*BRASSINAZOLE RESISTANT 1*)[181] και *BES1* (*BRI1 EMS-SUPPRESSOR 1*) [182] [Εικόνα 13], οι οποίοι ελέγχουν άμεσα τη μεταγραφή χιλιάδων γονιδίων που αποκρίνονται στην ορμόνη *BR* και ως εκ τούτου ρυθμίζουν μια πληθώρα αναπτυξιακών γεγονότων στο φυτό [183, 184]. Όταν απουσιάζει η *BR* τότε προκύπτει αρνητική ρύθμιση από την *BIN2* η οποία φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες *BZR1/BES1* και τις απενεργοποιεί [185], χάνοντας έτσι την ιδιότητά τους να δεσμεύουν *DNA* και συνεπώς το σηματοδοτικό μονοπάτι καθίσταται ανενεργό ομοιάζοντας με το ρόλο των *GSK3* των ζώων κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης τόσο του *Wnt* όσο και του *Hedgehog* μονοπατιού [84, 186].



Εικόνα 13. Απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού *BRI1*. Παρουσία *BR* οι πρωτεΐνες *BRI1* ετεροδιμερίζονται με το *BAK1*, ξεκινώντας έναν ενδοκυττάριο καταρράκτη φωσφορλίωσης που οδηγεί σε αποφωσφορλίωση και επακόλουθα σε ενεργοποίηση των *BZR1* και *BES1*. Απουσία *BR*, η *BIN2* φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες *BZR1* και *BES1* σε πολλά κατάλοιπα *Ser* και *Thr* προωθώντας την αποικοδόμησή τους [187].

1.2.3. Δομή

Όπως αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, όσες *GSK3* των θηλαστικών έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής, διαθέτουν τη θέση πρόσδεσης προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος η οποία αποτελείται από τρία βασικά αμινοξικά κατάλοιπα. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου υποδηλώνει ότι η λειτουργία τους εξαρτάται άμεσα

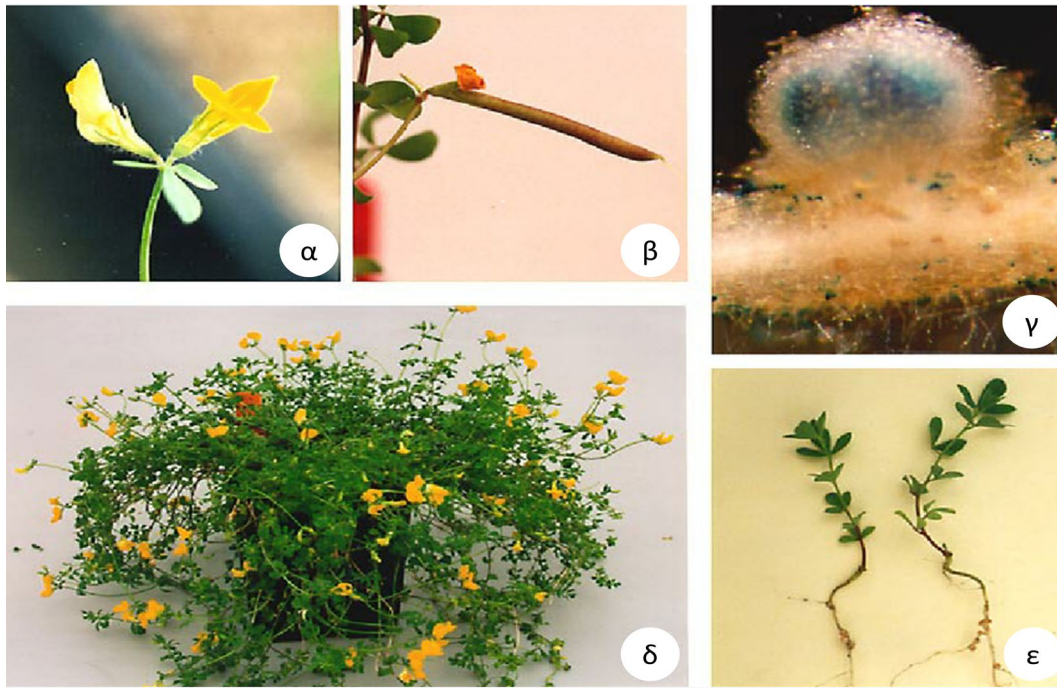
από το αν το υποστρώμα είναι προ-φωσφορυλιωμένο ή όχι. Στα φυτά, ωστόσο, η πρώιμη φωσφορυλίωση του υποστρώματος φαίνεται να μην επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα των *GSK3-like* πρωτεϊνών καθώς έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα και να φωσφορυλιώνουν οι ίδιες τα υποστρώματά τους [183]. *In vitro* μελέτες στην *AtSK21/BIN2*, έδειξαν ότι είναι ικανή να φωσφορυλιώσει τις πρωτεΐνες *BZR1* και *BES1*, οι οποίες είχαν προηγουμένως επωασθεί με αλκαλική φωσφατάση του εντέρου του μόσχου (*calf intestine alkaline phosphatase, CIAP*) και άρα είχαν απομακρυνθεί οι φωσφορικές ομάδες [188]. Όπως επίσης, στοχευμένες μεταλλάξεις σε καίρια κατάλοιπα, αντίστοιχα αυτών που εμπλέκονται στη θέση πρόσδεσης του προ-φωσφορυλιωμένου υποστρώματος στις *GSK3* των θηλαστικών, δεν εμφάνισαν καμία αλλαγή στη δραστηριότητα του ενζύμου *in vivo* [189]. Σε αντίθεση όμως με την *AtSK21/BIN2*, όταν πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες μεταλλάξεις στην *AtSK32*, και συγκεκριμένα στο αμινοξικό κατάλοιπο *Arg178*, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη δραστηριότητα *in vitro* έναντι προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων αλλά όχι έναντι των μη φωσφορυλιωμένων [143]. Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα είναι εύκολο να θεωρήσουμε ότι η πρώιμη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων, μπορεί να μην είναι αναγκαία για τις *GSK3-like* πρωτεΐνες των φυτών, αλλά παρόλα αυτά μπορεί να παίζει λειτουργικό ρόλο ανάλογα με τα υποστρώματα [120].

Άλλη αλλαγή που παρατηρούμε στη δομή των *GSK3-like* πρωτεϊνών των φυτών, συγκριτικά με τις *GSK3* των θηλαστικών, είναι ότι δεν διαθέτουν ένα καλά συντηρημένο N-τελικό άκρο και συνεπώς δεν μπορεί να εφαρμοστεί η αυτό-αναστολή που πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης της Ser του N-τελικού άκρου [190]. Αντιθέτως όμως τα κατάλοιπα της *Tyr*, αντίστοιχα με τα κατάλοιπα *Tyr216* και *Tyr279* των ανθρώπινων *GSK3b* και *a*, παραμένουν καλά διατηρημένα σε όσες *GSK3* έχουν ταυτοποιηθεί [191] και συνεπώς η φωσφορυλίωση τους παραμένει βασικής σημασίας για την πλήρη ενεργοποίηση και των *GSK3-like* πρωτεϊνών των φυτών. Τέλος, παρά το γεγονός ότι το N-τελικό άκρο δεν συντηρείται και διαφέρει μεταξύ των *GSK3-like* των φυτών, το C-τελικό άκρο και η επικράτεια κινάσης βρίσκονται να είναι καλά συντηρημένα, ειδικά σε όλα τα μέλη

των *AtSK* πρωτεϊνών, υποδηλώνοντας βασικό ρόλο στην αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα [192].

1.3. Το φυτό *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* [Εικόνα 14.α & δ] είναι ένα ψυχανθές και πιο συγκεκριμένα ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae* [193], αλλιώς και *Leguminosae*. Η οικογένεια *Leguminosae* είναι η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια Αγγειόσπερμων και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών της, καθώς αποτελείται από περίπου 20.000 διαφορετικά είδη. Στην οικογένεια ανήκουν φυτά ή ξυλώδη δέντρα που έχουν σημαντική γεωργική και βιολογική σημασία, καθώς είναι πλούσιες πηγές πρωτεϊνών και ελαίων και μπορούν επίσης να βοηθήσουν στην καθήλωση του ατμοσφαιρικού αζώτου. Είναι φυτά που μπορούν να αναπτυχθούν σε εδάφη φτωχά σε θρεπτικά συστατικά λόγω της ικανότητάς τους να δημιουργούν συμβίωση με ριζόβια βακτήρια που καθιλώνουν το άζωτο, χαρακτηριστικό μοναδικό για τα όσπρια, αλλά και με μύκητες εδάφους που συλλέγουν θρεπτικά στοιχεία, παρέχοντας έτσι στα φυτά φώσφορο και άλλα απαραίτητα συστατικά [194].



Εικόνα 14. Στάδια της ανάπτυξης του φυτού *Lotus japonicus*. **α)** Ένα ώριμο λουλούδι, μήκος 8-12 mm, **β)** ένας ώριμος λοβός σπόρων, **γ)** ένα χρωματισμένο οζίδιο και τμήμα ρίζας ηλικίας 3 εβδομάδων, ύστερα από αντιμετώπιση με στέλεχος *Rhizobium loti* QJ101, **δ)** ένα ώριμο φυτό σε πλήρη ανθοφορία, **ε)** οζίδια που σχηματίστηκαν ύστερα από 3 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό [195].

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί να χρησιμοποιείται το *Lotus japonicus* ως ένα φυτό μοντέλο για την έρευνα των οσπρίων. Κάποια από τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό για αυτή τη χρήση είναι το μικρό του μέγεθος, τα μεγάλα και άφθονα άνθη, η εύκολη επικονίαση, η εύκολη καλλιέργεια καθώς και ο σύντομος χρόνος ζωής του. Η ανάγκη να διεκρινθεί η έρευνα για τα όσπρια ήταν επιτακτική, όταν αναλογιστούμε ότι αντιπροσωπεύουν το ένα τρίτο της παγκόσμιας πρωτογενούς φυτικής παραγωγής, ανθρώπινης διατροφικής πρωτεΐνης και επεξεργασμένου φυτικού ελαίου και αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τα ζώα καθώς και πρώτες ύλες για τη βιομηχανία. Επιπρόσθετα, η αξία τους ισχυροποιείται διότι αποτελούν βασικό συστατικό όλων των βιώσιμων γεωργικών συστημάτων λόγω της ικανότητάς τους να δημιουργούν συμβιωτικές σχέσεις, όπως αναφέραμε και παραπάνω.

Παρότι το *Arabidopsis thaliana* αποτελεί φυτό πρότυπο και εξυπηρετεί πολύ καλά ως φυτό μοντέλο για την κατανόηση της βιολογίας των φυτών, η μικρή του ικανότητα να εισέλθει σε συμβιωτική αλληλεπίδραση δημιουργώντας μυκόρριζα ή η αδυναμία του να σχηματίσει αζωτοδεσμευτικά οζίδια στις ρίζες σε συμβίωση με ριζόβια βακτήρια, ανέδειξε την ανάγκη να βρεθεί ένα φυτό μοντέλο για τα όσπρια. Άλλωστε η δομή των γονιδιωμάτων των οσπρίων μπορεί να διαφέρει αρκετά από το *Arabidopsis*, καθώς μελέτες βιοπληροφορικής υποδεικνύουν ότι τα όσπρια δεν έχουν υποστεί ένα από τα γεγονότα διπλασιασμού του γονιδιώματος που συνάγεται για το *Arabidopsis*. Έτσι, το *Lotus japonicus*, μαζί με τη σόγια, το φασόλι, το μπιζέλι και το σεσμπάνια, ανήκουν στα φυτά που σχηματίζουν οζίδια [Εικόνα 14.ε] και μέσω της μελέτης τους αποκτούμε κατανόηση της διαδικασίας όζωσης καθώς και των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτούς τους μηχανισμούς [194].

Το *Lotus japonicus* συναντάται κυρίως στην Ανατολική και Κεντρική Ασία, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής γύρω από την Ιαπωνία, την Κορέα, την Κίνα και εκτείνεται μέχρι το Αφγανιστάν. Είναι ένα διπλοειδές φυτό που αυτόγονιμοποιείται και αναπτύσσει ευθύγραμμους σπόρους κατά μήκος ενός απλού γραμμικού άξονα καθιστώντας τους εύκολους στη διαλογή. Η μορφολογία των λοβών του είναι παρόμοια με τη μορφολογία των πιο σημαντικών οσπρίων όπως η σόγια και το μπιζέλι. Χαρακτηρίζεται από άφθονα και σχετικά μεγάλα κίτρινα άνθη [Εικόνα 14.δ], και αναπτύσσεται σχετικά αργά κατά τις πρώτες εβδομάδες. Το ώριμο φυτό καταλήγει σε θαμνώδη ανάπτυξη με άφθονα και ακαθόριστα άνθη, τα οποία είναι συνήθως διατεταγμένα σε ζευγάρια και σπανιότερα σε ένα ή τρία άνθη ανά μίσχο. Σε συνθήκες θερμοκηπίου έχει χρόνο ανάπτυξης περίπου 3 μηνών και ο σχηματισμός λοβών σε γονιμοποιημένα άνθη γίνεται εντός 3-4 ημερών. Είναι ένα πολυετές φυτό και συνεπώς απομάκρυνση παλιών κλαδιών δεν σταματάει την ανάπτυξή του [194]. Η αργή του ανάπτυξη στα πρώτα στάδια επιτρέπει την βλάστηση υψηλής πυκνότητας, τον έλεγχο μεταλλαγμένων φυτών σε πλάκες άγαρ καθώς και δοκιμές σχηματισμού οζιδίων, ενώ η μεγάλη ανθοφορία του ώριμου φυτού το καθιστά πολύ χρήσιμο για βιοχημικές, χημικές και φυσιολογικές μελέτες, αφού μπορεί να συγκομιστεί άφθονο υλικό [194].

Οι ιδανικές συνθήκες για την καλλιέργεια του είναι θερμοκρασίες μεταξύ 18-22°C και η υγρασία να βρίσκεται γύρω στο 70%. Οι συνήθεις συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης φυτών, δηλαδή 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι, είναι οι κατάλληλες φωτοπερίοδοι και για την υποστήριξή του χρησιμοποιούνται αδρανή υλικά όπως κόκκοι αργίλου (*Ieca*), μείγμα 1:1 περλίτη:βερμικουλίτη ή ακόμα και σκέτος βερμικουλίτης. Γενικά είναι ένα φυτό ευαίσθητο στο υπερβολικό πότισμα και προτιμάται να ποτίζεται από κάτω και να αποφεύγεται η υπερχειλίση από το πάνω μέρος. Η καλύτερη συνθήκη για να παραχθούν σπόροι είναι όταν το φυτό καλλιεργείται σε τύρφη και μπορεί να αναπτύξει μεγαλύτερο μέγεθος με πολλά κλαδιά και πλευρικούς βλαστούς, δίνοντας μια πιο θαμνώδη εμφάνιση. Τα παλιά κλαδιά μπορούν να αφαιρεθούν εύκολα χωρίς να επηρεάσουν τον κύκλο ζωής του φυτού καθώς μπορεί να αναγεννήσει νέα κλαδιά και να ανθοφορήσουν από την αρχή [194].

1.3.1. Συμβιωτικές σχέσεις

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η σπουδαιότητα του *Lotus japonicus* έγκειται στην ικανότητά του να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με ριζόβια βακτήρια που δεσμεύουν το άζωτο. Είναι γνωστό ότι τόσο το “ταχείας ανάπτυξης” *Mesorhizobium loti* όσο και το “αργής ανάπτυξης” *Bradyrhizobium sp.* είναι ικανά να οδηγήσουν σε όζωση του φυτού, με τη διαφορά ότι τα ταχέως αναπτυσσόμενα στελέχη προκαλούν οζίδια αποτελεσματικά στη δέσμευση του αζώτου ενώ τα αργής ανάπτυξης στελέχη δημιουργούν αναποτελεσματικά οζίδια [194]. Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, του *Lotus japonicus* με το *Mesorhizobium loti* οδηγεί στην ανάπτυξη ενός εξειδικευμένου οργάνου, του όζου της ρίζας [Εικόνα 15]. Αυτό είναι ένα σφαιρικό όργανο, που αναπτύσσεται από διαφοροποιημένα ριζικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν ένα μερίστωμα που υφίσταται περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Το αποτέλεσμα είναι το ριζόβιο να αποικίζει κύτταρα στο φλοιό των οζιδίων, καθένα από τα οποία περιέχει πολλές χιλιάδες βακτήρια που καθλώνουν το άζωτο και ονομάζονται βακτηριοειδή. Άκρως σημαντικό για τη συμβιωτική

καθήλωση του αζώτου (*symbiotic nitrogen fixation, SNF*), αποτελεί η διαφοροποίηση τόσο των φυτικών όσο και των βακτηριακών κυττάρων, καθώς ελαττώματα σε οποιοδήποτε από τα δύο θέτει σε κίνδυνο την *SNF* [196].



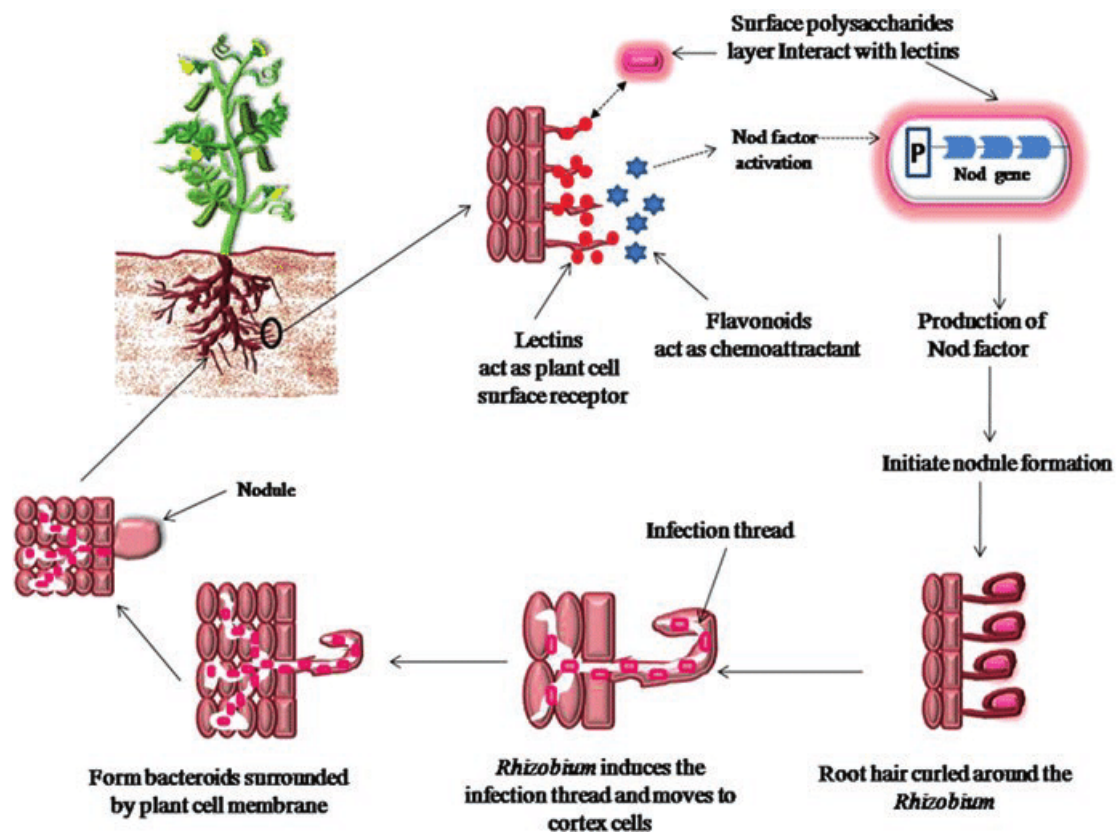
Εικόνα 15. Ακαθόριστα οζίδια που αναπτύσσονται στις ρίζες του *Medicago italica* [197].

1.3.1.1. Συμβιωτική καθήλωση αζώτου (*SNF*)

Η συμβιωτική καθήλωση του αζώτου αφορά την μετατροπή του N_2 της ατμόσφαιρας σε αμμωνία με τη βοήθεια ενός βασικού ενζύμου που ονομάζεται αζωτογενάση [198] και αποτελεί μία από τις πιο βασικές βιολογικές διαδικασίες που είναι σημαντικές για την ανάπτυξη βιώσιμης γεωργίας. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται με την συνεργασία βακτηρίων και φυτών, και πιο συγκεκριμένα από βακτήρια που βρίσκονται μέσα σε κύτταρα *de novo* σχηματισμένων οργάνων, των όζων, που συνήθως αναπτύσσονται στις ρίζες διαφόρων ψυχανθών, δημιουργώντας μια σύνθετη αλληλεπίδραση [199]. Τα βακτήρια που αποτελούν τους κύριους πρωταγωνιστές της *SNF*, καλούνται για λόγους ευκολίας ως ριζόβια και αφορούν τα

γέννη *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* και *Mesorhizobium* που είναι *Gramm*-αρνητικοί βάκιλλοι που ζουν ελεύθερα στο έδαφος. Αυτοί δεν μπορούν να καθηλώσουν το ατμοσφαιρικό άζωτο μέχρι να εισβάλουν στις ρίζες του κατάλληλου οσπρίου. Αυτή η αμοιβαία σχέση που αναπτύσσεται είναι ωφέλιμη και για τους δύο συμμετέχοντες καθώς το φυτό ξενιστής παρέχει στα ριζόβια άνθρακα και πηγή ενέργειας για να λειτουργήσουν και να αναπτυχθούν, ενώ παράλληλα τα ριζόβια καθηλώνουν το ατμοσφαιρικό N_2 και παρέχουν στο φυτό μια πηγή αζώτου υπό τη μορφή αμμωνιακού άλατος η οποία μπορεί να αξιοποιηθεί από αυτά.

Η αλληλεπίδραση λοιπόν, μεταξύ ενός ριζόβιου στελέχους και ενός κατάλληλου οσπρίου, μεσολαβείται από έναν παράγοντα που εκκρίνεται από το ριζόβιο και τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς στα κύτταρα των τριχών της ρίζας του οσπρίου και ονομάζεται *Nod factor* (*NFs*) [200] [Εικόνα 16]. Στην ουσία οι *NFs* είναι μόρια ολιγοσακχαριτών που παράγονται από τα ριζόβια ως απόκριση στα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα εκκρίματα της ρίζας και είναι απαραίτητοι για την έναρξη και διατήρηση της συμβιωτικής σχέσης [201]. Συμμετέχουν ενεργά στο μοριακό διάλογο που αναπτύσσεται μεταξύ των δύο εταίρων. Τα όσπρια εκκρίνουν ένα κοκτέιλ από φαινολικά μόρια, κυρίως φλαβονοειδή και ισοφλαβονοειδή, στη ριζόσφαιρα και τα σήματα αυτά προσλαμβάνονται από τα ριζόβια, τα οποία δεσμεύουν τον μεταγραφικό παράγοντα *NodD* και ενεργοποιούν στη συνέχεια μια σειρά γονιδίων βακτηριακής οξειδοποίησης τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των *NFs* [202]. Διαφορετικά στελέχη ριζόβιου παράγουν διαφορετικούς παράγοντες *NFs* και διαφορετικά όσπρια παράγουν υποδοχείς διαφορετικής εξειδίκευσης. Λόγω της ειδικότητας της αλληλεπίδρασης μεταξύ του *NF* και του υποδοχέα στο όσπριο, ορισμένα στελέχη ριζόβιου θα μολύνουν μόνο τα μπιζέλια, άλλα μόνο το τριφύλλι, μερικά μόνο μηδική κ.λπ. [200]. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό των *NFs* αποτελεί ότι έχουν βρεθεί να διεγείρουν τον σχηματισμό πλευρικών ριζών μέσω της συμβιωτικής οδού σηματοδότησης, υποδεικνύοντας ότι παρόμοιοι μηχανισμοί ξενιστή εμπλέκονται τόσο στην ανάπτυξη οζιδίων όσο και στην πλευρική ανάπτυξη της ρίζας [203].



Εικόνα 16. Συνοπτικός μηχανισμός σχηματισμού οζιδίων κατά τη συμβίωση ριζόβιου και οσπρίου [204].

Η διαδικασία της συμβιωτικής δέσμευσης του αζώτου περιορίζεται κυρίως στα όσπρια στα γεωργικά συστήματα, και υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τη διερεύνηση του κατά πόσον παρόμοιες συμβιώσεις μπορούν να αναπτυχθούν σε μη όσπρια, τα οποία παράγουν το μεγαλύτερο μέρος της ανθρώπινης τροφής [205]. Αποτελεί σημαντικό ερευνητικό πεδίο που θα μπορούσε να έχει βέλτιστες εφαρμογές στη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων, μέσω της χρήσης τεχνικών συνθετικής βιολογίας δημιουργώντας μία μηχανική που να αφορά το συγκεκριμένο κομμάτι και που θα επεκτείνει τη συμβιωτική καθήλωση αζώτου σε μεγαλύτερη ποικιλία καλλιεργήσιμων φυτών.

1.3.1.2. *Lotus japonicus* και συμβιωτικοί εταίροι

Η συμβιωτική αλληλεπίδραση μεταξύ των οσπρίων και των βακτηρίων χαρακτηρίζεται από επιλεκτικότητα. Μεμονωμένα είδη ριζοβίων έχουν ένα χαρακτηριστικό εύρος ξενιστών στα οποία επιτρέπεται η δημιουργία όζων σε συγκεκριμένο σύνολο οσπρίων [206]. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι σε αντίθεση με τις ταξινομικά ποικιλόμορφες βακτηριακές κοινότητες που σχετίζονται με τη ρίζα και τη ριζόσφαιρα που περιλαμβάνουν ένα δίκτυο συσχετίσεων μικροβίου-μικροβίου και φυτού-μικροβίου, η συμβίωση οζιδίων και ρίζας ορίζει μια εξαιρετικά ειδική δυαδική αλληλεπίδραση φυτού-μικροβίου όπου το συμβατό βακτήριο του εδάφους που καθηλώνει το άζωτο επιλέγεται από τον ξενιστή για ενδοκυτταρική μόλυνση και επακόλουθη προσαρμογή και ενίσχυση μέσα στα οζώδη κύτταρα [207]. Η συμβίωση λοιπόν, μεταξύ του *Lotus japonicus* και των ριζοβίων χαρακτηρίζεται από ισχυρή εκλεκτικότητα και παράλληλα μεγάλη ποικιλομορφία και θεωρούνταν για πολύ καιρό συγκεκριμένη καθώς μόνο δύο βακτηριακά είδη είχαν αναγνωριστεί ως μικροσυμβιώτες του φυτού. Το *Mesorhizobium loti* θεωρήθηκε το τυπικό ριζόβιο για το σύμπλεγμα *Lotus corniculatus*, ενώ το *Bradyrhizobium sp. (Lotus)* ήταν το σύμβιο για το *Lotus uliginosus* και τα σχετικά είδη. Τα δεδομένα αυτά έχουν αλλάξει δραματικά τα τελευταία χρόνια χάρη στον χαρακτηρισμό βακτηριακών οζιδίων σε παγκόσμιο γεωγραφικό εύρος καθώς και χάρη στην ανακάλυψη νέων ειδών του *Lotus*. Τα πιο πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα ριζόβια του *Lotus* είναι διασκορπισμένα σε σχεδόν 20 είδη σε 5 γένη, τα οποία είναι τα εξής: *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* και *Aminobacter* [208].

Επιπρόσθετες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι οι ρίζες του *Lotus japonicus* αποικίζονται επίσης αποτελεσματικά από συμβιωτικούς μυκόρριζους μύκητες, όπως για παράδειγμα οι *Glomus intraradices* και *Gigaspora margarita* και αποτελεί κομμάτι με εν δυνάμει οικολογική και αγρονομική σημασία. Αυτοί οι μύκητες εισβάλλουν στον ριζικό ιστό μέσω της μεσοκυττάριας και ενδοκυτταρικής ανάπτυξης υφών και σχηματίζουν συγκεκριμένες δομές στα φλοιώδη κύτταρα όπου λαμβάνουν χώρα μεταβολικές ανταλλαγές. Αυτές οι μυκόρριζες υφές αυξάνουν την επιφάνεια της ρίζας και βελτιώνουν την πρόσληψη φωσφόρου [206], ενώ σε

αντάλλαγμα έως και 20% του φυτικού άνθρακα μεταφέρεται στον μύκητα [209]. Η μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων γίνεται ουσιαστικά μέσω των συμβιωτικών δομών μέσα στα κύτταρα της ρίζας των φυτών, γνωστών ως υφές που αναφέραμε και προηγουμένως. Η ανάπτυξη αυτών των υφών συνοδεύεται από ανταλλαγή μορίων σηματοδότησης μεταξύ των συμβιούντων και πιο συγκεκριμένα από μια νέα κατηγορία φυτικών ορμονών που είναι γνωστές ως στριγκολακτόνες και εκκρίνονται από τις ρίζες των φυτών. Από τη μία πλευρά, οι στριγκολακτόνες διεγείρουν τον μεταβολισμό και τη διακλάδωση των μυκήτων ενώ από την άλλη οι μύκητες απελευθερώνουν μόρια σηματοδότησης με τη μορφή «παραγόντων *Myc*» που πυροδοτούν τις συμβιωτικές αποκρίσεις της ρίζας [209].

Τέλος πρέπει να επισημανθεί ότι η μεγάλη ποικιλομορφία των ριζόβιων του *Lotus japonicus* μπορεί και κινδυνεύει να χαθεί καθώς χρησιμοποιούνται μόνο ελάχιστα βακτηριακά στελέχη για την επιμόλυνση του φυτού σε διάφορες γεωγραφικές τοποθεσίες και με μεγάλη ποικιλία εδαφικών και κλιματικών συνθηκών. Απαιτείται καλύτερη κατανόηση του αγρο-οικολογικού δυναμικού του γένους *Lotus* ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί πλήρως και να αναγνωριστεί η μεγάλη ποικιλία των συμβιωτικών αλληλεπιδράσεων καθώς και την εύρεση των καλύτερων συνθηκών που θα οδηγήσουν στη βέλτιστη συμβιωτική καθήλωση του αζώτου κάτω από περιβαλλοντικές συνθήκες που περιορίζονται καιρό με τον καιρό [208].

1.3.2. Ο ρόλος του *Lotus japonicus* πέρα από την καθήλωση αζώτου

Όπως αναφέραμε πολλάκις, το συγκεκριμένο φυτό καθιερώθηκε ως μοντέλο και μελετήθηκε εκτενέστατα κυρίως λόγω της ικανότητάς του να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με βακτήρια ή μύκητες συμβάλλοντας έτσι στον κύκλο του αζώτου. Πέρα από αυτό όμως τα τελευταία χρόνια έχει ξεκινήσει να αναδεικνύεται ως ισχυρό μοντέλο για τη μελέτη συμβατών και ασύμβατων αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτών και νηματωδών [210]. Τα νηματώδη είναι ένας τύπος σκωλήκων τα οποία αποτελούν τη συνομοταξία των Νηματωδών. Ο λόγος που μελετούνται σε

σχέση με τα ψυχανθή είναι διότι εμπλέκονται σε πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις προκαλώντας εξειδικευμένες δομές με σκοπό να τραφούν ανακατευθύνοντας τις αναπτυξιακές οδούς των φυτών, καταλήγοντας έτσι σε μοτίβα που εύκολα παραλληλίζονται με την ανάπτυξη των ριζοβιακών οξιδίων στα όσπρια [210]. Η καθιέρωση λοιπόν του *Lotus japonicus* ως μοντέλο στο συγκεκριμένο ερευνητικό θέμα θα διευκόλυνε πολύ την καλύτερη κατανόηση των διαφορών μεταξύ παρασιτικής (νηματωδών) και αμοιβαίας (ριζόβια και μυκόρριζες) συμβίωσης [211].

Στο κομμάτι των αλληλεπιδράσεων του φυτού με τα έντομα, το φυτό μπορεί να αξιοποιηθεί ως ένα σύστημα γενετικού μοντέλου για τη μελέτη των κυανογόνων γλυκοσιδών, οι οποίοι είναι πρόδρομοι του τοξικού υδροκυανίου που παρέχουν στα φυτά μια άμεση χημική αμυντική απόκριση σε φυτοφάγα και παθογόνα που προκαλούν βλάβη στους ιστούς [212, 213], συμμετέχοντας έτσι στη μηχανική της σύνθεσης των κυανογόνων γλυκοσιδών καθώς και στην καλύτερη κατανόηση του αμυντικού συστήματος των ψυχανθών. Επιπλέον χρησιμεύει ως ένα χρήσιμο σύστημα για τη μελέτη των έμμεσων μηχανισμών άμυνας φυτών-φυτοφάγων σε ένα όσπριο, καθώς τα φυτά όταν προσβάλλονται από φυτοφάγα, αρχίζουν να εκπέμπουν ένα συγκεκριμένο μείγμα πτητικών ενώσεων που προσελκύουν σαρκοφάγους φυσικούς εχθρούς των φυτοφάγων, προστατεύοντας έτσι δυνητικά το φυτό [214].

Άλλη χρήση του φυτού, σχετίζεται με τη συσσώρευση ταννινών. Παρά το γεγονός ότι το *Lotus japonicus* δεν χρησιμοποιείται στη γεωργία έχει μελετηθεί εκτενώς για τη συσσώρευση προανθοκυανιδινών ή αλλιώς συμπυκνωμένων ταννινών, οι οποίες αποτελούν πολυμερισμένες μονάδες φλαβαν-3-ολών που προκύπτουν από τα φλαβονοειδή. Το ενδιαφέρον για αυτούς τους φυτικούς μεταβολίτες έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια λόγω των αντιοξειδωτικών και κατακρημνιστικών ιδιοτήτων τους καθώς επίσης και για το ρόλο τους στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και της αντοχής των φυτών. Έχει βρεθεί λοιπόν ότι στο *Lotus japonicus* οι συμπυκνωμένες τανίνες κατανεμήθηκαν σε όλους τους ιστούς του φυτού αν και σε πολύ χαμηλό επίπεδο, με την αξιοσημείωτη εξαίρεση ότι σε αντίθεση με το *Lotus corniculatus*, ο ιστός των φύλλων βρέθηκε να είναι απαλλαγμένος από τανίνες [215].

1.4. Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ (*X-ray crystallography*) χρησιμοποιείται για να προσδιορίζονται οι τρισδιάστατες δομές κρυστάλλων που προέρχονται από ορυκτά, άλατα, πρωτεΐνες, RNA, σάκχαρα, κλπ. Κρύσταλλος ορίζεται οποιοδήποτε στερεό που χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό εσωτερικής τρισδιάστατης συμμετρίας [216], και λόγω της ποικιλίας τους, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ως τεχνική συνετέλεσε στην ανάπτυξη πολλών επιστημονικών πεδίων. Αρχικά εφαρμόστηκε για τον καθορισμό του μεγέθους των ατόμων, τα μήκη και τους τύπους των χημικών δεσμών σε διάφορες ενώσεις. Αργότερα όμως καθώς αποδείχτηκε ότι τα βιομόρια μπορούν να αναπτύξουν κρυστάλλους, εξελίχθηκε ως ένα πολύ ικανό εργαλείο για την αποκάλυψη των τρισδιάστατων δομών των μακρομορίων.

Στις πρώτες εφαρμογές της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ για τον προσδιορισμό τρισδιάστατων δομών πρωτεϊνών, αποκαλύφθηκαν οι δομές της μυοσφαιρίνης από τον John Kendrew και της αιμοσφαιρίνης από τον *Max Perutz* κάπου στα μέσα της δεκαετίας του 1950, όπως επίσης και της λυσοζύμης από τον *David Philips* λίγα χρόνια αργότερα. Η ανακάλυψη της δομής του *DNA* από τους *Watson* και *Crick* το 1953, οφείλεται και αυτή σε πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ, καθώς όταν βρέθηκαν μπροστά σε κρυσταλλογραφικά δεδομένα της *Rosalind Franklin* μπόρεσαν με τους κατάλληλους υπολογισμούς και να χαρίσουν στον κόσμο αυτή την πολύτιμη πληροφορία.

Πλέον η τεχνική της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών έχει αποκαλύψει ένα σημαντικό αριθμό τρισδιάστατων δομών και θεωρείται ακόμα η επικρατέστερη τεχνική στον τομέα της Δομικής Βιοχημείας καθώς σε αντίθεση με άλλες τεχνικές είναι εφαρμόσιμη σε μακρομόρια ανεξάρτητα από το μοριακό τους βάρος. Η ακρίβεια της και η αξιοπιστία της είναι αδιαμφισβήτητη και έχει αξιοποιηθεί σε όλο το εύρος των κρυσταλλικών συστημάτων, με μόνο μειονέκτημα της η δυσκολία που παρουσιάζουν πολλές πρωτεΐνες στην κρυστάλλωσή τους. Ίσως στο μέλλον να χάσει την κυριαρχία της, καθώς τεχνικές όπως η φασματοσκοπία *NMR* και η ιδιαίτερα η κρυοσκοπική ηλεκτρονική μικροσκοπία (*cryo-EM*) αναπτύσσονται με γοργούς ρυθμούς. Επιπροσθέτως, πριν από σχεδόν δύο χρόνια αναπτύχθηκαν αλγόριθμοι τεχνητής νοημοσύνης (AI), από την εταιρεία *DeepMind* (σήμερα τμήμα της

Alphabet, Inc. που την αγόρασε από τη *Google* το 2015 και που είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη τεχνολογίας τεχνητής νοημοσύνης γενικού σκοπού (AGI) που είναι επίσης γνωστή ως *Google DeepMind*) ικανοί να προβλέψουν με μεγάλη ακρίβεια τις πρωτεϊνικές δομές από την αλληλουχία των αμινοξέων τους μόνο. Βέβαια η αντικατάσταση των κλασικών τεχνικών Δομικής Βιοχημείας από την τεχνητή νοημοσύνη βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο μιας και φαίνεται πως απαιτεί αρκετά μεγαλύτερο όγκο πειραματικών δεδομένων από αυτά που υπάρχουν μέχρι σήμερα, αλλά φαίνεται ότι θα απασχολήσει κατά πολύ την επιστημονική κοινότητα στο μέλλον [217].

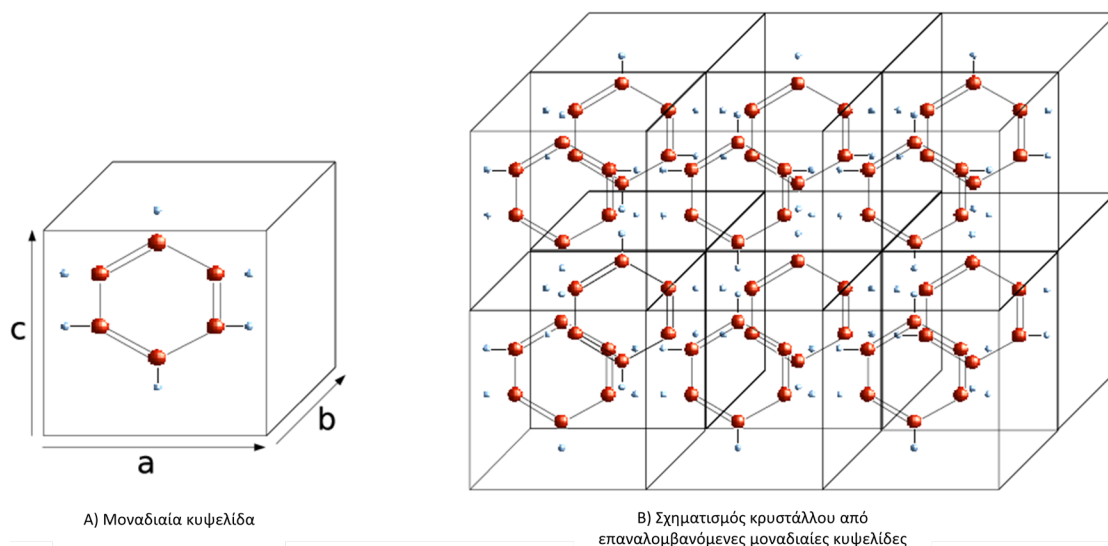
1.4.1. Κρύσταλλοι πρωτεϊνών

Οι κρύσταλλοι πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την απομόνωση και τον έλεγχο της καθαρότητας μιας πρωτεΐνης, μιας και η μικροκρυσταλλικότητα ήταν ισχυρή ένδειξη, αλλά εγκαταλείφθηκε σχετικά σύντομα εφόσον οι κρύσταλλοι μπορεί να περιέχουν έως και 10% άλλες προσμίξεις. Στην πορεία έγινε ξεκάθαρο ότι γνωρίζοντας την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης, μπορούν να απαντηθούν πολλά βιολογικά ερωτήματα καθώς επίσης μπορούν να σχεδιαστούν και φάρμακα με στοχευμένη δράση. Έτσι μέσω της κρυστάλλωσης μπορούμε να μελετήσουμε την ατομική δομή μιας πρωτεΐνης, προσδιορίζοντας τη θέση του κάθε ατόμου της [218].

Η επίτευξη κρυστάλλωσης όμως μίας πρωτεΐνης, αποτελεί μία πολύπλοκη και πολυπαραγοντική διεργασία, καθώς αφορά μόρια τα οποία είναι ιδιαίτερα σύνθετα, μεγάλου μεγέθους τα οποία πολύ συχνά αποτελούνται από πολλές υπομονάδες. Αναγνωρίζοντας τη φύση τους είναι εύκολο να συμπεράνουμε ότι μιλάμε για σχετικά ασταθή φυσικοχημικά μόρια, που παρουσιάζουν όμως δυναμικές καταστάσεις και χαρακτηρίζονται από χημικές και φυσικές ιδιότητες, μοναδικές για την κάθε πρωτεΐνη που οφείλονται στην αμινοξική της αλληλουχία της και στην τρισδιάστατη δομή της. Η διαμόρφωση, το φορτίο, το σχήμα, οι ιδιότητες δηλαδή της πρωτεΐνης, εξαρτώνται όπως είναι λογικό και από το

περιβάλλον της, αποδεικνύοντας την πολυπαραγοντικότητα της κρυστάλλωσης της και τη δυσκολία της συγκεκριμένης διεργασίας. Μικρές αλλαγές στο pH, την ιοντική ισχύ, ή τη θερμοκρασία, δηλαδή οποιαδήποτε μεταβολή σε κάποια πειραματική παράμετρο, έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή διαφόρων άλλων παραγόντων, επηρεάζοντας έτσι την κρυστάλλωση [219]. Η εύρεση λοιπόν, των κατάλληλων συνθηκών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή υψηλής ποιότητας πρωτεϊνικών κρυστάλλων είναι μία χρονοβόρος, επίπονη, και πολύ συχνά ανεπιτυχής διαδικασία. Αυτή ουσιαστικά βασίζεται στη δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος του βιομορίου το οποίο μελετάμε, μέσω μιας εξαιρετικά αργής μεταβολής κατά την οποία επιθυμούμε να επιτύχουμε θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ της στερεάς και της υγρής φάσης.

Ο κρύσταλλος δημιουργείται μέσω της επανάληψης με απλή μετάθεση ενός βασικού παραλληλεπιπέδου το οποίο ονομάζεται στοιχειώδης ή μοναδιαία κυψελίδα [Εικόνα 17.]. Διαδοχικές κυψελίδες που είναι μεταξύ τους πανομοιότυπες τόσο σε διαστάσεις όσο και σε περιεχόμενο συγκροτούν το μακροσκοπικό αντικείμενο που ονομάζεται κρύσταλλος [218]. Η στοιχειώδης κυψελίδα, αποτελεί τη μικρότερη στοιχειώδη ομάδα η οποία απαιτείται για να δημιουργηθεί ολόκληρος ο κρύσταλλος με επαναλαμβανόμενη συμμετρία και δεν είναι απαραίτητο να περιέχει μόνο ένα πρωτεϊνικό μόριο καθώς συνήθως παρατηρείται να αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεόμενα με κάποιο είδος συμμετρικής διεύθεσης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν τον χώρο πιο ικανοποιητικά παρά αν ήταν το καθένα μόνο του.



Εικόνα 17. Α) Μία στοιχειώδης κυψελίδα που περιγράφει ότι η θέση κάθε ατόμου του μορίου μπορεί να προσδιοριστεί με σύστημα συντεταγμένων. **Β)** Επαναλαμβανόμενες στοιχειώδης κυψελίδες που καταλήγουν στον σχηματισμό του κρυστάλλου [220].

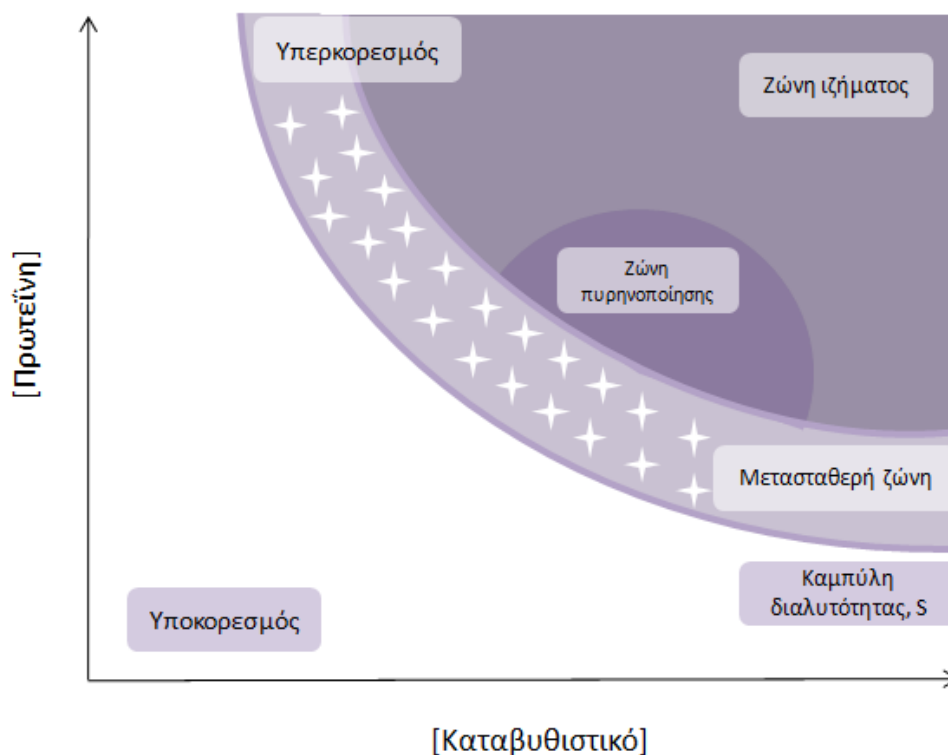
1.4.1.1. Στάδια κρυστάλλωσης και διάγραμμα φάσης

Τα κύρια στάδια της κρυστάλλωσης είναι δύο και αποτελούνται από την πυρηνοποίηση και την αύξηση του μεγέθους του σχηματιζόμενου κρυστάλλου. Ο μηχανισμός πίσω από τη πυρηνοποίηση δεν είναι γνωστός, αλλά γνωρίζουμε ότι πρόκειται για έναν αυθόρμητο σχηματισμό μέσα στο υπέρκορο διάλυμα. Είναι το πιο κρίσιμο στάδιο στη διαδικασία της κρυστάλλωσης καθώς εάν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης δεν φτάσει στον υπερκορεσμό τότε δεν θα σχηματιστεί ο αρχικός πυρήνας [221] πάνω στον οποίο αργότερα προστίθενται επιπλέον μόρια ώστε να σχηματιστεί ο κρύσταλλος. Η δυσκολία του συγκεκριμένου σταδίου έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί ουσιαστικά μία μετάβαση φάσης πρώτης τάξης κατά την οποία τα μόρια περνούν από μία κατάσταση πλήρους αταξίας σε μία κατάσταση ορισμένης διάταξης [222]. Είναι ήδη ξεκάθαρο ότι κρίσιμο ρόλο στο στάδιο της πυρηνοποίησης παίζει η διαλυτότητα του μακρομορίου, η οποία πρέπει να μειωθεί με ελεγχόμενο τρόπο ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό υπέρκορο διάλυμα και θα αναλυθεί παρακάτω παραθέτοντας και το διάλυμα φάσης.

Στο δεύτερο στάδιο που αφορά την ανάπτυξη του σχηματιζόμενου κρυστάλλου δεν δημιουργούνται πλέον νέοι πυρήνες κρυστάλλωσης παρά μόνο πραγματοποιείται αύξηση του μεγέθους μέσω της ενσωμάτωσης μορίων της πρωτεΐνης από το διάλυμα στον ήδη υπάρχοντα πυρήνα. Αφορά δηλαδή το στάδιο κατά το οποίο τα μόρια έχουν ήδη επέλθει στην επιθυμητή κατάσταση υπερκορεσμού (*supersaturated state*) μέσω σταδιακής αφυδάτωσης του διαλύματος που οδηγεί στη μεταβολή της διαλυτότητάς τους και στο σχηματισμό των πρώτων πυρήνων του οποίους έρχονται να προστεθούν νέα μόρια αυξάνοντας το μέγεθος του κρυστάλλου. Το στάδιο αυτό είναι επίσης γνωστό και ως μετασταθερή ζώνη και όταν επανέλθει η ισορροπία στο διάλυμα, τότε τα μόρια καθιζάνουν υπό μορφή κρυστάλλων. Φυσικά, είναι πολύ πιθανό αντί για κρύσταλλο να σχηματιστεί ένα άμορφο ίζημα το οποίο περιέχει πρωτεϊνικά μόρια τα οποία δεν είχαν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και άρα να μην έχουν καταφέρει να διευθετηθούν κατάλληλα [223] ή ακόμα και να σχηματιστούν πολλοί πυρήνες, με αποτέλεσμα να καταναλωθούν τα μόρια της πρωτεΐνης και συνεπώς να μην αναπτυχθεί κρύσταλλος.

Όλα τα παραπάνω είναι εύκολο να εξηγηθούν και να γίνουν κατανοητά με τη βοήθεια του διαγράμματος φάσης [Εικόνα 18.]. Ουσιαστικά το διάγραμμα φάσης αποτελεί ένα δισδιάστατο διάγραμμα διαλυτότητας μεταξύ δύο μεταβλητών, της διαλυτότητας και της συγκέντρωσης μίας πρωτεΐνης. Μέσα από αυτό το διάγραμμα διαχωρίζονται οι καταστάσεις του διαλύματος σε υγρό, κρύσταλλο και ίζημα και γίνεται προσπάθεια να προσδιοριστούν τα λεπτά όρια μεταξύ τους. Η καμπύλη διαλυτότητας (*S*) ορίζει τις ζώνες υπερκορεσμού και υποκορεσμού και προσδιορίζει ότι κάτω από την καμπύλη δεν πρόκειται ποτέ να σχηματιστεί κρύσταλλος ενώ πάνω από την καμπύλη η συγκέντρωση της πρωτεΐνης οδηγεί σε υπέρκορο διάλυμα και ανάλογα μπορεί να βρίσκεται σε κάποια από τις τρεις ζώνες: ζώνη κατακρήμνισης στην οποία συναντάμε την άμορφη μάζα, ζώνη πυρήνωσης όπου η είναι η ιδανική συνθήκη για τον σχηματισμό των πυρήνων κρυστάλλωσης και τέλος στην μετασταθερή ζώνη όπου αντιστοιχεί ιδανικά στην αύξηση του ήδη υπάρχοντος κρυστάλλου. Από το διάγραμμα καταλαβαίνουμε ότι ιδανικά η κρυστάλλωση θα ξεκινήσει ακριβώς μετά την μετασταθερή ζώνη, στα πρώτα στάδια της ζώνης

πυρήνωσης, όπου θα δημιουργηθούν οι πρώτοι πυρήνες και άρα θα μειωθεί αργά και σταθερά η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα και ακολούθως θα βρεθεί στο στάδιο ανάπτυξης της μετασταθερής ζώνης.



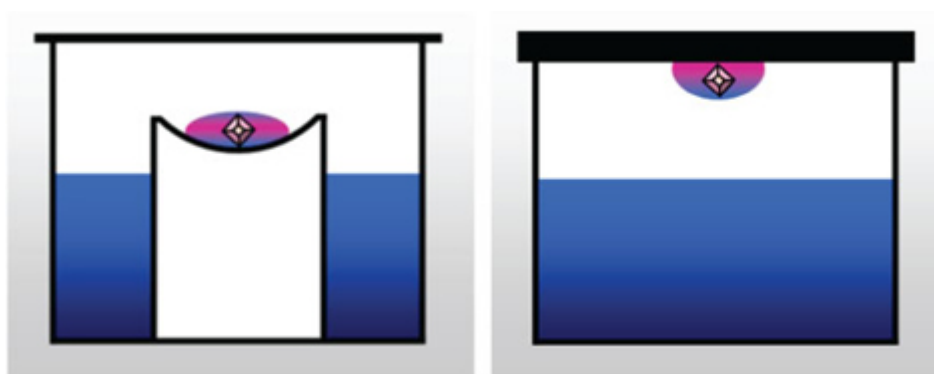
Εικόνα 18. Διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Στον κατακόρυφο άξονα αναπαριστάται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ενώ στον οριζόντιο οι παράμετροι που βοηθούν στην καθίζηση της.

1.4.1.2. Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Έχουν αναπτυχθεί πολλοί μέθοδοι κρυστάλλωσης και παρά την ποικιλία τους μοιράζονται τον ίδιο σκοπό που δεν είναι άλλος από το να φέρουν το διάλυμα σε μία υπέρκορη κατάσταση ιδανική για το στάδιο της πυρήνωσης. Μοιράζονται δηλαδή την ίδια αρχή μεθόδου ώστε να επιτευχθεί ελεγχόμενη αφυδάτωση του πρωτεϊνικού διαλύματος μεταβάλλοντας αργά τη θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ της στερεάς και της υγρής φάσης. Έτσι λοιπόν έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές με

τις κυριότερες να είναι α) η διάχυση ατμών (*vapor diffusion*), β) μικροσπορά/μακροσπορά (*microseeding/macroseeding*), γ) μέθοδος διαπίδυσης (*dialysis*) και δ) η στατική μέθοδος *batch* [224].

Η διάχυση ατμών συναντάται με δύο μορφές, τη μέθοδο της επικρεμάμενης σταγόνας (*hanging-drop*) και τη μέθοδο της επικαθήμενης σταγόνας (*sitting-drop*). Η διαφορά τους έγκειται στον τρόπο που τοποθετείται η σταγόνα, όπου στην πρώτη περίπτωση βρίσκεται να αιωρείται στην κάτω επιφάνεια μιας γυάλινης πλάκας, ενώ στη δεύτερη τοποθετείται σε μία πλαστική ή γυάλινη επιφάνεια [Εικόνα 19.]. Και στις δύο μορφές η σταγόνα κλείνεται αεροστεγώς και εξισορροπείται έναντι βοθρίου που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης και τον κατακρημνιστικό παράγοντα, επιτρέποντας έτσι την αργή αύξηση των συγκεντρώσεων και άρα και την επίτευξη της θερμοδυναμικής ισορροπίας που είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει η κρυστάλλωση.



Εικόνα 19. Τεχνική διάχυσης ατμών. Σύγκριση των δύο μορφών, της επικρεμάμενης (*hanging-drop*) και της επικαθήμενης σταγόνας (*sitting-drop*) [225].

Η μικροσπορά/μακροσπορά (*microseeding/macroseeding*) είναι αντίστοιχα μία ισχυρή μέθοδος για την πυρήνωση και ανάπτυξη των κρυστάλλων και χρησιμοποιεί ήδη υπάρχοντες μικρούς κρυστάλλους ως πυρήνες οι οποίοι τοποθετούνται σε σταγονίδια που έρχονται σε κατάσταση ισορροπίας σε χαμηλότερα επίπεδα υπερκορεσμού. Σαν τεχνική προτιμάται για να δημιουργηθούν διαφορετικές κρυσταλλικές δομές ή για να βελτιωθεί η ανάπτυξη κρυστάλλων υψηλής ποιότητας

περίθλασης [226]. Η μέθοδος της διαπίδυσης αποτελεί παραλλαγή της τεχνικής διάχυσης των ατμών και περιλαμβάνει τη διάχυση και την εξισορρόπηση των μορίων καθίζησης μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης ως μέσο για την αργή προσέγγιση της συγκέντρωσης στην οποία κρυσταλλώνεται η πρωτεΐνη [227]. Και τέλος η στατική μέθοδος *batch* στην οποία όλα τα συστατικά και των δύο διαλυμάτων αναμιγνύονται στις τελικές τους συγκεντρώσεις, μέσα σε κλειστό δοχείο και συνεπώς, σε αντίθεση με τις προηγούμενες μεθόδους, ο υπερκορεσμός επιτυγχάνεται άμεσα [224].

1.4.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

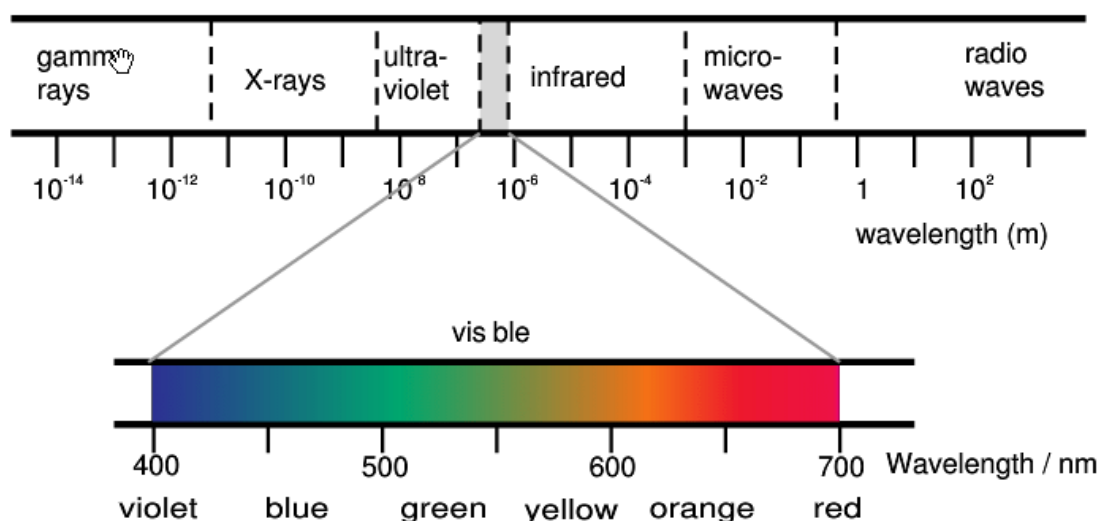
Όπως αναφέραμε και παραπάνω η διαδικασία της κρυστάλλωσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως επίπονη καθώς εξαρτάται από πολλές διαφορετικές παραμέτρους. Λόγω της πολυπλοκότητας του θέματος δεν είναι εφικτό να προβλεφθούν με ακρίβεια οι ιδανικές συνθήκες για την κρυστάλλωση του εκάστοτε μακρομορίου, με κατάληξη η δημιουργία των αρχικών πυρήνων να αποτελεί τη μεγαλύτερη σπαζοκεφαλιά των ερευνητών που ασχολούνται με τη Δομική Βιοχημεία. Οι παράμετροι μπορεί να είναι ενδογενείς φυσικοχημικές, βιοχημικές και βιοφυσικές, βιολογικές και τέλος ακόμα και η καθαρότητα των ίδιων των μακρομορίων. Ίδιος ενδογενείς φυσικοχημικές παραμέτρους εμπεριέχονται η θερμοκρασία, οι μεταβολές στο *pH*, οι ρυθμοί εξισορρόπησης και αύξησης, η φύση των παραγόντων κατακρήμνισης καθώς και των ρυθμιστικών διαλυμάτων, η επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης καθώς καίδιοςδιος ο ερευνητής. Στις βιοχημικές και βιοφυσικές παραμέτρους εμπεριέχονται η ποιότητα και η γήρανση του δείγματος, οι ιδιότητες των πρωτεϊνών όπως η οξειδωση ή η υδροφοβικότητα, η ευαισθησία της ίδιας της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές μεταβολές και τέλος η δέσμευση άλλων πρόσθετων ουσιών. Οι βιολογικές αφορούν την ύπαρξη αυτών των πρωτεϊνών σε αφθονία στη φύση, κάτι που έχει λυθεί με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας και τέλος η καθαρότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος που σχετίζεται με μακρομοριακές μολύνσεις, ετερογένεια της πρωτεϊνικής ακολουθίας λόγω της

δράσης πρωτεασών ή νουκλεασών και φυσικά η δομική ετερογένεια που σχετίζεται με τη δημιουργία συσσωματωμάτων ή και σχετική αποδιάταξη του μακρομορίου.

Ο κατάλογος με τις παραμέτρους που επηρεάζουν την επιτυχία της κρυστάλλωσης είναι μεγάλος και αποτελεί τη μεγαλύτερη απόδειξη της δυσκολίας της διεργασίας. Με την ανάπτυξη όμως της τεχνολογίας είναι εύλογο να συμπεράνουμε ότι έχουν αναπτυχθεί κάποιες τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν οδηγός σε αυτή την προσπάθεια. Για παράδειγμα, πλέον η ποιότητα του δείγματος μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση μεθόδων όπως ο Κυκλικός Διχρωισμός (*Circular Dichroism*), η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (*Dynamic Light Scattering, DLS*), ή ακόμα και διάφορες τεχνικές ηλεκτροφόρησης [228]. Επίσης, για τη διευκόλυνση των δοκιμών τόσων συνθηκών μέχρι να επιτευχθεί το ιδανικό αποτέλεσμα, έχουν αναπτυχθεί ρομποτικά συστήματα με σκοπό την ελαχιστοποίηση της ποσότητας της πρωτεΐνης που απαιτείται, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον αριθμό των πειραμάτων που μπορούν να πραγματοποιηθούν.

1.4.2. Περίθλαση ακτίνων-Χ

Οι ακτίνες Χ ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά το 1895 από τον *Wilhelm Conrad Röntgen* και έκτοτε βρήκαν εφαρμογή σε πολλούς εφαρμοσμένους τομείς της επιστήμης, με την κυριότερη να είναι η χρήση τους για ιατρικές ακτινογραφίες. Ουσιαστικά πρόκειται για ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκη κύματος πολύ μικρότερα από αυτά του ορατού φάσματος [Εικόνα 20.], από 10^{-8} m μέχρι 10^{-11} m και αντιστοιχεί σε εύρος συχνότητας από $3 \times 10^{16} \text{ Hz}$ μέχρι $3 \times 10^{19} \text{ Hz}$. Το μήκος κύματος τους είναι τυπικά 1 \AA ($= 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$), συγκρίσιμο με τις αποστάσεις ανάμεσα στα άτομα ή στα ιόντα, και για αυτό το λόγο βρίσκουν πολλές εφαρμογές.



Εικόνα 20. Απεικόνιση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος [229].

Η περίθλαση αποτελεί φαινόμενο της διάδοσης των κυμάτων και ορίζεται ως η απόκλιση από την ευθύγραμμη διάδοση του φωτός που προκαλείται λόγω παρεμβολής κάποιου εμποδίου. Αφορά λοιπόν το φαινόμενο της διάχυσης των κυμάτων προς όλες τις κατευθύνσεις όταν αυτά συναντάνε ένα εμπόδιο ή μία οπή με διαστάσεις παραπλήσιες του μήκους κύματος. Η περίθλαση των ακτίνων Χ διαπιστώθηκε πρώτη φορά το 1912, όταν ο γερμανός φυσικός *Max Theodor Felix von Laue* παρατήρησε ότι εάν μια δέσμη ακτίνων Χ διέλθει από ένα κρύσταλλο, τότε η δέσμη των ακτίνων Χ προσβάλλει το κρυσταλλικό πλέγμα και προκαλεί διέγερση των ηλεκτρονίων των ατόμων του, τα οποία μετατρέπονται σε κέντρα σφαιρικών κυμάτων. Τα κύματα αυτά διαδίδονται προς όλες τις διευθύνσεις στο χώρο και το αποτέλεσμα μπορεί να αποτυπωθεί σε μία φωτογραφική πλάκα τοποθετημένη σύμφωνα με την κατεύθυνση της διάδοσης των ακτίνων Χ.

Η αρχή λειτουργίας της περίθλασης ακτίνων Χ βασίζεται στην περίθλαση μιας δέσμης ακτίνων από διάφορα πλεγματικά επίπεδα (hkl) που συμβάλλουν ενισχυτικά για συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης θ . Χρησιμοποιούνται ειδικά περιθλασίμετρα ακτίνων Χ στα οποία ο ανιχνευτής καταγράφει τις γωνίες στις οποίες τα πλεγματικά επίπεδα περιθλούν τις ακτίνες Χ καθώς και τις εντάσεις τους. Η γωνιακή θέση (2θ)

και οι εντάσεις των ανακλώμενων κορυφών της ακτινοβολίας παράγουν ένα δυσδιάστατο μοτίβο που αποτελεί χαρακτηριστικό αποτύπωμα του κάθε υλικού που υπόκειται στη διαδικασία περίθλασης των ακτίνων Χ.

Για τη περίθλαση των ακτίνων Χ υπάρχουν τρεις βασικές μέθοδοι: α) μέθοδος *Laue*, που υπολογίζει τον προσανατολισμό κρυσταλλικών επιπέδων υπό σταθερή γωνία, χρήση πολυχρωματικών ακτίνων Χ και εξετάζει μονοκρύσταλλο, β) μέθοδος περιστρεφόμενου κρυστάλλου, η οποία υπολογίζει τη σταθερά του πλέγματος υπό μεταβλητή γωνία, χρησιμοποιεί μονοχρωματική ακτίνα Χ και εξετάζει μονοκρύσταλλο και γ) μέθοδος κόνεως, η οποία υπολογίζει τις παραμέτρους του πλέγματος υπό μεταβλητή γωνία, χρησιμοποιεί μονοχρωματική ακτίνα και εξετάζει πολυκρυσταλλικό δείγμα σε σκόνη. Το αποτέλεσμα λοιπόν της πρόσπτωσης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων ακτίνων Χ πάνω σε έναν κρύσταλλο (είτε κρύσταλλο βιολογικών μορίων είτε κρύσταλλο οργανικών ή ανόργανων μορίων) είναι η δημιουργία των περιθλάσεων (*reflections*) που αποτελούν το άθροισμα της ενισχυτικής συμβολής όλων των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης δημιουργείται το διάγραμμα περίθλασης [Εικόνα 21.] ή αλλιώς γνωστό ως περιθλασίγραμμα, που αποτελεί το χαρακτηριστικό αποτύπωμα του δείγματος [218].

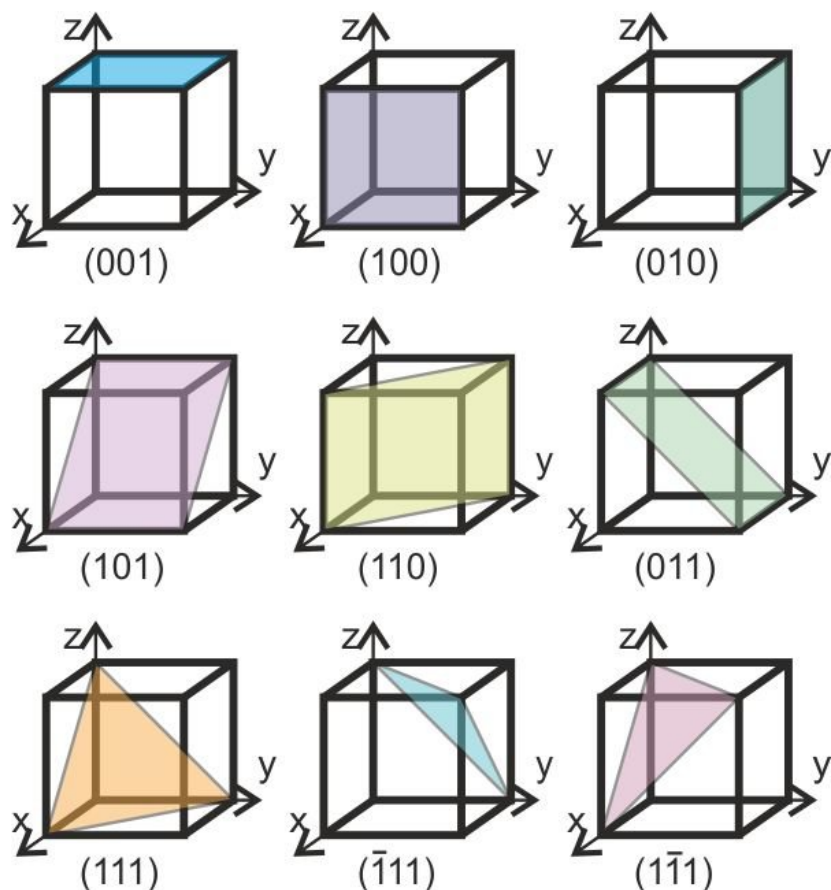


Εικόνα 21. Απεικόνιση της διαδικασίας περίθλασης ακτίνων Χ σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους και το τελικό διάγραμμα περίθλασης που λαμβάνεται [230].

1.4.2.1. Δείκτες *Miller h, k, l*

Για να προσδιοριστεί μία κρυσταλλική δομή πρέπει να οριστούν τα επίπεδα όπως ακριβώς γίνεται και με τις διευθύνσεις. Τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα λοιπόν, χαρακτηρίζονται με τρεις δείκτες (h, k, l) η οποίοι είναι γνωστοί ως δείκτες *Miller* καθώς αναπτύχθηκαν από τον καθηγητή *William Hallows Miller* ο οποίος έθεσε τα θεμέλια της σύγχρονης κρυσταλλογραφίας. Είναι ακέραιοι αριθμοί και ουσιαστικά πρόκειται για μία ομάδα τριών αριθμών που δείχνει τον προσανατολισμό ενός επιπέδου ή ενός συνόλου παράλληλων επιπέδων των ατόμων σε έναν κρύσταλλο. Θεωρώντας ότι κάθε άτομο στον κρύσταλλο αντιπροσωπεύεται από ένα σημείο και αυτά τα σημεία μεταξύ τους μπορούν να συνδεθούν με γραμμές, το πλέγμα που προκύπτει μπορεί να διαιρεθεί σε έναν αριθμό πανομοιότυπων συμπλεγμάτων ή μοναδιαίων κυψελίδων. Τα τεμνόμενα άκρα μια μοναδιαίας κυψελίδας, ορίζουν ένα σύνολο κρυσταλλογραφικών αξόνων και συνεπώς οι δείκτες *Miller* καθορίζονται από την τομή του επιπέδου με τους αυτούς τους άξονες [231].

Προσδιορίζοντας τα σημεία τομής του επιπέδου με τους κρυσταλλογραφικούς άξονες (x, y, z) της μοναδιαίας κυψελίδας προκύπτουν υποδιαίρέσεις του μήκους των πλευρών αυτής αλλά αντιστρέφοντας τα κλάσματα καταλήγουμε σε ακέραιους αριθμούς που αποτελούν τις τιμές των h, k και l [Εικόνα 22.]. Το πλεονέκτημα των δεικτών *Miller* είναι ότι εξαλείφει όλα τα κλάσματα από τη σημειογραφία ενός επιπέδου, απλουστεύοντάς το. Έτσι με τη χρήση των δεικτών ($h\ k\ l$) μπορεί να περιγραφεί ο προσανατολισμός ενός κρυσταλλογραφικού επιπέδου ή μιας κρυσταλλογραφικής διεύθυνσης, όπως επίσης μπορεί και προσδιοριστεί η θέση ενός ατόμου μέσα στον κρύσταλλο.



Εικόνα 22. Μερικοί από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες Miller για την περιγραφή επιπέδων πλέγματος σε κυβικό σύστημα [232].

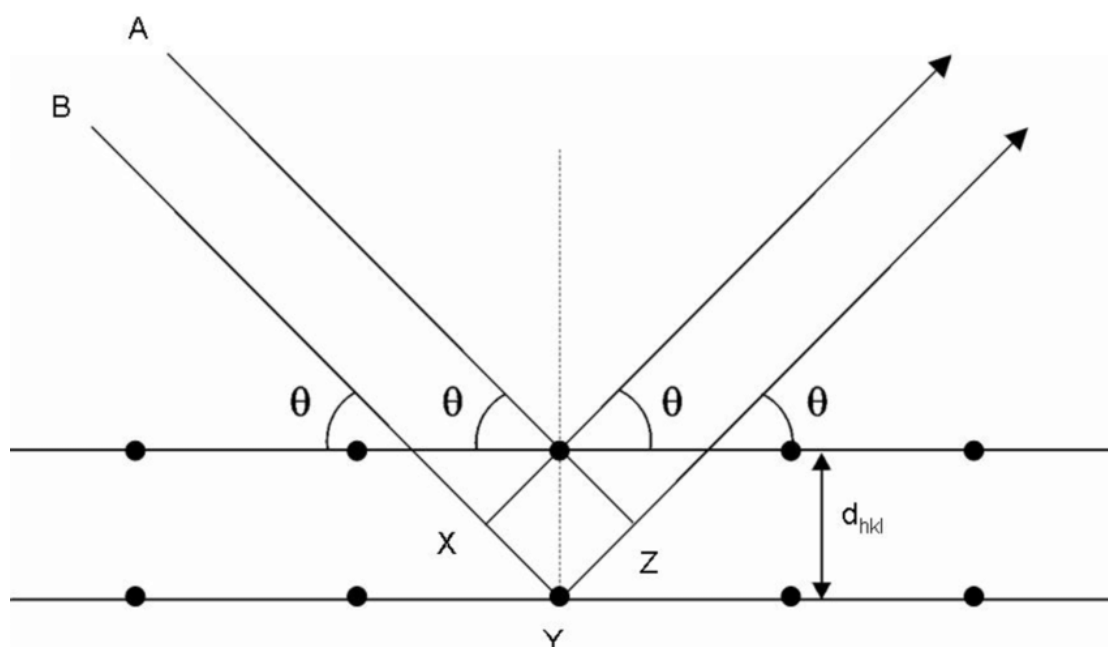
1.4.2.2. Ο νόμος του Bragg

Ο νόμος του Bragg συνδέει το μήκος κύματος λ των ακτίνων X με τη γωνία πρόσπτωσης θ πάνω σε διαδοχικά επίπεδα ενός κρυστάλλου μαζί με την απόσταση d μεταξύ τους. Διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον William Henry Bragg και το γιό του Lawrence Bragg το 1913 και διατυπώνεται ως εξής:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας X, n είναι η τάξη ανάκλασης, d είναι η ισαπόσταση της δέσμης των παραλλήλων επιπέδων και θ είναι η γωνία πρόσπτωσης.

Η σχέση αυτή περιγράφει το φαινόμενο της περίθλασης μονοχρωματικής δέσμης ακτίνων X όταν αυτή προσπίπτει υπό γωνία θ σε παράλληλα και ισαπέχοντα κρυσταλλικά επίπεδα (hkl). Από τη γεωμετρία της περίθλασης [Εικόνα 23.] καταλαβαίνουμε ότι η προσπίπτουσα και η περιθλώμενη ακτίνα X υπακούουν στο νόμο της ανάκλασης του λευκού φωτός όταν αυτό προσπίτει σε λεία επιφάνεια. Βλέπουμε επίσης ότι η προσπίπτουσα και περιθλώμενη σχηματίζουν γωνία 2θ και έχουν διαφορά πορείας $2d\sin\theta$ δύο παράλληλων ακτίνων που όταν είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος λ , τότε έχουμε εξερχόμενη δέσμη. Όταν η διαφορά πορείας δεν είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του λ , τότε οι εξερχόμενες ακτίνες έχουν διαφορά φάσης και προστιθέμενες αλληλοαναιρούνται.



Εικόνα 23. Η γεωμετρία της περίθλασης. Δύο ακτίνες με το ίδιο μήκος κύματος και φάση προσεγγίζουν ένα κρυσταλλικό στερεό και διασκορπίζονται από δύο διαφορετικά άτομα μέσα σε αυτό [233].

Η μελέτη της σχέσης του Bragg δείχνει ότι η γωνία θ είναι αντιστρόφως ανάλογη της ισαπόστασης d και αυτό σημαίνει ότι οι μεγάλες κυψελίδες των βιολογικών μορίων θα έχουν μεγάλες ισαποστάσεις, άρα πολύ μικρές τιμές των $1/d$ και συνεπώς οι

γωνίες στις οποίες θα λαμβάνονται ανακλάσεις με μικρές τιμές hkl θα είναι και αυτές πολύ μικρές. Το αποτέλεσμα θα είναι ότι εφόσον οι ανακλάσεις θα αρχίζουν να εμφανίζονται από πολύ μικρές γωνίες, θα υπάρχουν περιθώρια συλλογής πολλών ανακλάσεων μέχρι να τερματίσει τη διαδρομή του ο ανιχνευτής. Επίσης λόγω των μεγάλων ισαποστάσεων θα υπάρχουν πολλά περισσότερα ατομικά επίπεδα ικανά να δώσουν πολύ περισσότερες ανακλάσεις σε σχέση με τις μικρές κυψελίδες και συνεπώς τα διαγράμματα περίθλασης παρουσιάζουν πιο πυκνή εικόνα όσων αφορά τα μεγάλα βιομόρια ενώ λιγότερο πυκνή όσων αφορά τα μικρά μόρια [234].

1.4.2.3. Μετασχηματισμοί *Fourier*

Ο μετασχηματισμός *Fourier* είναι ένας μαθηματικός μετασχηματισμός που αποσυνθέτει συναρτήσεις ανάλογα με το χώρο ή το χρόνο σε συναρτήσεις ανάλογα με τη χωρική ή χρονική συχνότητα. Είναι ουσιαστικά ένα εργαλείο που αποσυνθέτει μια κυματομορφή (συνάρτηση ή σήμα) σε μια εναλλακτική αναπαράσταση, που χαρακτηρίζεται από τις συναρτήσεις ημιτόνων και συνημιτόνων ποικίλων συχνοτήτων. Αναγνωρίζοντας λοιπόν ότι όλες οι κυματομορφές, ανεξάρτητα από το τι παρατηρείτε, είναι το άθροισμα απλών ημιτόνων, με τη βοήθεια του μετασχηματισμού *Fourier* μπορούμε να τις προβάλλουμε με διαφορετικό και μοναδικό τρόπο ως το άθροισμα των ημιτόνων της.

Με απλά λόγια αυτό που μας προσφέρουν οι μετασχηματισμοί *Fourier* είναι η έκφραση των κυμάτων να γίνεται σε σειρές και ολοκληρώματα αλλά επίσης μας έδωσαν και τη δυνατότητα μετάβασης από τον ευθύ στον αντίστροφο χώρο και αντιστρόφως. Μας επιτρέπει λοιπόν, να εκφράσουμε ένα κύμα σε εκθετική μορφή και όταν διάφορα κύματα φθάνουν ταυτόχρονα στο ίδιο σημείο να δίνουν ένα συνιστώμενο κύμα που με την σειρά του θα εκφράζεται από την συνιστάμενη των διανυσμάτων τους.

Ο παράγων δομής F κατά μήκος μιας διεύθυνσης στο χώρο $[hkl]$ ορίζεται σαν την συνιστάμενη των κυμάτων από όλα τα άτομα της κυψελίδας στη διεύθυνση αυτή. Καθένα από αυτά τα κύματα συνιστώσες αντιπροσωπεύονται τόσο κατά πλάτος, ανάλογο της σκεδαστικής ικανότητας του κάθε ατόμου στην κυψελίδα, όσο και κατά φάση ϕ , η οποία θα είναι διαφορετική από αυτήν που θα είχε το κύμα που προήλθε από ένα άτομο στη θέση 0,0,0 της κυψελίδας. Γενικώς αν ένα άτομο έχει κλασματικές συντεταγμένες x, y, z θα εκπέμπει κύμα με διαφορά φάσης ως προς το άτομο στην αρχή της κυψελίδας [234].

Η μετάβαση από την ηλεκτρονική πυκνότητα, που αποτελεί ποσότητα του ευθέως χώρου, στον παράγοντα δομής, που αποτελεί ποσότητα του αντίστροφου χώρου, συμβαίνει με τη βοήθεια του μετασχηματισμού *Fourier* και καταλήγουμε ουσιαστικά με ένα ζεύγος σχέσεων. Ο παράγοντας δομής περιγράφεται ως η άθροιση ηλεκτρονικών πυκνοτήτων στον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας:

$$\vec{F}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV$$

όπου dV ο στοιχειώδης όγκος της κυψελίδας, xyz οι συντεταγμένες της, $2\pi(hx+ky+lz)$ η φάση στις συγκεκριμένες συντεταγμένες, $\rho(xyz)$ το πλάτος του κύματος που περιγράφεται ως η τιμή της ηλεκτρονικής πυκνότητας και φυσικά hkl οι δείκτες *Miller* του παράγοντα δομής.

Και η εξίσωση που προκύπτει για τον προσδιορισμό της ηλεκτρονικής πυκνότητας κάθε σημείου της μοναδιαίας κυψελίδας:

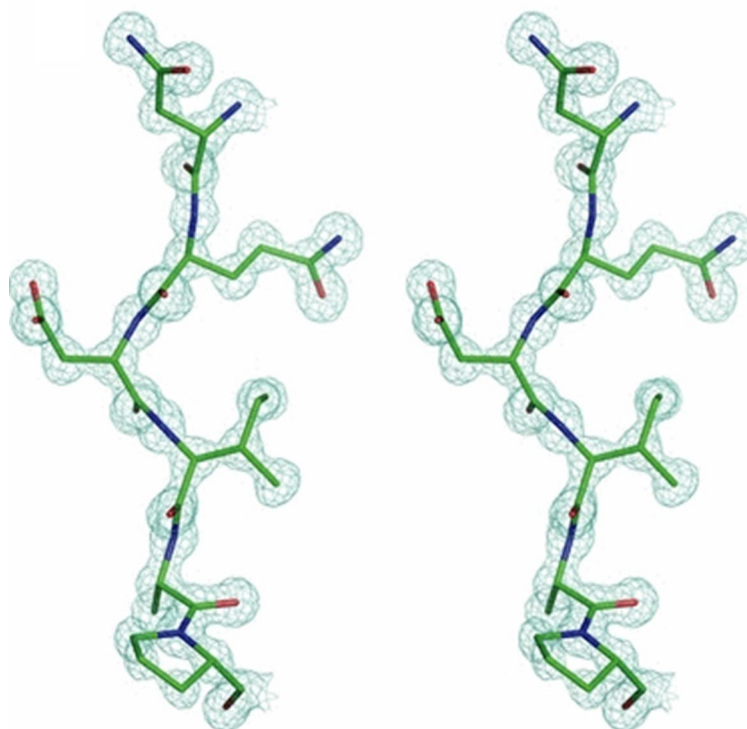
$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

όπου $\rho(xyz)$ η συνάρτηση της ηλεκτρονικής πυκνότητας, όπου $|F_{hkl}|$ είναι το πλάτος και ϕ_{hkl} η φάση του παράγοντα δομής F_{hkl} και το $-2\pi(hx+ky+lz)$ δηλώνει το πόσο συνεισφέρει ο παράγοντας F_{hkl} στη διαμόρφωση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στη θέση xyz [218].

1.4.2.4. Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Όπως έχουμε αναφέρει και σε προηγούμενες ενότητες, η κρυσταλλική δομή ουσιαστικά κωδικοποιείται στις ακτίνες X που περιθλώνται. Το σχήμα και η συμμετρία της κυψελίδας καθορίζουν τις κατευθύνσεις των περιθλώμενων δεσμών και οι θέσεις των ατόμων στον κρύσταλλο καθορίζουν τις εντάσεις τους. Η πειραματική διαδικασία της περίθλασης των ακτίνων X καταλήγει στον υπολογισμό μεγάλου αριθμού εντάσεων περίθλασης, ορισμένες από τις οποίες αναμένεται να είναι ισοδύναμες λόγω της συμμετρίας του κρυστάλλου. Από τις μετρούμενες εντάσεις υπολογίζεται μόνο το πλάτος της περίθλασης και δεν παρέχονται άμεσες πληροφορίες σχετικά με τις φάσεις της. Για να καταφέρουμε να ταυτοποιήσουμε την κατανομή των ηλεκτρονίων στο ασύμμετρο τμήμα της μοναδιαίας κυψελίδας χρησιμοποιούμε τον μετασχηματισμό *Fourier* που αναφέραμε παραπάνω και στηριζόμαστε σε κάποιες μεθόδους για τον προσδιορισμό των φάσεων. Μία από αυτές τις μεθόδους είναι η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης στην οποία βασιζόμαστε σε ένα δομικό μοντέλο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, κάνοντας μια αρχική προσέγγιση στην κατανομή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας η οποία βελτιώνεται με επαναληπτικό τρόπο συγκλίνοντας στο μοντέλο [235].

Το αρχικό πειραματικό αποτέλεσμα συνοψίζεται σε έναν χάρτη της πυκνότητας των ηλεκτρονίων [Εικόνα 24.] εντός του κρυστάλλου που ερμηνεύεται με όρους μεμονωμένων ατόμων και μορίων. Ο χάρτης αυτός, ουσιαστικά, συνδυάζει το δομικό μοντέλο και τα πειραματικά δεδομένα που έχουν συλλεχθεί και αναπαριστά το πόσο καλά ταιριάζουν μεταξύ τους. Καταλήγουμε λοιπόν, με μία τρισδιάστατη περιγραφή της πυκνότητας των ηλεκτρονίων σε μια κρυσταλλική δομή η οποία όμως χρειάζεται βελτίωση ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη συμφωνία μεταξύ των παρατηρούμενων πλατών περίθλασης (F_{obs}) και εκείνων που υπολογίζονται από το μοντέλο (F_{calc}). Αυτή η συμφωνία κρίνεται από τον κρυσταλλογραφικό παράγοντα R και πρέπει να τονιστεί ότι ο παράγοντας R είναι σφαιρικός δείκτης, που δείχνει τη συνολική συμφωνία, μεταξύ παρατηρούμενων και υπολογισμένων πλατών [235].



Εικόνα 24. Στερεοσκοπική απεικόνιση χάρτη πυκνότητας ηλεκτρονίων πρωτεΐνης (κωδικός *PDB*: 2axw [236]) [235].

1.4.2.5. Αξιολόγηση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Εφόσον έχουμε αναφερθεί σε όλα τα παραπάνω και έχουμε καλύψει ένα μικρό αλλά ικανοποιητικό κομμάτι πίσω από την ‘τέχνη’ της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών, θα κλείσουμε την ενότητα με τον πιο προφανή τρόπο, το πώς αξιολογούμε τα δεδομένα που με τόσο κόπο συλλέξαμε. Είναι ηλίου φαινότερο ότι η ποιότητα των κρυσταλλογραφικών δομών εξαρτάται απόλυτα από την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ που συλλέχθηκαν. Ένας κρυσταλλογράφος, πριν προχωρήσει σε πιο εξειδικευμένους δείκτες, στρέφεται σε δύο βασικές ενδείξεις που μαρτυρούν πολλά για την ποιότητα αυτών των δεδομένων. Αυτοί οι δύο γενικοί δείκτες δεν είναι άλλοι από την ευκρίνεια (*resolution*) και την πληρότητα (*completeness*).

Η ευκρίνεια καθορίζει το επίπεδο της λεπτομέρειας που μπορεί να φανεί σε ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας και έτσι δεδομένα των $\sim 4\text{\AA}$ είναι ικανά να ταυτοποιούν μόνο την κύρια αλυσίδα και στοιχεία δευτεροταγούς δομής αφήνοντας εκτός τις πλευρικές αλυσίδες ενώ δεδομένα των $2,5\text{-}3\text{\AA}$ επιτρέπουν ταυτοποίηση της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών αλυσίδων όχι όμως και των εύκαμπτων τμημάτων της πρωτεΐνης. Όσο αυξάνεται δηλαδή η ευκρίνεια, από $<2\text{-}2,5\text{\AA}$ είναι εύκολο να δημιουργηθεί ένα σχεδόν πλήρες μοντέλο, το οποίο θα περιλαμβάνει τα περισσότερα από τα διατεταγμένα μόρια διαλύτη καθώς και τους προσδέτες στις σωστές διαμορφώσεις [237].

Η πληρότητα των δεδομένων, από την άλλη, ορίζεται από τον αριθμό των περιθλάσεων που έχουν συλλεχθεί σε σύγκριση με τον αριθμό των θεωρητικών πιθανών περιθλάσεων που θα μπορούσαν να έχουν συλλεχθεί για την εκάστοτε κρυσταλλική συμμετρία. Για να θεωρηθεί ένα μοντέλο που κατασκευάζεται αξιόπιστο, είναι επιθυμητό η πληρότητα που παρουσιάζει να υπερβαίνει ένα ποσοστό της τάξης του 90% καθώς τιμές μικρότερες από 80% θεωρούνται ελλιπείς και συνεπώς αμφισβητείται η εγκυρότητα τους [238]. Πέρα όμως από την ευκρίνεια και την πληρότητα, ένα τελικό δομικό μοντέλο θα πρέπει να συμμορφώνεται με φυσικούς και χημικούς κανόνες (σωστή στερεοχημεία, σωστές γωνίες και μήκη δεσμών, κλπ.) και θα πρέπει να έχει λογικές τιμές για διάφορα κρυσταλλογραφικά κριτήρια όπως οι συντελεστές R και οι ακραίες τιμές *Ramachadran* [239], η οποίες σχετίζονται με τις δίεδρες γωνίες ϕ και ψ κάθε αμινοξικού καταλοίπου. Η εκτίμηση όλων αυτών των παραμέτρων, σε συνδυασμό με τον ενδελεχή έλεγχο από τον κρυσταλλογράφο βοηθάει στην αποτροπή της δημιουργίας υποθέσεων καθώς και στην αποφυγή επακόλουθων πειραμάτων για τα οποία δεν υπάρχει σταθερή βάση.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σαν αντικείμενο μελέτης τον χαρακτηρισμό της *LjSK1*, μίας κινάσης της οικογένειας των *GSK3β* κινασών από το φυτό *Lotus japonicus* που εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ ψυχανθών-ριζοβίων και σε οργανογενετικές διαδικασίες των φυματίων στη ρίζα των φυτών. Η δράση της έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση αναπτυξιακών διαδικασιών, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δράσης της και ο ρόλος της στα βιοχημικά μονοπάτια του φυτού δεν είναι γνωστά. Στόχος της διατριβής ήταν ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της και ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της για την αποκάλυψη της σχέσης δομής-δράσης της.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

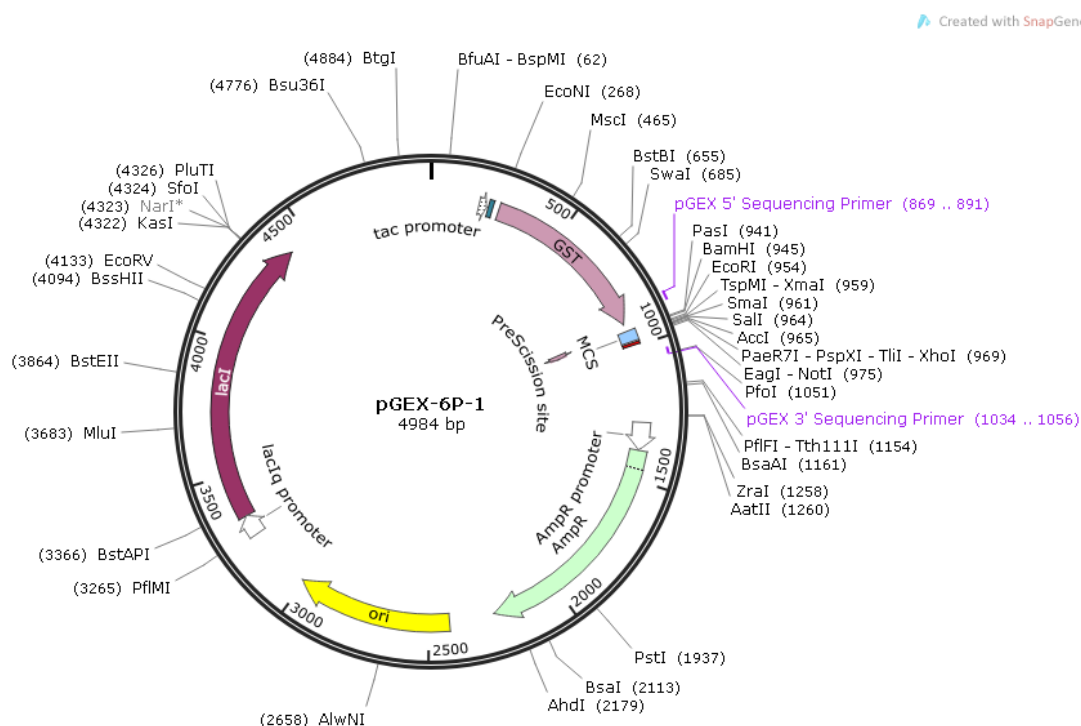
3.1. Χαρακτηρισμός *LjSK1*

3.1.1. Χημικός μετασχηματισμός βακτηριακών στελεχών *E. coli*

Αφορά βακτηριακά στελέχη που έχουν προηγουμένως επεξεργαστεί με $CaCl_2$ ώστε να είναι επιδεκτικά σε εισαγωγή πλασμιδίου. Η μέθοδος βασίζεται σε γνωστό πρωτόκολλο [240] και αρχικά πραγματοποιείται επώαση των βακτηριακών στελεχών με τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα για $\sim 30 \text{ min}$, στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec , τοποθέτηση στον πάγο για $\sim 2 \text{ min}$, προσθήκη υγρού θρεπτικού μέσου *LB Broth* (*Applichem*) και επώαση στους 37°C υπό ανακίνηση (210 rpm) για 1 h . Τέλος, μέρος των ανασυνδυασμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία *Petri* με θρεπτικό μέσο *LB Agar* (*SERVA*) στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων και επωάζονται για $\sim 16 \text{ h}$.

- ✚ Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες με χρήση αποστειρωμένων μέσων και υλικών.
- ✚ Χημικός μετασχηματισμός πραγματοποιήθηκε στα βακτηριακά στελέχη *E. coli XL1-Blue* (*Agilent Technologies*), *BL21-Gold(DE3)* (*Agilent Technologies*) και *Rosetta 2(DE3)* (*Novagen*).
- ✚ Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *pGEX-6P-1* (*SIGMA*), ο οποίος φέρει ετικέτα αγκιστείας την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST*) [Εικόνα 25.].
- ✚ Τα αντιβιοτικά επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων ήταν *Ampicillin* (*SERVA*), σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g/mL}$, για τα στελέχη *XL1-Blue* και *BL21-Gold(DE3)* και *Ampicillin* και *Chloroamphenicol* (*SIGMA*), σε συγκεντρώσεις $50 \mu\text{g/mL}$ και $34 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα, για το βακτηριακό στέλεχος *Rosetta 2(DE3)*.

✚ Για την επώαση υπό συνεχή ανακίνηση χρησιμοποιήθηκε *Shaking Incubator (LabTech)*



Εικόνα 25. Πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης *pGEX-6P-1*

3.1.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης *LjSK1*

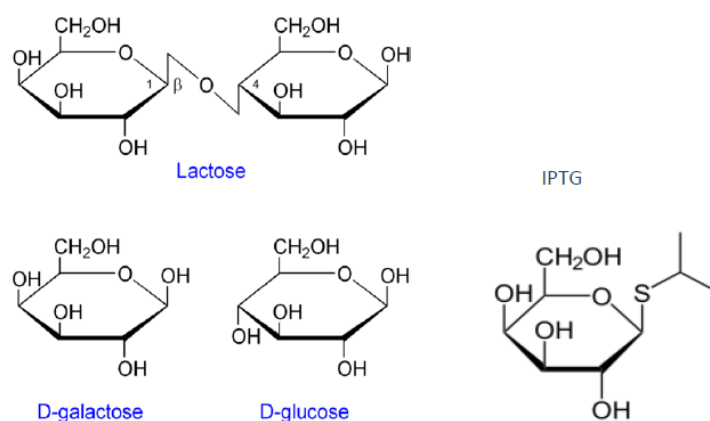
Για να διαπιστωθούν οι καταλληλότερες συνθήκες παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης *LjSK1*, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στα βακτηριακά στελέχη *E. coli* *BL21-Gold* και *Rosetta 2*. Τα κύτταρα είχαν προηγουμένως μετασχηματιστεί χημικά και μέρος αυτών επιστρώθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό *LB Agar* παρουσία των αντιβιοτικών επιλογής και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 16 h, προς σχηματισμό μοναδιαίων στικτών αποικιών. Στο επόμενο στάδιο, μία αποικία από κάθε βακτηριακή σειρά μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό μέσο *LB Broth* και αφήνονται για επώαση υπό συνεχή ανακίνηση (210 rpm) στους 37 °C για 16 h. Ακολουθεί μεταφορά ποσότητας των ανεπτυγμένων βακτηρίων σε φρέσκο υγρό θρεπτικό, σε αναλογία 1:100 και συνεχίζεται επώαση στους 37 °C υπό ανακίνηση

(210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm να πλησιάζει την τιμή 0.6, δηλαδή μέχρι τα βακτήρια να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και πριν την στατική φάση.

Στο σημείο αυτό οι δύο καλλιέργειες χωρίζονται σε 3 σωλήνες τύπου *falcon*, η κάθε μία. Για κάθε καλλιέργεια, ο ένας σωλήνας αποτέλεσε το *control* στο οποίο δεν προστίθεται επαγωγέας IPTG (*SERVA*), στο δεύτερο σωλήνα προστέθηκε IPTG συγκέντρωσης 0.2 mM και στον τρίτο σωλήνα προστέθηκε IPTG 0.5 mM. Όλες οι καλλιέργειες, μετά την επαγωγή, επωάζονται σε θερμοκρασία 18 °C υπό συνεχή ανακίνηση (210 rpm) για 16 h. Μετά το πέρας της επώασης τοποθετούνται σε πάγο, ώστε να ανακοπεί η ανάπτυξη, και φυγοκεντρούνται σε 5000 rpm, στους 4 °C για 10 min. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιείται με ειδικό διάλυμα λύσης. Ακολουθεί περαιτέρω μηχανική λύση των βακτηριακών κυττάρων με συσκευή υπερήχων και κρατείται δείγμα των συνολικών πρωτεϊνών (*Total*) και τα υπόλοιπα κύτταρα φυγοκεντρούνται εκ νέου σε 12000 rpm, στους 4 °C για 30 min. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης συλλέγεται το υπερκείμενο (*Soluble*), το οποίο αναλύεται, μαζί και με το *Total* σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

- 🌈 Σε όλα τα στάδια η συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλογής ήταν ίδια. Για τα *BL21-Gold* 50 µg/mL *Ampicillin* και για τα *Rosetta 2* 50 µg/mL *Ampicillin* και 34 µg/mL *Chloroamphenicol*. Στα *Rosetta 2* γίνεται χρήση διπλού αντιβιοτικού γιατί διαθέτουν επιπλέον πλασμίδιο που κωδικεύει tRNAs για 7 σπάνια κωδικόνια και φέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό *Chloroamphenicol*.
- 🌈 Ως επαγωγέας χρησιμοποιείται η ισοπροπυλο-β-D-θειογλυκοκυρανόζη ή αλλιώς γνωστό ως IPTG (*SERVA*). Η επαγωγή βασίζεται στο ότι είναι δομικά παραπλήσιο με το μόριο της λακτόζης [Εικόνα 26.] και μπορεί να προσδένεται ισχυρά στον καταστολέα του *lac* οπερονίου [241]
- 🌈 Για τις φυγοκεντρήσεις χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος *Hermle Z36HK* και για τη μηχανική λύση των βακτηριακών κυττάρων η συσκευή υπερήχων *Ultrasonic processor UP400S* (400 W, 24 kHz) της εταιρείας *Hielscher*.

- Η μηχανική λύση πραγματοποιήθηκε σε 1 κύκλο των 5 sec, με υπερήχους εύρους 70% σε συνεχές κύκλο και εφόσον τα δείγματα είχαν τοποθετηθεί σε πάγο για αποφυγή της αύξησης της θερμοκρασίας.
- Το διάλυμα λύσης των βακτηριακών κυττάρων περιείχε 50 mM Tris (Applichem), 0.2 M NaCl (Applichem), 5% (v/v) Glycerol (Panreac) και 0.1% (v/v) MTG (3-Mercapto-1,2-propanediol SIGMA). Το pH ρυθμίστηκε με HCl (Merck) στο 7.



Εικόνα 26. Η δομή της λακτόζης σε σύγκριση με την δομή του επαγωγέα IPTG

3.1.3. Υπερέκφραση της *LjSK1* στο ετερόλογο σύστημα *E.coli*

Ο πλασμιδιακός φορέας εισέρχεται με τη μέθοδο του χημικού μετασχηματισμού σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Rosetta 2* και μέρος αυτών επιστρώνονται σε τρυβλίο *Petri* σε στέρεο θρεπτικό, *Lb Agar*. Τα τρυβλία αφήνονται για επώαση στους 37 °C για 16 h ώστε να αναπτυχθούν μοναδιαίες στικτές αποικίες. Στη συνέχεια γίνεται επιλογή μίας αποικίας όπου και αφήνεται να αναπτυχθεί σε υγρό θρεπτικό υλικό, *LB Broth*, μικρής κλίμακας (~100 mL) υπό συνεχή ανακίνηση (210 rpm) στους 37 °C και πάλι για 16 h. Μετά το πέρας της επώασης, μέρος των ανεπτυγμένων κυττάρων μεταφέρονται σε νέο υγρό θρεπτικό, μεγαλύτερης κλίμακας (2 L) σε αναλογία 1:100 και συνεχίζεται επώαση στους 37 °C υπό ανακίνηση (210 rpm) μέχρι

η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 *nm* να πλησιάζει την τιμή 0.6 Στο στάδιο αυτό οι καλλιέργειες τοποθετούνται σε πάγο και όταν η θερμοκρασία τους πέσει ικανοποιητικά, ώστε να ανακοπή η ανάπτυξη των βακτηρίων, προστίθενται σε αυτές 0.5 *mM IPTG* και αφήνονται να επωαστούν στους 18 °C, υπό συνεχή ανακίνηση, για 16 *h*. Με το τέλος της επαγωγής τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται ύστερα από φυγοκέντρηση σε 7000 *rpm*, στους 4 °C επί 30 *min*.

- ✚ Σε όλα τα στάδια η συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλογής ήταν ίδια. 50 *μg/mL Ampicillin* και 34 *μg/mL Chloroamphenicol*.
- ✚ Μέχρι και το στάδιο της επαγωγής, όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες με χρήση αποστειρωμένων μέσων και υλικών.
- ✚ Για τη φυγοκέντρηση χρησιμοποιήθηκε η φυγόκεντρος *Hitachi*.

3.1.4. Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, διαλυτοποιείται άμεσα με ειδικό διάλυμα λύσης και ενώ είναι τοποθετημένο σε πάγο για αποφυγή της δράσης πρωτεασών. Η διαλυτοποίηση γίνεται με ~20 *mL* διαλύματος και στη συνέχεια προστίθεται βενζονάση (*SIGMA*) και το μίγμα παραμένει για 10 *min* σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το πέρας των 10 *min* ακολουθεί άμεση κατάψυξη (*flash-freeze*) σε αιθανόλη που προηγουμένως έχει καταψυχθεί στους -80 °C και τέλος αποθηκεύονται σε καταψύκτη βαθιάς κατάψυξης, στους -80 °C.

- ✚ Αρχικά το διάλυμα λύσης περιείχε 50 *mM Tris* , 0.2 *M NaCl* , 5% (*v/v*) *Glycerol* και 0.1% (*v/v*) *MTG* και το *pH* ρυθμίστηκε με *HCl* στο 7. Στην πορεία τροποποιήθηκε ελάχιστα και προστέθηκε και 1 *mM EDTA (Sds)* καθώς είναι ένας χηλικός παράγοντας που συνεισφέρει τόσο στην εξάλειψη της μόλυνσης από δισθενή κατιόντα όσο και στην αναστολή της δραστηριότητας πρωτεασών [242].

- ✚ Επίσης το διάλυμα λύσης περιέχει πάντα, είτε 1 mM PMSF (*Applichem*) ως αναστολέα πρωτεασών το οποίο προστίθεται πάντα ακριβώς πριν τη λύση των βακτηρίων λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του, είτε το κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών *Protease inhibitor cocktail tablets (Roche)*.
- ✚ Η τεχνική *flash freeze* επιλέχθηκε σαν στάδιο της βακτηριακής λύσης καθώς προκαλεί τα κύτταρα να διογκωθούν και τελικά να σπάσουν, λόγω των κρυστάλλων πάγου που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία της κατάψυξης, ενώ στη συνέχεια κατά τη διαδικασία της απόψυξης συστέλλονται ξανά.

3.1.5. Έλεγχος πρωτεόλυσης της διαλυτής *LjSK1*

Η πρωτεόλυση αναφέρεται στη διάσπαση των πρωτεϊνών σε μικρότερα συστατικά. *In vivo* συμβαίνει συνήθως είτε για να ενεργοποιήσει είτε για να μειώσει τη λειτουργικότητα κυτταρικών πρωτεϊνών, αλλά μπορεί να προκληθεί και λόγω εξωτερικών ερεθισμάτων, όπως για παράδειγμα το στρες λόγω θερμότητας. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεολυτική διάσπαση πολλών πρωτεϊνών οδηγεί σε αποικοδόμηση της πρωτεΐνης και απενεργοποίηση του υποστρώματος [243]. Είναι κατανοητό λοιπόν ότι στην περίπτωση που η διαλυτή *LjSK1* πρωτεολύεται, η μελέτη της καθίσταται δύσκολη και πολύπλοκη.

Για τον έλεγχο πρωτεόλυσης, η διαλυτή *LjSK1* χωρίζεται σε τρεις σωλήνες τύπου *erppendorf*. Ο ένας σωλήνας αποτελεί το *control*, στο δεύτερο σωλήνα προστίθεται 1 mM EDTA και στον τρίτο σωλήνα 1 mM EDTA και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών. Οι σωλήνες αποθηκεύονται στους 4°C και λαμβάνεται δείγμα, από κάθε έναν, ανά δύο ημέρες. Στα δείγματα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 4X (*Sample buffer*) και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι το πέρας του πειράματος, όπου και τελικά αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*).

- ✚ Η διαλυτή *LjSK1* βρίσκεται σε διάλυμα σύστασης 50 mM Tris pH 7 , 0.2 M NaCl , 5% (v/v) Glycerol και 0.1% (v/v) MTG

- ✚ Η LjSK1 που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελεύθερη της ετικέτας αγκιστείας GST-tag.
- ✚ Το κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών είναι το *Protease inhibitor cocktail tablets* (Roche).
- ✚ Το ρυθμιστικό διάλυμα των δειγμάτων (*Sample buffer 4X*) για το SDS-PAGE περιέχει 240 mM Tris, 40% (v/v) Glycerol, 8% (v/v) SDS (SERVA), 5% (v/v) β-mercaptoethanol (SIGMA), 0.04% (v/v) Bromophenol Blue (Research organics) και το pH έχει ρυθμιστεί στο 6.8 με HCl.

3.1.6. Καθαρισμός της LjSK1 με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Η διαδικασία του καθαρισμού μιας πρωτεΐνης αποτελεί κομβικό σημείο καθώς από την επιτυχία της εξαρτάται η συνέχιση των πειραμάτων. Απαιτείται συνδυασμός τεχνικών, δοκιμών επί δοκιμών και εξέταση πολλών παραγόντων, μέχρι να βρεθεί το κατάλληλο πρωτόκολλο που εξυπηρετεί τον καθαρισμό της εκάστοτε πρωτεΐνης, στο μέγιστο δυνατό. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, επιλέχθηκε ως σύστημα καθαρισμού η ÄKTA FPLC (GE, HealthCare) και δοκιμάστηκαν διάφορα είδη χρωματογραφικών τεχνικών, όπως η χρωματογραφία συγγένειας, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, η χρωματογραφία μοριακής διήθησης και η χρωματογραφία ανάστροφης φάσης.

Η αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας (*Affinity Chromatography, AC*) βασίζεται στη βιολογική συγγένεια, δηλαδή στην ικανότητα των πρωτεϊνών να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν, επιλεκτικά και αντιστρέψιμα, συγκεκριμένα μόρια (*ligands*). Σαν τεχνική παρέχει υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας λόγω του ότι στηρίζεται σε ειδικές βιολογικές αλληλεπιδράσεις. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες φέρουν μία ετικέτα αγκιστείας (*His-tag, GST-tag*) ως προς το υλικό πρόσδεσης και μπορούν να προσδεθούν σε αυτό και στη συνέχεια απομονώνονται είτε με μη ειδική έκλουση (αλλαγή pH ή ιοντικής ισχύς) ή με έκλουση συγγένειας (προσθήκη ενώσεων που

αλληλεπιδρούν επίσης με το υλικό). Το υλικό πρόσδεσης μπορεί να είναι απόλυτα εξειδικευμένο για ένα συγκεκριμένο μόριο ή και πιο γενικό που αλληλεπιδρά με πολλά μόρια αρκεί να φέρουν συγκεκριμένη ομάδα.



Η αρχή λειτουργίας της ιοντοανταλλαγής βασίζεται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και διαχωρίζει τα μόρια ανάλογα με το φορτίο τους. Ουσιαστικά, ο διαχωρισμός στηρίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση φορτισμένων μορίων, όπως οι πρωτεΐνες, στις καθηλωμένες ομάδες του ιοντικού ανταλλάκτη (συνήθως ρητίνες) οι οποίες είναι αντίθετα φορτισμένες. Λόγω των διαφορών στα φορτία, στην πυκνότητα των φορτίων και στις διαφορές των φορτίων στις επιφάνειές τους, τα μόρια έχουν διαφορετικούς βαθμούς αλληλεπίδρασης με τον ιοντικό ανταλλάκτη και καταφέρνουν να διαχωριστούν. Οι στήλες ιοντοανταλλαγής χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, κατιοανταλλακτικές και ανιοανταλλακτικές. Στις κατιοανταλλακτικές η στερεή φάση αποτελείται από αρνητικά φορτισμένες ομάδες στις οποίες προσδένονται θετικά φορτισμένα μόρια, ενώ στις ανιοανταλλακτικές η στερεή φάση αποτελείται από θετικά φορτισμένες ομάδες στις οποίες προσδένονται αρνητικά φορτισμένα μόρια. Η έκλουση των πρωτεϊνών συνήθως επιτυγχάνεται με διαλύματα αυξημένης συγκέντρωσης άλατος, όπου οι ασθενώς προσδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται πρώτα ενώ οι ισχυρά προσδεμένες πρωτεΐνες εκλύονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος.

Στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (*SEC*) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Ουσιαστικά δεν υπάρχει αλληλεπίδραση των μορίων με το υλικό της στήλης και τα διάφορα μόρια εισέρχονται στα πορώδη σφαιρίδια που δημιουργούνται από το υλικό. Συνεπώς, μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες δεν μπορούν να εισέλθουν στους πόρους του υλικού και το αποτέλεσμα είναι να εκλύονται στα πρώτα στάδια, ενώ μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες εισέρχονται στους πόρους και εκλύονται καθυστερημένα. Επιπλέον, υπάρχει ένα περιθώριο στην αρχή της στήλης που ονομάζεται νεκρός όγκος (*void volume*) κατά το οποίο εκλύονται τυχόν συσσωματώματα πρωτεϊνών λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους [244]. Είναι πολύ σύνηθες, πρωτεΐνες που δεν είναι σωστά αναδιπλωμένες ή άλλες παράμετροι έχουν οδηγήσει στη δημιουργία συσσωματωμάτων να εξέρχονται από την στήλη στα πρώτα κιόλας στάδια.

Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (*RPC*), ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Η στατική φάση αποτελείται από ρητίνες που φέρουν προσαρτημένες μικρές υδρόφοβες ομάδες, ενώ η κινητή φάση που διέρχεται είναι ουσιαστικά ένας πολικός διαλύτης που περιέχει όλες τις διαλυτοποιημένες ουσίες. Έτσι, οι υδρόφοβες ουσίες της κινητής φάσης τείνουν να δεσμευτούν στην στατική φάση μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και επιτυγχάνεται έτσι ο διαχωρισμός. Η έκλυση πραγματοποιείται με τη χρήση οργανικών διαλυτών, όπως το ακετονιτρίλιο ή η προπανόλη, ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση του νερού στην κινητή φάση αποδυναμώνοντας έτσι τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και της στήλης.

3.1.6.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού *LjSK1 No. 1*

Αρχικά, το διαλυτοποιημένο βακτηριακό ίζημα που βρίσκεται αποθηκευμένο στους -80°C , αφήνεται να αποψυχθεί αργά (*thaw ice*) και ακολουθεί μηχανική λύση με χρήση υπερήχων και τέλος φυγοκέντρωση σε υψηλές στροφές ώστε να διαχωριστεί το κυτταρόλυμα από το ίζημα.

-  Η μηχανική λύση με υπερήχους πραγματοποιήθηκε σε 5 κύκλους των 25 sec, με ενδιάμεση ξεκούραση των 15 sec, με υπερήχους εύρους 70% σε συνεχές κύκλο και εφόσον το δείγμα είχε τοποθετηθεί σε πάγο για αποφυγή της αύξησης της θερμοκρασίας.
-  Η φυγοκέντρωση πραγματοποιείται σε 12.000 rpm, στους 4°C για 45 min

Στάδιο 1^ο (στήλη συγγένειας): το κυτταρόλυμα διέρχεται από χρωματογραφική στήλη συγγένειας, την *Protino GST 4B (Macherey-Nagel)*, η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με το ίδιο διάλυμα που έχουν διαλυτοποιηθεί και τα βακτηριακά κύτταρα. Το δείγμα διέρχεται με ροή 0.3 mL/min από την στήλη και

εφόσον έχει περάσει ο όγκος του ακολουθεί πλύση και τέλος έκλυση με ειδικό διάλυμα (*elution buffer*) στο 100% της συγκέντρωσης του. Η ανάλυση των κλασμάτων γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και επιλέγονται τα πιο καθαρά.

- ✚ Η *LjSK1* εκφράζεται σε φορέα *pGEX-6P-1* (*GE HealthCare*) και φέρει ως ετικέτα την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST-tag*, 26 *KDa*). Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στην στήλη συγγένειας *Protino GST 4B*, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την στήλη απομακρύνονται.
- ✚ Το διάλυμα διαλυτοποίησης και εξισορρόπησης της στήλης περιείχε 50 *mM Tris*, 0.2 *M NaCl*, 5% (*v/v*) *Glycerol*, 0.1% (*v/v*) *MTG* και το *pH* ρυθμίστηκε με *HCl* στο 7. Το διάλυμα έκλυσης ήταν της ίδιας σύστασης αλλά περιείχε και 20 *mM L-Glutathione reduced, GSH* (*SERVA*) [245].

Στάδιο 2°: συλλέγονται τα κλάσματα της έκλυσης και πραγματοποιείται διαπίδυση ώστε να απομακρυνθεί το *NaCl* και να αλλαχθεί το *pH* του διαλύματος. Κινήσεις απαραίτητες ώστε σε επόμενο στάδιο το δείγμα να διέλθει από στήλη ανιοανταλλαγής. Η διαπίδυση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4 °C αρχικά για 16 *h* και στη συνέχεια σε φρέσκο διάλυμα για 2 *h* στην ίδια θερμοκρασία.

- ✚ Το διάλυμα διαπίδυσης περιείχε 50 *mM Tris*, *pH* 8 και 1 *mM DTT* (*SERVA*)
- ✚ Σε *pH* 8 η *LjSK1* έχει αρνητικό φορτίο και άρα μπορεί να προσδεθεί σε στήλη που είναι θετικά φορτισμένη
- ✚ Για τη διαπίδυση χρησιμοποιήθηκαν *Membrane dialysis tubing* με κατώφ 10.000 (*SIGMA*).

Στάδιο 3° (στήλη ανιοανταλλαγής) : μετά το πέρας της διαπίδυσης, συλλέγεται το δείγμα και εισέρχεται σε στήλη ανιοανταλλαγής *Resource Q* (*GE HealthCare*). Η στήλη έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα ίδιας σύστασης με το διάλυμα διαπίδυσης και το δείγμα εισάγεται με ροή 0.5 *mL/min*. Η έκλυση

πραγματοποιείται με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος που περιέχει *NaCl* και πιο συγκεκριμένα γίνεται σε χρονικό διάστημα 40 min, από 0-40% της συγκέντρωσης του διαλύματος έκλουσης και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Η ανάλυση των κλασμάτων γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και επιλέγονται τα πιο καθαρά.

🚦 Το διάλυμα έκλουσης περιείχε 50 mM *Tris*, pH 8, 1 mM *DTT* και 1 M *NaCl*.

Στάδιο 4°: στα κλάσματα με την υψηλότερη καθαρότητα της *LjSK1* πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο *Bradford* [246], με χρήση του αντιδραστηρίου *Bradford protein assay* 5X (*Bio-rad*). Στη συνέχεια, προστίθεται πρωτεάση 3C σε αναλογία 1 mg 3C σε 20 mg πρωτεΐνης και αφήνονται για 16 h σε θερμοκρασία 4 °C ώστε να κοπεί η ετικέτα συγγένειας.

🚦 Η πρωτεάση 3C διαθέτει ετικέτα συγγένειας *GST-tag* και το μοριακό της βάρος μαζί με την ετικέτα ανέρχεται σε ~46 KDa.

Στάδιο 5° (στήλη συγγένειας/αφαιρετική): το δείγμα εισέρχεται και πάλι σε στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* με σκοπό να διαχωριστεί η *LjSK1* από την πρωτεάση 3C. Η *LjSK1*, δεν φέρει πλέον την ετικέτα *GST* με αποτέλεσμα να μην προσδένεται στη στήλη και να εξέρχεται πρώτη, ενώ η πρωτεάση λόγω της ετικέτας συγγένειας προσδένεται στη στήλη και εκλούεται αργότερα με το 100% της συγκέντρωσης του διαλύματος έκλουσης. Τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και επιλέγονται τα πιο καθαρά όπου και συμπυκνώνονται σε φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 30 KDa, *Amicon Ultra-4* (*Merck Millipore*).

🚦 Η στήλη είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα που περιείχε 50 mM *Tris*, 50 mM *NaCl*, 5% (v/v) *Glycerol*, 0.1% (v/v) *MTG* και το pH ρυθμίστηκε με *HCl* στο 8. Το διάλυμα έκλουσης ήταν της ίδιας σύστασης αλλά περιείχε και 20 mM *GSH*.

3.1.6.2. Πρωτόκολλο καθαρισμού *LjSK1* No. 2

Το διαλυτοποιημένο βακτηριακό ίζημα επεξεργάζεται αρχικά όπως και στην παραπάνω ενότητα.

Στάδιο 1^ο (στήλη συγγένειας): το κυτταρόλυμα διέρχεται αρχικά από χρωματογραφική στήλη συγγένειας, την *Protino GST 4B*, όπως και στην προηγούμενη ενότητα. Εφόσον ο όγκος του δείγματος περάσει την στήλη, ακολουθεί πλύση με διαφορετικό διάλυμα (*Wash buffer*), έως ότου διέλθουν δύο όγκοι στήλης. Μετά το πέρας της πλύσης εισάγεται εντός της στήλης η πρωτεάση 3C σε αναλογία 1 *mg* 3C σε 20 *mg* πρωτεΐνης, όπου και αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για τουλάχιστον 16 *h*. Με αυτή την τεχνική η *LjSK1* αποκόβεται από την ετικέτα συγγένειας *GST-tag* και όταν η ροή συνεχίζεται η 3C παραμένει προσδεμένη λόγω της ετικέτας της, ενώ η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1* εξέρχεται από την στήλη. Ακολουθεί έκλουση με το αντίστοιχο διάλυμα στο 100% της συγκέντρωσής του και στο τέλος τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, ώστε να ταυτοποιηθούν αυτά που περιέχουν την *LjSK1*.

🌈 Τα διαλύματα διαλυτοποίησης του ιζήματος, εξισορρόπησης της στήλης και έκλουσης της στήλης έχουν την ίδια σύσταση που αναφέρεται και στην προηγούμενη ενότητα. Το διάλυμα πλύσης περιέχει 50 *mM Tris pH 8* και 0.1% (v/v) *MTG*.

Στάδιο 2^ο (στήλη συγγένειας): τα κλάσματα που επιλέχθηκαν ύστερα από την ανάλυση στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου συλλέγονται και εισέρχονται σε στήλη *HiTrap Blue sepharose HP (Cibacron Blue F3G-A, GE HeathCare)*. Το δείγμα εισέρχεται στην στήλη με ροή 0.5 *mL/min*, ακολουθεί πλύση και τέλος έκλουση με αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος [247]. Τέλος τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

- Η *HiTrap Blue sepharose HP* είναι μία στήλη που παρουσιάζει εκλεκτικότητα έναντι πολλών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων και των κινάσων, καθώς περιέχει μία χρωστική, την *Cibacron Blue F3G-A*, η οποία εμφανίζει δομικές ομοιότητες με τον συμπαράγοντα NAD^+ . Έτσι λοιπόν οι αφυδρογονάσεις που εξαρτώνται από NAD^+ και οι *ATP*-εξαρτώμενες κινάσες μπορούν να προσδεθούν σε αυτή.
- Το διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης περιείχε 50 mM *Tris* pH 8, 0.1% (v/v) *MTG* και 5% (v/v) *Glycerol*. Το διάλυμα έκλουσης περιείχε 50 mM *Tris* pH 8, 1 M *NaCl*, 0.1% (v/v) *MTG* και 5% (v/v) *Glycerol*.
- Η έκλουση πραγματοποιείται με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος έκλουσης σε στάδια (*step gradient*), ξεκινώντας από 20% και συνεχίζοντας με 40%, 60%, 80% και τέλος 100%.

3.1.6.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού *LjSK1* Νο. 3

Το διαλυτοποιημένο βακτηριακό ίζημα επεξεργάζεται αρχικά όπως και στην ενότητα 3.1.6.1.

Στάδιο 1^ο (στήλη συγγένειας): ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο όπως και στο 1^ο στάδιο της παραπάνω ενότητας. Χρησιμοποιείται αρχικά στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* και το δείγμα αφήνεται μαζί με την πρωτεάση 3C για 16 h. Η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1* εξέρχεται από την στήλη και ακολουθεί έκλουση με το αντίστοιχο διάλυμα στο 100% της συγκέντρωσής του. Τέλος τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ταυτοποιούνται αυτά που περιέχουν την *LjSK1*.

Στάδιο 2^ο (στήλη συγγένειας): τα κλάσματα που περιείχαν την *LjSK1*, συλλέγονται και εισέρχονται ξανά σε στήλη *Protino GST 4B*, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν

κατάλοιπα της πρωτεάσης 3C και της *LjSK1* που φέρει ακόμα την ετικέτα συγγένειας (*GST-tag*). Το δείγμα εισέρχεται με ροή 0.3 *mL/min*, ακολουθεί πλύση για έναν όγκο στήλης και τέλος έκλουση με το διάλυμα έκλουσης στο 100% της συγκέντρωσής του. Τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και συλλέγονται τα επιθυμητά.

🚦 Το διάλυμα εξισορρόπησης στήλης περιέχει 50 *mM Tris pH 8*, 0.1% (v/v) *MTG*. Το διάλυμα έκλουσης περιέχει 50 *mM Tris pH 8*, 50 *mM NaCl*, 5% (v/v) *Glycerol*, 0.1% (v/v) *MTG* και 20 *mM GSH*.

Στάδιο 3^ο (στήλη ανάστροφης φάσης): τα επιθυμητά κλάσματα συλλέγονται και εισέρχονται σε στήλη ανάστροφης φάσης *Resource RPC (GE Healthcare)*. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται αρχικά με 5 όγκους στήλης διαλύματος B και με ροή 1 *mL/min*. Ακολουθεί γραμμική αύξηση του διαλύματος A, έως ότου φτάσει το 100% της συγκέντρωσής του και στη συνέχεια αφήνεται να περάσουν 10 όγκοι στήλης αυτού. Στο τέλος της εξισορρόπησης αφήνονται να διέλθουν 5 όγκοι στήλης διαλύματος B στο 5% της συγκέντρωσής του. Το πρωτεϊνικό δείγμα εισέρχεται στην στήλη και εφόσον διέλθει ακολουθεί έκπλυση για 5 όγκους στήλης με διάλυμα B στο 25% της συγκέντρωσής του. Τέλος, η έκλουση πραγματοποιείται με διαβάθμιση του διαλύματος B, για συγκεντρώσεις 25% έως 45% και συλλέγονται τα κλάσματα.

🚦 Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το διάλυμα A με σύσταση 0.1% (v/v) *TFA* και το διάλυμα B μίγμα με σύσταση 0.08% (v/v) *TFA (SIGMA)* σε 2-*propanol (SIGMA)*: *Acetonitrile (SIGMA)*: νερό σε αναλογία 3:2:2.

3.1.6.4. Πρωτόκολλο καθαρισμού *LjSK1 No. 4*

Το διαλυτοποιημένο βακτηριακό ίζημα επεξεργάζεται αρχικά όπως και στην ενότητα 3.1.6.1.

Στάδιο 1° (στήλη συγγένειας): το κυτταρόλυμα διέρχεται αρχικά από χρωματογραφική στήλη συγγένειας, την *Protino GST 4B*, που είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα ίδιας σύστασης του διαλύματος διαλυτοποίησης του βακτηριακού ιζήματος. Το πρωτεϊνικό δείγμα διέρχεται από τη στήλη με ροή 0.3 mL/min και ακολουθεί πλύση με διαφορετικό διάλυμα (*Wash buffer*) έως ότου διέλθουν δύο όγκοι στήλης. Μετά το πέρας της πλύσης εισάγεται εντός της στήλης η πρωτεάση 3C σε αναλογία 1 mg 3C σε 20 mg πρωτεΐνης, όπου και αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για τουλάχιστον 16 h. Η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1* εξέρχεται από την στήλη και ακολουθεί έκλυση με το αντίστοιχο διάλυμα στο 100% της συγκέντρωσής του. Τέλος τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ταυτοποιούνται αυτά που περιέχουν την *LjSK1*.

🌈 Το διάλυμα εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκε είχε σύσταση 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerol, 0.1% (v/v) MTG, 1 mM EDTA και το pH ρυθμίστηκε με HCl στο 8. Το διάλυμα έκλυσης ήταν της ίδιας σύστασης αλλά περιείχε και 20 mM GSH και το pH ήταν ρυθμισμένο στο 8. Το διάλυμα πλύσης είχε σύσταση 20 mM Tris, pH 8, 0.1% (v/v) MTG και 1 mM EDTA.

Στάδιο 2° (στήλη συγγένειας): τα κλάσματα που περιείχαν την *LjSK1*, συλλέγονται και εισέρχονται ξανά σε στήλη *Protino GST 4B*, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα της πρωτεάσης 3C και της *LjSK1* που φέρει ακόμα την ετικέτα συγγένειας (*GST-tag*). Το δείγμα εισέρχεται με ροή 0.3 mL/min, ακολουθεί πλύση για δέκα όγκους στήλης και τέλος έκλυση με το διάλυμα έκλυσης στο 100% της συγκέντρωσής του. Τα κλάσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και συλλέγονται τα επιθυμητά, όπου και πραγματοποιείται ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο *Bradford*.

- 🌈 Το διάλυμα εξισορρόπησης είχε σύσταση 20 mM Tris, pH 8, 0.1% (v/v) MTG και 1 mM EDTA. Το διάλυμα έκλουσης είχε σύσταση 50 mM Tris, pH 8, 50 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerol, 0.1% (v/v) MTG, 1 mM EDTA και 20 mM GSH.

Στάδιο 3^ο: τα κλάσματα που επιλέχθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν, συμπυκνώνονται με χρήση φίλτρου *Vivaspin Turbo 4* (Sartorius), με κατώφλι 10000 και με μεμβράνη PES.

- 🌈 Η μεμβράνη PES (polyethersulfone) προτιμήθηκε λόγω της υδροφιλικότητάς της η οποία παρέχει χαμηλή δέσμευση πρωτεϊνών και άρα ελαχιστοποίηση της πιθανότητας δέσμευσης της προς ανάλυση πρωτεΐνης.

Στάδιο 4^ο (στήλη μοριακής διήθησης): το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό δείγμα διέρχεται από στήλη μοριακής διήθησης *Superdex S200* (SEC, GE HealthCare). Η στήλη είχε προηγουμένως εξισορροπηθεί και η διέλευση του δείγματος πραγματοποιείται με ροή 0.5 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Η ταυτοποίηση των κλασμάτων που περιέχουν την *LjSK1* γίνεται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και τέλος τα επιθυμητά κλάσματα συμπυκνώνονται εκ νέου με φίλτρο *Vivaspin Turbo 4*, (MWCO 10000).

- 🌈 Το διάλυμα εξισορρόπησης είχε σύσταση 20 mM Tris, pH 8, 0.1% (v/v) MTG και 1 mM EDTA.

3.1.7. Ανοσοαποτύπωση Western blot

Η ανάλυση κατά Western αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τον Harry Towbin το 1979 [248] και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της παρουσίας, του μεγέθους και της αφθονίας συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Ουσιαστικά οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση και μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη όπου και επωάζονται με ειδικά αντισώματα. Χάρη στα αντισώματα αυτά είναι

εφικτό, πέρα από την ανίχνευση πρωτεϊνών, να ταυτοποιηθούν και ειδικά αμινοξικά κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται και έχουν συγκεκριμένο ρόλο στη λειτουργία μίας πρωτεΐνης.

Στη δεδομένη διδακτορική διατριβή, η ανοσοαποτύπωση κατά *Western* χρησιμοποιήθηκε ώστε να εξακριβωθούν κατά πόσο τα κατάλοιπα *Ser9* και *Tyr298* της *LjSK1* φωσφορυλιώνονται και άρα έχουν άμεση επίδραση στη λειτουργία της. Με βάση τη βιβλιογραφία [50] και ύστερα από σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της *LjSK1* με την ανθρώπινη *GSK3β*, τα δύο αυτά κατάλοιπα κέντρισαν το ενδιαφέρον, καθώς η πιθανή φωσφορυλίωση της *Ser9* θα ερμηνευόταν ως αυτο-αναστολή του ενζύμου, ενώ η πιθανή φωσφορυλίωση της *Tyr 298* θα σχετιζόταν με την πλήρη ενεργοποίησή του.

Η τεχνική εκτελέστηκε σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο [249] και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικά αντι-φώσφο αντισώματα, *p-GSK-3α/β* (6D3) και *p-GSK3β* (F-2) της εταιρείας *Santa Cruz Biotechnology*. Το *p-GSK-3α/β* (6D3) αφορά την ανίχνευση της *Tyr279* στην ανθρώπινη *GSK3α* και της *Tyr216* στην ανθρώπινη *GSK3β*, ενώ το *p-GSK3β* (F-2) αφορά την ανίχνευση της *Ser9* της ανθρώπινης *GSK3β*.

🚦 Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:250.

3.1.8. Στοχευμένες σημειακές μεταλλάξεις

Για τον προσδιορισμό της λειτουργίας της *LjSK1* και την ανίχνευση των αμινοξικών καταλοίπων που συμμετέχουν σε αυτή κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς που εκφράζουν την *LjSK1* με στοχευμένες μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία [50, 70] και την σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας με την ανθρώπινη *GSK3β*. Για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν και εκφράζουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις ακολουθήθηκε γνωστό πρωτόκολλο [249].

🚦 Ως πλασμιδιακός φορέας για όλα τα μεταλλάγματα επιλέχθηκε ο *pGEX-6P-1*.

- Τα αμινοξικά κατάλοιπα που επιλέχθηκαν για στοχευμένη μετάλλαξη ήταν: *Ser9*, *Tyr298*, *Arg178*, *Lys287* και *Lys167* και όλα αντικαταστάθηκαν από *Ala*.
- Η *Ser9* και η *Tyr298* εξετάστηκαν σχετικά με τη συμμετοχή τους στην αυτό-αναστολή και στην ενεργοποίηση του ενζύμου αντίστοιχα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Η *Arg178* και η *Lys287* εξετάστηκαν για πιθανή συμμετοχή τους στην πρόσδεση των υποστρωμάτων. Τέλος η *Lys167* εξετάστηκε ώστε να εξακριβωθεί εάν αποτελεί κατάλοιπο του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παραθέτονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις στοχευμένες μεταλλάξεις.

Εκκινητές	Αλληλουχίες
S9A_F	5' GATGAGACGGCTCAAGGCGATTGCTTCTGGGAGG 3'
S9A_R	5' CCTCCAGAAAGCAATCGCCTTGAGCCGTCTCATC 3'
Y298A_F	5' GGTGAACCAAACATATCAGCGATATGCTCTCGATACTACC 3'
Y298A_R	5' GGTAGTATCGAGAGCATATCGCTGATATGTTTGGTTCAAC 3'
R178A_F	5' CAAGAGATACAAGAATGCGGAAGTCCAGGTTATGC 3'
R178A_R	5' GCATAACCTGGAGTTCCGCATTCTTGTATCTCTTG 3'
K167A_F	5' GAAGCAGTTGCCATAGCGAAGGTGCTGCAAG 3'
K167A_R	5' CTTGCAGCACCTTCGCTATGGCAACTGCTTC 3'
K287A_F	5' GCATAACCTGGAGTTCCGCATTCTTGTATCTCTTG 3'
K287A_R	5' GCATAACCTGGAGTTCCGCATTCTTGTATCTCTTG 3'

3.1.9. Καθαρισμός των μεταλλαγμάτων με *FPLC*

Η υπερέκφραση κάθε μεταλλάγματος πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2 (DE3)*, και η επαγωγή έλαβε χώρα στους 18 °C για 16 h και συγκέντρωση *IPTG* 0.5 mM. Για την απομόνωση και καθαρισμό του κάθε μεταλλάγματος ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού με της *LjSK1*, πρωτόκολλο καθαρισμού No.4, με τη διαφορά ότι για τα μεταλλάγματα *K167A* και *K287A* δεν πραγματοποιήθηκε επώαση της πρωτεΐνης 3C μαζί με τις πρωτεΐνες εντός της

στήλης, παρά προστέθηκε στα επιθυμητά κλάσματα που προέκυψαν μετά το πέρας της *Protino GST 4B*. Επίσης για το μετάλλαγμα *K167A* στο τελικό στάδιο χρησιμοποιήθηκε στήλη μοριακής διήθησης *SEC75* αντί για *SEC200*.

3.1.10. Κατασκευή περικεκομμένης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇

Στο N-τελικό άκρο της *LjSK1*, εντοπίζεται ένα τμήμα που θεωρείται αποδιατεταγμένο ή απλώς ευκίνητο. Για τη διευκόλυνση λοιπών πειραμάτων και για την εξακρίβωση του ρόλου του συγκεκριμένου τμήματος, αποφασίστηκε να κατασκευαστεί φορέας που θα φέρει και θα εκφράζει την *LjSK1* από τα αμινοξέα 139 έως 467. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού και για την διεκπεραίωση προτιμήθηκε η μέθοδος *In-Fusion® HD Cloning Kit* (*Takara Bio USA, Inc.*). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που συνιστάται από την εταιρεία [250]. Η αρχή μεθόδου του βασίζεται στο ένζυμο *In-Fusion* το οποίο ουσιαστικά αποτελεί μία ρεκομπινάση και συνδέει τμήματα *DNA* (προϊόν *PCR* και γραμμικός πλασμιδιακός φορέας) τα οποία χαρακτηρίζονται από αλληλεπικάλυψη 15 *bp*.

- ✚ Ως πλασμιδιακός φορέας επιλέχθηκε ο *pGEX-6P-1*.
- ✚ Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση συσκευής *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*).
- ✚ Για την ενίσχυση του γονιδίου της *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο η αρχική *LjSK1* και το αντιδραστήριο *KAPA HiFi HotStart ReadyMix* (*Kapa Biosystems*).
- ✚ Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα έγινε με χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* (*NEB*) και με χρήση του αντίστοιχου διαλύματος, *Buffer 10X*.
- ✚ Τόσο το προϊόν *PCR* όσο και ο γραμμικός φορέας ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (*SIGMA*) 1% και απομονώθηκαν με χρήση *Gel & PCR cleanup kit* (*Macherey-Nagel*).

- Μετά το πέρας της αντίδρασης σύνδεσης των τμημάτων *DNA*, το προϊόν μετασχηματίστηκε σε βακτηριακά στελέχη *XL1-Blue*, επιλέχθηκαν οι επιθυμητοί κλώνοι και ταυτοποιήθηκαν ύστερα από αλληλούχιση.
- Οι εκκινητές επιλέχθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας και παραθέτονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των *LjSK1₉₀₋₄₆₇* και *LjSK1₁₃₉₋₄₆₇*.

Εκκινητές	Αλληλουχίες
<i>LjSK1₁₃₉₋₄₆₇_F</i>	5' GGGATCCCCGGAATTCATGGCTGAACGTGTGGTTGG 3'
<i>LjSK1₁₃₉₋₄₆₇_R</i>	5' GGGATCCCCGGAATTCATGGCTGAACGTGTGGTTGG 3'

3.1.11. Καθαρισμός των περικεκομμένων *LjSK1₉₀₋₄₆₇* και *LjSK1₁₃₉₋₄₆₇*

Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός των περικεκομμένων *LjSK1₉₀₋₄₆₇* και *LjSK1₁₃₉₋₄₆₇* πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού της *LjSK1*, πρωτόκολλο καθαρισμού No.4 (Ενότητα 3.1.6.4.). Οι παραλλαγές που έγιναν αφορούσαν τα βακτηριακά στελέχη, καθώς για την υπερέκφραση επιλέχθηκαν τα *B834pLysS* και για τις δύο κατασκευές αντί των *Rosetta 2 (DE3)*, και το κυτταρικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα ίδιας σύστασης με της *LjSK1* αλλά σε pH 7.5 αντί για 7.0.

3.1.12. Κινητικές μελέτες

Για την εύρεση των κινητικών παραμέτρων επιλέχθηκε πρωτόκολλο βασισμένο στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και χρησιμοποιήθηκε το *Kinase-Glo™ Luminescent Kinase assay (Promega)*. Δεδομένου ότι όλες οι κινάσες χρησιμοποιούν *ATP* ως υπόστρωμα-δότη φωσφορικής ομάδας, η δραστητικότητα του ενζύμου μπορεί να

μετρηθεί μέσω ποσοτικοποίησης της ποσότητας της *ATP* που παραμένει μέσα στο διάλυμα μετά το πέρας της ενζυμικής αντίδρασης. Το σήμα φωταύγειας που λαμβάνεται, είναι ανάλογο της *ATP* που δεν έχει καταναλωθεί και συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τη δραστηριότητα.

Ως υπόστρωμα έναντι της *LjSK1*, των μεταλλαγμάτων της και της περικεκομμένης μορφής της επιλέχθηκε το πολυπεπτίδιο *His-Ser-Ser-Pro-His-Gln-Ser(PO₃H₂)-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu* το οποίο συντέθηκε από την εταιρεία *GeneCust (Laboratoire de Biotechnologie du Luxembourg S.A.)*. Στηριζόμενοι στην ανθρώπινη *GSK3β* η οποία έχει εκλεκτικότητα για προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα [50] το πολυπεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε στις κινητικές μελέτες, επιλέχθηκε να είναι φωσφορυλιωμένο και να ακολουθεί το γνωστό μοτίβο *S/T-X-X-X-X-S/T(P)*.

Οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν αρχικά για τον προσδιορισμό των ιδανικότερων συνθηκών (θερμοκρασία °C, pH) ενζυμικής δραστηριότητας, εύρεση του κατάλληλου δισθενούς ιόντος (*Mg²⁺*, *Ca²⁺*, *Mn²⁺*), εύρεση της σταθεράς *Michaelis-Menten (Km)* και της μέγιστης ταχύτητας (*Vmax*) και τέλος για τον προσδιορισμό των σταθερών αναστολής *IC₅₀*.

3.1.12.1. Θερμοκρασία και pH

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές αντιδράσεις σε διάφορες θερμοκρασίες. Χρησιμοποιήθηκε *LjSK1* (10 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM *Tris/HCL* (pH 8), 1 mM *EDTA*, 0,1% (v/v) *MTG*, 15 mM *MgCl₂* (*Alfa Aesar*) και 25 μM υποστρώματος. Πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες σε θερμοκρασίες 4, 20, 25, 30 και 37 °C παρουσία 0,5 μM *ATP* (*SIGMA*) και κάθε δείγμα επωάστηκε στην αντίστοιχη θερμοκρασία για 15 min πριν από την έναρξη της αντίδρασης. Η ενζυμική αντίδραση διακόπτεται με 20 μL αντιδραστήριου *Kinase-Glo* και η φωταύγεια καταγράφεται μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire* (*PerkinElmer*).

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων τιμών pH πραγματοποιήθηκαν εκ νέου ξεχωριστές αντιδράσεις με χρήση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκε *LjSK1* (10 $\mu g/mL$) στα εξής ρυθμιστικά διαλύματα: ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM *MES/NaOH* σε pH 6 και ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM *Tris/HCL* σε pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 και 9.0. Όλα τα διαλύματα περιείχαν 1 mM *EDTA* και 0,1% (v/v) *MTG*, και τέλος στην ενζυμική αντίδραση προστέθηκαν 15 mM *MgCl₂* και 25 μM υποστρώματος. Όλες οι κινητικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C παρουσία 0.5 μM *ATP*. Οι ενζυμικές αντιδράσεις διακόπτονται με 20 μL αντιδραστήριου *Kinase-Glo* και η φωταύγεια καταγράφεται μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire*.

- ✚ Για τη βέλτιστη απόδοση στην καταγραφή της φωταύγειας σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πλάκες, λευκού χρώματος και 384 πηγαδιών.
- ✚ Η δραστικότητα είναι ανάλογη με τη διαφορά της συνολικής ποσότητας *ATP* και της *ATP* που έχει καταναλωθεί κατά την ενζυμική αντίδραση. Η ποσοτικοποίηση της *ATP* στα διάφορα στάδια γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης.
- ✚ Η *ATP* προστίθεται ακριβώς πριν ξεκινήσει η επώαση της ενζυμικής αντίδρασης λόγω του ότι χαρακτηρίζεται από υψηλή υδρόλυση.

3.1.12.2. Δισθενές ιόν

Όπως είναι γνωστό οι κινάσες γενικότερα αποτελούν ένζυμα εξαρτώμενα από μέταλλα και χρησιμοποιούν δισθενή ιόντα για την κατάλυση και τη ρύθμιση. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι πέρα από το κοινώς αποδεκτό Mg^{2+} , άλλα δισθενή ιόντα όπως το Mn^{2+} και ο Zn^{2+} μπορούν να βοηθήσουν στη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας ή και στη σύνδεση του υποστρώματος, ενώ και το Mg^{2+} επιτρέπει ιδανικά τη σταθερή σύνδεση του υποστρώματος, τον προσανατολισμό του αλλά και τη γρήγορη απελευθέρωση του προϊόντος [251]. Διερευνήθηκε λοιπόν

ο ρόλος των δισθενών μεταλλικών ιόντων Mg^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} , ώστε να ταυτοποιηθεί το δισθενές ιόν που προτιμά η *LjSK1*.

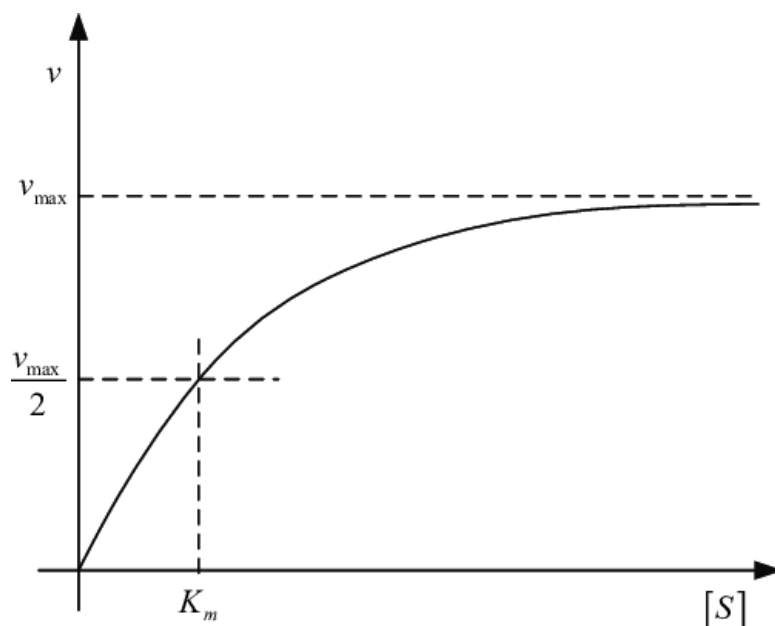
Πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις με *LjSK1* (10 $\mu g/mL$) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM *Tris/HCL* (pH 8), 1 mM *EDTA* και 0,1% (v/v) *MTG*. Τα δισθενή ιόντα (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) προσθέτονται σε διάφορες συγκεντρώσεις, το υπόστρωμα σε τελική συγκέντρωση 25 μM και η *ATP* σε τελική συγκέντρωση 0.5 μM . Η θερμοκρασία επώασης των αντιδράσεων είναι 25 °C και για 15 min. Μετά το πέρας της επώασης, οι αντιδράσεις διακόπτονται με προσθήκη αντιδραστήριου *Kinase Glo* (*Promega*) και η φωταύγεια καταγράφεται μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire*.

- ✚ Για τη βέλτιστη απόδοση στην καταγραφή της φωταύγειας σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πλάκες, λευκού χρώματος και 384 πηγαδιών.
- ✚ Η δραστηριότητα είναι ανάλογη με τη διαφορά της συνολικής ποσότητας *ATP* και της *ATP* που έχει καταναλωθεί κατά την ενζυμική αντίδραση. Η ποσοτικοποίηση της *ATP* στα διάφορα στάδια γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης.
- ✚ Η *ATP* προστίθεται ακριβώς πριν ξεκινήσει η επώαση της ενζυμικής αντίδρασης λόγω του ότι χαρακτηρίζεται από υψηλή υδρόλυση.

3.1.12.3. Κινητικές παράμετροι

Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων είναι ουσιαστικά η μελέτη της ταχύτητας μιας συγκεκριμένης αντίδρασης και πώς αυτή επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του ενζύμου, των υποστρωμάτων και τυχόν αναστολέων ή ενεργοποιητών. Πέρα από όλα όμως, όταν θέλουμε να χαρακτηρίσουμε κινητικά ένα ένζυμο είναι απαραίτητο να προσδιορισθούν κυρίως η σταθερά *Michaelis-Menten* και η *Vmax*. Η σταθερά *Michaelis-Menten* (*Km*) εκφράζει ουσιαστικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος

που απαιτείται ώστε να δίνει ταχύτητα αντίδρασης ίση με το μισό της μέγιστης V_{max} [Εικόνα 27.].

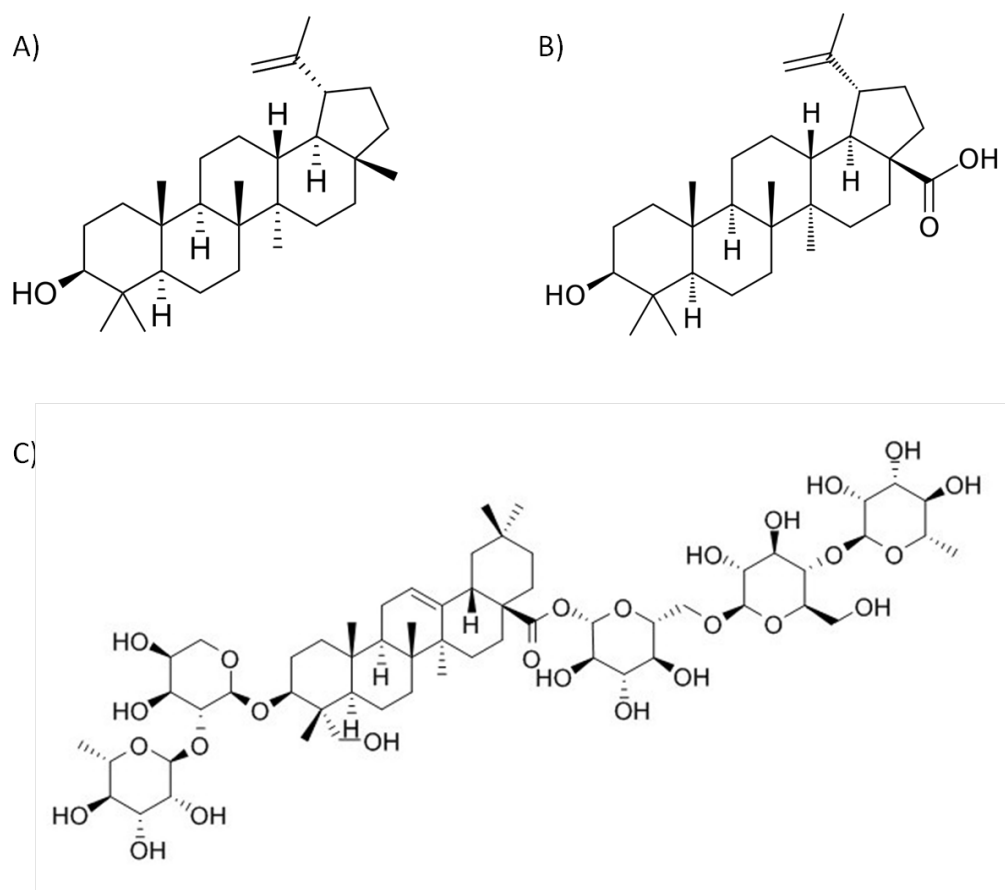


Εικόνα 27. Διάγραμμα *Michaelis-Menten*. Όπου $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος, V η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, K_m η σταθερά *Michaelis-Menten* και V_{max} η μέγιστη ταχύτητα [252].

Για το χαρακτηρισμό των κινητικών παραμέτρων της *LjSK1*, των μεταλλαγμάτων και της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο βασισμένο στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας και χρησιμοποιήθηκε το *Kinase-Glo™ Luminescent Kinase assay*. Το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρίσκονταν τα ένζυμα είχε σύσταση 50 mM *Tris/HCl* (pH 8,0), 1 mM *EDTA*, 0,1% (v/v) *MTG* και 15 mM *MgCl*₂. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C χρησιμοποιώντας λευκές πλάκες 384 πηγαδιών. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 5 μ L ενζύμου (10 μ g/mL), 5 μ L πεπτιδίου (25 μ M), 5 μ L *MgCl*₂ (15 mM) και 5 μ L *ATP* (σε διάφορες συγκεντρώσεις). Μετά από επώαση 35 min στους 25°C η ενζυμική αντίδραση διακόπηκε με 20 μ L αντιδραστήριου *Kinase-Glo Max*. Η φωταύγεια καταγράφηκε μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire*. Για τον υπολογισμό και τη στατιστική αξιολόγηση των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *GRAFIT* [253].

3.1.12.4. IC_{50}

Για την περαιτέρω κινητική μελέτη της *LjSK1* και της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, μελετήθηκε η επίδραση δύο τερπενοειδών στη δραστικότητα τους. Τα τερπενοειδή που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα *Lupeol*, *Betulinic acid* και *Hederacoside C* [Εικόνα 28]. Και τα δύο αποτελούν πεντακυκλικά τερπενοειδή, βρίσκονται φυσικά σε ποικιλία φυτών και εμφανίζουν πολλές πιθανές φαρμακευτικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση [254, 255]. Το ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες ενώσεις προκύπτει χάρη στην ομολογία που μοιράζεται η *LjSK1* με την ανθρώπινη *GSK3β*.



Εικόνα 28. Οι χημικές δομές των A) *Lupeol*, B) *Betulinic acid* και C) *Hederacoside C* [256-258].

Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα σύστασης 50 mM *Tris/HCl* (pH 8,0), 1 mM *EDTA* και 0,1% (v/v) *MTG* και σε

θερμοκρασία 25 °C. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 5 μL ενζύμου (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 μL διαλύματος πεπτιδίου/ MgCl_2 (25 $\mu\text{M}/15 \text{ mM}$), 5 μL ATP (100 μM) και 5 μL Lupeol (*Phytolab*), Betulinic acid (*Phytolab*) και Hederacoside C (*Phytolab*) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Πραγματοποιήθηκε επώαση για 35 min στους 25 °C και στη συνέχεια διακόπηκε η αντίδραση με την προσθήκη 20 μL αντιδραστηρίου *Kinase-Glo Max*. Η φωταύγεια καταγράφηκε μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire*. Για τον υπολογισμό και τη στατιστική αξιολόγηση των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *GRAFIT* [253].

🌈 Όλες οι ουσίες διαλυτοποιήθηκαν σε *Dimethyl Sulfoxide, DMSO* (*Applichem*). Λόγω περιορισμένης διαλυτότητας, πριν από την κάθε χρήση πραγματοποιούνταν ενίσχυση της διαλυτότητας για 2 min με συσκευή υπερήχων, *Ultrasonic Cleaner USC-THD* (*VWR*).

3.1.13. Κρυσταλλογραφία

Βασικό κομμάτι στον χαρακτηρισμό της *LjSK1* αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της. Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων ικανών να δώσουν δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ, ήταν καίριας σημασίας καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί καμία τρισδιάστατη δομή κινασών που προέρχονται από τα φυτά. Η ανάπτυξη λοιπόν, τέτοιων κρυστάλλων και η επίλυση της δομής τους, αποτελούν ένα κομβικό σημείο ως προς την κατανόηση των κινασών αυτών και θα μπορούσαν να αποσαφηνίσουν τους τρόπους λειτουργίας και ρύθμισής τους όπως επίσης και να εξηγήσουν τις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ αυτών και της ανθρώπινης *GSK3 β* , όπως για παράδειγμα στο N-τελικό άκρο στο οποίο οι περισσότερες κινάσες αυτού του είδους των φυτών διαθέτουν μία μεγάλη επικράτεια αμινοξικών καταλοίπων που απουσιάζει από την *GSK3 β* [120].

3.1.13.1. Σχηματισμός πρωτεϊνικών κρυστάλλων

Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της *LjSK1* και της περικεκομμένης μορφής της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ πραγματοποιήθηκαν τόσο με χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης *OryxNano* (*Douglas Instruments*) όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη μέθοδο επικαθήμενης σταγόνας (*sitting drop*).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σάρωση 384 πρότυπων συνθηκών κρυστάλλωσης η οποία οδήγησε στην εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης. Το διάλυμα κρυστάλλωσης περιείχε 100 mM *Tris/HCl* pH 8.5, 1 M *Li₂SO₄* και 10 mM *NiCl₂* και οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 16 °C και συγκέντρωση πρωτεΐνης 4.5 mg/mL. Το μέγεθος της σταγόνας είναι 0.8 μL. Η κρυστάλλωση διεξάγεται αναμιγνύοντας ίσους όγκους πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος κρυστάλλωσης.

🌈 Οι 384 πρότυπες συνθήκες κρυστάλλωσης προκύπτουν από τη χρήση των συλλογών *JBScreen Basic* 1-4 (*Jena Bioscience*) και *JBScreen Kinase* 1-4 (*Jena Bioscience*). Κάθε μία διαθέτει 96 διαφορετικές συνθήκες οι οποίες εφαρμόστηκαν τόσο στην ελεύθερη *LjSK1* όσο και στο σύμπλοκο *LjSK1*-λουπεόλη.

Με στόχο την αύξηση του μεγέθους των πρωτεϊνικών κρυστάλλων διεξήχθησαν πειράματα κρυστάλλωσης τροποποιώντας τη σύσταση του διαλύματος κρυστάλλωσης της αρχικής συνθήκης. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν μικρές μεταβολές του pH (pH 7.5, 8.0, 8.5) και των συγκεντρώσεων των *Li₂SO₄* (0.7 M, 0.8 M, 0.9 M) και *NiCl₂* (παρουσία/απουσία *Ni²⁺*), ενώ διερευνήθηκε και η επίδραση στη διαδικασία της κρυστάλλωσης της παρουσίας των δισθενών ιόντων *Mg²⁺*, *Mn²⁺* και *Ca²⁺* σε συγκεντρώσεις 10 mM. Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν επίσης παρουσίας 1 mM ATP και 2 mM *MgCl₂*.

Όπως και στην *LjSK1* έτσι και στην *LjSK1₉₀₋₄₆₇* δοκιμάστηκαν οι συλλογές *JBScreen Basic* 1-4 και *JBScreen Kinase* 1-4 παρουσία και απουσία 10 μM λουπεόλης. Περεταίρω προσπάθειες πραγματοποιήθηκαν με χρήση των συλλογών *Morpheus I (Molecular Dimensions)* και *Morpheus II (Molecular Dimensions)*, με τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στα 2.8 mg/mL και σε αναλογία 1:1.

Από το *Morpheus I* προτιμήθηκε μία συνθήκη η οποία είχε σύσταση 0.09 M *NPS* (0.3 M NaNO_3 , 0.3 M Na_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 0.1 M *Buffer System 1 (Imidazole, MES)*, pH 6.5 και 30% (v/v) *Precipitant mix 1* (40% (v/v) *PEG 500 MME* και 20% (v/v) *PEG 20000*). Με βάση τη συνθήκη αυτή πραγματοποιήθηκαν περεταίρω δοκιμές με μετατροπές τόσο στην συγκέντρωση του ενζύμου, στη συγκέντρωση του καταβυθιστικού αλλά και στο pH σε διάφορους συνδυασμούς.

- ✚ Οι συγκεντρώσεις της *LjSK1₉₀₋₄₆₇* που δοκιμάστηκαν στις κρυσταλλώσεις ήταν 2.8 mg/mL αλλά και 2.5 mg/mL .
- ✚ Οι συγκεντρώσεις των καταβυθιστικών διαλυμάτων που δοκιμάστηκαν ήταν: 35.0% (v/v), 30.0% (v/v) και 25.0% (v/v) *PEG 500 MME* και 17.5% (v/v), 15% (v/v) και 12.5% (v/v) *PEG 20000*. Η πολυαιθυλική αλκοόλη, *PEG*, είναι ένα υδατοδιαλυτό πολυμερές και είναι ιδιαίτερα γνωστό για τις καταβυθιστικές του ικανότητες.
- ✚ Οι τιμές pH που δοκιμάστηκαν πέρα από την αρχική 6.5, ήταν 5.5 και 7.5.
- ✚ Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην αναπαραγωγή της συνθήκης από το *Morpheus I* και των παραλλαγών της ήταν: *Sodium nitrate (SERVA)*, *Sodium phosphate dibasic (Applichem)*, *Ammonium sulfate (SERVA)*, *Imidazole ultrapure (SIGMA)*, *MES monohydrate (SERVA)*.

3.1.13.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων περίθλασης ακτίνων-Χ

Για να καταφέρουμε να προσδιορίσουμε την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, ο κρύσταλλος περιστρέφεται ώστε να συλλεχθούν διαφορετικά περιθλασιγράμματα σε ποικίλες γωνίες και εν συνεχεία κατασκευάζεται το τρισδιάστατο μοντέλο της

πρωτεΐνης [218]. Έτσι λοιπόν ο κρύσταλλος της πρωτεΐνης που έχει σχηματιστεί στην σταγόνα μεταφέρεται με ειδικό εργαλείο τύπου βρόχου (*loop*) και εμβαπτίζεται για μερικά δευτερόλεπτα σε κατάλληλο κρυοπροστατευτικό μέσο, εάν είναι απαραίτητο. Στη συνέχεια ο ειδικός βρόχος που φέρει τον κρύσταλλο τοποθετείται σε γωνιόμετρο ανάμεσα στον ανιχνευτή και την πηγή της ακτινοβολίας και τέλος ευθυγραμμίζεται (*alignment*) ως προς τη διεύθυνση της δέσμης της ακτινοβολίας. Καταγράφονται όλα τα χαρακτηριστικά του πειράματος και στη συνέχεια ο κρύσταλλος εκτίθεται σε ακτίνες X και λαμβάνονται τα φάσματα περίθλασης.

- 🌈 Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιείται με εκροή υγρού αζώτου σε θερμοκρασία 100 K και συνεπώς η προστασία του κρυστάλλου από το πάγωμα είναι καίριας σημασίας.
- 🌈 Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τη χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας στον σταθμό MX27890-2, ακτίνα I24 στο *Diamond Light Source* της Οξφόρδης, Ηνωμένο Βασίλειο.

Για την ανάλυση των δεδομένων και την επίλυση της τρισδιάστατης δομής ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

Βήμα 1^ο: χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης (*Molecular replacement, MR*) και πιο συγκεκριμένα το ειδικό λογισμικό *MrBUMP* [259]. Ουσιαστικά με τη μοριακή αντικατάσταση επιλύεται το πρόβλημα της φάσης που είχε αναφερθεί σε άλλη ενότητα και σαν μέθοδος βασίζεται στην ύπαρξη μιας προηγούμενης πρωτεϊνικής δομής που θα χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο μιας και είναι παρόμοια με την άγνωστη νέα δομή που προέρχεται από τα δεδομένα περίθλασης.

Βήμα 2^ο: με τη χρήση του λογισμικού *REFMAC* [260], το οποίο βασίζεται στη μέθοδο της μέγιστης πιθανοφάνειας (*maximum likelihood*), κατασκευάζεται ο χάρτης

ηλεκτρονιακής πυκνότητας μέσω μετασχηματισμών *Fourier* και βελτιστοποιείται η δομή.

Βήμα 3°: ακολούθησε η ανοικοδόμηση και η προσαρμογή του μοντέλου στο χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας με βάση τη στερεοχημεία της πρωτεϊνικής δομής, με χρήση του προγράμματος *Coot* (*Crystallographic Object-Oriented Toolkit*) [261]. Το πρόγραμμα *Coot*, ουσιαστικά, απεικονίζει χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας και επιτρέπει ποικιλία χειρισμών του μοντέλου (*real space refinement, manual rotation/translation, rigid-body fitting, ligand search, rotamers, Ramachandran idealization*).

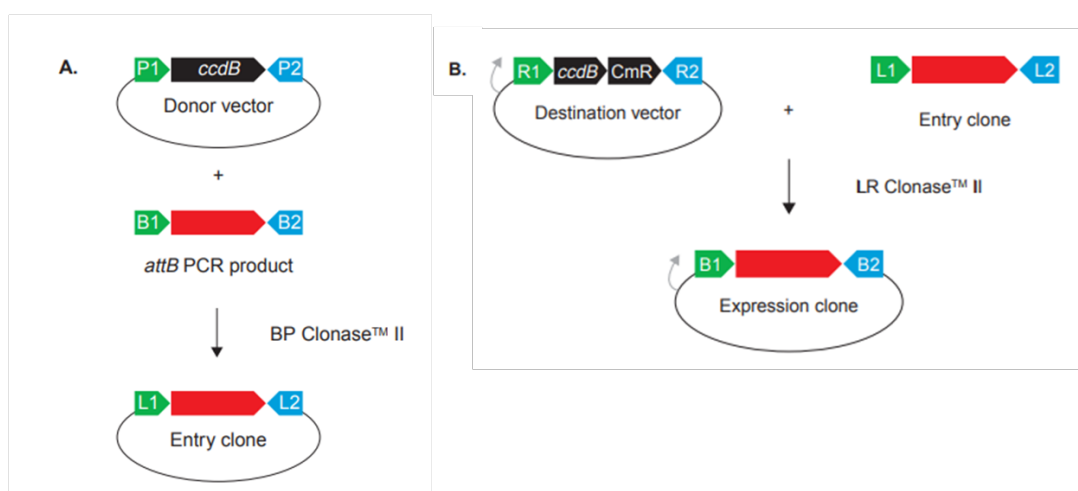
Βήμα 4°: ακολούθησαν πολλαπλοί κύκλοι βελτιστοποίησης με το πρόγραμμα *REFMAC* και επαναπροσαρμογή με το πρόγραμμα *Coot*, μέχρι η ποιότητα του μοντέλου να έχει βελτιωθεί.

Βήμα 5°: τέλος το μοντέλο που προκύπτει ελέγχεται για την αξιοπιστία του. Η αξιολόγηση βασίζεται στον έλεγχο της εγκυρότητας των χιλιάδων έως εκατομμυρίων μετρήσεων του πειράματος, στον έλεγχο του πόσο συνεπές είναι το ατομικό μοντέλο με τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα καθώς και στον έλεγχο της συνοχής του μοντέλου με γνωστές φυσικοχημικές ιδιότητες. Υπάρχουν διάφορα προγράμματα αξιολόγησης όπως τα MolProbity, SAVESv6.0 και το PROSESS. Το τελικό μοντέλο ελέγχθηκε με το SAVESv6.0, το οποίο παρέχει πληθώρα προγραμμάτων επιτρέποντας τον έλεγχο της συμβατότητας ενός ατομικού μοντέλου (3D) με την αλληλουχία αμινοξέων του (1D) συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με άλλες αξιόπιστες γνωστές δομές, τον έλεγχο πολλών στερεοχημικών παραμέτρων των καταλοίπων του μοντέλου, καθώς και τον έλεγχο της στερεοχημικής ποιότητας της δομής αναλύοντας τη γεωμετρία καταλοίπου προς κατάλοιπο αλλά και τη συνολική γεωμετρία της δομής.

3.2. *In planta* πειράματα της *LjSK1*

3.2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων ειδικών για μετασχηματισμό φυτών

Για να ελεγχθεί η συμμετοχή της *LjSK1* στις αναπτυξιακές διαδικασίες του φυτού και στον σχηματισμό φυματίων, αποφασίστηκε να κατασκευαστούν ειδικοί πλασμιδιακοί φορείς που θα φέρουν τις μεταλλάξεις *K167A* και *Y298A* καθώς και την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ ώστε να μετασχηματιστούν στο ίδιο το φυτό. Για την κατασκευή αυτών των πλασμιδιακών φορέων επιλέχθηκε η τεχνολογία κλωνοποίησης *Gateway*[®] (*Thermo Fischer*). Η συγκεκριμένη τεχνολογία προτιμήθηκε καθώς αντικαθιστά τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και λιγάσης και επιτρέπει τη μεταφορά θραυσμάτων *DNA* μεταξύ διαφορετικών φορέων κλωνοποίησης ενώ παράλληλα διατηρεί το αναγνωστικό πλαίσιο. Σαν μέθοδος βασίζεται στις ιδιότητες ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λάμδα [262] και συνοψίζεται σε δύο κύριες αντιδράσεις *BP* και *LR* αντίστοιχα καθώς και στη χρήση ενός φορέα εισαγωγής (*entry clone*). Αρχικά πραγματοποιείται η *BP* αντίδραση με τη χρήση του ενζύμου *BP Clonase*[™] II ώστε να σχηματιστεί ο φορέας εισαγωγής και στη συνέχεια ακολουθεί η *LR* αντίδραση με χρήση του ενζύμου *LR Clonase*[™] II για να κατασκευαστεί ο τελικός φορέας έκφρασης [Εικόνα 29] [263].



Εικόνα 29. Σύνοψη της τεχνολογίας κλωνοποίησης *Gateway*[®]. Στο Α. απεικονίζεται η πρώτη αντίδραση *BP* ώστε να σχηματιστεί ο φορέας εισαγωγής και στο Β. απεικονίζεται η αντίδραση *LR* που δίνει τον τελικό φορέα έκφρασης [263].

Αντίδραση ανασυνδυασμού BP

Στάδιο 1^ο: τα γονίδια ενδιαφέροντος ενισχύθηκαν από τον αντίστοιχο φορέα *pGEX-6P-1* που έχουν περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα και ταυτόχρονα γίνεται ενσωμάτωση των θέσεων ανασυνδυασμού *attB1* και *attB2* μέσω ειδικών εκκινητών [Πίνακας 3]. Στη συνέχεια εισάγονται μέσω της αντίδρασης ανασυνδυασμού του ενζύμου *BP ClonaseTM II* στον φορέα *pDONRTM221 (entry clone, Thermo Fisher)*.

- ✚ Για την ενίσχυση των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο *KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems)* και ο τελικός όγκος των αντιδράσεων ήταν 50 μ L. Το προϊόν κάθε αντίδρασης *PCR* ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης 1% και απομονώθηκαν με χρήση *Gel & PCR cleanup kit*.
- ✚ Για την αντίδραση *BP* χρησιμοποιήθηκαν 100 ng *pDONRTM221*, 1 μ L *BP ClonaseTM II* και 100 ng προϊόν *PCR* για κάθε γονίδιο σε τελικό όγκο αντίδρασης 5 μ L.
- ✚ Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 25 °C για 1 h.

Πίνακας 3. Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων.

Εκκινητές	Αλληλουχίες
LJSK1_attb1_For	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCATGAAATCAAAGATGAGAAAAG 3'
LJSK1GWF	5'GGGGACAATTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAACATGATGAGACGG 3'
LJSK1GWR	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAACTCCTTGCATGCTC 3'

Στάδιο 2^ο: μετά το πέρας της επώασης προστέθηκε σε κάθε αντίδραση 2 μ L διαλύματος *Proteinase K* (2 μ g/ μ L).

- ✚ Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 37 °C για 10 min.

Στάδιο 3^ο: τα προϊόντα των BP αντιδράσεων μετασχηματίστηκαν σε βακτηριακά στελέχη *E. coli XL1-Blue* με τη μέθοδο του χημικού μετασχηματισμού που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα.

✚ Για την επιλογή των φορέων που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς επιλέχθηκε το αντιβιοτικό *Gentamicin* (SERVA) σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/mL}$.

Στάδιο 4^ο: τα μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB Broth* στους 37 °C για 16 h και στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση τους με τη χρήση του συστήματος *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel). Τέλος, για την επαλήθευση της επιτυχίας της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP στον φορέα εισαγωγής *pDONR™221* πραγματοποιείται αλληλούχηση.

Αντίδραση ανασυνδυασμού LR

Στάδιο 1^ο: οι φορείς εισαγωγής που φέρουν τις ειδικές περιοχές *attL* εισάγονται σε τελικούς φορείς έκφρασης *pUB-GW-Hyg* που διαθέτουν ειδικές περιοχές *attR* και βρίσκονται υπό τον έλεγχο του υποδοχέα του *Lotus japonicus Ubiquitin 1* [264].

✚ Για την αντίδραση LR χρησιμοποιήθηκαν 100 ng από κάθε φορέα *pDONR™221*, 1 μL *LR Clonase™ II* και 100 ng φορέα έκφρασης *pUB-GW-Hyg*.

✚ Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν όμοια με τις αντιδράσεις BP.

Στάδιο 2^ο: τα προϊόντα των LR αντιδράσεων μετασχηματίστηκαν σε βακτηριακά στελέχη *E. coli DH5a* (Thermo Fisher) και η επιλογή των φορέων που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς πραγματοποιήθηκε όμοια με τις BP αντιδράσεις.

Στάδιο 3^ο: τα μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB Broth* στους 37 °C για 16 h και στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση τους με τη χρήση του συστήματος *NucleoSpin Plasmid*.

Στάδιο 4^ο: η επαλήθευση της επιτυχίας της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με πέψη των φορέων *pUB-GW-Hyg* με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRV* (NEB) και *BamHI* (NEB).

🧪 Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων πέψης ήταν 30 μL και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37 °C για 2 h.

🧪 Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 0.8%.

3.2.2. Μετασχηματισμός φυτών

Εφόσον έχουν κατασκευαστεί τα ειδικά πλασμίδια που φέρουν τις μεταλλάξεις *K167A* και *Y298A* καθώς και την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ η πειραματική διαδικασία συνεχίζεται με μετασχηματισμό της ρίζας (*hairy root*) του φυτού *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Leguminosae). Συνολικά δημιουργήθηκαν πέντε διαφορετικές σειρές μετασχηματισμένων φυτών. Μία σειρά ελέγχου η οποία μετασχηματίστηκε με τον μη ανασυνδυασμένο κενό φορέα *pUB-GW-Hyg*, μία σειρά που μετασχηματίστηκε με την κανονική *LjSK1*, σειρές που μετασχηματίστηκαν με τις μεταλλαγμένες μορφές *LjSK1 K167A* και *LjSK1 Y298A* αντίστοιχα και τέλος μία σειρά που μετασχηματίστηκε με την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇.

Στάδιο 1^ο: το στέλεχος *Agrobacterium rhizogenes* LBA 1334 μετασχηματίζεται με ηλεκτροδιάτρηση [265] με τους αντίστοιχους πλασμιδιακούς φορείς και επωάζεται σε αποστειρωμένα τρυβλία *Petri* που περιείχαν θρεπτικό μέσο *LB Agar* και τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

🧪 Ως αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν *Kanamycin monosulphate* (Applichem) σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/mL}$ και *Spectinomycin* (SIGMA) σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$.

✚ Η επώαση πραγματοποιείται στους 28 °C για 48-72 h.

Στάδιο 2°: μετά το πέρας της επώασης σε στερεό θρεπτικό υλικό, για κάθε μετασχηματισμένο στέλεχος ακολουθεί καλλιέργεια υγρού τύπου χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο το *LB Agar* και τα αντίστοιχα αντιβιοτικά. Χρησιμοποιούνται τα ίδια αντιβιοτικά με το 1° Στάδιο και στις ίδιες συγκεντρώσεις.

✚ Τα αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις τους παραμένουν τα ίδια με του 1^{ου} Σταδίου.

✚ Η επώαση πραγματοποιείται και πάλι στους 28 °C αλλά για 24-48 h.

Στάδιο 3°: εφόσον τα μετασχηματισμένα στελέχη έχουν αναπτυχθεί, 1 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένα πλακίδια που περιέχουν θρεπτικό μέσο *LB Agar* και τα αντίστοιχα αντιβιοτικά και επωάζονται εκ νέου.

✚ Τα αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις τους παραμένουν τα ίδια με του 1^{ου} Σταδίου.

✚ Η επώαση πραγματοποιείται στους 28 °C για 24 h.

Στάδιο 4°: οι σπόροι και τα φυτά του *Lotus japonicus* προετοιμάζονται σύμφωνα με γνωστό πρωτόκολλο [266] και ρίζες αγρίου τύπου απομακρύνονται.

Στάδιο 5°: μετά την ανάπτυξη σε πρώιμα στάδια και το σχηματισμό υποκοτυλίων, δημιουργούνται μοσχεύματα με τη χρήση νυστεριού. Κάθε μόσχευμα επιμολύνεται με εμβάπτιση στον πολτό *Agrobacterium rhizogenes* που είχε παρασκευαστεί στα προηγούμενα στάδια, ώστε να επιτραπεί η μόλυνση και ο επακόλουθος σχηματισμός νέων μετασχηματισμένων ριζών [267-269] και αφήνονται να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο *MS*^{1/2}.

- ✚ Τα νέα φυτά αφήνονται για 24-48 h στο σκοτάδι ώστε να αναγεννηθούν οι ρίζες τους και μετά μεταφέρονται στο φως για 3 εβδομάδες συνολικά.
- ✚ Μετά την πρώτη εβδομάδα ανάπτυξης τα φυτά μεταφέρονται εκ νέου σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο $MS^{1/2}$ και αντιβιοτικό κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενιάς σε συγκέντρωση 300 $\mu g/mL$ ώστε να απομακρυνθεί το περισσευούμενο *Agrobacterium rhizogenes* και αφήνονται ώστε να συνεχιστεί η ανάπτυξη.
- ✚ Το θρεπτικό μέσο έχει σύσταση 0.22% *MS salt mixture* (SIGMA), 1% *Sucrose* (SIGMA) και 0.8% *Agar*.

3.2.3. Ανάπτυξη φυτών και σχηματισμός φυματίων

Εφόσον έχουν αναγεννηθεί οι ρίζες των νέων μετασχηματισμένων φυτών, ακολουθεί μεταφορά τους σε αποστειρωμένο μείγμα άμμου:βερμικουλίτη σε αναλογία 3:1, ώστε να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους. Τα φυτά πλέον ποτίζονται περιοδικά με τροποποιημένο διάλυμα άνευ αζώτου *Hoagland*, όπως αναφέρεται σε γνωστό πρωτόκολλο [266] και ύστερα από 10 μέρες ανάπτυξης, εμβολιάζονται με 1 mL καλλιέργειας *Mesorhizobium loti* R7a *DsRed* με $OD_{600} = 0,02$ και αφήνονται να αναπτυχθούν για επιπλέον 20 μέρες. Με το πέρας των ημερών, συλλέγονται, φωτογραφίζονται και καταμετρείται ο αριθμός των οζιδίων, το μήκος της ρίζας και το καθαρό βάρος της ρίζας. Μεμονωμένα, η κάθε ρίζα πλένεται προσεκτικά και ένα μικρό τμήμα της αποκόπτεται ώστε να απομονωθεί το γονιδιωματικό DNA και να επαληθευτεί η ενσωμάτωση του επιθυμητού *T-DNA* μέσω *PCR* όπως περιγράφεται σε γνωστό πρωτόκολλο [173].

- ✚ Η καλλιέργεια του *Mesorhizobium loti* γίνεται σε θρεπτικό μέσο *YMB* (*yeast mannitol broth*, SIGMA), στους 30 °C για 48-72 h.

3.2.4. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Εφόσον σε προηγούμενο στάδιο έχουν ταυτοποιηθεί τα φυτά που μετασχηματίστηκαν επιτυχώς τα μη μετασχηματισμένα απορρίπτονται και ακολουθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων για τα μετασχηματισμένα φυτά. Για την στατιστική ανάλυση αυτών, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *One-way ANOVA* (*One-way analysis of variance*) ακολουθούμενη από το *Fischer's LSD post-hoc* τεστ εγκυρότητας.

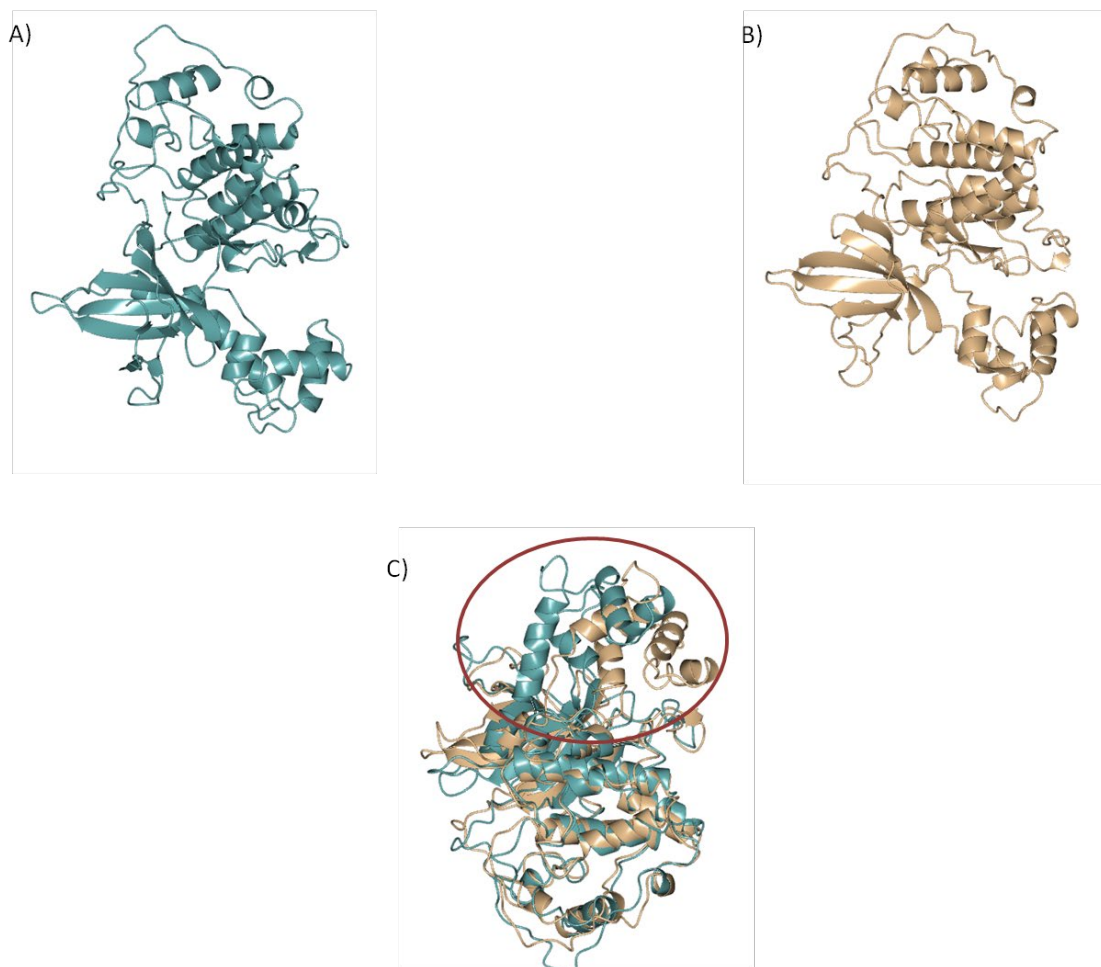
- ✚ Η τεχνική *One-way ANOVA* αποτελεί μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης και βασίζεται στην σύγκριση των μέσω όρων δύο δειγμάτων ώστε να υπολογιστεί το κατά πόσο η διαφορά τους είναι σημαντική ή όχι.
- ✚ Το *Fischer's LSD post-hoc* χρησιμοποιείται ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω η σύγκριση των μέσων τιμών των διάφορων ομάδων, καθώς σαν μέθοδος δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης μεταξύ όλων των ζευγών που έχουν προηγηθεί στην *One-way ANOVA*.

3.3. Παραγωγή συνθετικής πρωτεΐνης *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇

Η παρασκευή της συνθετικής πρωτεΐνης αποσκοπεί στη δημιουργία μίας νέας πρωτεΐνης που θα διατηρεί την επικράτεια κινάσης της *LjSK1* και ταυτόχρονα θα έχει και στοιχεία αισθητήρα ασβεστίου. Ο απώτερος στόχος είναι, σε μεταγενέστερο σημείο, η κατασκευή ενός καινοτόμου εντομοπροστατευτικού προϊόντος. Ουσιαστικά δηλαδή θα παραχθεί μία νέα συνθετική ασβεστοεξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση με προστατευτική δράση έναντι προσβολής των φυτών από έντομα. Επιλέχθηκε λοιπόν, να κατασκευαστεί αποτελούμενη από την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ στην οποία με τεχνικές συνθετικής βιολογίας θα έχει ενσωματωθεί η καταλυτική επικράτεια της ανθρώπινης καλμοδουλίνης. Έτσι θα 'ανιχνεύει' τις μεταβολές της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου που συμβαίνουν κατά τα αρχικά στάδια προσβολής των φυτών από έντομα και θα

λειτουργεί ως διακόπτης για την ενεργοποίηση των μεταβολικών μονοπατιών που ελέγχονται από την *LjSK1*.

Σαν βάση επιλέχθηκε η περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* καθώς αποτελεί μια πιο εύκολα διαχειρίσιμη πρωτεΐνη και οι μετέπειτα πειραματικές διαδικασίες είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα επιτυχίας. Ο τρόπος που επιλέχθηκε να συναρμολογηθούν τα αντίστοιχα κομμάτια βασίστηκε σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με διάφορα προγράμματα βιοπληροφορικής, των οποίων τα μοντέλα ελέγχθηκαν με προσομοιώσεις ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το τμήμα της καλμοδουλίνης που θα ενσωματωθεί θα διατηρεί την ικανότητά της να αλλάζει τη διαμόρφωσή του παρουσία ή απουσία Ca^{2+} . Τα τελικά μοντέλα που προέκυψαν μέσω των προγραμμάτων απεικονίζονται στην Εικόνα 30 και αφορούν την ολόκληρη *LjSK1*, αλλά αποτέλεσαν οδηγό για τη σύνθεση της νέας συνθετικής πρωτεΐνης *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*.

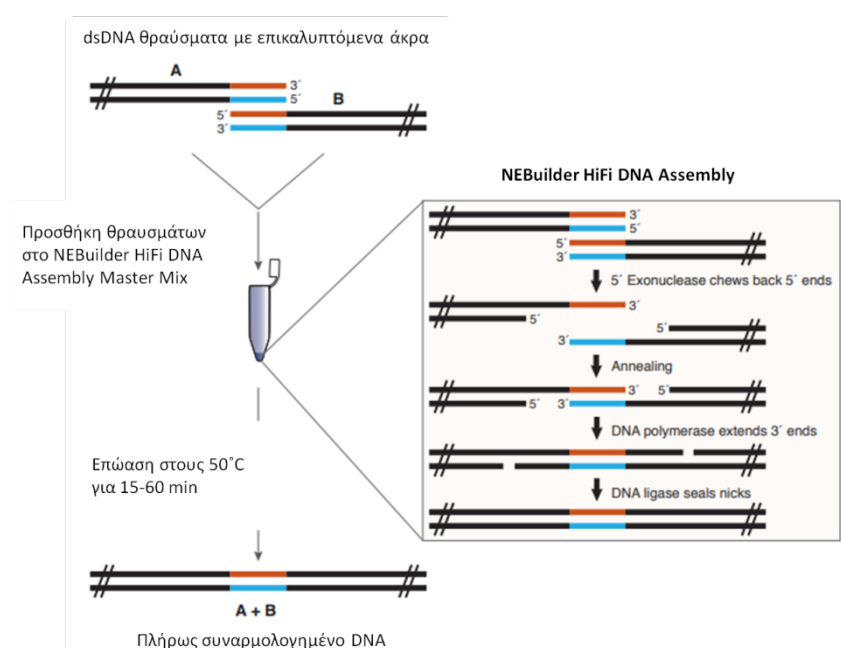


Εικόνα 30. Α) Μοντέλο της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* παρουσία Ca^{2+} . Β) Μοντέλο της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* απουσία Ca^{2+} . Γ) Η υπέρθεση των δύο μοντέλων αποδεικνύει την αλλαγή της διαμόρφωσης παρουσία και απουσία Ca^{2+} . Στον κόκκινο κύκλο επισημαίνεται η αλλαγή στη διαμόρφωση της καλμοδουλίνης από ανοιχτή (μπλε) όταν τα ιόντα Ca^{2+} είναι παρόν, σε κλειστή (μπεζ) όταν τα ιόντα Ca^{2+} απουσιάζουν.

3.3.1. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα

Η πειραματική διαδικασία κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που θα φέρει την συνθετική *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* βασίζεται σε τρία ουσιαστικά βήματα τα οποία αφορούν την επιλογή των κατάλληλων εκκινητών, η ενίσχυση των επιθυμητών θραυσμάτων *DNA* και τέλος η ένωση αυτών με χρήση κατάλληλης τεχνικής. Σαν τεχνική επιλέχθηκε το *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* της εταιρείας *New England BioLabs (NEB)* και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή [270]. Σαν μέθοδος επιτρέπει τη συναρμολόγηση πολλαπλών

θραυσμάτων *DNA*, ανεξάρτητα από το μέγεθος του κάθε θραύσματος ή τη συμβατότητα των άκρων τους [Εικόνα 31.]. Αυτό επιτυγχάνεται καθώς, αποτελείται από μία εξωνουκλεάση η οποία δημιουργεί μονόκλωνα 3' άκρα που διευκολύνουν την ανόπτηση (*annealing*) θραυσμάτων που μοιράζονται συμπληρωματικότητα στην περιοχή επικάλυψης, η πολυμεράση στη συνέχεια καλύπτει τα κενά των θραυσμάτων και τελικά η *DNA* λιγάση καταλύει τη σύνδεση με το να κλείνει τα ρήγματα ανάμεσα στα θραύσματα, δίνοντας σαν τελικό προϊόν δίκλωνο μόριο *DNA* [270].



Εικόνα 31. Συνοπτική απεικόνιση της μεθόδου συναρμολόγησης θραυσμάτων *DNA*, *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* [270]

Στάδιο 1^ο: επιλογή πλασμιδιακού φορέα και κατασκευή κατάλληλων εκκινητών. Για την *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως πλασμιδιακός φορέας ο *pGEX-6P-1*. Πιο συγκεκριμένα, για να αποφευχθεί η πέψη με περιοριστικό ένζυμο, αποφασίστηκε να σχεδιαστούν εκκινητές που θα ενισχύουν θραύσματα *DNA* από τον πλασμιδιακό φορέα *pGEX-6P-1* που φέρει ήδη την περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* καθώς και από την ανθρώπινη καλμοδουλίνη, τα οποία μεταξύ τους θα έχουν

αλληλεπικαλυπτόμενα άκρα [Εικόνα 31.]. Η σχεδίαση των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τη χρήση του αντίστοιχου προγράμματος που παρέχεται από την εταιρεία, *NEBuilder Assembly tool (version 2.5.6)* και παραθέτονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Λίστα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*.

Εκκινητές	Αλληλουχίες
Insert_For	5' CTGACTGAAGAGCAGATTGC 3'
Insert_Rev	5' AAAAGAAACAGTGCTTTAGTTTAACAATGTTAGGATGGTCTTTCTTGCCATCATTGTCA 3'
Vector1_For	5' GACCATCCTAACATTGTAA 3'
Vector1_Rev	5' TACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGG 3'
Vector2_For	5' AGTCAGTGAGCGAGGAAGCG 3'
Vector2_Rev	5' AAAAAGCTTCTTTGAATTCTGCAATCTGCTCTTCAGTCAGAACTGTGCGCATAACCTGGA 3'

Στάδιο 2^ο: ενίσχυση των επιθυμητών θραυσμάτων *DNA*. Οι εκκινητές που προτάθηκαν από το πρόγραμμα χαρακτηρίζονται από πολλές διαφορές με κυριότερη τη μεγάλη απόκλιση που παρουσιάζουν στη θερμοκρασία υβριδισμού τους (*T_m*) και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η τεχνική *Touchdown PCR (TD PCR)* [271] κατά την οποία πραγματοποιείται διαδοχική μείωση της θερμοκρασίας ανόπτησης μετά από κάθε κύκλο *PCR*. Συγκεκριμένα, σε κάθε βήμα, η θερμοκρασία ανόπτησης μειωνόταν κατά 2 βαθμούς έως ότου να πλησιάσει τη θερμοκρασία υβριδισμού του εκάστοτε εκκινητή μείον δύο βαθμούς ακόμα.

- ✚ Για τις αντιδράσεις ενίσχυσης με *PCR* χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KAPA HiFi Hotstart Ready mix* και ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης ήταν στα 50 μ L.
- ✚ Όλα τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αгарόζης (*SIGMA*) 1% για τα θραύσματα του πλασμιδιακού φορέα και 3% για το θραύσμα της *CALM* και απομονώθηκαν με χρήση *Gel & PCR cleanup kit (Macherey-Nagel)*.
- ✚ Κάθε προϊόν ποσοτικοποιήθηκε μετά την απομόνωση του με χρήση *Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific)*.

Στάδιο 3°: η αντίδραση συναρμολόγησης. Όλα τα προϊόντα *PCR* που ενισχύθηκαν στο προηγούμενο στάδιο, αναμιγνύονται με το αντιδραστήριο *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* και επωάζονται για 30 min στους 50 °C.

- 🔧 Η αντίδραση έχει τελικό όγκο 20 μ L εκ των οποίων τα 10 μ L είναι το αντιδραστήριο, ενώ τα προϊόντα *PCR* προσθέτονται σε αναλογία 1:1:2 (*Vector1* 1:*Vector2* 1:*CALM 2*).

Στάδιο 4°: χημικός μετασχηματισμός του προϊόντος της τελικής αντίδρασης σε βακτηριακά στελέχη *XL1 Blue*, ανάπτυξη υγρών καλλιιεργειών και απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα με τη χρήση του συστήματος *NucleoSpin Plasmid* (*Macherey-Nagel*).

- 🔧 Η επιτυχία της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που φέρει τη συνθετική πρωτεΐνη *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* επιβεβαιώνεται ύστερα από αλληλούχιση.

3.3.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης *CjALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*

Οι δοκιμές έκφρασης της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* πραγματοποιήθηκαν στα βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2(DE3)* και *B834pLysS* (*Novagen*), όπως περιγράφεται και στην ενότητα 3.1.2.

- 🔧 Η συγκέντρωση του επαγωγέα *IPTG* ήταν στα 0.5 mM και η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 18 °C για 16 h.
- 🔧 Η διαλυτοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα σύστασης 50 mM *Tris pH 7.5*, 0.2 M *NaCl*, 5% (v/v) *Glycerol*, 0.1% (v/v) *MTG* και 1 mM *EDTA*.

- ✚ Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν ύστερα από ηλεκτροφόρηση υπό διατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

3.3.3. Υπερέκφραση και απομόνωση της *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇

Ο πλασμιδιακός φορέας εισέρχεται με τη μέθοδο του χημικού μετασχηματισμού σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *Rosetta 2 (DE3)* και ακολουθείται το πρωτόκολλο όπως αναφέρεται και στην ενότητα 3.1.3.

- ✚ Η καλλιέργεια μεγαλύτερης κλίμακας αναφέρεται σε 2 L τελικού όγκου βακτηρίων.
- ✚ Η διαλυτοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα σύστασης 50 mM Tris pH 7.5 , 0.2 M NaCl , 5% (v/v) Glycerol, 0.1% (v/v) MTG και 1 mM EDTA.

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ σαν αρχικό πρωτόκολλο *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ No.1 ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο καθαρισμού με την *LjSK1* No. 4 (Ενότητα 3.1.6.4.). Επίσης δοκιμάστηκε σαν πρωτόκολλο καθαρισμού *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ No.2 το αντίστοιχο πρωτόκολλο καθαρισμού της *LjSK1* No.1 (Ενότητα 3.1.6.1.).

Και τέλος δοκιμάστηκε και το πρωτόκολλο καθαρισμού της *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ No.3 το οποίο αποτελείται από τα παρακάτω στάδια.

Στάδιο 1^ο (στήλη συγγένειας): το βακτηριακό ίζημα διαλυτοποιείται σε διαφορετικό διάλυμα από τα προηγούμενα δύο πρωτόκολλα, υφίσταται μηχανική λύση με υπέρηχους και φυγοκεντρείται. Το κυτταρόλυμα διέρχεται από στήλη *Protino GST 4B* η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με το ίδιο διάλυμα λύσης των βακτηριακών κυττάρων. Εφόσον περάσει ο όγκος του δείγματος και ύστερα από έκπλυση, προστίθεται η πρωτεάση 3C σε αναλογία 1 mg 3C σε 20 mg πρωτεΐνης και

αφήνονται για 16 h στους 4 °C ώστε να κοπεί η ετικέτα συγγένειας. Τα κλάσματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και τα επιθυμητά συλλέγονται για το επόμενο στάδιο.

🚦 Το διάλυμα λύσης του βακτηριακού ιζήματος έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5, 2 mM *EDTA* και 500 μM *PMSF* (*Applichem*).

Στάδιο 2° (στήλη υδρόφοβης αλληλεπίδρασης): στα επιθυμητά κλάσματα του προηγούμενου σταδίου προστίθεται CaCl_2 σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Χρησιμοποιείται η στήλη *HiTrap Phenyl FF* (*Cytiva*), η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί, αρχικά με 5 όγκους στήλης με το διάλυμα έκλουσης και μετέπειτα με 10 όγκους στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης. Το δείγμα εισέρχεται στη στήλη με ροή 1 mL/min και εφόσον έχει διέλθει ο συνολικός όγκος του ακολουθεί έκπλυση αρχικά με 10 όγκους στήλης με το διάλυμα έκπλυσης 1 και στη συνέχεια με 10 όγκους στήλης με το διάλυμα έκπλυσης 2. Η έκλυση πραγματοποιείται με γραμμική διαβάθμιση του διαλύματος έκλουσης και πιο συγκεκριμένα για 10 όγκους στήλης μέχρι ο στόχος να φτάσει από 0 στο 100% της συγκέντρωσης, για κλάσματα του 1 mL και με ροή 0.5 mL/min. Τα κλάσματα συλλέγονται και αναλύονται με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

🚦 Το διάλυμα εξισορρόπησης έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5, 0.1 M *NaCl* και 5 mM CaCl_2 .

🚦 Το διάλυμα έκπλυσης 1 έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5, 0.1 M *NaCl* και 0.1 mM CaCl_2 . Ενώ το διάλυμα έκπλυσης 2 έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5, 0.5 M *NaCl* και 0.1 mM CaCl_2 .

🚦 Το διάλυμα έκλουσης έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5 και 1 mM *EGTA* (*SIGMA*).

Στάδιο 3^ο: για τα κλάσματα που εκλούστηκαν στο προηγούμενο στάδιο ακολουθεί διαπίδυση ώστε να απομακρυνθεί το *EGTA* και τέλος συμπύκνωση σε επιθυμητή συγκέντρωση.

🚦 Το διάλυμα διαπίδυσης έχει σύσταση 50 mM *Tris-HCl* pH 7.5.

3.3.4. Έλεγχος δραστικότητας της *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ παρουσία Ca^{2+}

Η επιτυχία της παραγωγής της συνθετικής πρωτεΐνης *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ κρίνεται από το κατά πόσο η κατασκευή της οδηγεί σε μία ασβεστοεξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση η οποία θα παρουσιάζει προστατευτική δράση έναντι προσβολής των φυτών από έντομα. Για να διευκρινιστεί αυτό είναι σημαντικό να ελεγχθεί η δραστικότητα της παρουσία Ca^{2+} . Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο χημειοφωταύγειας, *Kinase-Glo™ Luminescent Kinase assay (Promega)* και συνολικά πραγματοποιούνται 5 διαφορετικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του Ca^{2+} στη δραστικότητα της νέας πρωτεΐνης, ορίζονται ως εξής: 1) παρουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και απουσία ενζύμου, 2) απουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου, 3) παρουσία $Mg^{2+}/$ απουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου, 4) παρουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου και τέλος 5) απουσία $Mg^{2+}/$ παρουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου.

🚦 Ως υπόστρωμα έναντι της *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ χρησιμοποιήθηκε το ίδιο υπόστρωμα που αναφέρεται στην Ενότητα 3.1.10 και σε τελική συγκέντρωση 25 μM .

🚦 Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C για 35 min.

🚦 Η τελική συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 100 $\mu g/mL$ και η τελική συγκέντρωση της *ATP* ήταν 100 μM .

🚦 Οι αντιδράσεις διακόπτονται με προσθήκη αντιδραστήριου *Kinase Glo max (Promega)* και η φωταύγεια καταγράφεται μετά από 10 min χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών πολλαπλών λειτουργιών *EnSpire*.

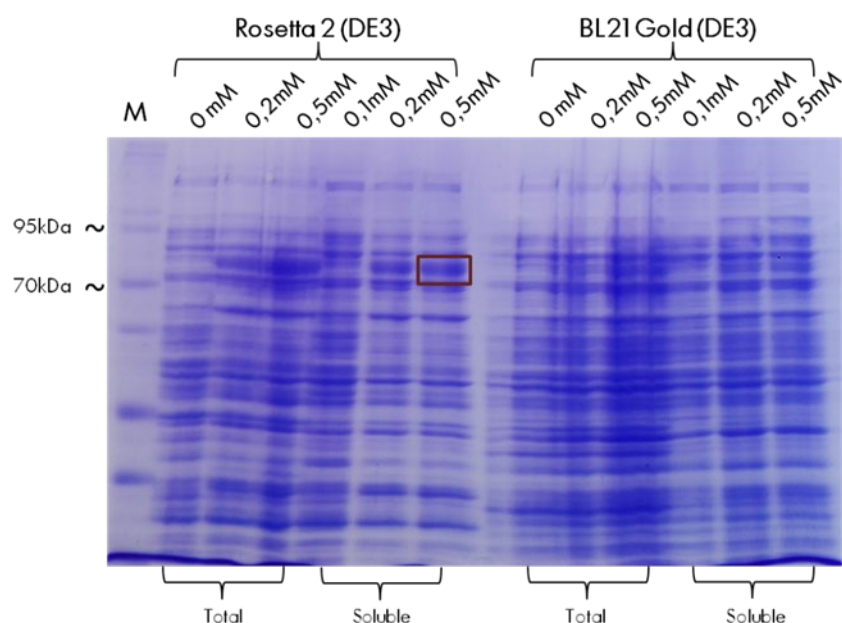
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Χαρακτηρισμός *LjSK1*

4.1.1. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης

4.1.1.1. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης *LjSK1*

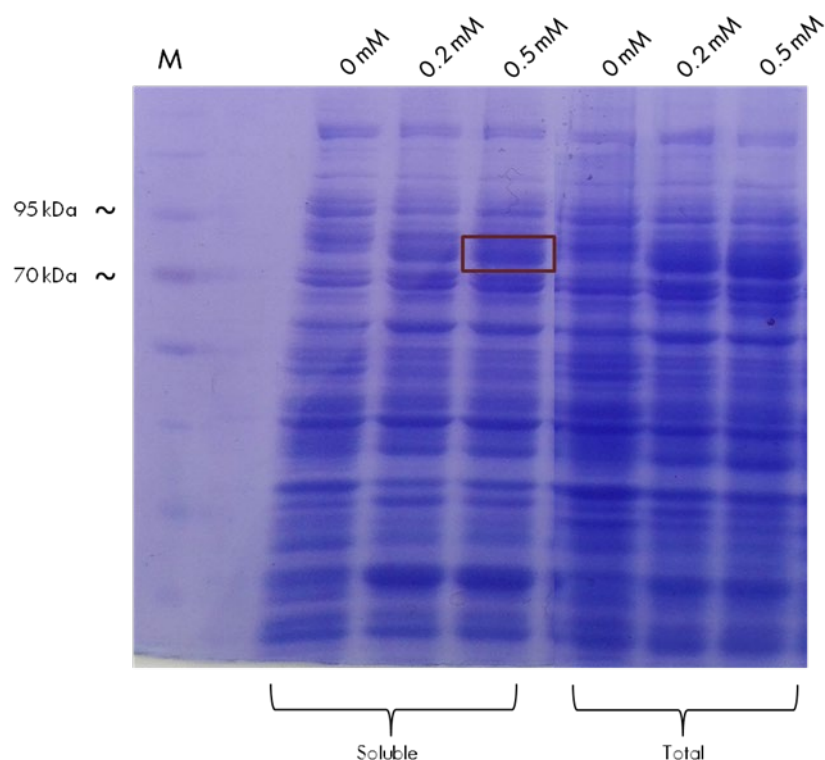
Όπως αναφέρεται και στην ενότητα 3.1.2. πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στα βακτηριακά στελέχη *BL21-Gold* και *Rosetta 2*. Για κάθε καλλιέργεια, ο ένας σωλήνας αποτέλεσε το *control* στο οποίο δεν προστέθηκε επαγωγέας *IPTG*, στον δεύτερο σωλήνα προστέθηκε *IPTG* συγκέντρωσης 0.2 mM και στον τρίτο σωλήνα προστέθηκε *IPTG* 0.5 mM. Όλες οι καλλιέργειες, μετά την επαγωγή, επώαστηκαν στους 18 °C υπό συνεχή ανακίνηση (210 rpm) για 16 h. Μετά το πέρας της διαδικασίας τα δείγματα συλλέχθηκαν ύστερα από φυγοκεντρήσεις, διαλυτοποιήθηκαν με το αντίστοιχο διάλυμα και αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Σύμφωνα με την πηκτή [Εικόνα 32.], η *LjSK1* εκφράζεται ιδανικότερα σε βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2*, με προσθήκη 0.5 mM *IPTG* και επώαση στους 18 °C για 16 h.



Εικόνα 32. Δοκιμή έκφρασης της *LjSK1* στα βακτηριακά στελέχη *BL21-Gold* και *Rosetta 2*. Ως *Total* αναφέρεται το δείγμα των συνολικών πρωτεϊνών που συλλέγεται ύστερα από μηχανική λύση με υπερήχους και ως *Soluble* αναφέρεται το δείγμα που προκύπτει ύστερα από φυγοκέντρηση των συνολικών πρωτεϊνών. Στην περίπτωση του στελέχους *BL21Gold* η έκφραση της *LjSK1* είναι ασθενής, τόσο στο *Total* όσο και στο *Soluble*. Στην περίπτωση του στελέχους *Rosetta 2*, παρατηρείται αυξημένη έκφραση στα δείγματα τα οποία προστέθηκε επαγωγέας *IPTG* σε αναλογία με την αύξηση της συγκέντρωσης του.

4.1.1.2. Δοκιμή έκφρασης στο μετάλλαγμα *LjSK1 Arg178Ala*

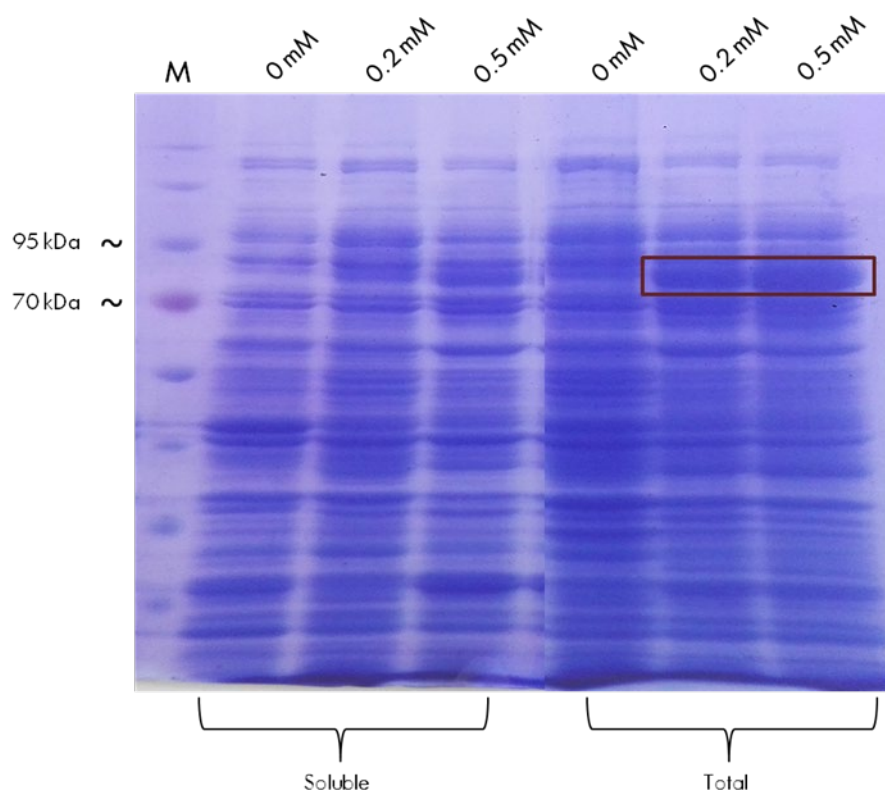
Για το μετάλλαγμα *LjSK1 Arg178Ala*, ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο με την ενότητα 3.1.2. με τη διαφορά ότι μετασχηματίστηκε χημικά μόνο το βακτηριακό στέλεχος *Rosetta 2*. Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε και πάλι στους 18 °C για 16 h και οι συγκεντρώσεις του *IPTG* ήταν 0 mM, 0.2 mM και 0.5 mM. Τα δείγματα αναλύθηκαν και πάλι σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες [Εικόνα 33.] και παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του μεταλλάγματος ύστερα από προσθήκη επαγωγέα σε συγκέντρωση 0.5 mM.



Εικόνα 33. Δοκιμή έκφρασης της *LjSK1 Arg178Ala* στο βακτηριακό στέλεχος *Rosetta 2*. Ως *Total* αναφέρεται το δείγμα των συνολικών πρωτεϊνών που συλλέγεται ύστερα από μηχανική λύση με υπερήχους και ως *Soluble* αναφέρεται το δείγμα που προκύπτει ύστερα από φυγοκέντρηση των συνολικών πρωτεϊνών. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση του μεταλλάγματος, σε αναλογία με την αύξηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα, τόσο στο *Total* όσο και στο *Soluble*.

4.1.1.3. Δοκιμή έκφρασης στο μετάλλαγμα *LjSK1 Lys278Ala*

Για το μετάλλαγμα *LjSK1 Lys278Ala*, πραγματοποιήθηκε δοκιμή έκφρασης ακριβώς όπως και στο προηγούμενο μετάλλαγμα *LjSK1 Arg178Ala* (Ενότητα 4.1.1.2.) και η ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες [Εικόνα 34.] έδειξε ότι το συγκεκριμένο μετάλλαγμα δεν εκφραζόταν στο διαλυτό κλάσμα. Είναι πολύ πιθανό μία μετάλλαξη στην αμινοξική αλληλουχία μίας πρωτεΐνης να επιφέρει αλλαγές στην αναδίπλωση και τη σταθερότητά της [272], ειδικά όταν αφορά συγκεκριμένες θέσεις όπως καλά συντηρημένα κατάλοιπα [273] και στην περίπτωση της *LjSK1* το αμινοξύ 278 θεωρείται ότι αποτελεί μέρος της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος.

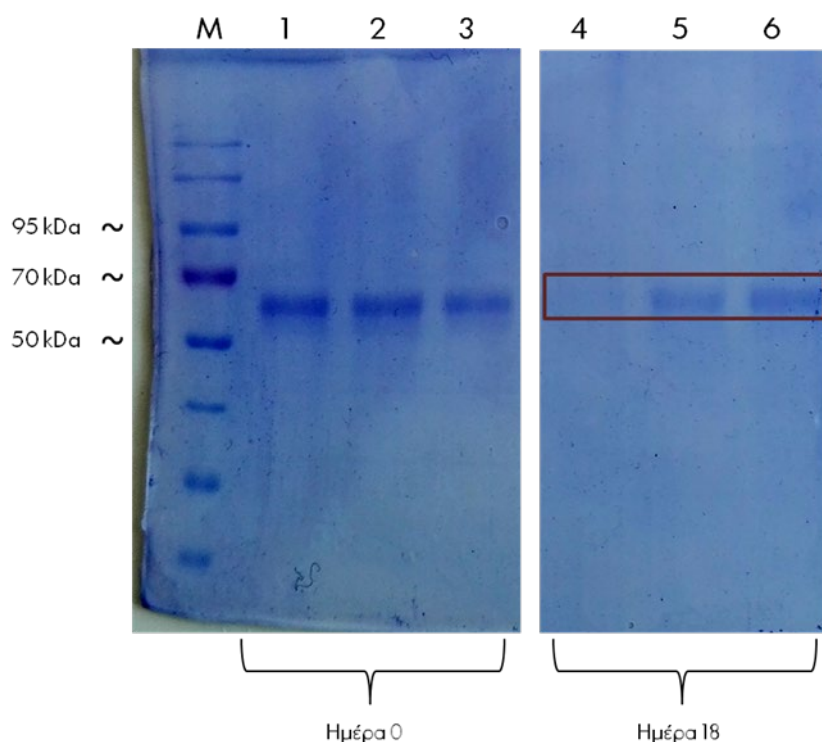


Εικόνα 34. Δοκιμή έκφρασης της *LjSK1 Lys287Ala* στο βακτηριακό στέλεχος *Rosetta 2*. Ως *Total* αναφέρεται το δείγμα των συνολικών πρωτεϊνών που συλλέγεται ύστερα από μηχανική λύση με υπερήχους και ως *Soluble* αναφέρεται το δείγμα που προκύπτει ύστερα από φυγοκέντρηση των συνολικών πρωτεϊνών. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση του μεταλλάγματος κυρίως στο *Total*.

4.1.2. Έλεγχος πρωτεόλυσης της διαλυτοποιημένης *LjSK1*

Η *LjSK1* ελέγχθηκε για την περίπτωση που υφίσταται πρωτεόλυση σύμφωνα με την Ενότητα 3.1.5. Η διαλυτοποιημένη *LjSK1* χωρίστηκε σε τρεις σωλήνες τύπου *erpendorf*. Ο ένας σωλήνας αποτέλεσε το *control*, ο δεύτερος σωλήνας περιείχε 1 mM EDTA και ο τρίτος σωλήνας περιείχε συνδυασμό 1 mM EDTA και κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών. Οι σωλήνες αποθηκεύτηκαν στους 4°C και λαμβανόταν δείγμα για τον κάθε ένα, ανά 2-4 μέρες για 18 μέρες συνολικά. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες [Εικόνα 35.]. Αποκαλύφθηκε έτσι η επίδραση πρωτεασών έναντι της *LjSK1* καθώς μετά το πέρασ 18 ημερών το *control* υδρολύθηκε πλήρως και δεν ήταν ικανό να δώσει ευδιάκριτη ζώνη στην πηκτή. Με βάση το πείραμα αυτό αποφασίστηκε οι

περαιτέρω μελέτες της *LjSK1* να διεξάγονται είτε παρουσία *EDTA*, είτε συνδυάζοντας *EDTA* με αναστολείς πρωτεασών.



Εικόνα 35. Έλεγχος πρωτεόλυσης της διαλυτοποιημένης *LjSK1*. Τα 1, 2 και 3 είναι τα δείγματα που λήφθηκαν στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας. Τα 4, 5 και 6 είναι τα δείγματα που λήφθηκαν στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Τα 1 και 2 αποτελούν το control, τα 2 και 5 αποτελούν τα δείγματα του σωλήνα που περιείχε 1 mM *EDTA* και τα 3 και 6 αποτελούν τα δείγματα από τον σωλήνα που περιείχε συνδυασμό 1 mM *EDTA* μαζί με κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών. Η *LjSK1* που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία προήλθε από στάδιο απομόνωσης μετά την απομάκρυνση της ετικέτας αχιστείας *GST-tag* και συνεπώς το μοριακό της βάρος βρίσκεται στα 53 KDa.

4.1.3. Καθαρισμός της *LjSK1* με ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (*FPLC*)

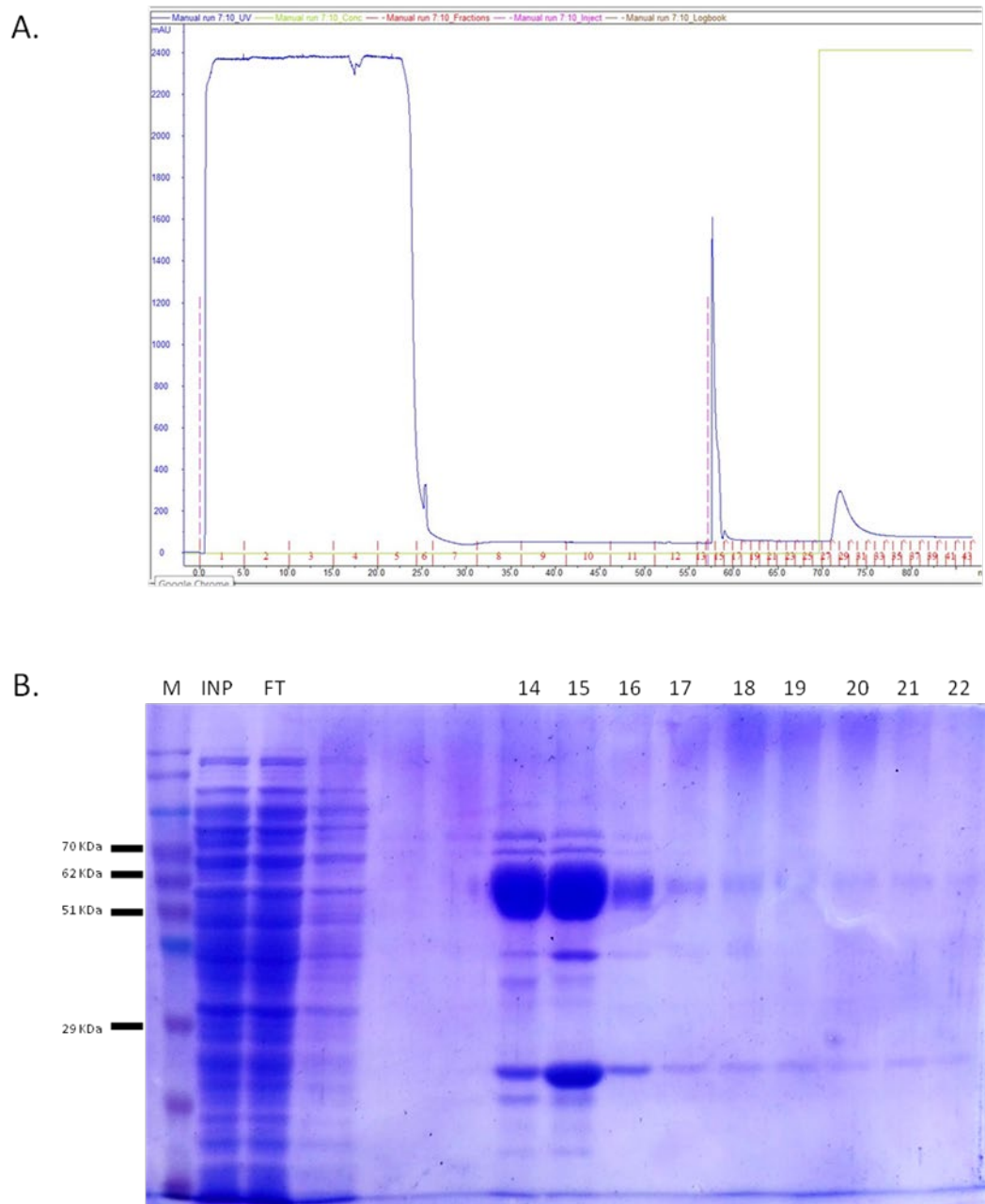
Για να βρεθεί το καταλληλότερο πρωτόκολλο για τον καθαρισμό και την απομόνωση της *LjSK1* δοκιμάστηκαν διάφορες τεχνικές *FPLC* που αναφέρονται αναλυτικά στην Ενότητα 3.1.6. Δυστυχώς, τα πρωτόκολλα καθαρισμού **No. 1**, **No. 2** και **No. 3** δεν απέδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Στην περίπτωση του πρωτοκόλλου **No. 1**, κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας

σε συνδυασμό με χρωματογραφία ανιοανταλλαγής, η *LjSK1* δεν κατάφερε να καθαριστεί επαρκώς με συνέπεια το δείγμα να μην είναι ιδανικό για περαιτέρω μελέτες. Στην περίπτωση του πρωτοκόλλου **No. 2**, κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε αρχικά η στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* και στη συνέχεια η στήλη συγγένειας *HiTrap Blue sepharose HP*, η *LjSK1* δεν κατάφερε να προσδεθεί ισχυρά στην στήλη, με αποτέλεσμα την αραίωση του δείγματος χωρίς βελτίωση της καθαρότητάς του, καθιστώντας περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες αναξιόπιστες. Ενώ και το πρωτόκολλο **No. 3**, κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός χρωματογραφίας συγγένειας και ανάστροφης φάσης δεν απέδωσε λόγω αδυναμίας πρόσδεσης της *LjSK1* στην στήλη *Resource RPC* με συνέπεια καμία βελτίωση στην καθαρότητα του δείγματος.

Τελικά, το πρωτόκολλο καθαρισμού **No. 4** χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και καθαρισμό της *LjSK1*, καθώς η απόδοση του ήταν κατάλληλη ώστε να παρέχει δείγμα υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για χρήση σε κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες.

4.1.3.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού *LjSK1* No. 4

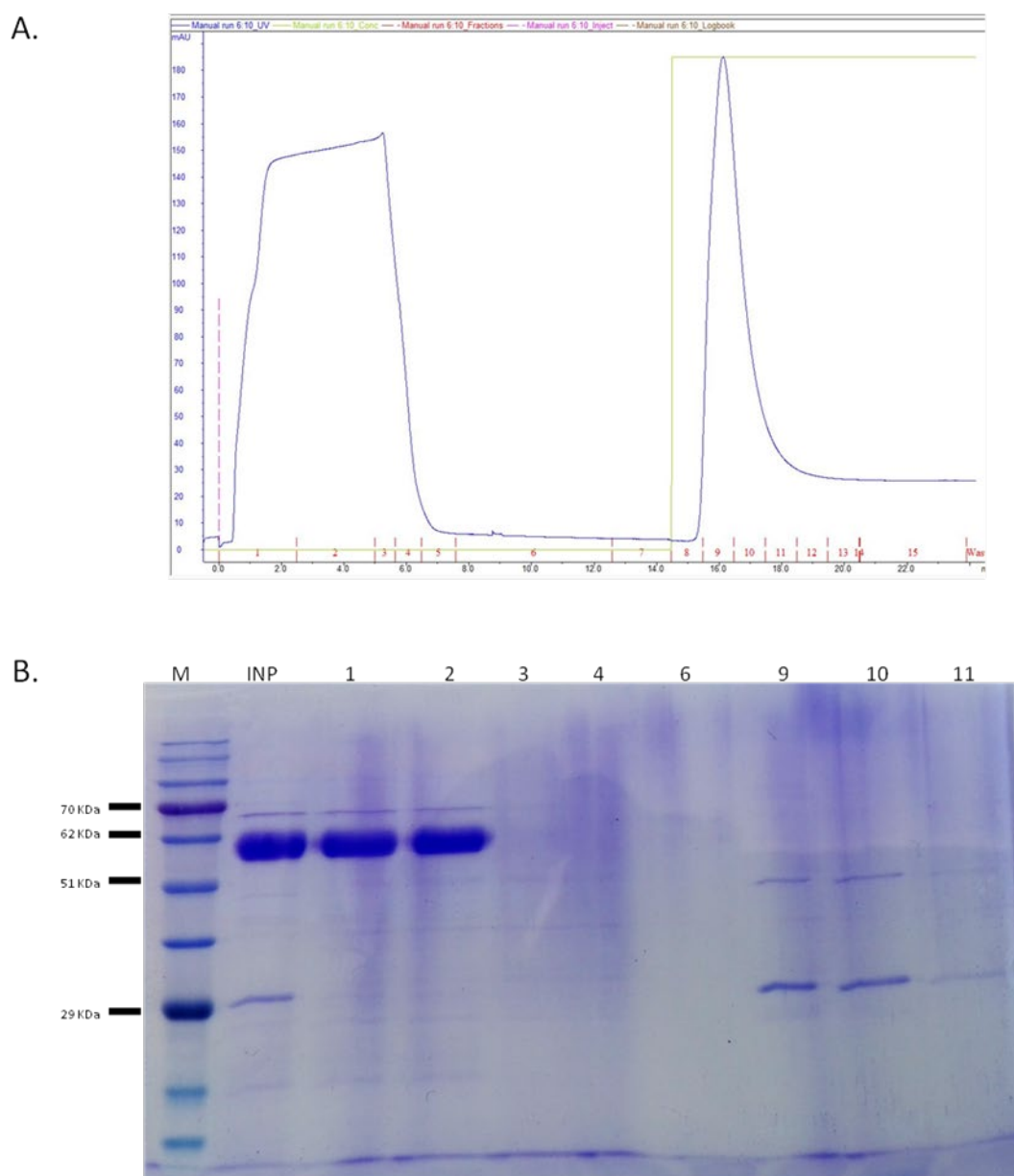
Στο τελικό πρωτόκολλο καθαρισμού (No. 4) το κυτταρόλυμα εισέρχεται σε 1^ο στάδιο στη στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* [Εικόνα 36.A.]. Εφόσον το πρωτεϊνικό δείγμα διέλθει από τη στήλη ακολουθεί εκτεταμένη έκπλυση με διάλυμα διαφορετικής σύστασης από το αρχικό (Ενότητα 3.1.6.4.) και στη συνέχεια εισάγεται εντός της στήλης η πρωτεάση 3C και αφήνεται να αλληλοεπιδράσει με την *LjSK1* για τουλάχιστον 16 h. Η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1* εξέρχεται από την στήλη και ακολουθεί έκλυση με το αντίστοιχο διάλυμα στο 100% της συγκέντρωσής του. Μέσω *SDS-PAGE* [Εικόνα 36.B.] τα κλάσματα που περιέχουν την ελεύθερη ετικέτας (*GST-tag*) *LjSK1*, ταυτοποιούνται και συλλέγονται για το επόμενο στάδιο.



Εικόνα 36. Στάδιο 1^ο του πρωτόκολλου καθαρισμού της *LjSK1* No. 4. Στο A απεικονίζεται το χρωματογράφημα, με τα κλάσματα 1-6 να αποτελούν το *flow through*, τα κλάσματα 7-13 την εκτεταμένη έκπλυση και τα κλάσματα 14-19 την ελεύθερη ετικέτας *GST-tag*, *LjSK1* που εξέρχεται από την στήλη εφόσον πλέον δεν φέρει συγγένεια και άρα δεν μπορεί να παραμείνει προσδεμένη. Στο B απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες και φαίνονται καθαρά τα κλάσματα 14-19 που φέρουν την ελεύθερη ετικέτας *LjSK1* σε μοριακό βάρος 53 *KDa*. Όπου *INP* είναι το αρχικό πρωτεϊνικό δείγμα που εισήλθε στη στήλη.

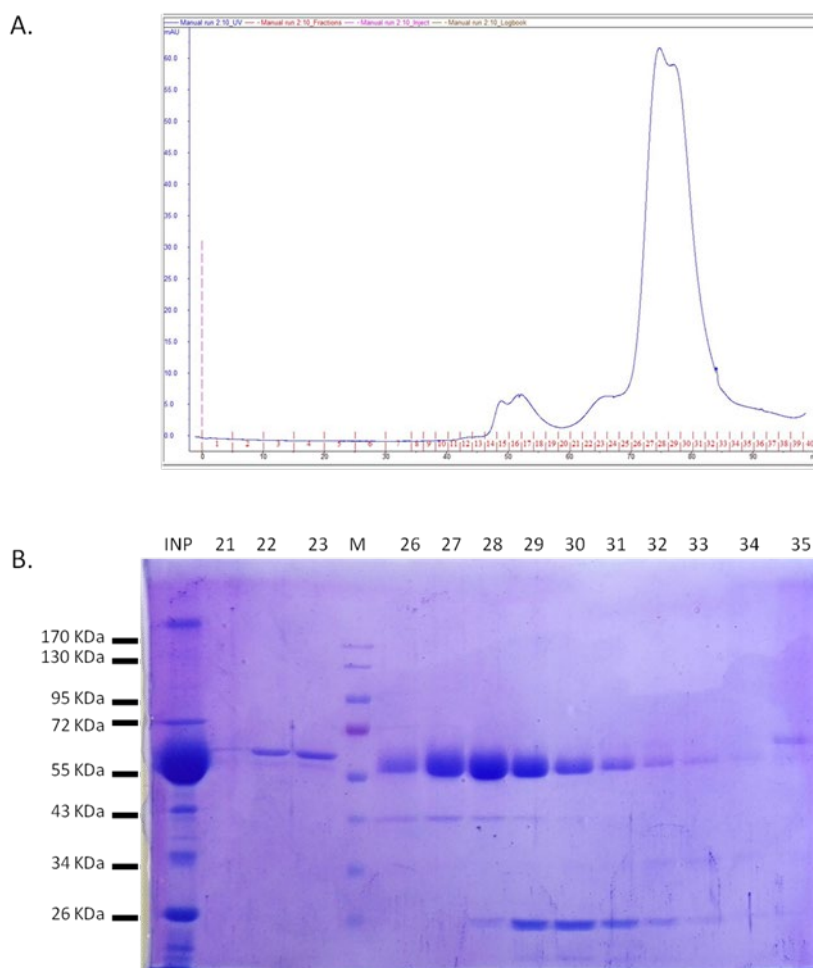
Στο 2^ο στάδιο τα κλάσματα 14-19 εισέρχονται ξανά σε στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 37.A.], ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα της πρωτεάσης 3C και της *LjSK1*

που μπορεί να φέρει ακόμα την ετικέτα συγγένειας (*GST-tag*) και τέλος αναλύονται με *SDS-PAGE* [Εικόνα 37.B.] ώστε να ελεγχθεί το επίπεδο καθαρότητας. Κατά το στάδιο αυτό οι περισσότερες προσμίξεις έχουν απομακρυνθεί, δίνοντας ένα δείγμα ικανοποιητικής καθαρότητας με τη μόνη πρόσμιξη που διατηρείται να είναι μία πρωτεΐνη περίπου στα 70 *KDa*.



Εικόνα 37. Στάδιο 2^ο του πρωτόκολλου καθαρισμού της *LjSK1* No. 4. Στο A απεικονίζεται το χρωματογράφημα, με τα κλάσματα 1-2 να αποτελούν το flow through και άρα την ελεύθερη ετικέτας *LjSK1*, ενώ τα κλάσματα 9-11 αποτελούν την έκλυση της στήλης με διάλυμα που περιείχε 20 *mM* *GSH*. Στο B απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμίδου υπό αποδιατακτικές συνθήκες με σκοπό τον έλεγχο αυτού του σταδίου.

Στο τελευταίο στάδιο του πρωτοκόλλου καθαρισμού της *LjSK1* **No. 4**, τα κλάσματα 1 και 2 του 2^{ου} σταδίου, συλλέγονται και συμπυκνώνονται με χρήση φίλτρου *Vivaspin Turbo 4*, με κατώφλι μοριακού βάρους 10000 και με μεμβράνη *PES*. Το συμπυκνωμένο δείγμα εισέρχεται σε στήλη μοριακής διήθησης *Superdex S200* [Εικόνα 38.A.] και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Ο έλεγχος αυτού του σταδίου καθώς και η ταυτοποίηση των κλασμάτων που περιέχουν την καθαρή πλέον *LjSK1*, πραγματοποιούνται με *SDS-PAGE* [Εικόνα 38.B.] και επιλέγονται τα κλάσματα, 26-29, καθώς φέρουν τη μέγιστη καθαρότητα. Τα κλάσματα αυτά στη συνέχεια συμπυκνώνονται ξανά με φίλτρο *Vivaspin Turbo 4* και αποθηκεύονται με 50% (v/v) γλυκερόλη στους -20 °C για περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 38. Τελικό στάδιο του πρωτοκόλλου καθαρισμού της *LjSK1* No.4. Στο A απεικονίζεται το χρωματογράφημα που προκύπτει από την στήλη μοριακής διήθησης, *Superdex S200*, ενώ στο B απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Όπου *INP* είναι το συμπυκνωμένο δείγμα που εισήλθε στη στήλη *Superdex S200* και στα κλάσματα 26-29 διακρίνεται η μέγιστη καθαρότητα του δείγματός μας.

4.1.4. Σύγκριση της πρωτοταγούς δομής της *LjSK1*

Για να διερευνήσουμε την *LjSK1* και τη λειτουργία της, καθώς και για να εντοπίσουμε τυχόν διαφορές ή ομοιότητες μεταξύ των *GSK3* των θηλαστικών με τις *GSK3-like* πρωτεΐνες των φυτών, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των αμινοξικών αλληλουχιών της *LjSK1*, της ανθρώπινης *GSK3β* και της *AtSK32* του *Arabidopsis thaliana* [Εικόνα 39.]. Από την σύγκριση παρατηρήθηκαν πολλά αμινοξικά κατάλοιπα που είναι συντηρημένα και στις τρεις πρωτεΐνες σε ποσοστό της τάξεως του 67%, ενώ έγινε ξεκάθαρο ότι και το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται καλά συντηρημένο. Πάνω σε αυτή την σύγκριση βασίστηκε η επιλογή των αμινοξικών καταλοίπων που έπρεπε να μελετηθούν σε βάθος ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στη λειτουργία της *LjSK1* και έτσι καταλήξαμε στην πραγματοποίηση στοχευμένων μεταλλάξεων στα αμινοξέα *Ser9*, *Tyr298*, *Arg178*, *Lys287* και *Lys167*.

LjSK1	1	MNMRRRLKSIASGRTSISSDPGGDSNSKRAKLDQETEKKNVEETKT-LGGKDQEQHVD-A
GSK3b	1	MSGRPRRTTSAES-----
AtSK3-2	1	MNMVRRRLKSIASGRTSISSDPGGDYALKRAKLDQENDNLCVDPMQVDQNSSCFEMKADVL
LjSK1	59	SKESTVGTSVDVSTVAKTEKSGFDELPKELHEMKIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETG
GSK3b	14	-----CKPV--QQPSAFGSMKVSRRDKD-----GSKVT
AtSK3-2	61	SQESVAGTSNVPVAV--SEKIPVDDQLPDVMIEMKIRDERNANREDKDMETTIVVNGSGTETG
LjSK1	119	QIITTAIGGRDGPQKQTSISYMAERVVGTGSFGVVEQAKCLETGEAVAIKKVLQDKRYKNR
GSK3b	39	TVVATP--GQGPDRPQEVSYTDTKVIGNGSFGVVYQAKLCDSGELVAIKKVLQDKRFKNR
AtSK3-2	119	QVITTVGGRDGPQKQTSISYMAQRVVGTGSFGVVEQAKCLETGEQVAIKKVLQDKRYKNR
		G-loop
LjSK1	179	ELQIMRQVDHFNIVKLKHCFFSTTD-KDELYLNLVLEVPETVYKVSQYIRVHQHMPII
GSK3b	97	ELQIMRQLDHFNIVRLRYFFYSGGEKDELYLNLVLDVPETVYRVARHYSRAKQTLPIVI
AtSK3-2	179	ELQIMRLQDHFNIVRLRHSFFSTTD-KDELYLNLVLEVPETVYRASKHYTKMNHMPII
LjSK1	238	YVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKLVGEPNLS
GSK3b	157	YVRLYMYQLFRSLAYIHS-FGICHRDIKPQNLLDPDTAVLKLICDFGSAKLVGEPNLS
AtSK3-2	238	FVQLYTYQICRALNYLHRVVGCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKLVGEPNLS
		activation loop
LjSK1	298	MICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVAELLGQPLFPGESGVQDLVEIIKVLGT
GSK3b	216	MICSRYYRAPELIFGATDYTSSIDVWSAGCVIAELLGQPIFPGESGVQDLVEIIKVLGT
AtSK3-2	298	MICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSGGCVMAELLGQPLFPGESGIDQDLVEIIKILGT
		activation loop
LjSK1	358	PTREEIROMNPHYNEFKFPQIKAHFWKVFYKRMPPPEAVDLVSRLLQYSPNIRCTALAAC
GSK3b	276	PTREQIREMNPNYTEFKFPQIKAHFWKVFYKRMPPPEAVDLVSRLLQYSPNIRCTALEAC
AtSK3-2	358	PTREEIROMNPNYTEFKFPQIKAHFWKIFHKRMPPPEAVDLVSRLLQYSPNIRCTALEAC
LjSK1	418	AHFFFDLDRPNASLPNGQPLPLFNFTPEELAHAPDELRLRLIPEHAR-----S-----
GSK3b	336	AHFFFDLDRPNVRLPNGRDTPLFNFTTQELSSNP-PLATILIPFHARIQAAASTPTNA
AtSK3-2	418	AHFFFDLDRPNVSLPNGRALPLFNFTTQELAGASTEIRQRLIPAHCGGTGSSS-----
LjSK1		-----
GSK3b	395	TAASDANTGDRGQTNNAAASASNST
AtSK3-2		-----

Εικόνα 39. Αλληλούχιση των αμινοξικών ακολουθιών της *LjSK1*, της ανθρώπινης *GSK3β* και της *AtSK32* του *Arabidopsis thaliana*. Με έντονους χαρακτήρες επισημαίνονται τα αμινοξέα που είναι ίδια και στις τρεις πρωτεΐνες. Τα αμινοξέα που επιλέχθηκαν να μεταλλαχθούν σε Αλανίνη βρίσκονται μέσα σε περίγραμμα. Τα κατάλοιπα που αποτελούν τον βρόχο G και τον βρόχο ενεργοποίησης

εμφανίζονται σε γκρι πλαίσιο. Τα μαύρα βέλη επισημαίνουν τα κατάλοιπα που πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με το ATP.

4.1.5. Στοχευμένες σημειακές μεταλλάξεις

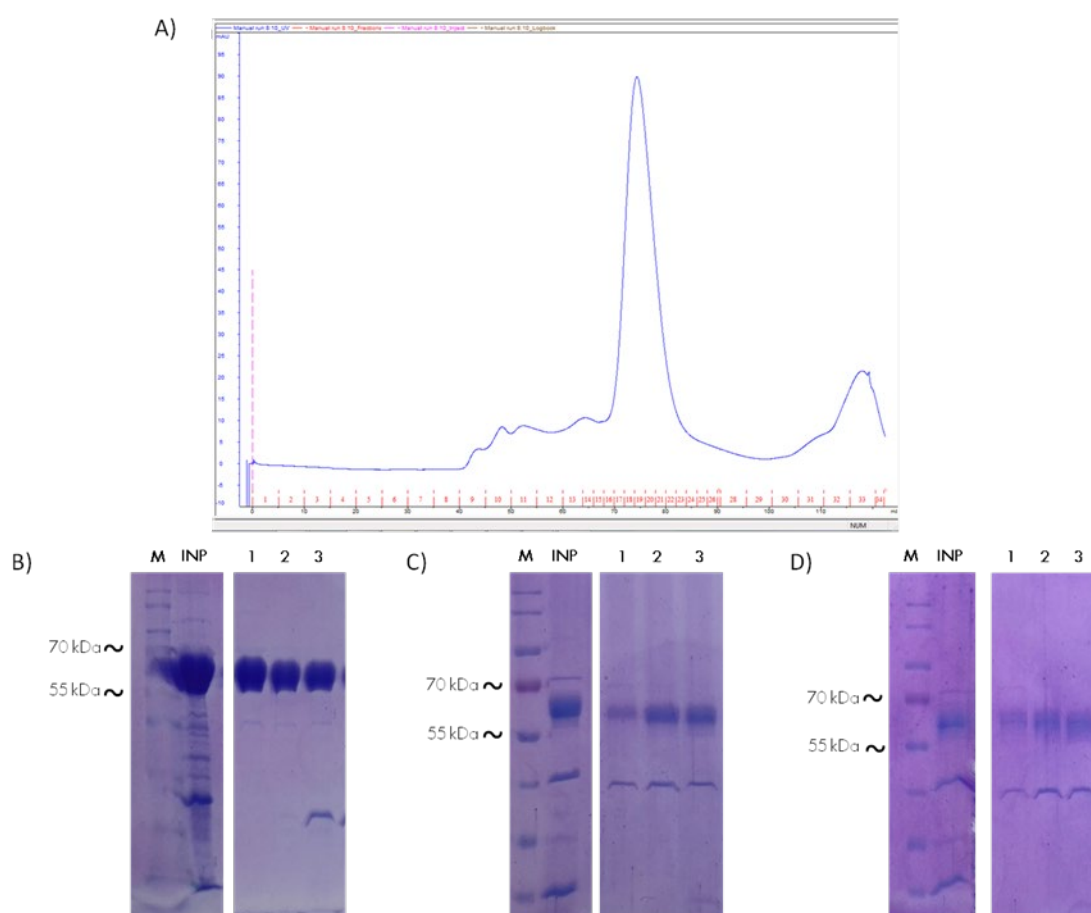
Η πειραματική διαδικασία για την κατασκευή πλασμιδιακών φορέων που θα φέρουν συγκεκριμένες σημειακές μεταλλάξεις αναφέρεται στην Ενότητα 3.1.8. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία [50, 70] καθώς και με την σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας με την ανθρώπινη GSK3β [Εικόνα 39.], ήταν τα εξής: *Ser9*, *Tyr298*, *Arg178*, *Lys287* και *Lys167*. Όλα μεταλλάχθηκαν σε *Ala*. Η επιτυχία των στοχευμένων σημειακών μεταλλάξεων επαληθεύτηκε ύστερα από αλληλούχιση και απεικονίζονται στην Εικόνα 40.



Εικόνα 40. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης για κάθε μετάλλαγμα. Με κόκκινο τρίγωνο επισημαίνονται οι σημειακές μεταλλάξεις που έλαβαν χώρα, μετατρέποντας την τριπλέτα του αντίστοιχου αμινοξέος σε τριπλέτα *Ala*. Για την απεικόνιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *SIM* που διατίθεται από το ινστιτούτο *SIB Swiss Institute of Bioinformatics* και ως μήτρα σύγκρισης χρησιμοποιείται το *BLOSUM62*.

4.1.6. Υπερέκφραση και απομόνωση μεταλλαγμάτων

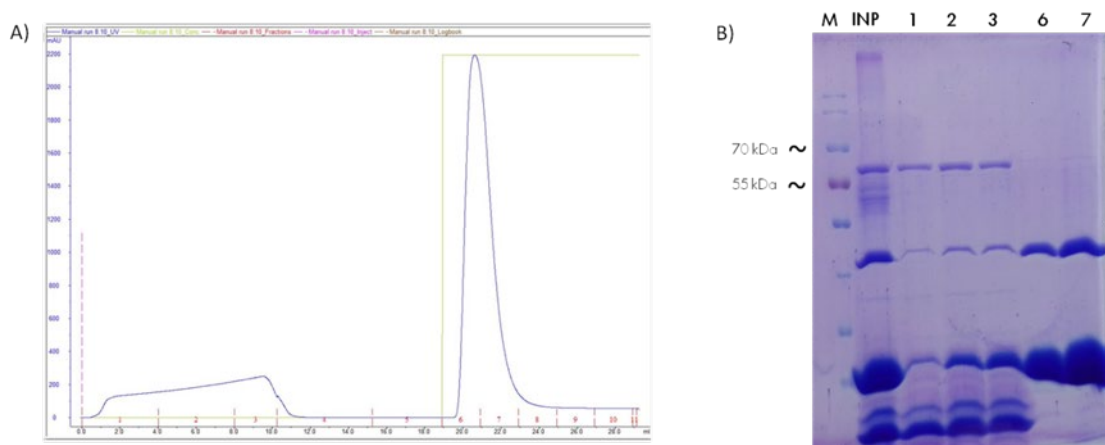
Όπως αναφέρεται και στην Ενότητα 3.1.9., τα μεταλλάγματα *S9A*, *Y298A* και *R178A* υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης *LjSK1* No.4. Τα χρωματογραφήματα και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρουσιάζουν την ίδια εικόνα καθώς αφορούν σημειακές μεταλλάξεις και οποιαδήποτε διαφορά δεν είναι διακριτή. Στην Εικόνα 41. απεικονίζεται ενδεικτικά το χρωματογράφημα από το μετάλλαγμα *Y298A* καθώς και για κάθε μετάλλαγμα, τα κλάσματα που επιλέχθηκαν μετά το πέρας του τελικού σταδίου, της στήλης μοριακής διήθησης *SEC200*.



Εικόνα 41. Τελικό στάδιο της απομόνωσης των μεταλλαγμάτων *S9A*, *Y298A* και *R178A*. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα του μεταλλάγματος *Y298A* το οποίο διήλθε από στήλη μοριακής διήθησης *SEC200*. Όλα τα χρωματογραφήματα και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου παρουσιάζουν ίδια εικόνα καθώς αφορά σημειακές μεταλλάξεις. Στο B) απεικονίζεται πιο συγκεκριμένα το τελικό στάδιο

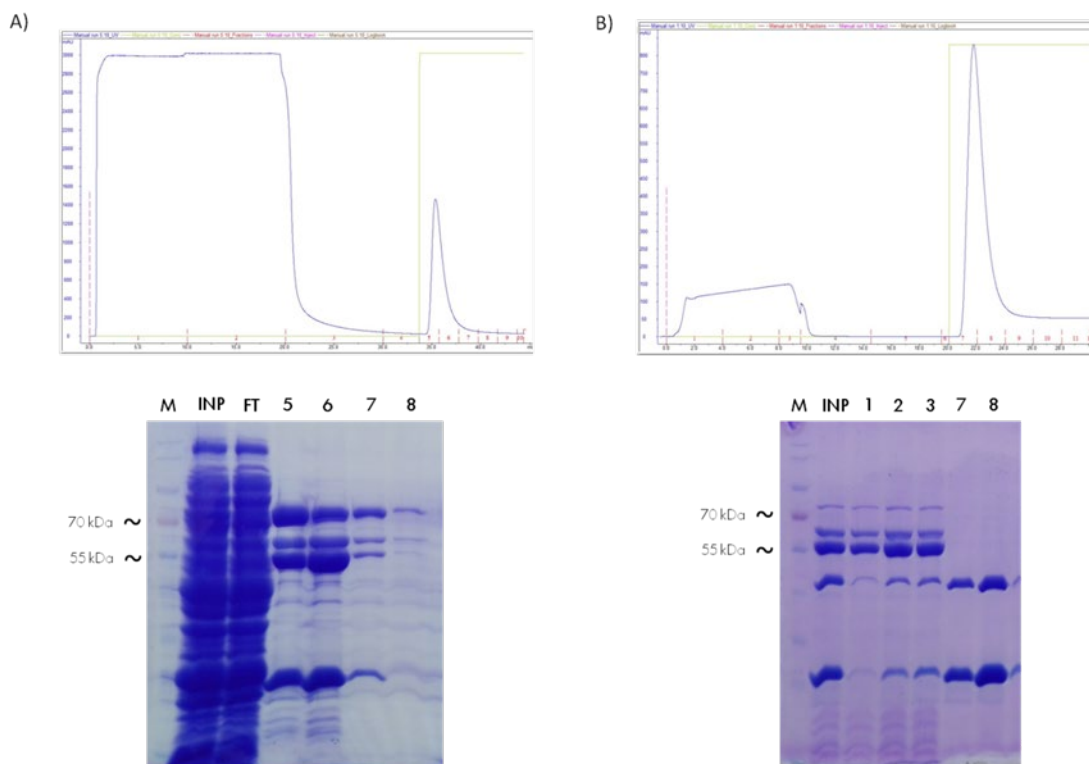
απομόνωσης του μεταλλάγματος *S9A*, όπου *M* ο δείκτης, *INP* το δείγμα που εισήλθε στην στήλη και τα 1,2 και 3 αποτελούν τα κλάσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Στο C) απεικονίζεται το τελικό στάδιο απομόνωσης του μεταλλάγματος *Y298A*, όπου *M* ο δείκτης, *INP* το δείγμα που εισήλθε στην στήλη και τα 1,2 και 3 αποτελούν τα κλάσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Τέλος στο D) απεικονίζεται το τελικό στάδιο απομόνωσης του μεταλλάγματος *R178A*, όπου *M* ο δείκτης, *INP* το δείγμα που εισήλθε στην στήλη και τα 1,2 και 3 αποτελούν τα κλάσματα που επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

Για τα μεταλλάγματα *K167A* και *K287A* το πρωτόκολλο απομόνωσης πραγματοποιήθηκε με μικρές παραλλαγές. Πιο συγκεκριμένα το μετάλλαγμα *K287A* διήλθε από στήλη συγγένειας *Protino GST 4B*, τα επιθυμητά κλάσματα συλλέχθηκαν και επωάστηκαν μαζί με την πρωτεάση 3C εκτός της στήλης και στη συνέχεια το δείγμα διήλθε και πάλι από στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 42.] ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα της πρωτεάσης και της πρωτεΐνης που φέρει ακόμα την ετικέτα αγκιστείας. Από την πρώτη στήλη είχε παρατηρηθεί μειωμένη απόδοση της έκφρασης του συγκεκριμένου μεταλλάγματος, γεγονός αναμενόμενο καθώς από τις δοκιμές έκφρασης (Ενότητα 4.1.1.3.) είχε φανεί ότι η μετάλλαξη του *K287* οδηγεί στην παραγωγή μη διαλυτής πρωτεΐνης. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, η ποσότητα του δείγματος να μην επαρκεί για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Απαιτείται αναθεώρηση του πρωτοκόλλου υπερέκφρασης και καθαρισμού του μεταλλάγματος *K287A*, με σκοπό την επίτευξη παραγωγής διαλυτής πρωτεΐνης.



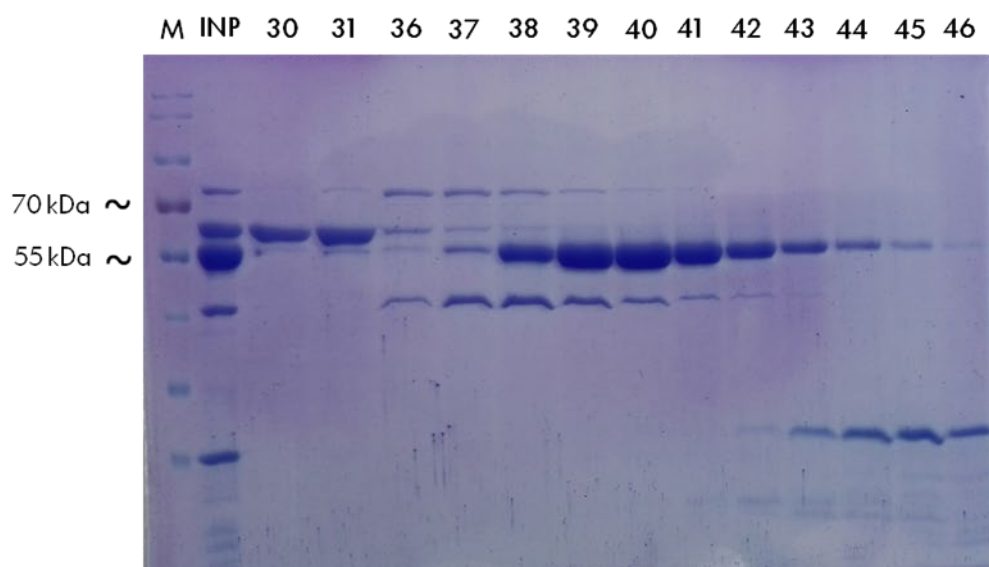
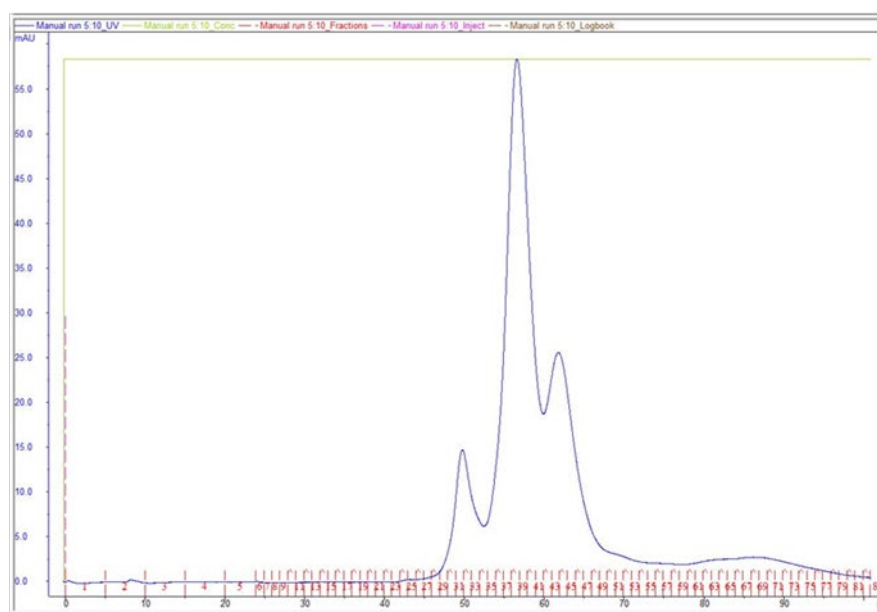
Εικόνα 42. Το τελευταίο στάδιο καθαρισμού του μεταλλάγματος *K287A*. Τα κλάσματα 1,2 και 3 αντιπροσωπεύουν την ελεύθερη ετικέτας *LysK1 K287A* και είναι εμφανές ότι η απόδοση είναι ιδιαίτερα μειωμένη.

Το μεταλλάγμα *K167A*, σε 1^ο στάδιο διήλθε από μία στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 43.A], τα επιθυμητά κλάσματα 5, 6, 7 και 8 συλλέχθηκαν και επωάστηκαν μαζί με την πρωτεάση 3C για 16 h εκτός της στήλης και στη συνέχεια διήλθαν ξανά από στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 43.B] με σκοπό να απομακρυνθούν τα υπολείμματα της πρωτεάσης καθώς και πρωτεΐνης που φέρει ακόμα την ετικέτα *GST-tag*.



Εικόνα 43. Τα πρώτα στάδια απομόνωσης του μεταλλάγματος *K167A*. Α) 1^ο στάδιο απομόνωσης με χρήση της στήλης *Protino GST 4B*. Τα κλάσματα 5-8 συλλέχθηκαν και επωάστηκαν μαζί με την πρωτεάση 3C. Β) 2^ο στάδιο απομόνωσης με χρήση πάλι της στήλης *Protino GST 4B*. Η ελεύθερη ετικέτας πρωτεΐνη εξέρχεται πρώτη από την στήλη (κλάσματα 1, 2 και 3).

Τα κλάσματα 1, 2 και 3 από το προηγούμενο στάδιο, συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν. Στο τελευταίο στάδιο, το συμπυκνωμένο δείγμα διήλθε από στήλη μοριακής διήθησης *SEC75* [Εικόνα 44] και επιλέχθηκαν τα επιθυμητά κλάσματα (κλάσματα 41-43) για περαιτέρω μελέτες.

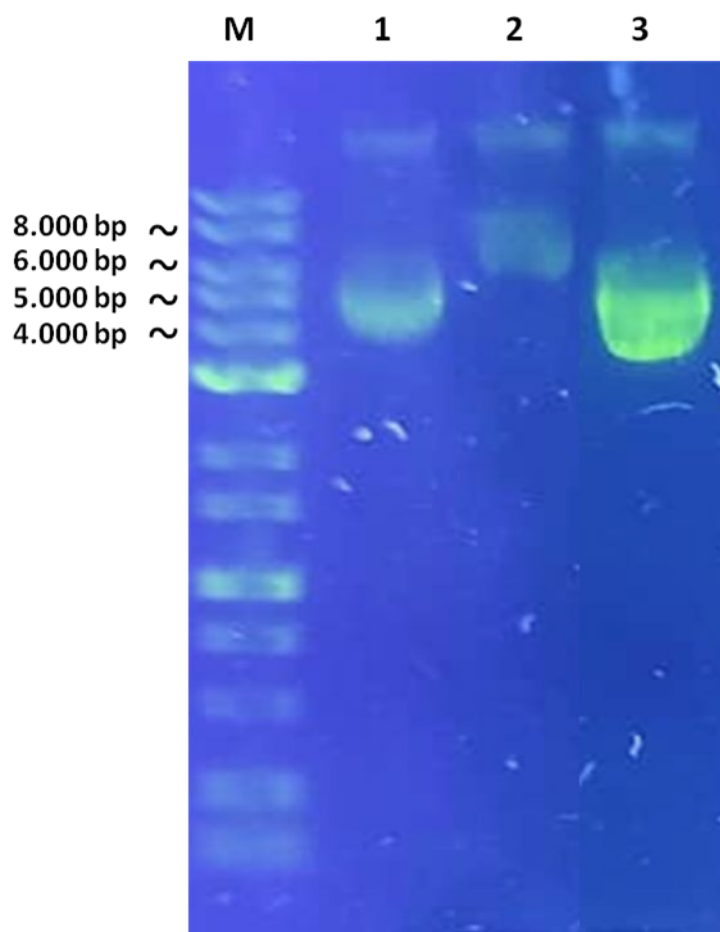


Εικόνα 44. Τελικό στάδιο απομόνωσης του μεταλλάγματος *K167A*. Το δείγμα διήλθε από στήλη μοριακής διήθησης *SEC75* και με βάση την πηκτή πολυακρυλαμίδιου επιλέχθηκαν τα κλάσματα 41-43 καθώς παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη καθαρότητα.

4.1.7. Κατασκευή του πλασμιδίου για την έκφραση της περικεκομμένης μορφή *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇

Η κατασκευή της περικεκομμένης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇, πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρεται στην Ενότητα 3.1.9. Η επιτυχία της κατασκευής επιβεβαιώθηκε ύστερα από

αλληλούχιση, η οποία παραθέτεται στο Παράρτημα, όσο και ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης [Εικόνα 45.] όπου και παρατηρούνται μπάντες στα επιθυμητά μοριακά βάρη. Με τον ίδιο τρόπο επιβεβαιώθηκε και η επιτυχία της κατασκευής της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇.



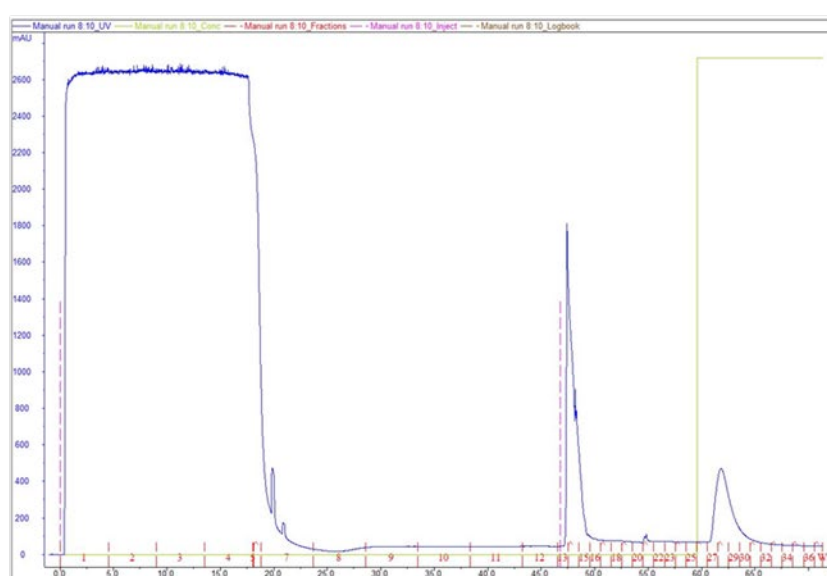
Εικόνα 45. Πηκτή αγαρόζης 0.8% που απεικονίζονται τα πλασμίδια των περικεκομμένων *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇. Στη διαδρομή 1 ηλεκτροφορήθηκε άδειο πλασμίδιο pGEX-6P-1 με μοριακό βάρος 4984 *bp*. Στη διαδρομή 2 βρίσκεται η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ με μοριακό βάρος στα 6121 *bp*. Στη διαδρομή 3 βρίσκεται η *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ με μοριακό βάρος στα 5974 *bp*.

4.1.8. Υπερέκφραση και απομόνωση *LjSK1*₉₀₋₄₆₇

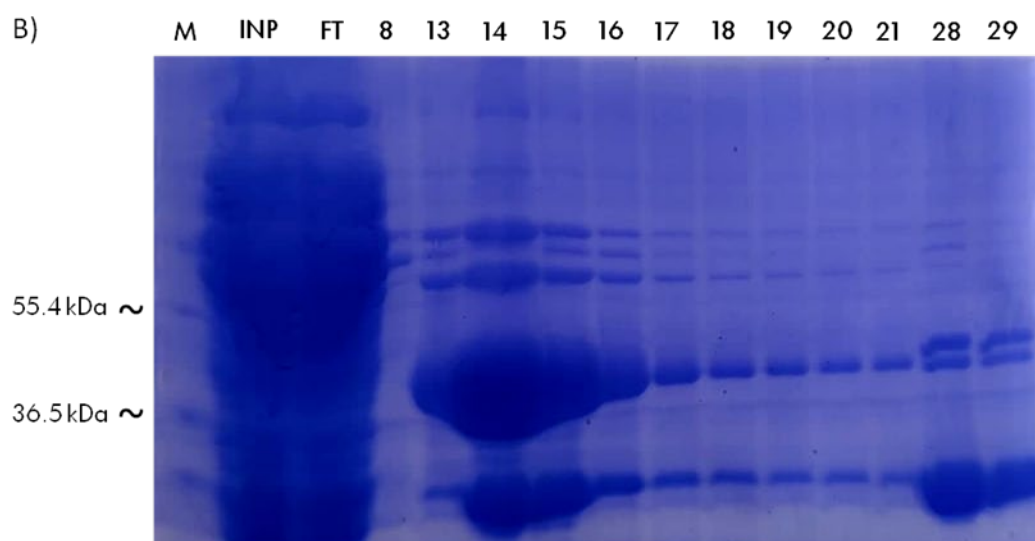
Για την υπερέκφραση και τον καθαρισμό της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της *LjSK1*. Η μόνη διαφορά ήταν στο διάλυμα διαλυτοποίησης των βακτηριακών κυττάρων που είχε pH 7.0 αντί 7.5. Στο 1^ο στάδιο

το κυτταρόλυμα διήλθε από στήλη συγγένειας *ProtinoGST 4B*, ακολούθησε εκτεταμένη έκπλυση με το αντίστοιχο διάλυμα και στη συνέχεια εισήχθηκε εντός της στήλης η πρωτεάση 3C για να επωαστούν μαζί για 16 h ώστε να αποκοπεί η ετικέτα αγκιστείας. Μετά το πέρας της επώασης η ροή της στήλης συνεχίστηκε και η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1₉₀₋₄₆₇* εξήλθε στα επόμενα κλάσματα. Βάση του χρωματογραφήματος [Εικόνα 46.A.] καθώς και της πηκτής πολυακρυλαμιδίου [Εικόνα 46.B.] συλλέχθηκαν τα κλάσματα 13-21 για να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία.

A)



B)

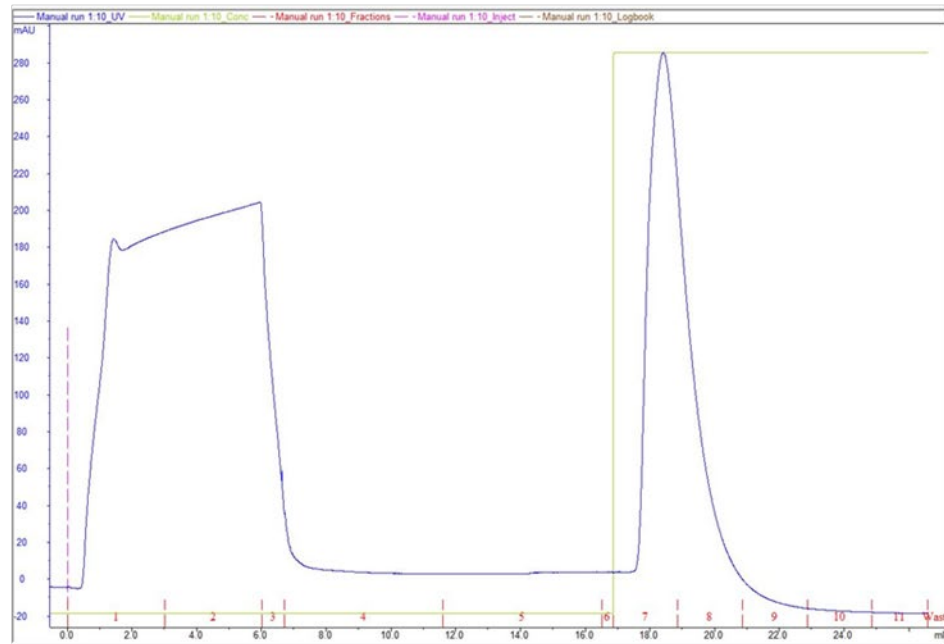


Εικόνα 46. Αρχικό στάδιο απομόνωσης της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. A) το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B*. B) πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Μετά το πέρας

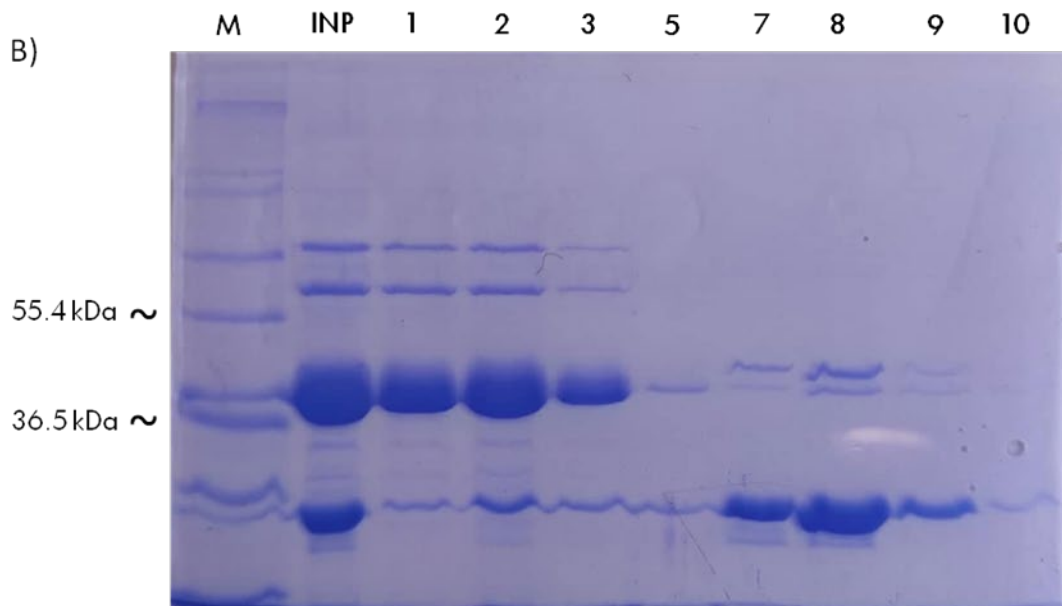
της επώασης της πρωτεάσης 3C (εισαγωγή εντός της στήλης στο κλάσμα 13) και του δείγματος, η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1₉₀₋₄₆₇* εξέρχεται από την στήλη στα κλάσματα 13-21.

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν εισήλθαν και πάλι σε στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* [Εικόνα 47.A.], με σκοπό να απομακρυνθούν υπολείμματα της πρωτεάσης 3C και τυχόν *LjSK1₉₀₋₄₆₇* που δεν κατάφερε να αποκοπεί από την ετικέτα *GST*. Επιλέχθηκαν τα κλάσματα 1-3 [Εικόνα 47.B.], τα οποία συμπυκνώθηκαν με ειδικό φίλτρο.

A)



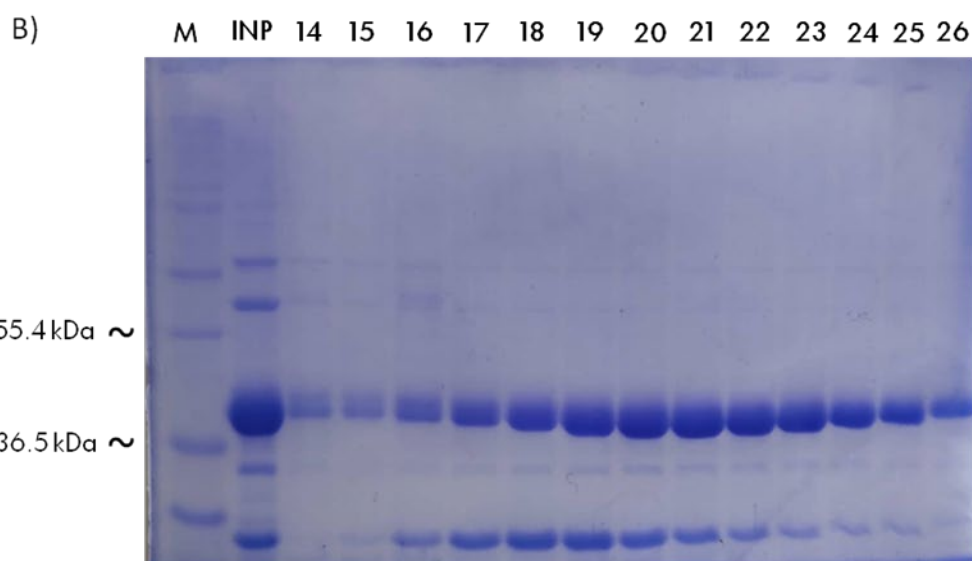
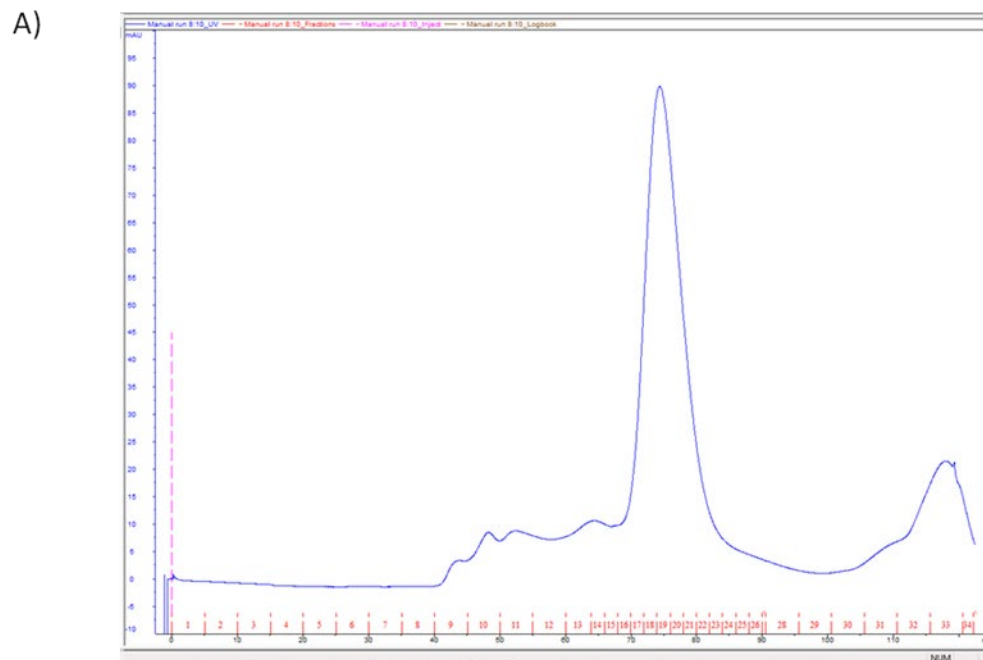
B)



Εικόνα 47. Στάδιο 2^ο απομόνωσης της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B*. Στο B) απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η ελεύθερη ετικέτας *LjSK1₉₀₋₄₆₇* συλλέγεται στα κλάσματα 1-3 και ακολουθεί συμπύκνωση.

Στο τελευταίο στάδιο της απομόνωσης, το συμπυκνωμένο δείγμα διέρχεται από στήλη μοριακής διήθησης *SEC200* [Εικόνα 48.A.]. Ύστερα από ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου [Εικόνα 48.B.], συλλέγονται τα κλάσματα 22-26 ως τα καθαρότερα. Η απόδοση της απομόνωσης είναι αρκετά υψηλή στα 0.6

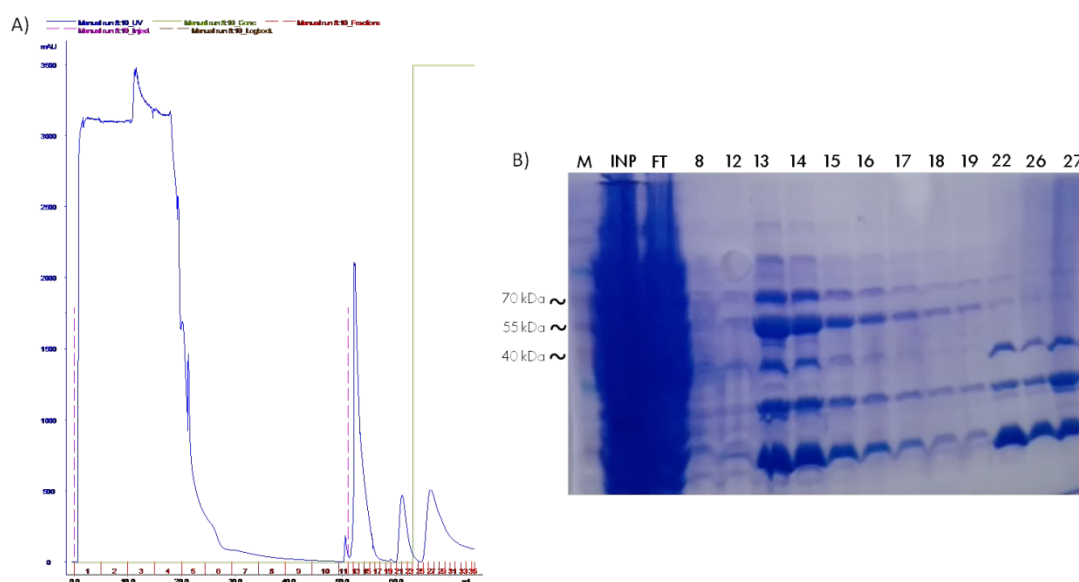
mg/L και το τελικό δείγμα, εφόσον συλλεχθεί, συμπυκνώνεται και αποθηκεύεται για περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 48. Τελικό στάδιο απομόνωσης της περικεκομμένης *LjSK190-467*. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης μοριακής διήθησης *SEC200*. Στο B) απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό απαδιατακτικές συνθήκες. Η απόδοση της απομόνωσης χαρακτηρίζεται υψηλή στα 5.8 mg/mL και τα τελικό δείγμα είναι κατάλληλο για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

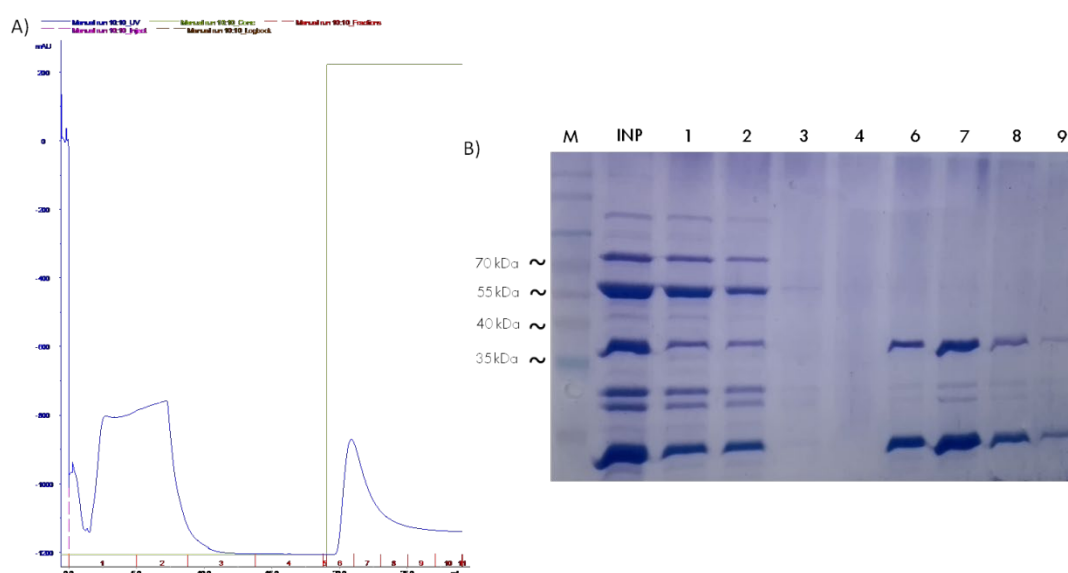
4.1.9. Υπερέκφραση και απομόνωση *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇

Για την απομόνωση της περικεκομμένης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇, ακολουθήθηκε παρόμοιο πρωτόκολλο με το πρωτόκολλο απομόνωσης της *LjSK1*, αλλά περιορίστηκε σε δύο στάδια μόνο. Σαν διάλυμα διαλυτοποίησης των βακτηριακών κυττάρων επιλέχθηκε διάλυμα ίδιας σύστασης με pH 7.0 αντί 7.5 και δεν χρησιμοποιήθηκε στήλη μοριακής διήθησης σαν τελικό στάδιο. Αρχικά το κυτταρόλυμα διήλθε από στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* [Εικόνα 49.A.] και ύστερα από εκτεταμένη έκπλυση με το αντίστοιχο διάλυμα, αφέθηκε μαζί με την πρωτεάση 3C εντός της στήλης να επωαστούν και να αποκοπεί η ετικέτα αγκιστείας. Η διαδικασία δεν χαρακτηρίστηκε από υψηλή απόδοση, μόλις 0.12 mg/L, καθώς και η επιθυμητή πρωτεΐνη δεν είχε εκφραστεί επαρκώς αλλά και παρατηρήθηκε αδυναμία της πρωτεάσης να επιδράσει και να αποκόψει την ετικέτα GST [Εικόνα 49.B.], αλλά τα κλάσματα 13-19 συλλέχθηκαν και συνεχίστηκε η διαδικασία στο 2^ο στάδιο.



Εικόνα 49. Αρχικό στάδιο απομόνωσης της περικεκομμένης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης συγγένειας *Protino GST 4B*. Στο B) απεικονίζεται η ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ έχει μοριακό βάρος 38 kDa χωρίς την ετικέτα αγκιστείας (64 kDa μαζί με την GST-tag) και σύμφωνα με το μοριακό βάρος του δείκτη καταλαβαίνουμε ότι η συγκέντρωση της είναι αρκετά χαμηλή ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται πρωτεΐνες και σε υψηλότερα μοριακά βάρη που πιθανώς να αντιπροσωπεύουν την *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ η οποία δεν κατάφερε να αποκοπεί από την ετικέτα της.

Τα επιθυμητά κλάσματα εισήλθαν και πάλι σε στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* [Εικόνα 50.A.], με σκοπό να απομακρυνθούν υπολείμματα της πρωτεάσης 3C καθώς και της *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ που φέρει ακόμα την ετικέτα αγκιστείας. Μετά και την ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου [Εικόνα 50.B.] έγινε ξεκάθαρο ότι ναι μεν η πρωτεΐνη βρίσκεται στα κλάσματα 1 και 2 αλλά η χαμηλή αρχική απόδοση δεν επιτρέπει την αξιοποίηση των δειγμάτων για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Το πρωτόκολλο απομόνωσης της περικεκομμένης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ επιδέχεται αλλαγές και πρέπει να επανεξεταστεί ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες που θα καταστήσουν το τελικό δείγμα αξιόπιστο.



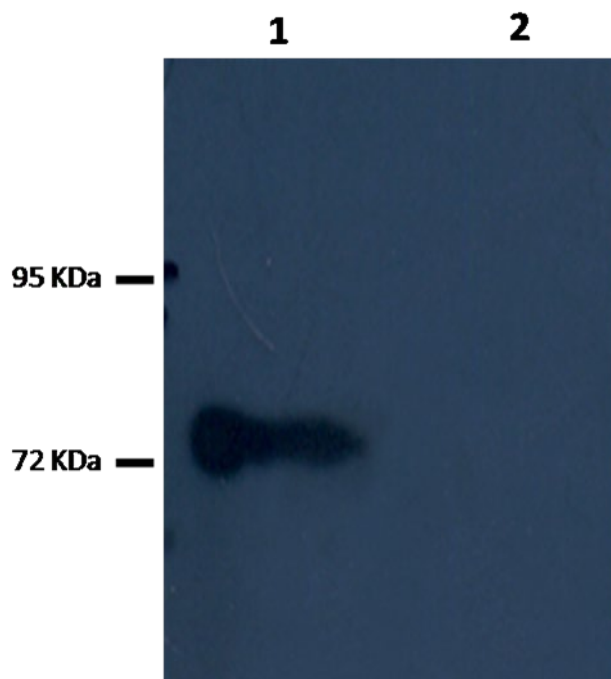
Εικόνα 50. Τελικό στάδιο απομόνωσης *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇. Στο Α) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης συγγένειας *Protino GST 4B* η οποία χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να απομακρυνθεί η πρωτεάση 3C καθώς και *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ που δεν κατάφερε να αποκοπεί από την ετικέτα της. Στο Β) απεικονίζεται η ανάλυση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Στα κλάσματα 1 και 2 βρίσκεται η *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ αλλά η συγκέντρωσή της είναι αρκετά χαμηλή και συνοδεύεται από πολλές προσμίξεις και συνεπώς το δείγμα δεν κρίθηκε αξιόπιστο για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Το πρωτόκολλο απομόνωσης της *LjSK1*₁₃₉₋₄₆₇ επιδέχεται αλλαγές.

4.1.10. Ανοσοαποτύπωση *Western blot*

Ανοσοαποτύπωση κατά *Western* χρησιμοποιήθηκε ώστε να εξακριβωθούν κατά πόσο τα κατάλοιπα *Ser9* και *Tyr298* της *LjSK1* φωσφορυλιώνονται και άρα έχουν άμεση επίδραση στη λειτουργία της. Η μεθοδολογία αναλύεται στην Ενότητα 3.1.7. και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ειδικά αντι-φώσφο αντισώματα, *p-GSK-3α/β* (6D3) και *p-GSK3β* (F-2). Για το κατάλοιπο *Tyr298* της *LjSK1* χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα *p-GSK-3α/β* (6D3), καθώς αφορά την ανίχνευση της *Tyr279* στην ανθρώπινη *GSK3α* και της *Tyr216* στην ανθρώπινη *GSK3β*, ενώ για το κατάλοιπο *Ser9* της *LjSK1* χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα *p-GSK3β* (F-2) το οποίο αφορά την ανίχνευση της *Ser9* της ανθρώπινης *GSK3β*.

Όσον αφορά την *Ser9*, η ανοσοαποτύπωση κατά *Western* δεν παρείχε κανένα σήμα συμπεραίνοντας ότι το συγκεκριμένο κατάλοιπο της *LjSK1* δεν φωσφορυλιώνεται και άρα δεν χρησιμοποιείται για αυτό-αναστολή του ενζύμου όπως συμβαίνει στην περίπτωση της ανθρώπινης *GSK3β* [27]. Το αποτέλεσμα είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται πως οι περισσότερες κινάσες που προέρχονται από φυτά και ομοιάζουν με την ανθρώπινη *GSK3β*, δεν διατηρούν καλά συντηρημένη την περιοχή του *N-τελικού* τους άκρου όπως οι *GSK3* των θηλαστικών [190] και συνεπώς η αυτό-ανασταλτική δράση της σερίνης δεν παρατηρείται.

Αντιθέτως, το κατάλοιπο *Tyr298* της *LjSK1*, έδωσε ισχυρό σήμα έναντι του αντισώματος *p-GSK-3α/β* (6D3) [Εικόνα 51.], επιβεβαιώνοντας τη φωσφορυλίωση του και υποδεικνύοντας ότι το συγκεκριμένο κατάλοιπο συμμετέχει στην εξειδίκευση της *LjSK1* ως προς τα υποστρώματα. Ανοσοαποτύπωση κατά *Western* πραγματοποιήθηκε τόσο στην αρχική *LjSK1* όσο και στο μετάλλαγμα *LjSK1 Tyr298Ala* το οποίο δεν παρείχε κανένα σήμα.



Εικόνα 51. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την *LjSK1* και το μετάλλαγμα *LjSK1 Tyr298Ala*. Όπου 1 η αρχική *LjSK1* και όπου 2 το μετάλλαγμα *LjSK1 Tyr298Ala*. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα *p-GSK-3α/β (6D3)*, το οποίο αναπτύχθηκε έναντι φωσφοπεπτιδίου που αντιστοιχεί σε υπολείμματα αμινοξέων που περιβάλλουν την *Tyr 279* της ανθρώπινης *GSK3α* και *Tyr 216* της ανθρώπινης *GSK3β*.

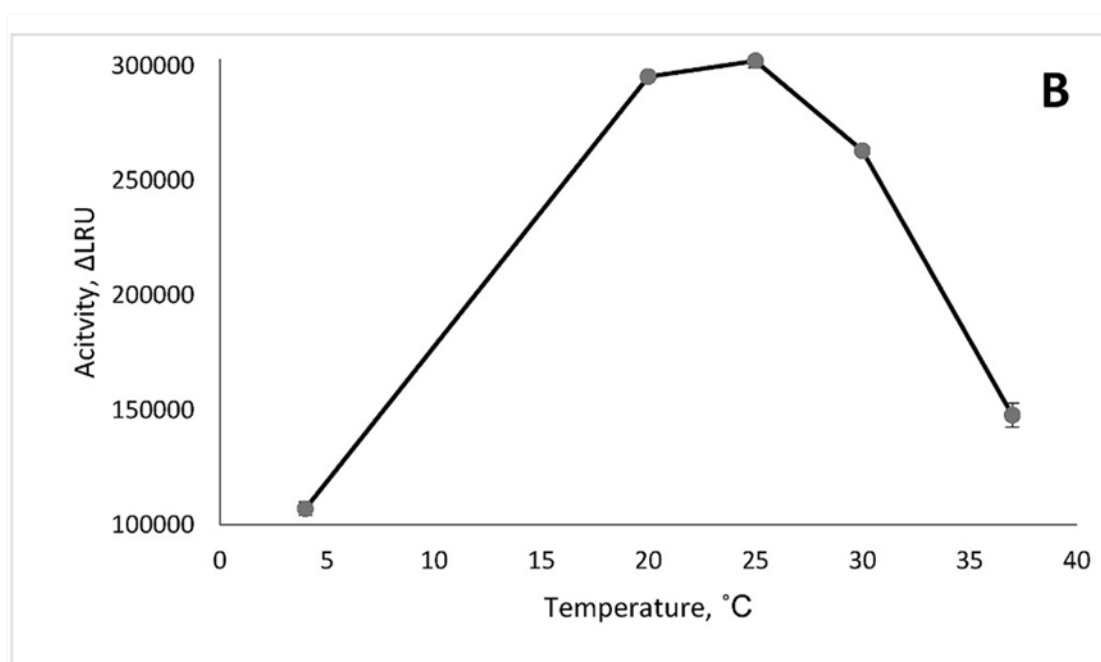
4.1.11. Κινητικές μελέτες

Όπως αναφέρεται αναλυτικά και στην Ενότητα 3.1.10, το πρωτόκολλο που επιλέχθηκε για την εύρεση των κινητικών παραμέτρων βασίζεται στη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ως αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν τα *Kinase Glo* και *Kinase Glo max* της εταιρείας *Promega* και ως υπόστρωμα επιλέχθηκε το πολυπεπτίδιο *His-Ser-Ser-Pro-His-Gln-Ser(PO₃H₂)-Glu-Asp-Glu-Glu-Glu* το οποίο καλύπτει την προτίμηση των *GSK3* κινασών για προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα. Με βάση το πρωτόκολλο αυτό, το σήμα φωταύγειας που λαμβάνεται μετά το πέρας των ενζυμικών αντιδράσεων είναι ανάλογο του *ATP* που δεν έχει καταναλωθεί και συσχετίζεται μέσω μιας πρότυπης καμπύλης, ως αντιστρόφως ανάλογο με τη δραστηριότητα του ενζύμου. Ο χαρακτηρισμός της *LjSK1* ξεκίνησε με την εύρεση των ιδανικών συνθηκών τέλεσης της ενζυμικής αντίδρασης και στη συνέχεια

μετρήθηκαν η σταθερά *Michaelis-Menten* (K_m) και η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}). Επιπροσθέτως διεξήχθη προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης αναστολέων που απαιτείται για να ανασταλεί το ένζυμο στο 50% (IC_{50}) με τους αναστολείς *Lupeol*, *Betulinic acid* και *Hederacoside C*.

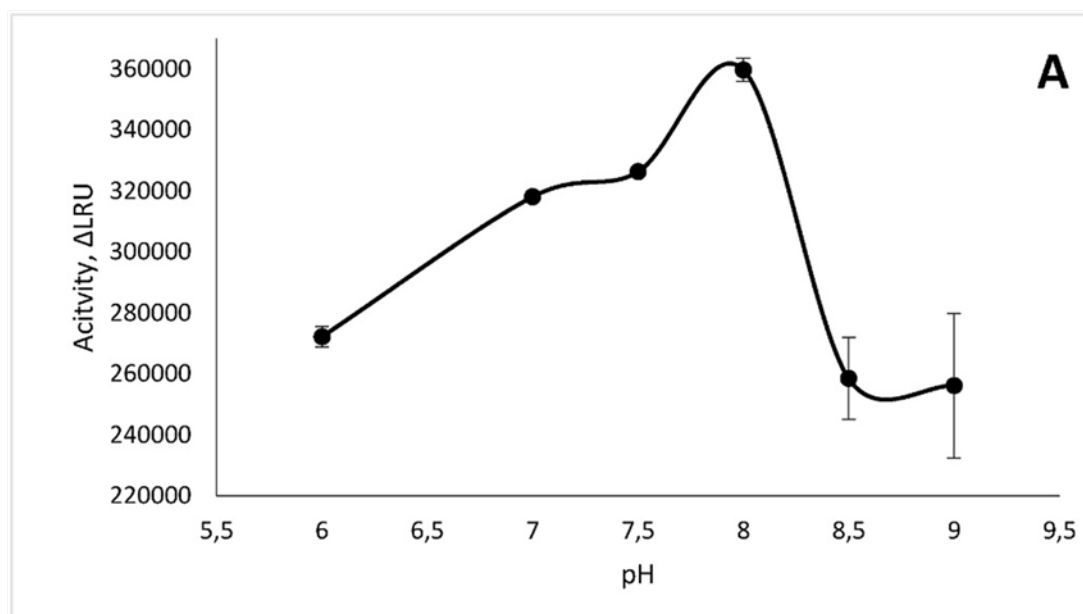
4.1.11.1. Θερμοκρασία και pH

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση μελετήθηκε *in vitro* μέσω δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες, όπως αναφέρεται και αναλυτικά στην Ενότητα 3.1.10.1. Οι θερμοκρασίες που ελέγχθηκαν ήταν 4, 20, 25, 30 και 37 °C παρουσία 0,5 μM ATP. Όπως φαίνεται και στο γράφημα [Εικόνα 52.], η βέλτιστη θερμοκρασία τέλεσης της ενζυμικής αντίδρασης είναι οι 25 °C.



Εικόνα 52. Γράφημα θερμοκρασίας για την *LjSK1*. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή που προκύπτει ύστερα από τρεις μετρήσεις. Το *RLU* αναφέρεται στις σχετικές μονάδες φωτός και αντίστοιχα το ΔRLU αναφέρεται στη διαφορά που προκύπτει ύστερα από αφαίρεση της μέτρησης του δείγματος από το *control*. Οι 25 °C αποτελούν τη βέλτιστη θερμοκρασία, καθώς όπως φαίνεται στο γράφημα, το ένζυμο έχει την υψηλότερη απόδοση.

Αντίστοιχα, μελετήθηκε και η επίδραση του pH στην ενζυμική δραστικότητα και ελέγχθηκαν οι τιμές pH 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 και 9.0 (Ενότητα 3.1.10.1). Όπως φαίνεται και στο γράφημα [Εικόνα 53.], η βέλτιστη τιμή pH αντιστοιχεί στο 8.0, ενώ σε οποιαδήποτε άλλη τιμή η ενζυμική δραστικότητα μειώνεται σημαντικά.

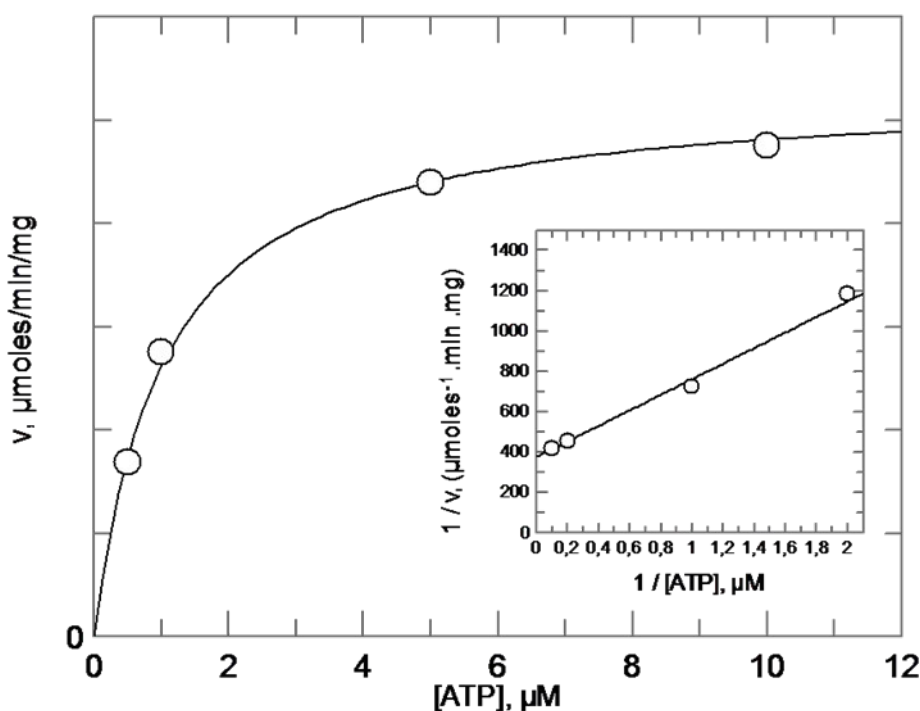


Εικόνα 53. Γράφημα pH για την *LjSK1*. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή που προκύπτει ύστερα από τρεις μετρήσεις. Το RLU αναφέρεται στις σχετικές μονάδες φωτός και αντίστοιχα το ΔRLU αναφέρεται στη διαφορά που προκύπτει ύστερα από αφαίρεση της μέτρησης του δείγματος από το *control*. Σε τιμή pH 8.0, η απόδοση της ενζυμικής δραστικότητας βρίσκεται στο μέγιστο, ενώ παρατηρείται σημαντική μείωση σε οποιαδήποτε άλλη τιμή.

4.1.11.2. Δισθενές κατιόν

Για να διερευνηθεί η επιθυμητή επίδραση δισθενών κατιόντων στην ενζυμική δραστικότητα της *LjSK1* (Ενότητα 3.1.10.2.), διερευνήθηκαν τα Mg^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} . Ως προς το Mn^{2+} , οι μετρήσεις που λήφθηκαν παρουσίαζαν αναξιοπιστία. Σε αρχικές χαμηλές συγκεντρώσεις το Mn^{2+} δεν επέφερε καμία επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου, ενώ με ελάχιστη αύξηση της συγκέντρωσης του, η δραστικότητα ανερχόταν σε υπερβολικά υψηλό ποσοστό. Το αποτέλεσμα δεν θεωρήθηκε αξιόπιστο γιατί πιθανόν το Mn^{2+} να αλληλοεπιδρούσε με τα στοιχεία του kit είτε με το υπόστρωμα. Ως προς το Ca^{2+} , υπολογίστηκε η συγγένεια που παρουσιάζει η *LjSK1*

και βρέθηκε ίση με $56.6 \pm 45.8 \mu\text{M}$, τιμή αρκετά υψηλή (και με σημαντικό σφάλμα) αποδεικνύοντας ότι ούτε και το Ca^{2+} είναι το κατάλληλο κατιόν. Τελικά όμως, ταυτοποιήθηκε το Mg^{2+} ως το κατιόν που είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του ενζύμου καθώς υπολογίστηκε η συγγένεια του με τη *LjSK1*, ίση με $1.00 \pm 0.01 \mu\text{M}$ [Εικόνα 54.]. Αποτέλεσμα σύμφωνο με τη βιβλιογραφία [274], μιας και το Mg^{2+} είναι το δισθενές κατιόν που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία εντός του κυττάρου και άρα θεωρείται το πιο κατάλληλο ιόν για το συντονισμό στη μεταβατική κατάσταση μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας.



Εικόνα 54. Η ενζυμική δραστηριότητα της *LjSK1* παρουσίας Mg^{2+} . Στο εσωτερικό απεικονίζεται η γραφική παράσταση *Lineweaver-Burk*.

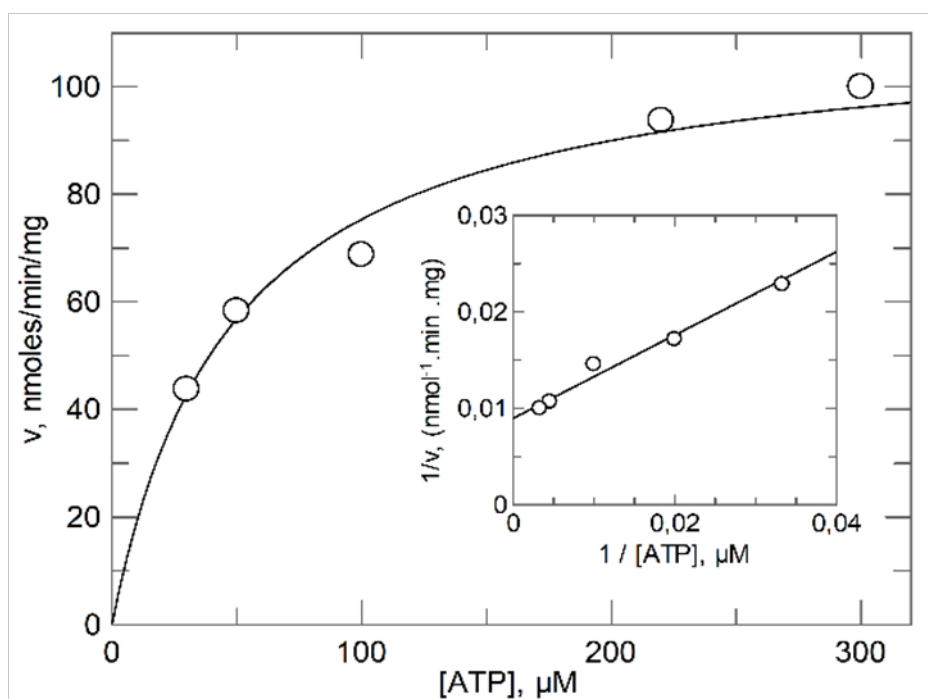
4.1.11.3. Κινητικές παράμετροι

Οι κινητικές παράμετροι, σταθερά *Michaelis-Menten* και V_{max} , μετρήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην Ενότητα 3.1.10.3. Αρχικά προσδιορίστηκαν για την *LjSK1* και στην πορεία, χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία, υπολογίστηκαν και για την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ καθώς και για τα

μεταλλάγματα *Ser9Ala*, *Arg178Ala*, *Tyr298Ala* και *Lys167Ala*. Μέσω σύγκρισης των τιμών αυτών είναι εύκολο να συμπεράνουμε το ρόλο που παίζουν στη λειτουργία της *LjSK1* τα συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα, καθώς και να υποθέσουμε τη λειτουργία της εκτεταμένης αμινοξικής περιοχής στο *N*-τελικό άκρο της πρωτεΐνης η οποία απουσιάζει από την ανθρώπινη *GSK3β*.

4.1.11.3.1. Κινητικές παράμετροι *LjSK1*

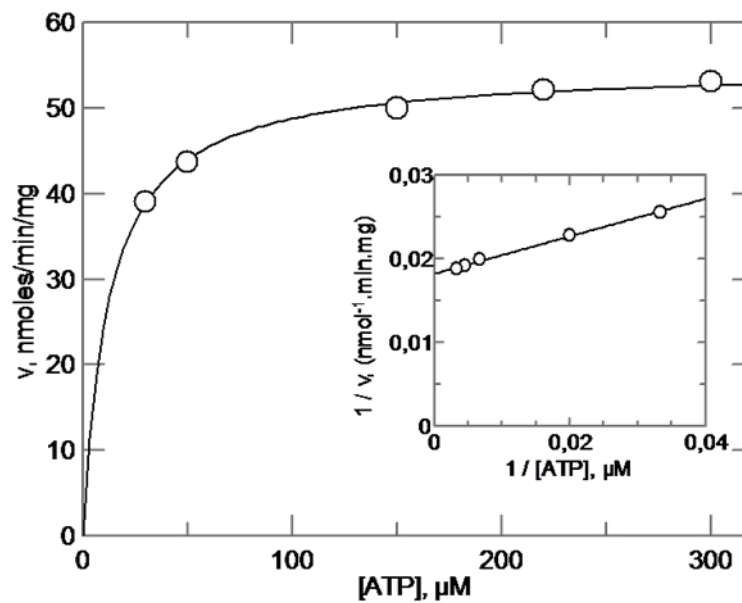
Μέσω της διεξαγωγής του πρωτοκόλλου χημειοφωταύγειας και ύστερα από ανάλυση των αποτελεσμάτων με το ειδικό πρόγραμμα *GRAFIT* [253] προσδιορίστηκε ότι η *LjSK1* ακολουθεί κινητική *Michaelis-Menten*. Η σταθερά *Michaelis-Menten* (K_m), υπολογίστηκε ίση με $48.2 \pm 7.8 \mu M$ ως προς *ATP* ενώ η V_{max} ίση με $111.6 \pm 7.1 \text{ nmoles/min/mg}$ [Εικόνα 55.].



Εικόνα 55. Η ενζυμική δραστικότητα της *LjSK1*. Το ένθετο απεικονίζει τη γραφική παράσταση *Lineweaver-Burk*.

4.1.11.3.2. Κινητικές παράμετροι *LjSK1*₉₀₋₄₆₇

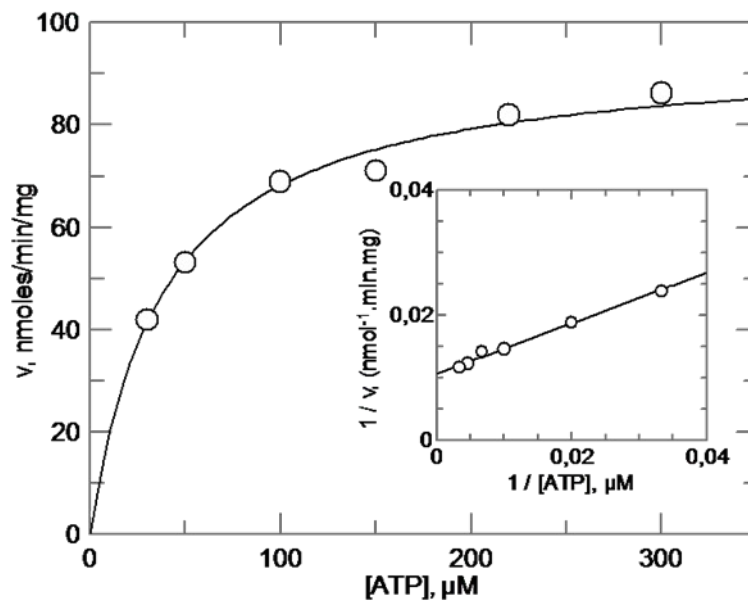
Για την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, η K_m προσδιορίστηκε σε $12.3 \pm 0.6 \mu M$ ως προς *ATP* ενώ η V_{max} ίση με $54.8 \pm 0.4 \text{ nmoles/min/mg}$ [Εικόνα 56].



Εικόνα 56. Η ενζυμική δραστηριότητα της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇. Το ένθετο απεικονίζει τη γραφική παράσταση *Lineweaver-Burk*.

4.1.11.3.3. Κινητικές παράμετροι *LjSK1 Ser9Ala*

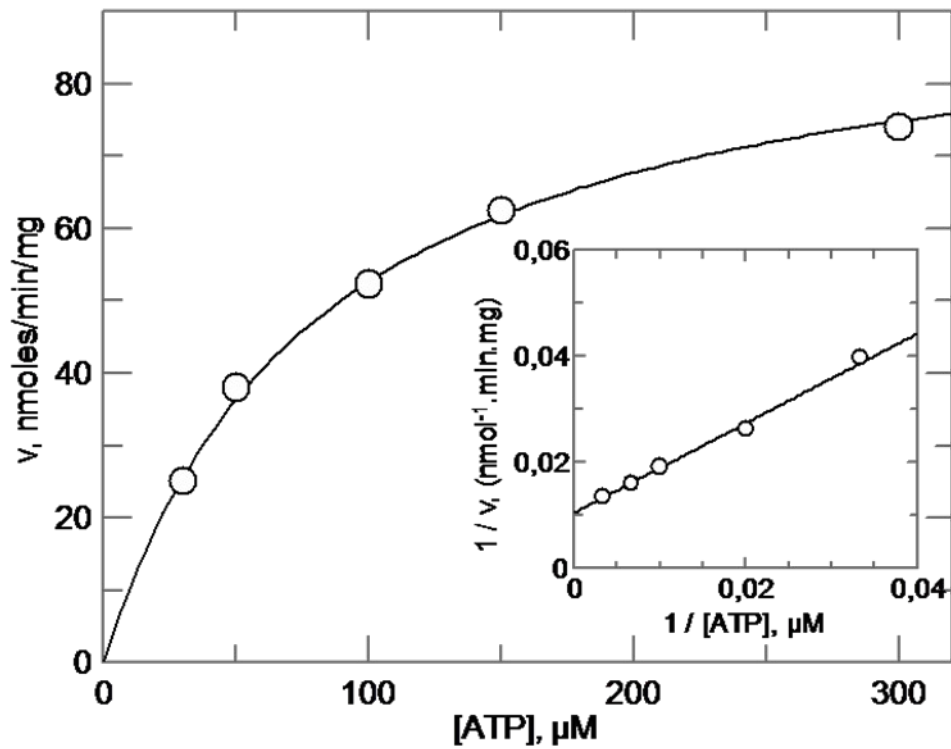
Για το μετάλλαγμα *LjSK1 Ser9Ala*, η K_m υπολογίστηκε ίση με $38.2 \pm 3.4 \mu M$ ως προς *ATP* ενώ η V_{max} ίση με $94.4 \pm 2.8 \text{ nmoles/min/mg}$ [Εικόνα 57.].



Εικόνα 57. Η ενζυμική δραστηριότητα του μεταλλάγματος *LjSK1 Ser9Ala*. Το ένθετο απεικονίζει τη γραφική παράσταση *Lineweaver-Burk*.

4.1.11.3.4. Κινητικές παράμετροι *LjSK1 Arg178Ala*

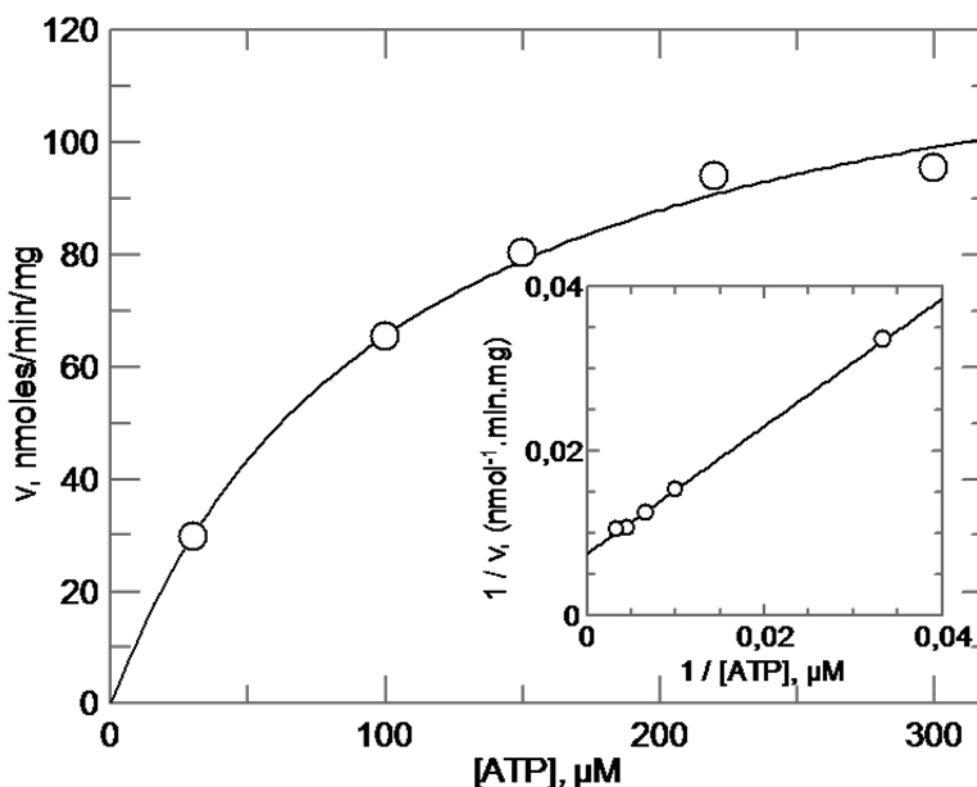
Για το μετάλλαγμα *LjSK1 Arg178Ala*, η K_m προσδιορίστηκε σε $80.3 \pm 6.0 \mu M$ ως προς ATP ενώ η V_{max} ίση με $95.0 \pm 3.6 \text{ nmoles/min/mg}$ [Εικόνα 58.].



Εικόνα 58. Η ενζυμική δραστηριότητα του μεταλλάγματος *LjSK1 Arg187Ala*. Το ένθετο απεικονίζει τη γραφική παράσταση *Lineweaver-Burk*.

4.1.11.3.5. Κινητικές παράμετροι *LjSK1 Tyr298Ala*

Για το μεταλλάγμα *LjSK1 Tyr298Ala*, η K_m προσδιορίστηκε σε $103.0 \pm 8.0 \mu M$ ως προς ATP ενώ η V_{max} ίση με $133.2 \pm 5.0 \text{ nmoles/min/mg}$ [Εικόνα 59.].



Εικόνα 59. Η ενζυμική δραστηριότητα του μεταλλάγματος *LjSK1 Tyr298Ala*. Το ένθετο απεικονίζει τη γραφική παράσταση Lineweaver-Burk.

4.1.11.3.6. Κινητικές παράμετροι *LjSK1 Lys167Ala*

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έγινε με σκοπό να εξακριβωθεί εάν η *Lys167* αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της *LjSK1*. Η επιλογή βασίστηκε στη σύγκριση των πρωτοταγών δομών της *LjSK1* και της ανθρώπινης *GSK3 β* (Ενότητα 4.1.4./ Εικόνα 38) όπου παρατηρήθηκε ότι είναι συντηρημένο. Πιο ειδικά, αντιστοιχεί στη *Lys85* της ανθρώπινης *GSK3 β* που αποτελεί κατάλοιπο του καταλυτικού της κέντρου [28].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ώστε να προσδιορισθούν οι κινητικές παράμετροι της συγκεκριμένης μετάλλαξης ήταν ίδια με όλα τα προηγούμενα

μεταλλάγματα. Το αποτέλεσμα όμως ήταν η *LjSK1 Lys167Ala* να μην παρουσιάσει καμία δραστικότητα. Η *ATP* που είχε προστεθεί στην αντίδραση δεν καταναλώθηκε και οι τιμές χημειοφωταύγειας που παρατηρήθηκαν ήταν αντίστοιχες του *control*. Συνεπώς, η *Lys167*, αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της *LjSK1* καθώς η δραστικότητα του ενζύμου μηδενίζεται κατά την απουσία του. Το αποτέλεσμα συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες που είχαν πραγματοποιηθεί στην *AtSK32* του *Arabidopsis thaliana* [143], υποστηρίζοντας περαιτέρω την υπόθεση ότι η συγκεκριμένη λυσίνη, η οποία παραμένει συντηρημένη ανάμεσα στα είδη, αποτελεί κρίσιμο κατάλοιπο για την καταλυτική λειτουργία των ενζύμων.

4.1.11.3.7. Σύγκριση κινητικών παραμέτρων

Μέσω της σύγκρισης των κινητικών παραμέτρων της *LjSK1* με την περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* αλλά και με τα μεταλλάγματα *Ser9Ala*, *Arg178Ala*, *Tyr298Ala* και *Lys167Ala*, είναι εύκολο πλέον να συμπεράνουμε το ρόλο που παίζουν τα κατάλοιπα αυτά και το *N*-τελικό άκρο της πρωτεΐνης στη λειτουργία της. Η σύγκριση βασίζεται στην καταλυτική ικανότητα (V_{max}/K_m) που παρουσιάζει κάθε ενζυμική μορφή και παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Κινητικές παράμετροι της *LjSK1*, των μεταλλαγμάτων της και της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇*.

Πρωτεΐνη	K_m ως προς <i>ATP</i> (μM)	V_{max} (<i>nmoles/min/mg</i>)	V_{max}/K_m
<i>LjSK1</i>	48.2 ± 7.8	111.6 ± 7.1	2.3 ± 0.2
<i>LjSK1₉₀₋₄₆₇</i>	12.3 ± 0.6	54.8 ± 0.4	4.5 ± 0.1
<i>LjSK1 Ser9Ala</i>	38.2 ± 3.4	94.4 ± 2.8	2.5 ± 0.2
<i>LjSK1 Arg178Ala</i>	80.3 ± 6.0	95.0 ± 3.6	1.2 ± 0.1
<i>LjSK1 Tyr298Ala</i>	103.0 ± 8.0	133.2 ± 5.0	1.3 ± 0.1
<i>LjSK1 Lys167Ala</i>	Καμία δραστικότητα		

Τα αποτελέσματα που αναγράφονται στον Πίνακα 5 μπορούν να οδηγήσουν στα εξής συμπεράσματα:

LjSK1 Ser9Ala: παρατηρώντας την καταλυτική ικανότητα (V_{max}/K_m), βλέπουμε ότι η μετάλλαξη του συγκεκριμένου καταλοίπου δεν επιφέρει καμία αλλαγή στην ενζυμική δραστηριότητα και συνεπώς δεν φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ρόλο στη δραστηριότητα της *LjSK1*. Αποτέλεσμα που συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η *Ser9* δεν συντηρείται σε όλες τις *GSK3* που προέρχονται από φυτά [118].

LjSK1 Tyr298Ala: για την *Tyr298*, παρατηρούμε ότι η μετάλλαξή της σε *Ala* οδηγεί σε μείωση κατά 50% της καταλυτικής ικανότητας, υποδεικνύοντας ότι η φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου καταλοίπου σχετίζεται με την ενεργοποίηση του ενζύμου. Ο τρόπος όμως που επιδρά στην ενεργοποίηση διαφέρει αρκετά από αυτόν στις *GSK3* των θηλαστικών. Γνωρίζουμε ότι η αυτο-φωσφορυλίωση του βρόχου ενεργοποίησης, αποτελεί συντηρημένο χαρακτηριστικό των κινασών που έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη, βελτιώνοντας την καταλυτική απόδοση αυξάνοντας την *kcat* και μειώνοντας την *Km* [275], γεγονός που δεν συμβαίνει στην *LjSK1* καθώς μειώνει μόνο την *Km* και δεν επηρεάζει την *kcat*. Ένδειξη που μπορεί να ερμηνευθεί ως το ότι οι *GSK3* των φυτών έχουν διαφοροποιηθεί κατά τη διάρκεια του εξελικτικού χρόνου.

LjSK1 Arg178Ala: η μετάλλαξη της *Arg178* σε *Ala* οδήγησε και αυτή σε μείωση κατά 50% της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι, αν και το συγκεκριμένο κατάλοιπο προσδίδει σημαντικά ως προς την εξειδίκευση που παρουσιάζει η *LjSK1* για προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα, δεν κατέχει τον καθοριστικό ρόλο ως προς την εξειδίκευση αυτή όπως συμβαίνει στην ανθρώπινη *GSK3β*. Στην ανθρώπινη *GSK3β*, η *Arg96*, αντίστοιχη της *Arg178* της *LjSK1*, αλληλεπιδρά τόσο με τα προ-φωσφορυλιωμένα υποστρώματα όσο και με το κατάλοιπο της *Ser9* στο *N*-τελικό άκρο της πρωτεΐνης που αυτό-αναστέλλει το ένζυμο [27], καταλαμβάνοντας τη θέση πρόσδεσης των υποστρωμάτων αυτών. Ενώ αυτή η θέση πρόσδεσης φαίνεται να αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την περαιτέρω φωσφορυλίωση των προ-φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων στην *GSK3β*, για την *LjSK1* φαίνεται ότι δεν αποτελεί προαπαιτούμενο. Παρόλα αυτά, η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του συγκεκριμένου μεταλλάγματος,

υποδεικνύει ότι η θέση δέσμευσης των φωσφορικών παραμένει συντηρημένη ανάμεσα σε φυτά και θηλαστικά.

***LjSK1*⁹⁰⁻⁴⁶⁷**: αυτό που παρατηρούμε στην καταλυτική ικανότητα της περικεκομμένης *LjSK1*, είναι ότι σχεδόν έχει διπλασιαστεί. Αυτή η ενισχυμένη ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να υποδηλώνει συμμετοχή του *N*-τελικού άκρου στην αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που δεν έχουν ακόμα αναγνωριστεί. Ουσιαστικά, εξυπηρετεί την υπόθεση ότι μπορεί να υπάρχει ένας πρόσθετος ρυθμιστικός μηχανισμός, διαφορετικός από άλλες κινάσες που ομοιάζουν με την *GSK3β*, και εκδηλώνεται ύστερα από την πρωτεολυτική διάσπαση αυτών των επιπλέον 89 αμινοξικών καταλοίπων που βρίσκονται στο *N*-άκρο και παρουσιάζονται ως περιοχή με μειωμένα δομικά χαρακτηριστικά.

Η ερμηνεία αυτή βασίζεται και σε προηγούμενες μελέτες κατά τις οποίες έχει αποδειχθεί ότι η δραστηριότητα της *GSK3* μπορεί να ενισχυθεί με πρωτεολυτική διάσπαση του αμινο-τελικού ή του καρβοξυ-τελικού άκρου [74, 276]. Αυτή η ενίσχυση μπορεί να οφείλεται είτε στην εξάλειψη των ανασταλτικών επιδράσεων των *Ser9/Ser21* που η φωσφορυλίωση τους οδηγεί σε αυτό-αναστολή του ενζύμου [277], είτε στη γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη εξαγωγή από τον πυρήνα [278], είτε και στην απώλεια αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες [279]. Έχει αποδειχθεί άλλωστε ότι περικεκομμένες μορφές πρωτεϊνών μπορούν να παραχθούν από τη μεταλλοπρωτεάση *MMP-2* [280] ή και την καλπαΐνη [74]. Η *LjSK1* όμως δεν διαθέτει το μηχανισμό αυτό-αναστολής της *Ser9*, ούτε και περιέχει τα απαραίτητα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία αποτελούν τις θέσεις διάσπασης των φυτικών καλπαϊνών [75] και άρα υποθέτουμε ότι η διάσπαση του *N*-τελικού άκρου οφείλεται σε κάποια άλλη πρωτεάση του φυτού.

4.1.11.4. *IC*₅₀

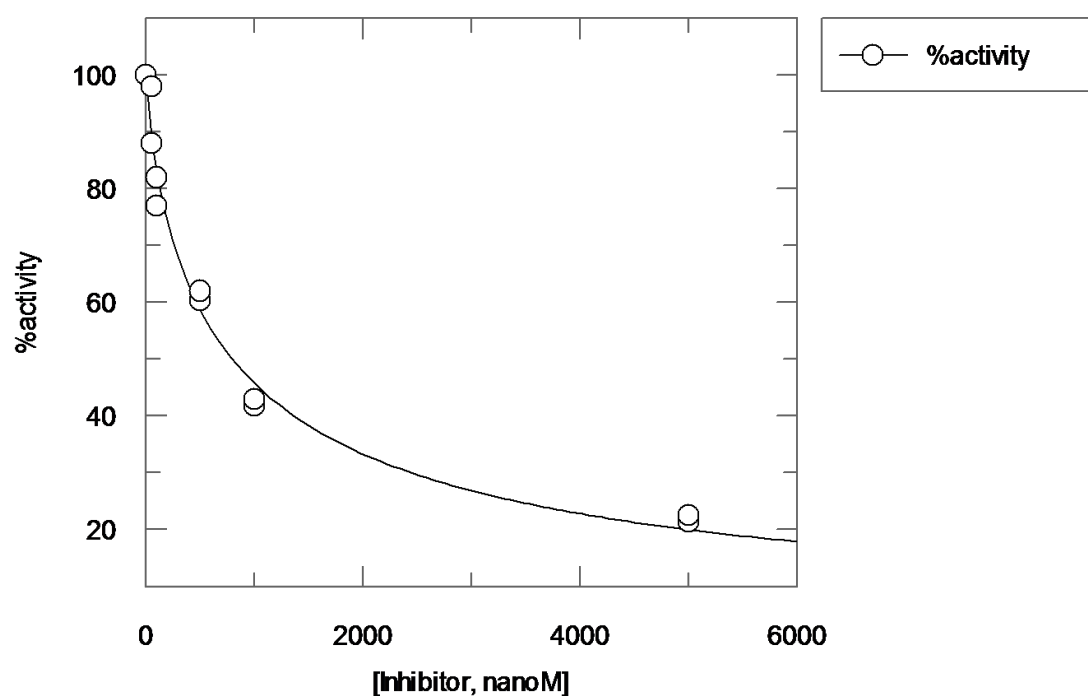
Στην ενότητα 3.1.10.4. αναφέρεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση τριών τερπενοειδών, *Lureol*,

Betulinic acid και *Hederacoside C*, στη δραστικότητα της *LjSK1* και της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τερπενοειδών που απαιτείται για να ανασταλεί 50% η ενζυμική δραστικότητα (IC_{50}) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *GRAFIT*.

Ένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίσαμε αρχικά ήταν ότι τόσο η *Lupeol* όσο και το *Betulinic acid* και το *Hederacoside C* χαρακτηρίζονται από μειωμένη διαλυτότητα και έπρεπε να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης ώστε να έχουμε τη μέγιστη απόδοση κατά την διαλυτοποίηση. Δοκιμάστηκε αρχικά η αιθανόλη ως διαλύτης, μιας και οι δύο ουσίες διαλυτοποιούνταν παρουσία της αλλά μελέτες που έγιναν στην *LjSK1* ώστε να προσδιοριστεί η IC_{50} ως προς αυτήν, έδειξαν ότι δεν μπορεί τελικά να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης καθώς αναστέλλει και η ίδια το ένζυμο σε πολύ μικρή συγκέντρωση (η IC_{50} βρέθηκε ίση με $2.84 \pm 0.16 \mu M$). Η αμέσως επόμενη λύση ήταν η χρήση του *Dimethyl Sulfoxide (DMSO)*, που αποτελεί αποτελεσματικό διαλύτη για ευρύ φάσμα οργανικών ουσιών και χρησιμοποιείται συχνά για να εξασφαλίσει τη διαλυτοποίηση αναστολέων σε κινητικές μελέτες. Αυτό που παρατηρήθηκε κατά τη χρήση του *DMSO* ήταν ότι ναι μεν η διαλυτοποίηση βελτιωνόταν αλλά δεν κατάφερνε να φτάσει σε υψηλές συγκεντρώσεις. Για το λόγο αυτό, πριν από κάθε χρήση του ανάλογου αναστολέα, πραγματοποιούνταν ενίσχυση της διαλυτότητας για 2 min με συσκευή υπερήχων, βοηθώντας κατά αυτόν τον τρόπο τον λεπτό διαμερισμό. Τα αποτελέσματα των κινητικών μελετών για τον προσδιορισμό της IC_{50} των *Lupeol*, *Betulinic acid* και *Hederacoside C* παρουσιάζονται στη συνέχεια.

4.1.11.4.1. IC_{50} *Lupeol* για την *LjSK1*

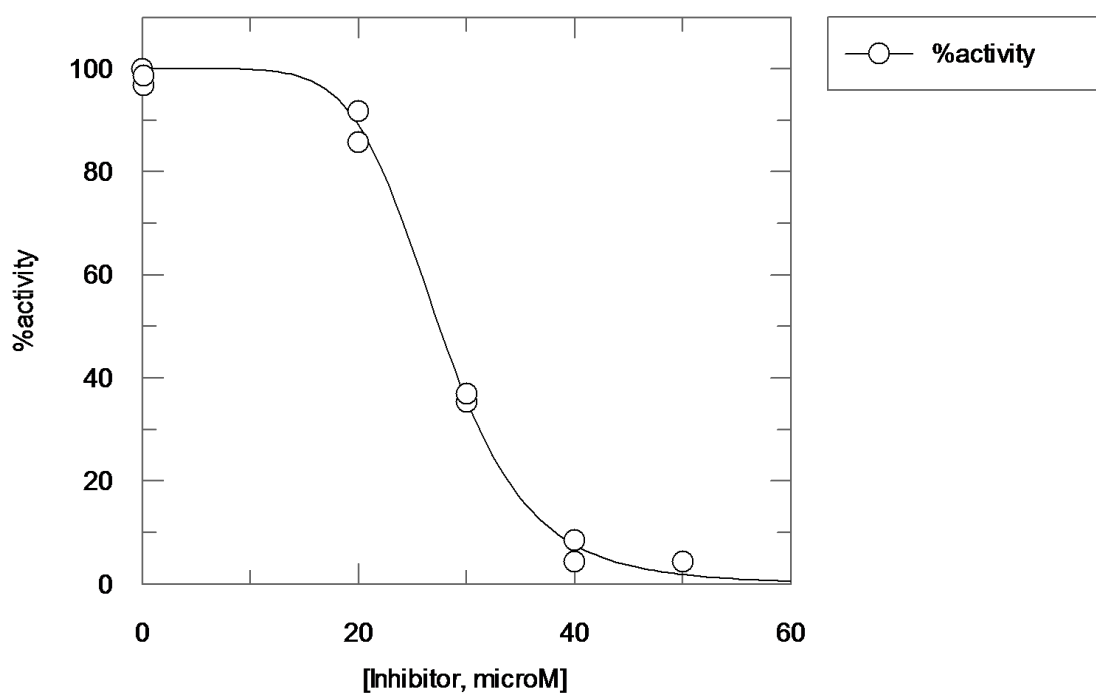
Η IC_{50} της *Lupeol* μετρήθηκε σε $796,9 \pm 73,0$ nM [Εικόνα 60.]. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η *Lupeol* αποτελεί έναν πολύ ισχυρό αναστολέα της *LjSK1*, εφόσον ποσότητες κάτω του 1 μM είναι ικανές να αναστείλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου.



Εικόνα 60. Γράφημα της αναστολής της *LjSK1* από το τριτερπένιο *Lupeol*.

4.1.11.4.2. IC₅₀ Betulinic acid για την LjSK1

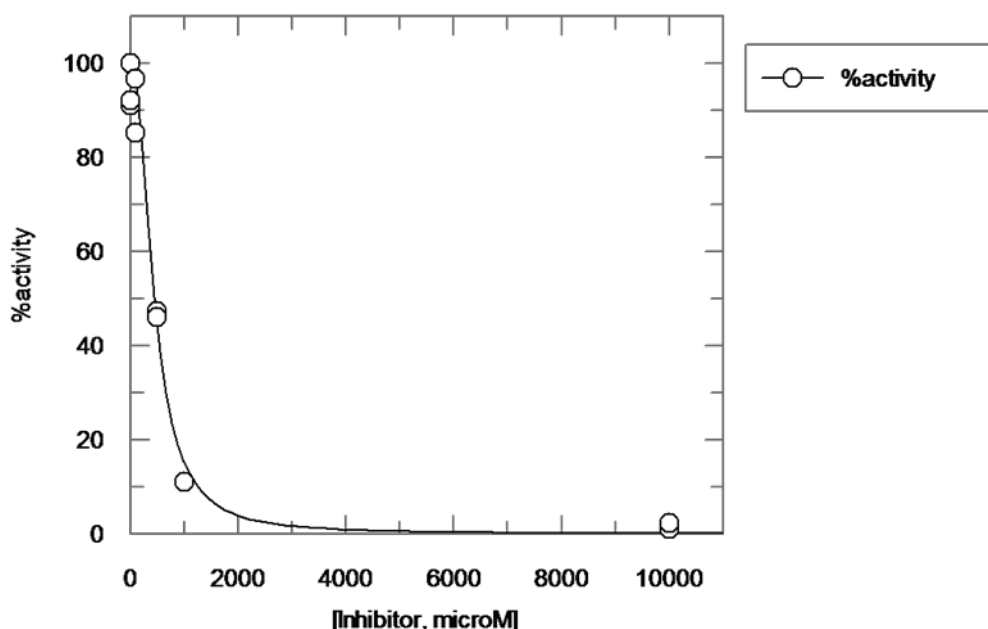
Η IC₅₀ του Betulinic acid προσδιορίστηκε σε $27,44 \pm 0,29 \mu M$ [Εικόνα 661.]. Το αποτέλεσμα αυτό αποκαλύπτει πως και το *Betulinic acid* είναι ισχυρός αναστολέας, όχι όμως τόσο ισχυρός όπως η *Lupeol* της οποίας η σταθερά IC₅₀ είναι μία τάξη μεγέθους μικρότερη.



Εικόνα 61. Γράφημα της αναστολής της LjSK1 από το τριτερπένιο *Betulinic acid*.

4.1.11.4.3. IC_{50} Hederacoside C για την LjSK1

Η IC_{50} του *Hederacoside C* προσδιορίστηκε σε $442,9 \pm 35,1$ nM [Εικόνα 62]. Συνεπώς το *Hederacoside C* αποτελεί έναν πολύ ισχυρό αναστολέα, ο οποίος είναι ο πλέον ισχυρότερος και από τις τρεις ενώσεις που μελετήθηκαν.



Εικόνα 62. Γράφημα αναστολής της *LjSK1* από το τριτερπένιο *Hederacoside C*

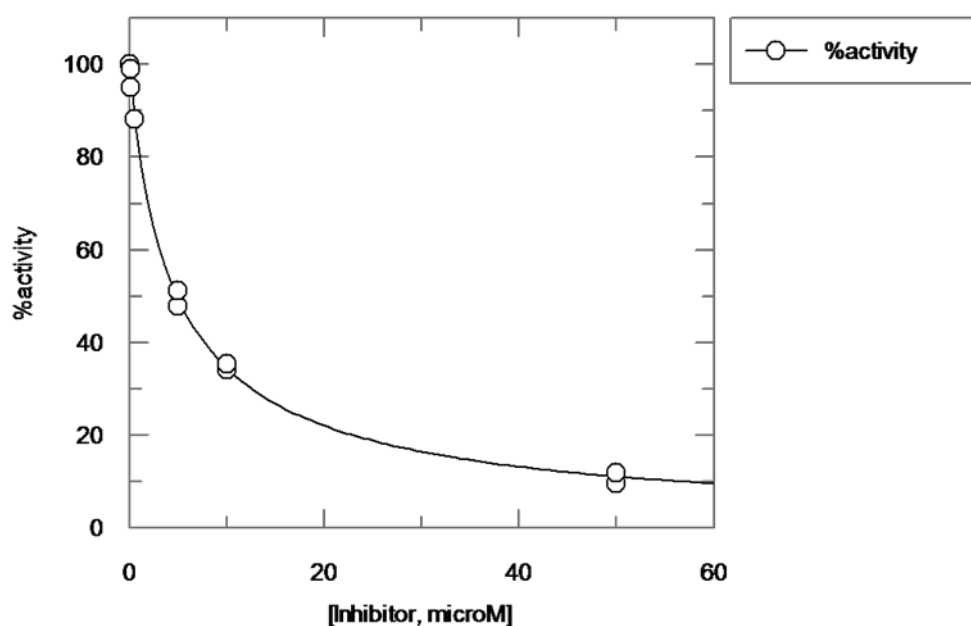
4.1.11.4.4. % δραστικότητα της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ με *Lupeol*

Στην προσπάθεια να προσδιοριστεί η IC_{50} της *Lupeol* για την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, αντιμετωπίσαμε αρκετά προβλήματα ως προς τη διαλυτότητα της ένωσης. Ενώ συγκεντρώσεις μέχρι 0.5 μM παρατηρούνταν μείωση της δραστικότητας, όταν γινόταν προσπάθεια για αύξηση της συγκέντρωσης του αναστολέα τότε δεν παρατηρούνταν ανάλογη μεταβολή στην ενζυμική δραστικότητα. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς οφείλεται πως στις πειραματικές συνθήκες η μέγιστη διαλυτότητα της *Lupeol* είναι η 0.5 μM . Έτσι, μιας και δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί η IC_{50} της *Lupeol* για την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ μετρήθηκε η % δραστικότητα του ενζύμου παρουσία 0.5 μM *Lupeol*. Ο προσδιορισμός έγινε με δέκα διαφορετικές επαναλήψεις και η μέση τιμή της δραστικότητας, της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ παρουσία *Lupeol* 0.5

μM βρέθηκε ίση με 67.4 % που σημαίνει πως 0.5 μM Lureol προκαλούν 32,6% αναστολή της δραστηριότητας, της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇.

4.1.11.4.5. IC_{50} Betulinic acid για την *LjSK1*₉₀₋₄₆₇

Η IC_{50} του *Betulinic acid* για την *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ προσδιορίστηκε σε $4,89 \pm 0,15 \mu\text{M}$ [Εικόνα 63.]. Η μείωση της IC_{50} σχεδόν κατά 6 φορές σε σχέση με αυτήν για την *LjSK1* υποδεικνύει ότι η απομάκρυνση των 89 αμινοξέων από το *N*-τελικό άκρο του ενζύμου οδηγεί σε μία διαμόρφωση στην οποία το *Betulinic acid* είναι πιο εύκολο να προσδεθεί.



Εικόνα 63. Γράφημα της αναστολής της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ από το τριτερπένιο *Betulinic acid*.

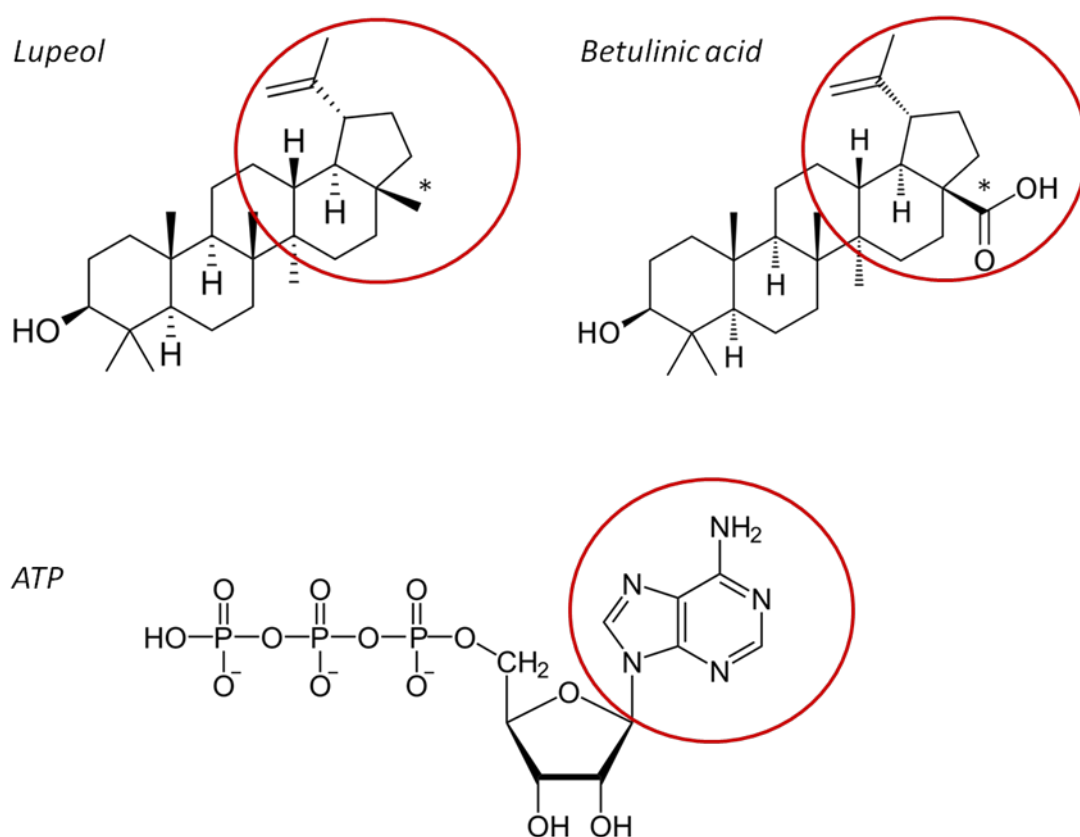
4.1.11.4.6. Ερμηνεία των αποτελεσμάτων IC_{50}

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία συναντάμε πληθώρα άρθρων που αφορούν την ανθρώπινη *GSK3β* και κυρίως την κρυσταλλική της δομή σε σύμπλοκο με διάφορους αναστολείς. Το κοινό που υπάρχει μεταξύ αυτών των δομών και των ενώσεων είναι ότι η ανασταλτική τους επίδραση οφείλεται τις περισσότερες φορές σε αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται από τα άτομα της ένωσης με συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Όπως είναι αναμενόμενο αυτά τα αμινοξικά κατάλοιπα βρίσκονται στο σημείο ένωσης του *N* και *C* λοβού και απαρτίζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου στο οποίο βρίσκεται και η θέση πρόσδεσης της *ATP* η οποία περιβάλλεται από μία υδρόφοβη περιοχή. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται, επιτρέπουν στην *ATP* να διατηρηθεί στο εσωτερικό της θέσης αυτής, με την πουρινική βάση να αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα *Asp133* και *Val135* και τη ριβόζη να σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο του *Glu185* [281]. Ταυτόχρονα το υπόστρωμα προσδένεται στην άκρη αυτής της υδροφοβικής περιοχής όπου συγκρατείται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις [282].

Η αναστολή συνήθως βασίζεται στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των ενώσεων με τα αμινοξικά κατάλοιπα που αναφέραμε προηγουμένως. Οι ενώσεις αυτές, κατά κύριο λόγο, φέρουν δακτυλίους οι οποίοι μπορούν και μιμούνται την πουρινική βάση της *ATP* με αποτέλεσμα να προσδένονται στην ειδική θέση αποτρέποντας έτσι τα μόρια *ATP* να προσδεθούν. Μερικά από τα πολλά παραδείγματα που υπάρχουν είναι η αναστολή της ανθρώπινης *GSK3β* από την ένωση *1H-Indazole-3-carboxamide*, της οποίας τα δομικά δεδομένα απέδειξαν τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξικά κατάλοιπα *Asp133* και *Val135* [283]. Όπως επίσης και η αναστολή που επιτυγχάνεται από την ένωση *BRD3937* η οποία βρίσκεται αγκιστρωμένη στην ένωση των λοβών και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα ίδια πάλι αμινοξικά κατάλοιπα [284].

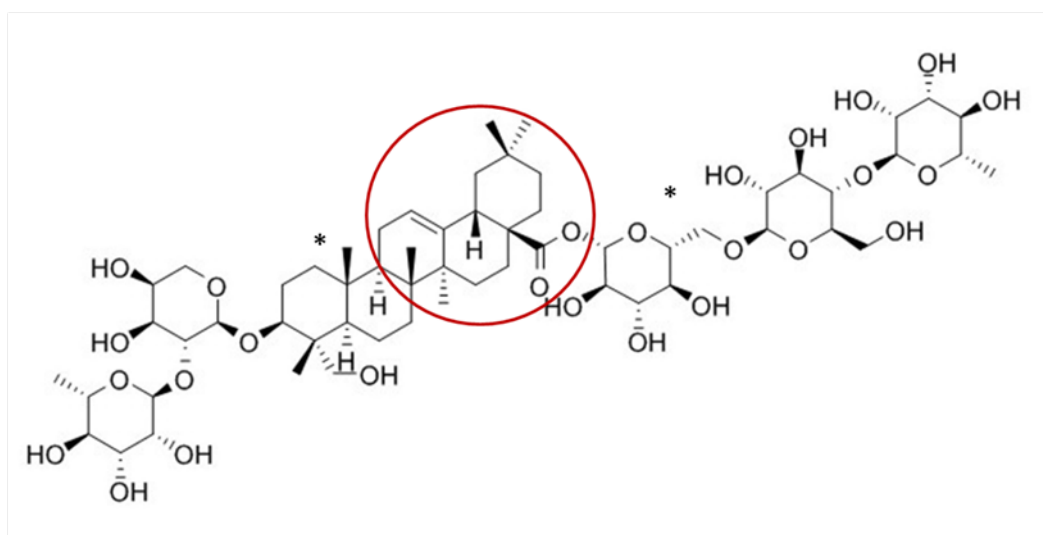
Θεωρούμε λοιπόν ότι και η αναστολή που επιτυγχάνεται στην *LjSK1* αλλά και στην περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* από τα τριτερπένια *Lupeol*, *Betulinic acid* και *Hederacoside C*, οφείλεται στο γεγονός ότι και οι τρεις ενώσεις αποτελούνται από πολλαπλούς δακτυλίους, που θα μπορούσαν να μιμηθούν την πουρινική ομάδα της *ATP* [Εικόνα

64.] και συνεπώς να αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα αμινοξέα της θέσης πρόσδεσης της *ATP* στην *LjSK1*. Παρατηρώντας τις χημικές δομές τους, είναι εμφανές ότι οι ενώσεις *Lupeol* και *Betulinic acid* είναι σχεδόν πανομοιότυπες. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στην αντικατάσταση μιας μεθυλομάδας που συναντάμε στο τριτερπένιο *Lupeol* από μία καρβοξυλική ομάδα στο *Betulinic acid* [Εικόνα 64.]. Αυτή η παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας θα μπορούσε να εξηγεί την μικρότερη αναστολή που παρατηρούμε από το *Betulinic acid*, καθώς είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με άλλα αμινοξέα εκτός της θέσης πρόσδεσης της *ATP* εμποδίζοντας έτσι την απόλυτη ενσωμάτωση της ένωσης μέσα στην υδρόφοβη περιοχή.



Εικόνα 64. Σύγκριση των χημικών δομών των τριτερπενίων *Lupeol* και *Betulinic acid* με την *ATP*. Με κόκκινο κύκλο επισημαίνεται η πουρινική ομάδα της *ATP* και οι αντίστοιχες ομάδες των ενώσεων που θα μπορούσαν να τη μιμηθούν. Με αστερίσκο επισημαίνεται η μοναδική διαφορά μεταξύ των δύο τριτερπενίων.

Αντίστοιχα μπορούμε να υποθέσουμε ότι και το τριτερπένιο *Hederacoside C* διαθέτει αρκετούς δακτυλίους που μπορούν να μιμηθούν την πουρινική ομάδα της *ATP*. Από τις τρεις ενώσεις, επιτυγχάνει την ισχυρότερη αναστολή και αυτό πιθανώς να οφείλεται στο μέγεθος του, το οποίο είναι κατά πολύ μεγαλύτερο ενώ ταυτόχρονα διαθέτει πολλαπλές ομάδες που θα μπορούσαν να το καθιστούν ικανό να αλληλεπιδρά και με άλλες περιοχές πέρα από το ενεργό κέντρο. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ναι μεν διαθέτει τον κατάλληλο δακτύλιο που θα του επιτρέψει να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα της θέσης πρόσδεσης της *ATP*, αλλά παράλληλα διαθέτει πλευρικές αλυσίδες ικανές να αλληλεπιδράσουν ακόμη και με το σημείο πρόσδεσης των υποστρωμάτων στην άκρη της υδροφοβικής περιοχής [Εικόνα 65.], αποτρέποντας έτσι την σύνδεση με το υπόστρωμα.



Εικόνα 65. Η χημική δομή του τριτερπενίου *Hederacoside C*. Στον κόκκινο κύκλο επισημαίνονται οι ομάδες που θα μπορούσαν να μιμηθούν την πουρινική βάση της *ATP*, ενώ με αστερίσκο τονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες που πιθανώς αλληλεπιδρούν με το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος.

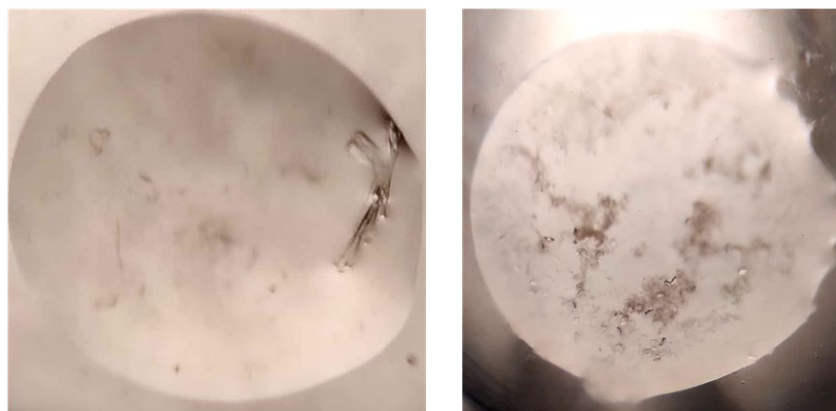
Όσον αφορά την αύξηση της αναστολής που παρατηρείται με την εφαρμογή *Betulinic acid* στην περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, μπορεί να δικαιολογηθεί με το γεγονός ότι 89 αμινοξέα από το *N*-τελικό άκρο της πρωτεΐνης έχουν αφαιρεθεί, καθιστώντας έτσι το σημείο ένωσης των *N* και *C* λοβών πιο προσπελάσιμο. Η

υδρόφοβη περιοχή που συγκρατεί στο εσωτερικό την περιοχή πρόσδεσης της *ATP* είναι περισσότερο εκτεθειμένη επιτρέποντας έτσι τον σχηματισμό επιπλέον αλληλεπιδράσεων που προηγουμένως αποτρέπονταν λόγω της παρουσίας αυτών των 89 αμινοξέων.

4.1.12. Κρυσταλλογραφία

4.1.12.1. Ανάπτυξη κρυστάλλων

Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων πραγματοποιήθηκαν τόσο για την *LjSK1* όσο και για την περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, όπως αναφέρεται και αναλυτικά στην Ενότητα 3.1.13.1. Εν τούτοις μόνο για την περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* επετεύχθη η ανάπτυξη κρυστάλλων με τη χρήση της εμπορικής συλλογής διαλυμάτων πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης *Morpheus I*. Η τελική συνθήκη κρυστάλλωσης είχε σύσταση 0.09 M *NPS* (0.3 M *NaNO₃*, 0.3 M *Na₂HPO₄*, (*NH₄*)₂*SO₄*), 0.1 M *Buffer System 1* (*Imidazole*, *MES*), pH 6.5 και 30% (v/v) *Precipitant mix 1* (40% (v/v) *PEG 500 MME* και 20% (v/v) *PEG 20000*), ενώ η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν στα 2.8 mg/mL. Για την παραγωγή των κρυστάλλων επιλέχθηκε η μέθοδος sitting drop και μετά το πέρας περίπου 3 εβδομάδων εμφανίστηκαν μικροί κρύσταλλοι σε ορθογώνιο και τετράγωνο/ρομβοειδές σχήμα [Εικόνα 66.].



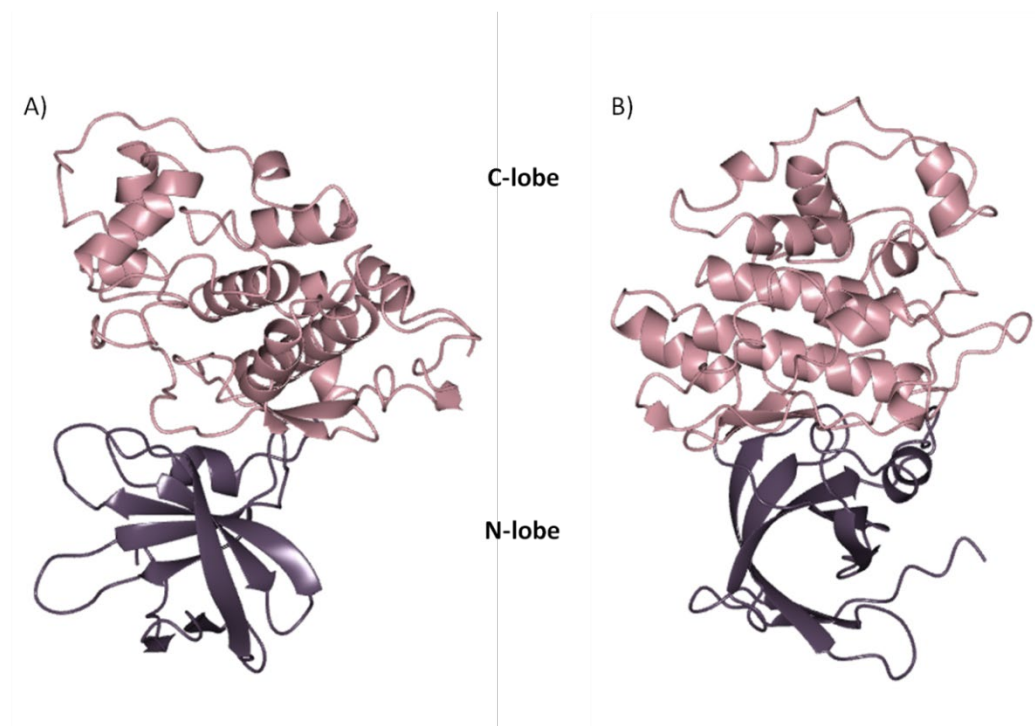
Εικόνα 66. Κρύσταλλοι της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, στη συνθήκη C1 από το *Morpheus I*. Στην πλειοψηφία τους εμφάνιζαν τετράγωνο/ρομβοειδές σχήμα.

4.1.12.2. Επίλυση κρυσταλλικής δομής *LjSK1₉₀₋₄₆₇*

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έγινε με τη χρήση συγχροτρονικής ακτινοβολίας στον σταθμό *MX27890-2*, ακτίνα *I24* στο *Diamond Light Source* της Οξφόρδης. Ως καινούργια τρισδιάστατη δομή, χρησιμοποιήθηκε αρχικά η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης με το ειδικό λογισμικό *MrBUMP* [259], το οποίο πρότεινε ως μοντέλο, για την επίλυση, την κατατεθειμένη στην παγκόσμια τράπεζα πρωτεϊνικών δομών (*RCSB PDB*) [285] πρωτεϊνική δομή του διαδικού συμπλόκου της ανθρώπινης κινάσης Ταυ με την *AMPPNP (1J1B)* [286]. Η κρυσταλλική δομή της *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, επιλύθηκε σε ευκρίνεια 2.90 Å (Πίνακας 6) [Εικόνα 67.].

Πίνακας 6. Στατιστικά δεδομένα συλλογής κρυσταλλογραφικών δεδομένων, επεξεργασίας και βελτιστοποίησης της *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

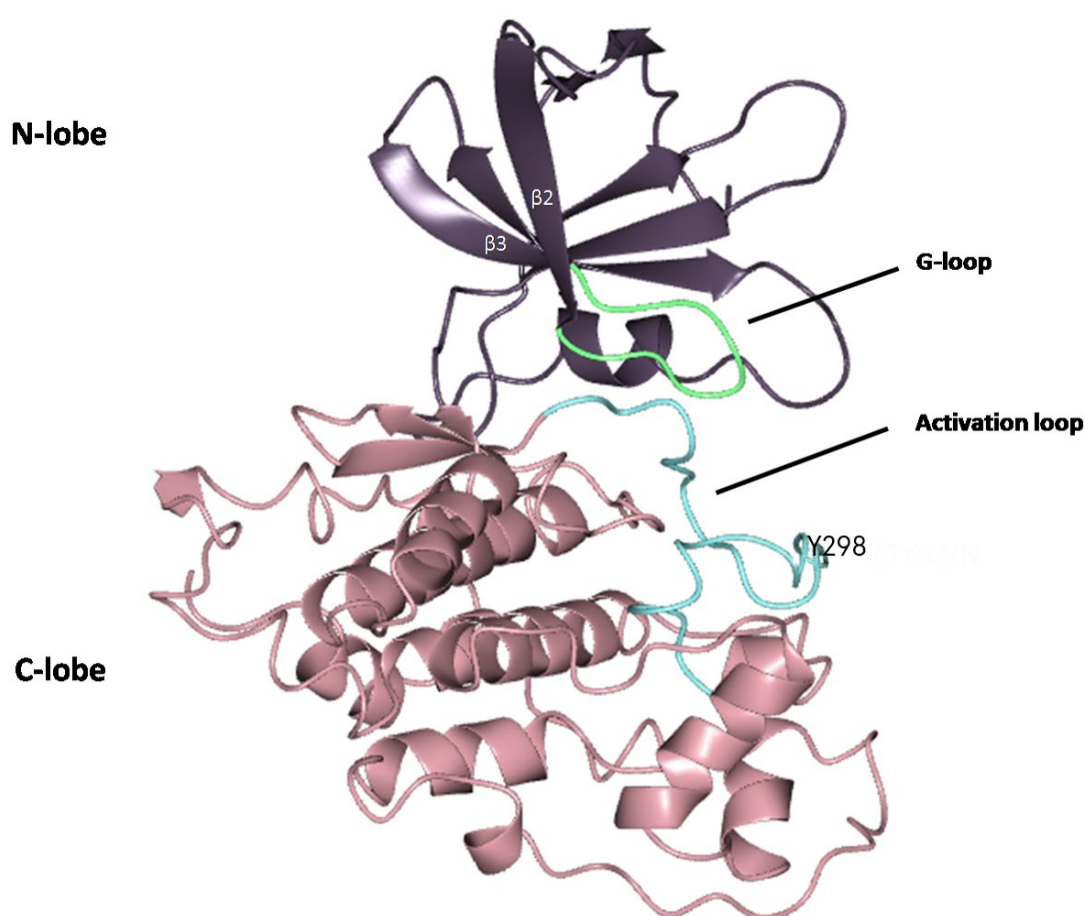
Σταθμός συγχροτρονικής ακτινοβολίας	<i>MX27890-2</i> , Ακτίνα <i>I24</i>
<i>Diamond Light Source, Oxford</i>	
Μήκος κύματος, λ (Å)	0.99
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	3.08-2.90
Ομάδα χώρου συμμετρίας	<i>P 21 21 21</i> ;
Διαστάσεις κυψελίδας (Å), <i>a,b,c</i>	55.32 69.32 99.64
Ευκρίνεια (Å)	43.24-2.90
Αριθμός ανακλάσεων	26087 (4110)
Μοναδικές ανακλάσεις	8837 (1395)
<i>R_{meas}</i>	0.249(1.075)
Πληρότητα (%)	99.3 (99.7)
<i><I/σI></i>	3.7 (1.4)
<i>CC1/2</i>	0.948 (0.359)
Εσωτερικοί δείκτες βελτιστοποίησης	
<i>Final R_{cryst} (R_{free}) %</i>	0.2457 (0.3232)
Απόκλιση <i>r.m.s.</i> από τις ιδεατές τιμές	
Μήκος δεσμών (Å)	0.011
Γωνίες (°)	1.561
Μέση τιμή παράγοντα θερμικής κίνησης (Å²)	
Άτομα πρωτεΐνης (αλυσίδα A & B)	26.9
Μόρια νερού	59.2
<i>Ramachandran plot</i>	Favored: 82.2% Allowed: 97,2% Outliers: 2.82%



Εικόνα 67. Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της περικεκομμένης *LjSK190-467*. Στο Α) είναι διακριτές οι β-πτυχώσεις που αποτελούν το Ν-λοβό. Στο Β) είναι ευδιάκριτες οι α-έλικες που αποτελούν το C-λοβό. Η διαμόρφωση αυτή συναντάται συχνά στις GSK3 κινάσες, καθώς το Ν-τελικό άκρο αποτελείται από αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα ενώ το C-τελικό άκρο αποτελείται κυρίως από α-έλικες.

Αυτό που παρατηρούμε από την τρισδιάστατη δομή, είναι ότι η περικεκομμένη *LjSK190-467* είναι ένα μονομερές το οποίο διατηρεί το συνηθισμένο μοτίβο που συναντάται στις GSK3 κινάσες [27]. Χαρακτηρίζεται δηλαδή, από αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα στο Ν-λοβό (κατάλοιπα 101-218) και κυρίως από α-έλικες στο C-λοβό (κατάλοιπα 219-464). Μεταξύ αυτών των δύο τμημάτων, βρίσκεται ο βρόχος ενεργοποίησης (*activation loop*) [Εικόνα 68] (κατάλοιπα 281-307) που αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών κινάσων, ενώ και το σημείο πρόσδεσης της ATP βρίσκεται εκεί ανάμεσα. Η συντήρηση των αμινοξικών καταλοίπων που συγκροτούν τα στοιχεία αυτά, είναι αυστηρή, με ελάχιστες αμελητέες παραλλαγές που δεν επηρεάζουν τη διαμόρφωση. Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου βρόχου οδηγεί είτε σε περιορισμό της πρόσβασης του υποστρώματος είτε στην ελεύθερη κίνηση του μέσα και έξω από την ενεργό θέση, διαμορφώνοντας έτσι τις κατάλληλες συνθήκες κατάλυσης [282].

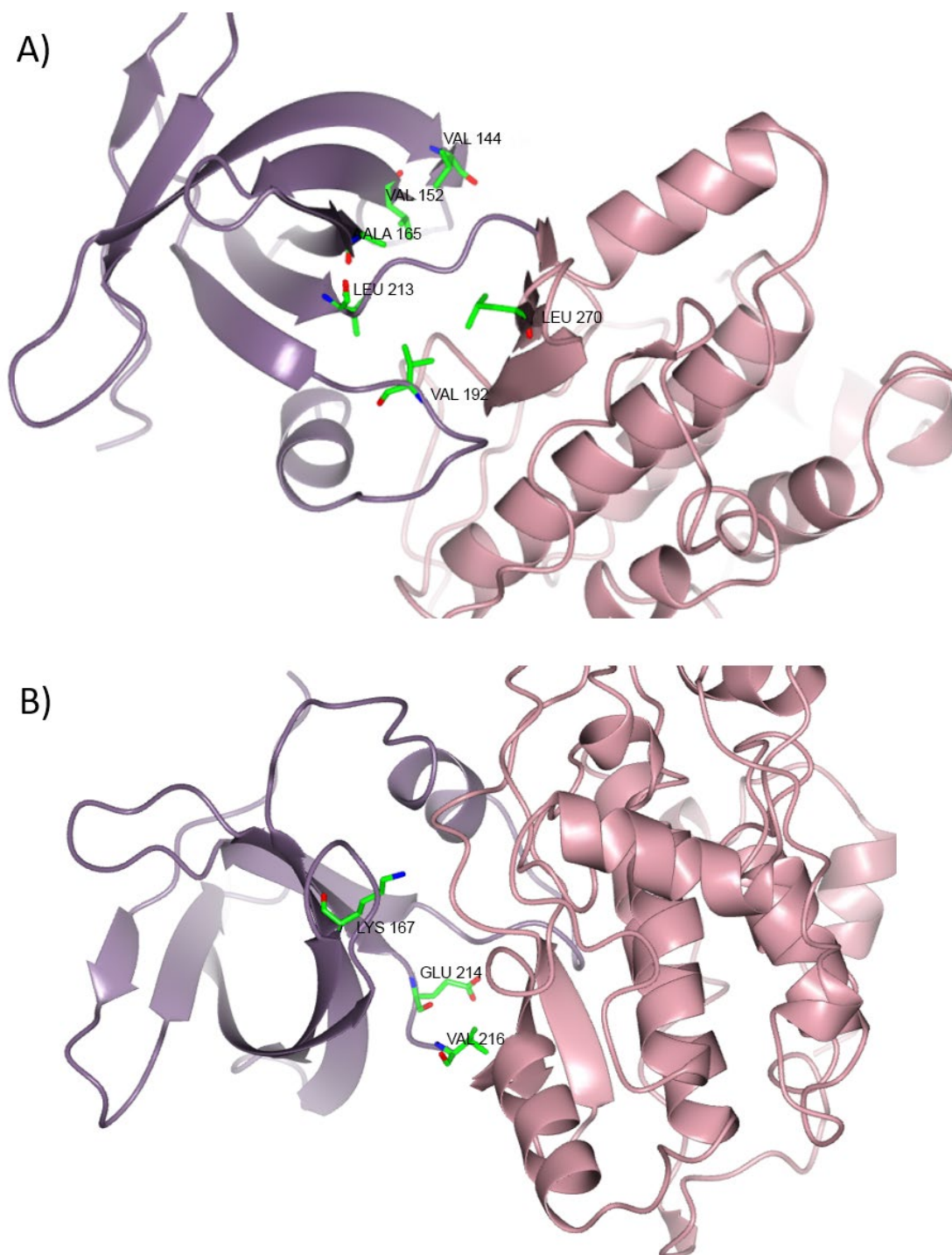
Παράλληλα, παρατηρούμε ότι είναι διατηρημένος και ο βρόχος *G* (*G-loop*) [Εικόνα 68] (κατάλοιπα 144-153), επίσης αυστηρά συντηρημένο χαρακτηριστικό των κινασών. Είναι ένας βρόχος πλούσιος σε κατάλοιπα Γλυκίνης (ακολουθεί το μοτίβο *GxGxxG*), που τον καθιστούν ιδιαίτερα εύκαμπτο. και ουσιαστικά είναι προσανατολισμένος προς την καταλυτική σχισμή και λειτουργεί με τέτοιο τρόπο ώστε να συγκρατεί την *ATP* τοποθετώντας την στην κατάλληλη θέση [287]. Ενώ στις κινάσες των ευκαρυωτικών ο *G-loop* συνδέει συνήθως το έλασμα $\beta 1$ με το $\beta 2$, στην περικεκομμένη *LjSK190-467* παρατηρούμε ότι συνδέει το έλασμα $\beta 2$ με το $\beta 3$. Γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην απουσία των 89 αμινοξέων από το *N*-τελικό άκρο.



Εικόνα 68. Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της περικεκομμένης *LjSK190-467*. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο *C*-λοβός και με ανοιχτό ροζ ο *N*-λοβός. Επισημαίνονται ο βρόχος *G* (*G-loop*) με ανοιχτό πράσινο που ενώνει τις πτυχωτές επιφάνειες $\beta 2$ και $\beta 3$, και ο βρόχος ενεργοποίησης με ανοιχτό μπλε. Επισημαίνεται και η *Tyr298* της οποίας η φωσφορυλίωση επηρεάζει την ενεργοποίηση του ενζύμου.

Όπως αναφέραμε, η θέση πρόσδεσης της *ATP* βρίσκεται ανάμεσα στην ένωση των δύο λοβών και έχει συντηρηθεί στο μεγαλύτερο μέρος της. Είναι γνωστό ότι στις

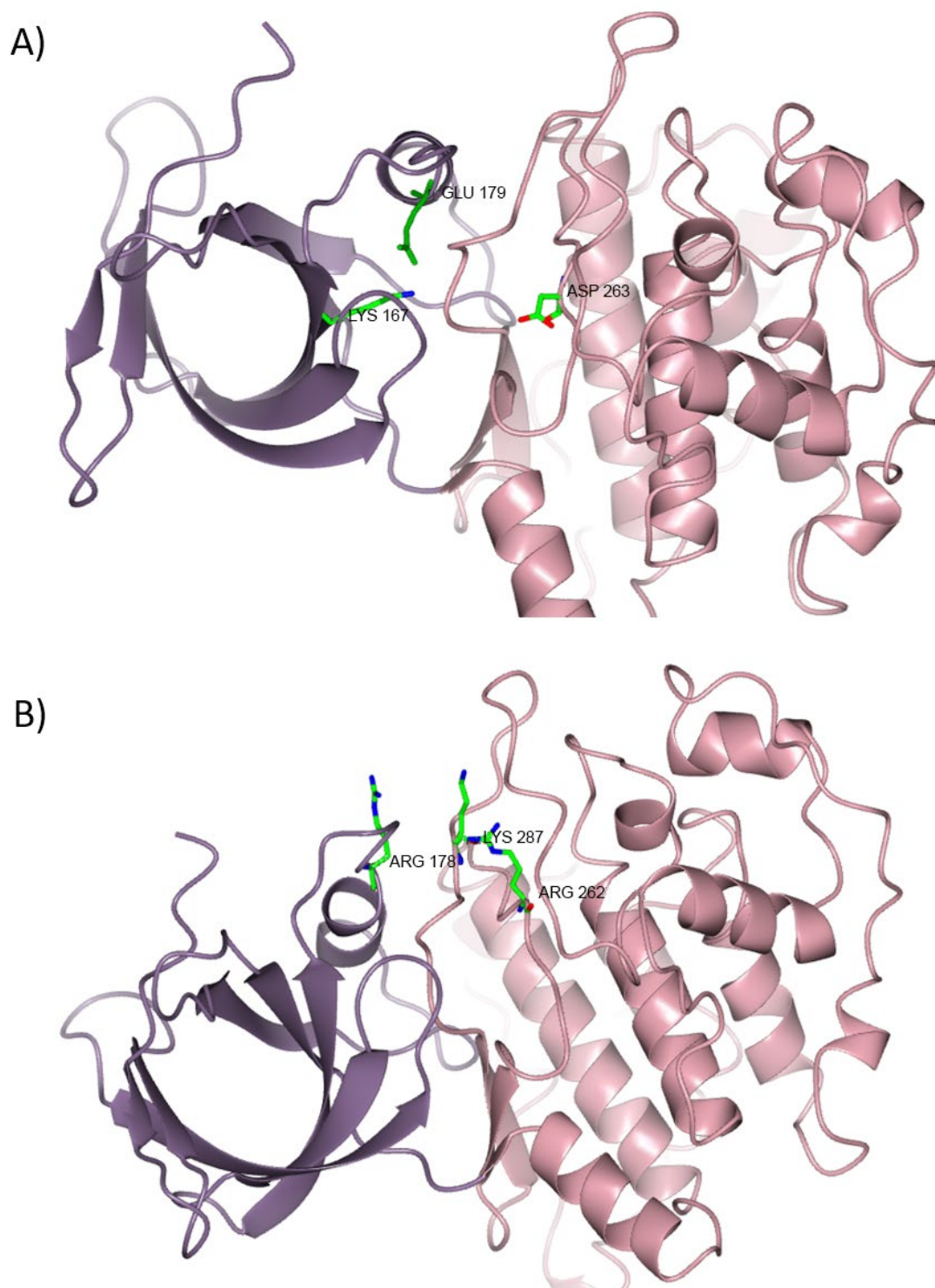
ευκαρυωτικές κινάσες ο δακτύλιος της αδενίνης της *ATP*, βρίσκεται θαμμένος σε μια υδροφοβική περιοχή που αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα *Ile62*, *Val70*, *Ala83*, *Val110*, *Leu132* και *Leu188*. Η βάση της πουρινικής ομάδας αλληλεπιδρά με τα αμινοξικά κατάλοιπα *Asp133* και *Val135*, ενώ η ριβόζη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο του *Glu85*. Όσων αφορά την *LjSK190-467*, τα κατάλοιπα αυτά είναι συντηρημένα, με τη μόνη διαφορά μία συντηρητική αντικατάσταση της *Ile62* από τη *Val144*. Η θέση πρόσδεσης της *ATP* στην *LjSK90-467*, συγκροτείται λοιπόν, από τα *Val144*, *Val152*, *Ala165*, *Val192*, *Leu213* και *Leu270* [Εικόνα 69.A)]. Αντίστοιχα συντηρημένα είναι και τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με την πουρινική βάση, *Glu214* και *Val216*, αλλά και το κατάλοιπο *Lys167* αντίστοιχο του καταλοίπου *Lys85* που σχηματίζει δεσμό με τη ριβόζη [Εικόνα 69.B)]. Τέλος, εντοπίζονται και τα αμινοξικά κατάλοιπα που γειτνιάζουν άμεσα με τις φωσφορικές ομάδες της *ATP* και πρόκειται για τα *Ser148*, *Phe144*, *Lys265*, *Gln267*, *Asp282* και φυσικά τα *Lys167* και *Glu179*, που αποτελούν τα ρυθμιστικά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου.



Εικόνα 69. Απεικόνιση των αμινοξικών καταλοίπων που έχουν συντηρηθεί από τις ευκαρυωτικές κινάσες στην *LjSK190-467*. Στο Α) επισημαίνονται τα αμινοξέα *Val144*, *Val152*, *Ala165*, *Val192*, *Leu213* και *Leu270* που αποτελούν την υδροφοβική περιοχή που ορίζει τη θέση πρόσδεσης της ATP. Στο Β) επισημαίνονται τα αμινοξέα *Glu214* και *Val216* που αλληλεπιδρούν με την πουρινική βάση της ATP και το αμινοξύ *Lys167* που σχηματίζει δεσμό με τη ριβόζη.

Η δράση κινάσης εξαρτάται από τρία κατάλοιπα που αποτελούν τη ρυθμιστική τριάδα και διατηρούνται σε όλες τις κινάσες. Αυτά τα κατάλοιπα είναι μία *Lys* που τοποθετείται στο πτυχωτό φύλλο του *N*-λοβού και ένα *Glu* και ένα *Asp* που τοποθετούνται στο *C*-λοβό [288]. Τα ίδια κατάλοιπα συναντώνται και στην περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. Πιο συγκεκριμένα αναφερόμαστε στα αμινοξέα *Lys167*, *Glu179* και *Asp263* [Εικόνα 70.A)]. Η *Lys167* σχηματίζει μία γέφυρα άλατος με το *Glu179*, όπως συμβαίνει αντίστοιχα με την *GSK3β* των θηλαστικών, καθώς η *Lys85* σχηματίζει γέφυρα άλατος με το *Glu97* [281], ενώ τα καρβοξυλικά οξυγόνα του *Glu* και *Asp* λειτουργούν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων.

Στο ενεργό κέντρο του ενζύμου απαντώνται και τα κατάλοιπα που σχετίζονται με τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Βρίσκονται στο χείλος της υδροφοβικής περιοχής στην οποία προσδένεται η *ATP* και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων συγκρατούν το εκάστοτε πεπτίδιο [282]. Συγκεκριμένα στην *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, τα κατάλοιπα αυτά είναι *Arg178*, *Arg262* και *Lys287* [Εικόνα 70.B)].

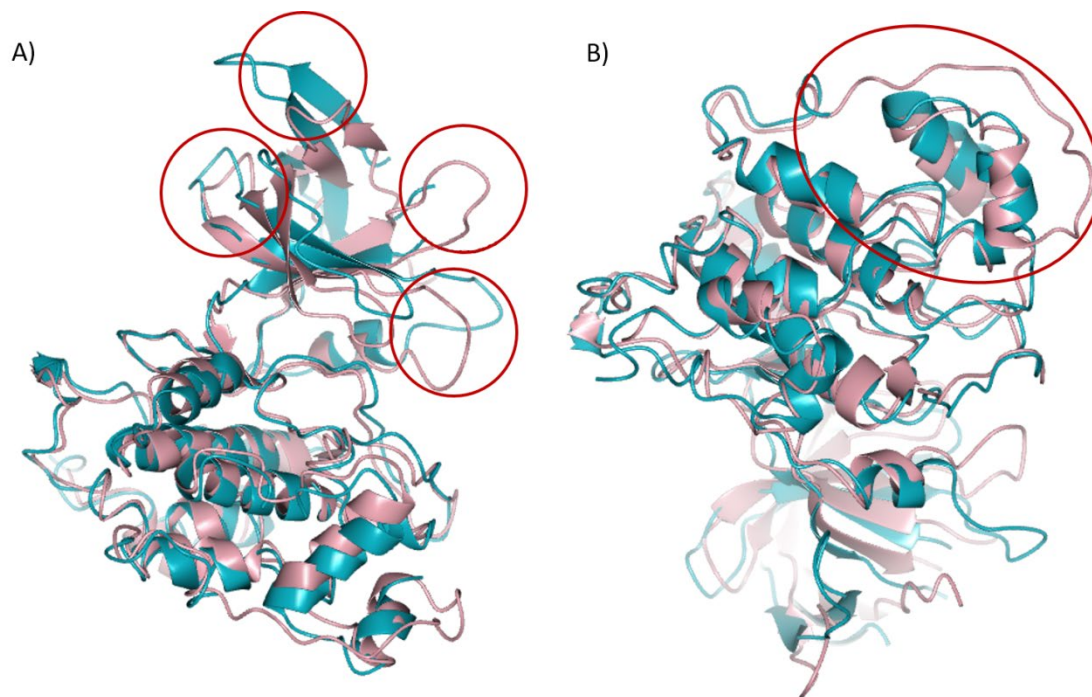


Εικόνα 70. Απεικόνιση του ενεργού κέντρου της *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. Στο Α) επισημαίνονται η ρυθμιστική τριάδα των αμινοξέων που καθορίζουν τη δράση κινάσης, *Lys167*, *Glu179* και *Asp263*. Στο Β) επισημαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που αποτελούν τη θέση πρόσδεσης τους υποστρώματος και βρίσκονται στο χείλος της υδροφοβικής περιοχής που συγκρατεί την *ATP*.

4.1.12.3. Υπέρθεση κρυσταλλικής δομής *LjSK1₉₀₋₄₆₇* και ανθρώπινης *GSK3β*

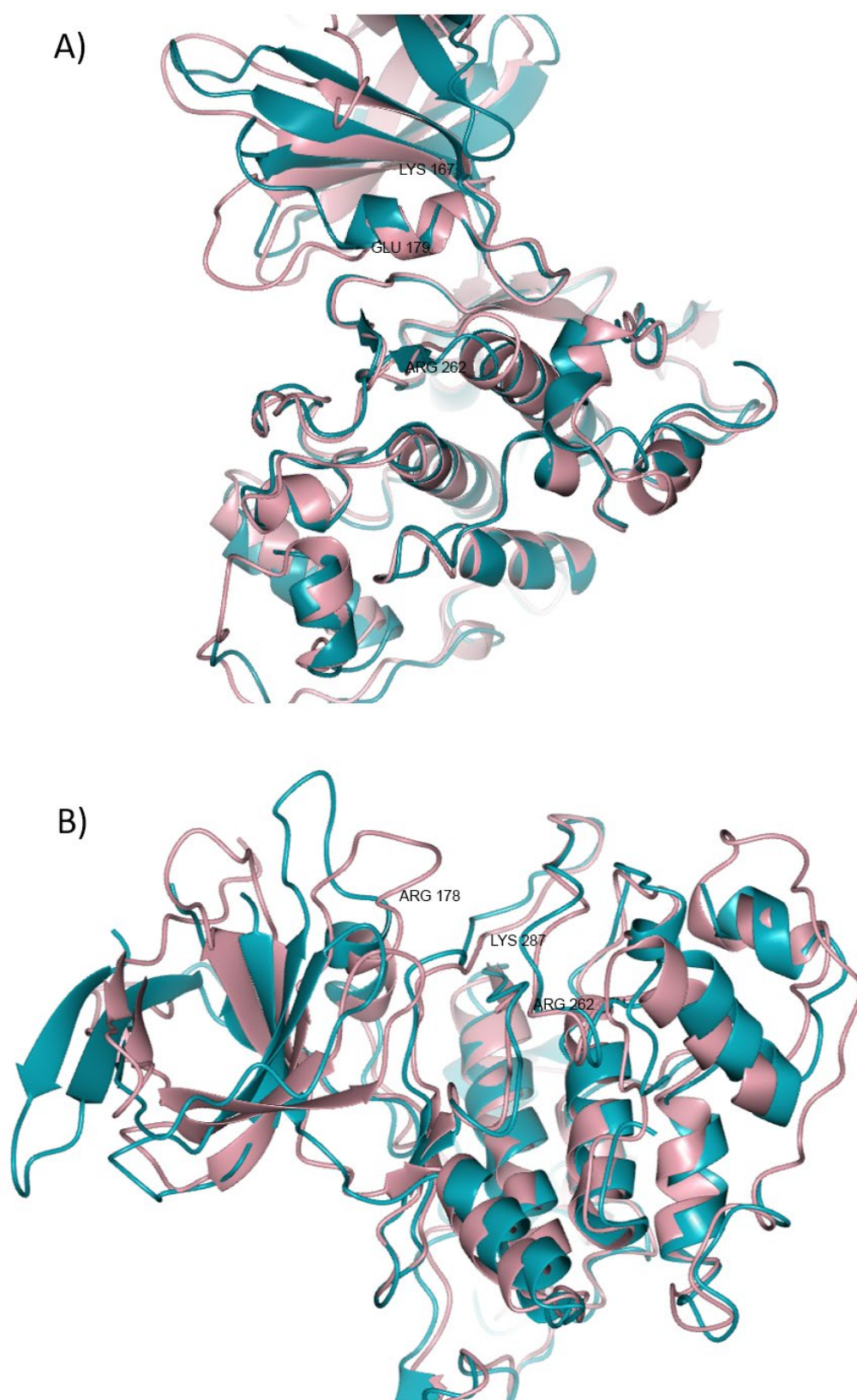
Επιλύοντας την τρισδιάστατη δομή της περικεκομμένης *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, καταγράφονται για πρώτη φορά δεδομένα που αφορούν τις κινάσες που ομοιάζουν με τις *GSK3* κινάσες των θηλαστικών και προέρχονται από φυτά. Παρά το γεγονός ότι έχει ταυτοποιηθεί σημαντικός αριθμός τέτοιων κινασών φυτικής προέλευσης, και η παρουσία τους συναντάται ανάμεσα σε διάφορα είδη, δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής κάποια τρισδιάστατη δομή και οι μελέτες πραγματοποιούνται με πληροφορίες που αφορούν κυρίως την ανθρώπινη *GSK3β*. Τα νέα αυτά δεδομένα, μας επιτρέπουν να συγκρίνουμε τις δύο αυτές δομές, αποσαφηνίζοντας περισσότερο το λειτουργικό κομμάτι πίσω από τις ομοιότητες και τις διαφορές που υπάρχουν.

Προχωρώντας σε υπέρθεση μεταξύ της δομής της *LjSK1₉₀₋₄₆₇* και της ανθρώπινης *GSK3β* (*PDB entry: 1I09*) [28] μπορούν να παρατηρηθούν ομοιότητες και διαφορές στις καίριες λειτουργικές περιοχές και να βγουν συμπεράσματα που θα διαλευκάνουν τη λειτουργία των *GSK3-like* κινασών των φυτών. Παρατηρώντας την υπέρθεση [Εικόνα 71.] (*RMSD C α* : 4.330 Å, *RMSD main chain*: 4.036 Å) γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι οι κυριότερες διαφορές μεταξύ των δύο δομών απαντώνται στο *N*-λοβό, γεγονός αναμενόμενο καθώς από την σύγκριση των αλληλουχιών είναι ξεκάθαρο ότι η *LjSK1₉₀₋₄₆₇* διαθέτει επιπλέον αμινοξέα όπως και οι περισσότερες κινάσες των φυτών. Σημαντική διαφορά συναντάται και στο *C*-λοβό καθώς η *LjSK1₉₀₋₄₆₇* διαθέτει αρκετά περισσότερα αμινοξέα από την ανθρώπινη *GSK3β*. Οι διαφορές αυτές πιθανόν υποδηλώνουν έναν επιπλέον ρυθμιστικό μηχανισμό που έχει εφαρμογή στην *LjSK1* και στις αντίστοιχες κινάσες των φυτών.



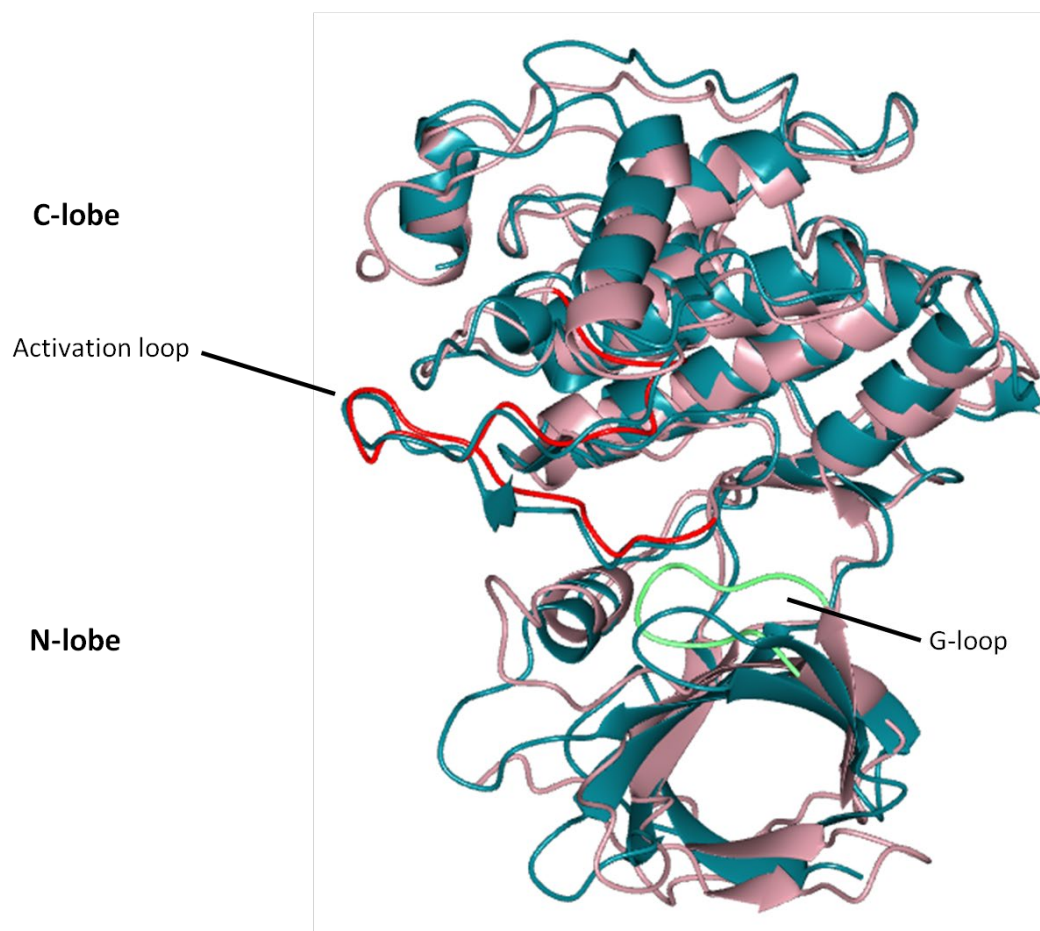
Εικόνα 71. Υπέρθηση των τρισδιάστατων δομών της περικεκομμένης *LjSK190-467* και της ανθρώπινης *GSK3β*. Με ροζ απεικονίζεται η *LjSK190-467* και με κυανό η *GSK3β*. Στο Α) επισημαίνονται με κόκκινο κύκλο οι κύριες διαφορές που παρατηρούνται στο *N*-λοβό των ενζύμων και αφορούν την περιοχή *Ala107-Arg178 LjSK190-467/Ser25-Arg96 GSK3β* (RMSD C $^{\alpha}$: 5.1 Å). Στο Β) επισημαίνεται με κόκκινο κύκλο η διαφορά που παρατηρείται στο *C*-λοβό των ενζύμων και αφορά την περιοχή *Glu342-Asn367 LjSK190-467/Asp260-Asn285 GSK3β* (RMSD C $^{\alpha}$: 0.69 Å), ενώ πέρα από αυτή την περιοχή δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση καθώς η δομή του ανθρώπινου ενζύμου *GSK3β* υπολείπεται καταλοίπων.

Σε αντίθεση με τις διαφορές που παρατηρούνται στο *C*-λοβό και στο *N*-λοβό μεταξύ των δύο δομών, το καταλυτικό κέντρο καθώς και το σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος παραμένουν συντηρημένα και δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές [Εικόνα 72.].



Εικόνα 72. Υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και της ανθρώπινης *GSK3β*. Με ροζ απεικονίζεται η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και με κυανό η *GSK3β*. Στο Α) επισημαίνονται τα κατάλοιπα που απαρτίζουν το καταλυτικό κέντρο της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και παρατηρείται η συντήρησή τους. Στο Β) επισημαίνονται τα κατάλοιπα που απαρτίζουν τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος της *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και συντηρούν επίσης τη δομή τους.

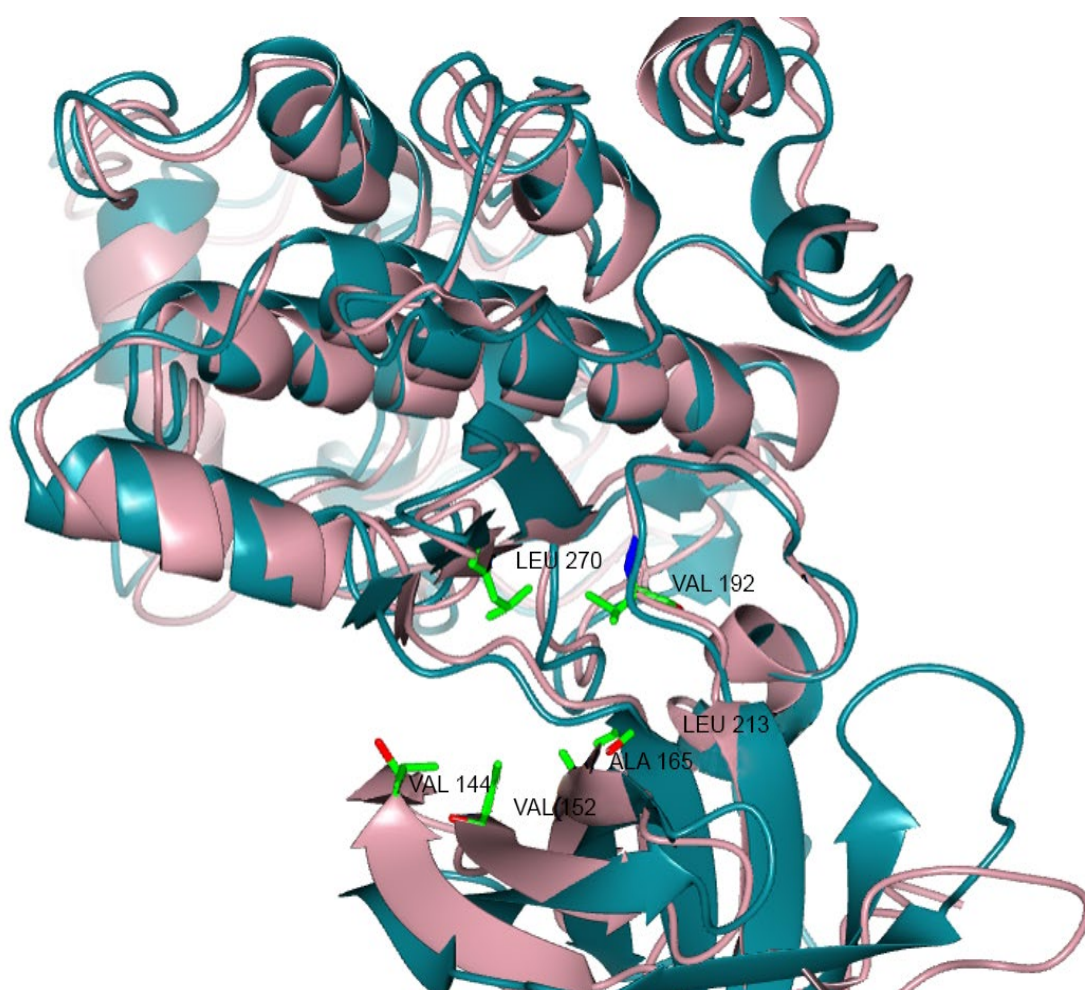
Αντίθετα η σύγκριση του *G-loop* (RMSD C α : 0.8 Å) επιδεικνύει αμελητέα αλλαγή στη διαμόρφωση του που πιθανώς οφείλεται στην διαφορά ορισμένων αμινοξέων καθώς και στο αρχικό τμήμα του *N*-λοβού που διαφοροποιείται μεταξύ των ενζύμων. Ενώ και η σύγκριση του βρόχου ενεργοποίησης (RMSD C α : 3.4 Å) μεταξύ των δύο δομών παρουσιάζει κάποια διαφορά αλλά διατηρεί τη διαμόρφωσή του και στην περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ [Εικόνα 73.].



Εικόνα 73. Υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και της ανθρώπινης *GSK3 β* . Με ροζ απεικονίζεται η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και με κυανό η *GSK3 β* . Με κόκκινο χρωματίζεται ο βρόχος ενεργοποίησης ο οποίος διατηρεί τη διαμόρφωση συγκριτικά με την ανθρώπινη *GSK3 β* . Με ανοιχτό πράσινο χρωματίζεται ο *G-loop* στον οποίο παρατηρείται αλλαγή της διαμόρφωσης.

Τέλος η σύγκριση των δύο δομών αποκαλύπτει ότι και η υδροφοβική περιοχή που ορίζει τη θέση πρόσδεσης της *ATP* βρίσκεται σε σημείο το οποίο διατηρεί τη διαμόρφωση του συγκριτικά με την ανθρώπινη *GSK3 β* και δεν παρατηρούνται

σημαντικές μεταβολές [Εικόνα 74.]. Από τα δεδομένα που αντλούμε από την υπέρθεση των δύο δομών, συμπεραίνουμε ότι οι βασικές λειτουργικές περιοχές διατηρούνται συντηρημένες και στην περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, εξηγώντας έτσι τις κοινές λειτουργίες που εμφανίζουν οι δύο πρωτεΐνες. Ενώ τα τμήματα των C-τελικών και N-τελικών άκρων διέπονται από σημαντικές αλλαγές οι οποίες μπορούν να ερμηνευτούν ως επιπλέον μηχανισμοί ρύθμισης της *LjSK1*, μηχανισμοί διαφορετικοί από τους γνωστούς της ανθρώπινης *GSK3β*.

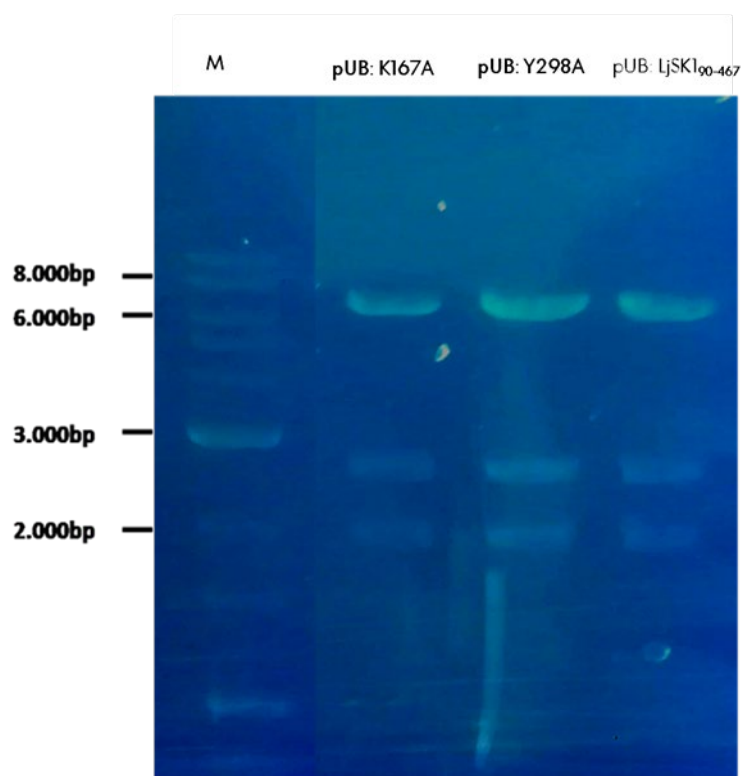


Εικόνα74. Υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και της ανθρώπινης *GSK3β*. Με ροζ απεικονίζεται η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ και με κυανό η *GSK3β*. Επισημαίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την υδροφοβική περιοχή δέσμευσης της *ATP*. Βρίσκονται σε περιοχές που διατηρούν τη διαμόρφωση τους συγκριτικά με την ανθρώπινη *GSK3β* και δεν παρατηρούνται αλλαγές.

4.2. *In planta* πειράματα της *LjSK1*

4.2.1. Κατασκευή πλασμιδιακών φορέων ειδικών για μετασχηματισμό φυτών

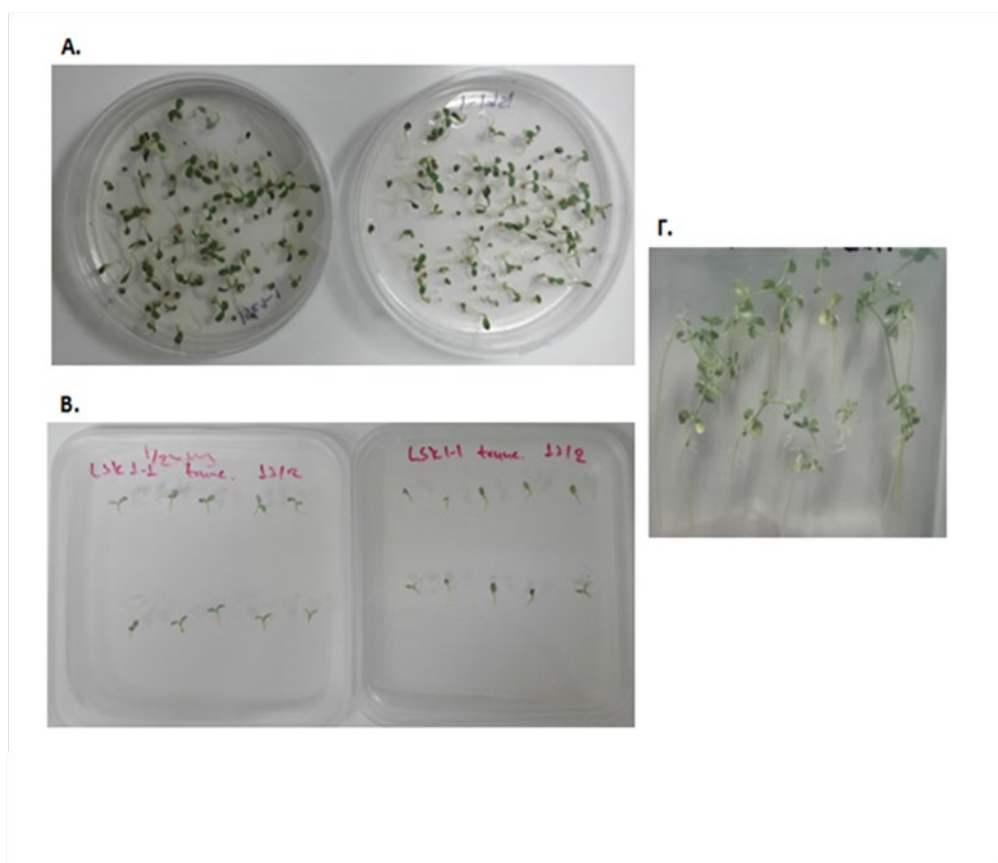
Όπως αναφέρεται αναλυτικά και την Ενότητα 3.2.1. κατασκευάστηκαν ειδικοί πλασμιδιακοί φορείς που θα φέρουν τις μεταλλάξεις *Lys167Ala* και *Tyr298Ala* καθώς και την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ ώστε να μετασχηματιστούν στο ίδιο το φυτό. Η πειραματική διαδικασία ακολούθησε την τεχνολογία κλωνοποίησης *Gateway*[®] και συνοψίζεται σε δύο κύριες αντιδράσεις *BP* και *LR* αντίστοιχα. Μετά το πέρας και της αντίδρασης *LR*, προκύπτει ο τελικός φορέας έκφρασης *pUB-GW-Hyg* με την εκάστοτε κατασκευή. Η επιτυχία της κλωνοποίησης επιβεβαιώθηκε ύστερα από πέψη των πλασμιδιακών φορέων με τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* και *EcoRV*, όπου και βλέπουμε τις μπάντες στα αναμενόμενα μοριακά βάρη 7000, 2500 και 2000 *bp* [Εικόνα 75.].



Εικόνα 75. Πηκτή αγαρόζης που απεικονίζεται η πέψη των πλασμιδιακών φορέων *pUB-GW-Hyg* με τα ένζυμα περιορισμού *BamHI* και *EcoRV*. Παρατηρούνται μπάντες στα μοριακά βάρη 7000, 2500 και 2000 *bp*.

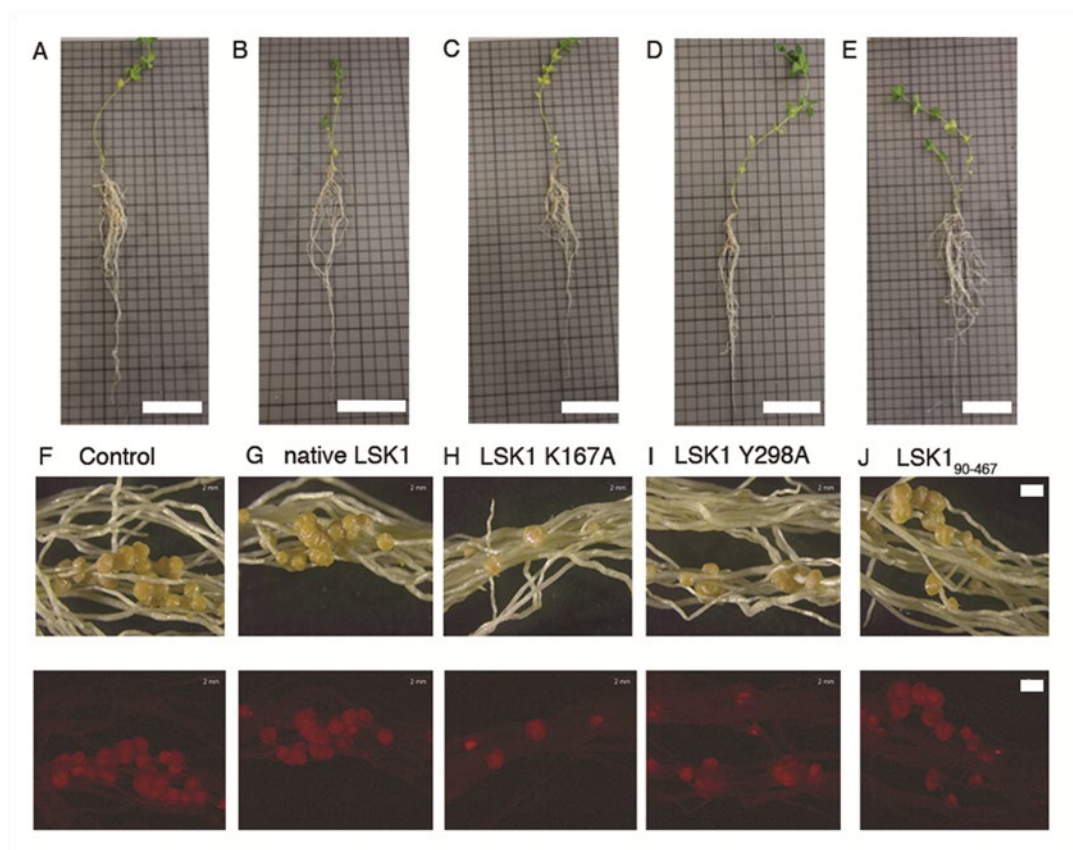
4.2.2. Ανάπτυξη φυτών και σχηματισμός φυματίων

Τα ειδικά πλασμίδια μετασχηματίστηκαν στη ρίζα (*hairy root*) του φυτού *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (*Leguminosae*) και συνολικά δημιουργήθηκαν πέντε διαφορετικές σειρές μετασχηματισμένων φυτών (Ενότητα 3.2.2.). Αρχικά τα φυτά αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε πρώιμα στάδια μέχρι το σχηματισμό υποκοτυλίων [Εικόνα 76.A.] και στη συνέχεια δημιουργούνται μοσχεύματα με τη χρήση νυστεριού. Κάθε μόσχευμα επιμολύνεται με εμφύσηση στον πολτό *Agrobacterium rhizogenes* ώστε να επιτραπεί ο μετασχηματισμός και μεταφέρονται σε πλακίδια που περιέχουν θρεπτικό μέσο $MS^{1/2}$, όπου και αφήνονται να αναπτυχθούν [Εικόνα 76.B & Γ.]. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μίγμα άμμου- βερμικουλίτη (3:1) και ακολούθησε επιπλέον εμβολιασμός των ριζών με το συμβιωτικό ριζόβιο στέλεχος *Mesorhizobium loti* R7A *DsRed* για να επιτραπεί η δημιουργία των φυματίων.



Εικόνα 76. Τα στάδια μετασχηματισμού και ανάπτυξης των φυτών. Στην εικόνα Α φαίνονται τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης και ο σχηματισμός υποκοτυλίων. Στις εικόνες Β και Γ φαίνονται τα επόμενα στάδια στα οποία τα μοσχεύματα έχουν επιμολυνθεί και αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι να αναγεννηθούν οι ρίζες τους και μεταφερθούν σε μίγμα άμμου-βερμικουλίτη (3:1).

Με την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, τα φυτά συλλέχθηκαν, φωτογραφήθηκαν, μετρήθηκε ο αριθμός των φυματίων, και τέλος μετρήθηκε το μήκος και το βάρος των ριζών [Εικόνα 77]. Οι αναγεννημένες ρίζες και τα φυμάτια εμφανίστηκαν μορφολογικά παρόμοια σε όλες τις γραμμές, συμπεριλαμβανομένου και του *control* [Εικόνα 77.A-E]. Επίσης αναλλοίωτες διατηρήθηκαν η μορφολογία των φυματίων και ο αποικισμός από το ριζόβιο [Εικόνα 77.F-J].



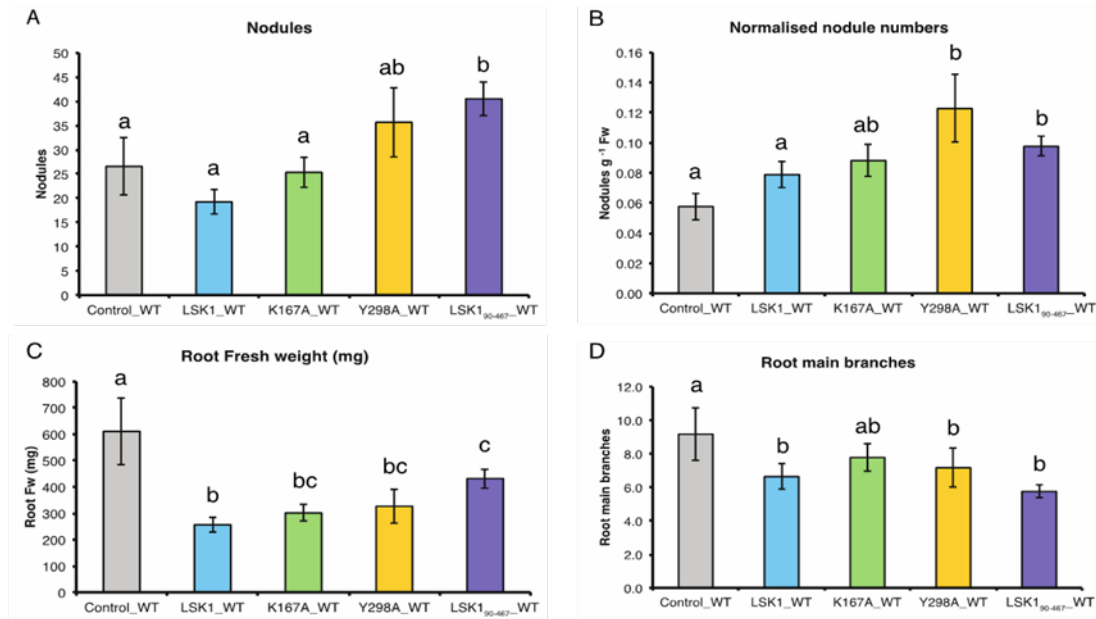
Εικόνα 77. Τα συλλεγμένα φυτά μετά το πέρας της ανάπτυξης. Τα A-E αποτελούν φωτογραφίες ολόκληρων των ανεπτυγμένων φυτών. Τα F-J αποτελούν εικόνες των φυματίων που δημιουργήθηκαν στις αναγεννημένες ρίζες. Το τελευταίο πάνελ αποτελεί τις ίδιες εικόνες F-J που λήφθηκαν με φίλτρο *RFP* για την απεικόνιση του αποικισμού του ριζοβίου *Mesorhizobium loti*.

4.2.3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική *One-way ANOVA* (*One-way analysis of variance*) ακολουθούμενη από το *Fischer's LSD post-hoc* τεστ εγκυρότητας [Εικόνα 78.]. Παρατηρείται ότι η επιπλέον υπερέκφραση

της *LjSK1*, όπως και του μεταλλάγματος *LjSK1 K167A* το οποίο βάση των κινητικών μελετών χάνει τη λειτουργία του, δεν έχουν επίπτωση στους απόλυτους ή κανονικοποιημένους αριθμούς φυματίων [Εικόνα 78.A & B]. Η μη επίδραση της υπερέκφρασης της *LjSK1* είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη [173]. Αξιοσημείωτο είναι ότι το μετάλλαγμα *LjSK1 Y298A* που παρουσιάζει μειωμένη καταλυτική ικανότητα, οδήγησε σε αύξηση του κανονικοποιημένου αριθμού φυματίων όταν συγκρίνονται με τα φυμάτια των φυτών control αλλά και των φυτών που υπερεκφράζεται η *LjSK1* [Εικόνα 78.B]. Παρόμοια, και η περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* που παρουσιάζει αυξημένη καταλυτική ικανότητα οδήγησε σε σημαντική αύξηση των απόλυτων αριθμών φυματίων συγκριτικά με τα άλλα φυτά [Εικόνα 78.A].

Επιπλέον παρατηρήθηκε, ότι η υπερέκφραση όλων των παραλλαγών μείωσε σημαντικά το καθαρό βάρος της ρίζας. Οι κατασκευές που υπερεκφράζονταν η *LjSK1* παρουσίασαν μείωση πάνω από 50%, οι κατασκευές που υπερεκφράζονταν το μετάλλαγμα *LjSK1 K167A* με μηδενική καταλυτική ικανότητα και το μετάλλαγμα *LjSK1 Y298A* εμφάνισαν ενδιάμεση μείωση ~50% και τέλος οι κατασκευές που υπερεκφράζονταν η περικεκομμένη *LjSK1₉₀₋₄₆₇* με αυξημένη καταλυτική ικανότητα *LjSK1₉₀₋₄₆₇* παρουσίασαν τη μικρότερη μείωση ~30% σε σύγκριση με τις κατασκευές control [Εικόνα 78.C]. Αυτή η μείωση στο καθαρό βάρος της ρίζας συνοδεύτηκε και από μείωση των πρωτογενών και δευτερογενών πλευρικών ριζών, κατά μέσο όρο από 10 διακλαδώσεις των φυτών του control σε 6 διακλαδώσεις για τις παραλλαγές *LjSK1*, *LjSK1 Y298A* και *LjSK1₉₀₋₄₆₇*. Η κατασκευή με το μετάλλαγμα *LjSK1 K167A*, παρουσίασε μία μέτρια μείωση των πλευρικών ριζών, κατά μέσο όρο 8 ανά φυτό, που δεν διαφέρει σημαντικά ούτε από το control ούτε και από τις υπόλοιπες παραλλαγές [Εικόνα 78.D].



Εικόνα 78. Γραφήματα στατιστικής ανάλυσης της επίδρασης της υπερέκφρασης διάφορων παραλλαγών της *LjSK1* στο φυτό *Lotus japonicus*. Αναλύονται οι φυσιολογικές παράμετροι των ριζών (*hairy roots*) του αγρίου τύπου *Lotus japonicus* που μετασχηματίστηκαν με την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, τα μεταλλάγματα *LjSK1* K167A και *LjSK1* Y298A και τη φυσική *LjSK1*, 21 ημέρες μετά τον εμβολιασμό τους με *Mesorhizobium loti*. Οι ρίζες των φυτών που αποτέλεσαν το control μετασχηματίστηκαν με κενό φορέα. Οι τιμές που εμφανίζονται είναι ο μέσος όρος \pm SEM για $n = 6-16$ μεμονωμένες ρίζες ανά κατασκευή. Τα γράμματα πάνω από κάθε γράφημα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των δειγμάτων.

4.2.4. Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Αλλάζοντας την καταλυτική ικανότητα της *LjSK1*, μέσω των διάφορων κατασκευών, συμπεραίνουμε ότι ναι μεν δεν συμμετέχει στις διαδικασίες μορφογένεσης και αποικισμού των φυματίων αλλά η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασής της επηρεάζει σημαντικά τον αριθμό τους. Έχει αποδειχθεί προηγουμένως ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *LjSK1* που συνεπάγεται και αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα, δεν οδηγεί σε αύξηση του σχηματισμού των φυματίων [173], φαινόμενο που πιθανός οφείλεται στο ότι τα επίπεδα της ενδογενούς *LjSK1* είναι αρκετά ώστε να καλύψουν την φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων που σχετίζονται με τη σηματοδότηση των φυματίων. Αυτό που παρατηρούμε εμείς όμως, είναι ότι τόσο η υπερέκφραση του μεταλλάγματος *LjSK1* Y298A που παρουσιάζει μειωμένη

καταλυτική ικανότητα, όσο και η υπερέκφραση της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ η οποία παρουσιάζει αυξημένη καταλυτική ικανότητα, οδήγησαν σε σημαντικά αυξημένο αριθμό φυματίων. Αποτέλεσμα όμως που έρχεται σε αντίθεση με την προηγούμενη έρευνα [173].

Για να αξιολογηθεί αυτό το αντικρουόμενο αποτέλεσμα θα πρέπει να λάβουμε υπόψη μας ότι όλες οι παραλλαγές εκφράστηκαν σε φυτά στα οποία εκφραζόταν ενδογενής *LjSK1* σε φυσιολογικά επίπεδα και άρα ήταν ικανή να καλύψει τις ανάγκες των διάφορων διεργασιών. Συνεπώς, οποιαδήποτε επίδραση παρατηρείται από την υπερέκφραση των άλλων παραλλαγών, πιθανός να οφείλεται σε κυρίαρχες αρνητικές επιδράσεις ή σε άθροισμα επιδράσεων λόγω αυξημένης καταλυτικής ικανότητας. Έτσι λοιπόν, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η εισαγωγή της περικεκομμένης *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ ή του μεταλλάγματος Y298A, μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα της ενδογενούς *LjSK1* να μετατοπίζεται στον πυρήνα ή να αποτρέπει την επίτευξη των αλληλεπιδράσεων στο κυτοσόλιο που σχετίζονται με τη ρύθμιση έναντι των υποστρωμάτων.

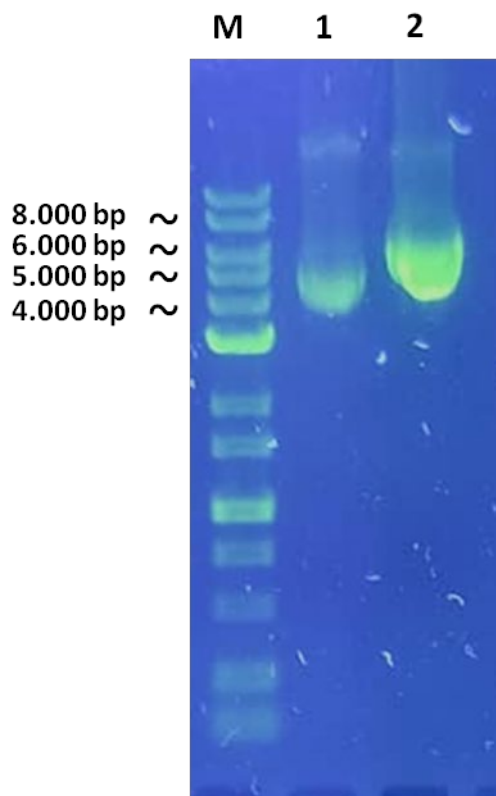
Πιο ειδικά για την περικεκομμένη *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, η έλλειψη ενός τόσο μεγάλου κομματιού από το *N*-τελικό άκρο, είναι αναμενόμενο να επηρεάζει τόσο τη μετα-μεταφραστική ρύθμιση όσο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και συνεπώς η ερμηνεία των επιδράσεων της να καθίστανται περισσότερο πολύπλοκες. Πειραματικά αποδείξαμε ότι η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇, παρουσιάζει μειωμένη *K_m* ως προς την *ATP* σε ποσοστό της τάξης του 75% περίπου συγκριτικά με την *LjSK1*, και ταυτόχρονα η *V_{max}* της μειώνεται κατά 50%. *In vivo* όμως είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε πως αυτό μεταφράζεται στη φωσφορυλίωση φυσικών υποστρωμάτων. Μπορούμε να υποθέσουμε ότι η *LjSK1*₉₀₋₄₆₇ δεν αναστέλλεται όπως θα αναστελλόταν αντίστοιχα η *LjSK1* σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω της ύπαρξης αυτού του *N*-τελικού άκρου. Εναλλακτικά μπορούμε να υποθέσουμε ότι η απουσία αυτής της περιοχής επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης, παρόμοια με την *AtSK1-2*, μέλος της οικογένειας *AtSK* του *Arabidopsis* [192]. Συνεπώς αυτή η σημαντική δομική αλλαγή μπορεί να οδηγεί σε παρεκκλίνουσα σηματοδότηση της *LjSK1*.

Στη συνέχεια των ευρημάτων μας, συμπεραίνουμε ότι η *LjSK1* εμπλέκεται στην ανάπτυξη της βιομάζας της ρίζας. Όλες οι παραλλαγές όταν υπερεκφράζονται, ανεξάρτητα από την καταλυτική τους ικανότητα, μειώνουν σημαντικά το καθαρό βάρος της ρίζας κατά >30%. Γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την ταυτόχρονη μείωση των πλευρικών ριζών σε όλες τις κατασκευές, πλην της κατασκευής που υπερεκφραζόταν το μετάλλαγμα *K167A*. Μιας και κατά μέσο όρο, το μεγαλύτερο τμήμα της ρίζας δεν παρουσίασε διαφορές, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οποιαδήποτε αλλαγή στην καταλυτική ικανότητα της *LjSK1* πέρα από τα φυσικά επίπεδα, ευθύνεται για τη μείωση του καθαρού βάρους της ρίζας μιας και αναστέλλεται ο σχηματισμός των πλευρικών ριζών. Το συμπέρασμα αυτό επαληθεύεται και σε προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την *BIN2* (*AtSK2-1/ASKη*) του *Arabidopsis thaliana* και βρέθηκε ότι λειτουργεί ως σηματοδότης, μέσω φωσφορυλίωσης, για την ενεργοποίηση του σχηματισμού των πλευρικών ριζών [133].

4.3. Παραγωγή συνθετικής πρωτεΐνης *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*

4.3.1. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα

Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα που φέρει τη χιμαιρική πρωτεΐνη *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* ακολουθήθηκε η τεχνική *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* της εταιρείας *NEB*, όπως αναφέρεται και αναλυτικά στην Ενότητα 3.3.1. Μετά και το τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, κατά το οποίο τα ενισχυμένα τμήματα *DNA* αναμιγνύονται με το ειδικό αντιδραστήριο και επωάζονται για 30 min στους 50 °C ακολουθήθηκε επαλήθευση της επιτυχίας της κλωνοποίησης. Η επαλήθευση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε πηκτή αгарόζης [Εικόνα 79] όπου και παρατηρήθηκε προϊόν στο επιθυμητό μοριακό βάρος στα 6.300 bp και μετέπειτα από αλληλούχιση, της οποίας τα αποτελέσματα αναφέρονται στο Παράρτημα.

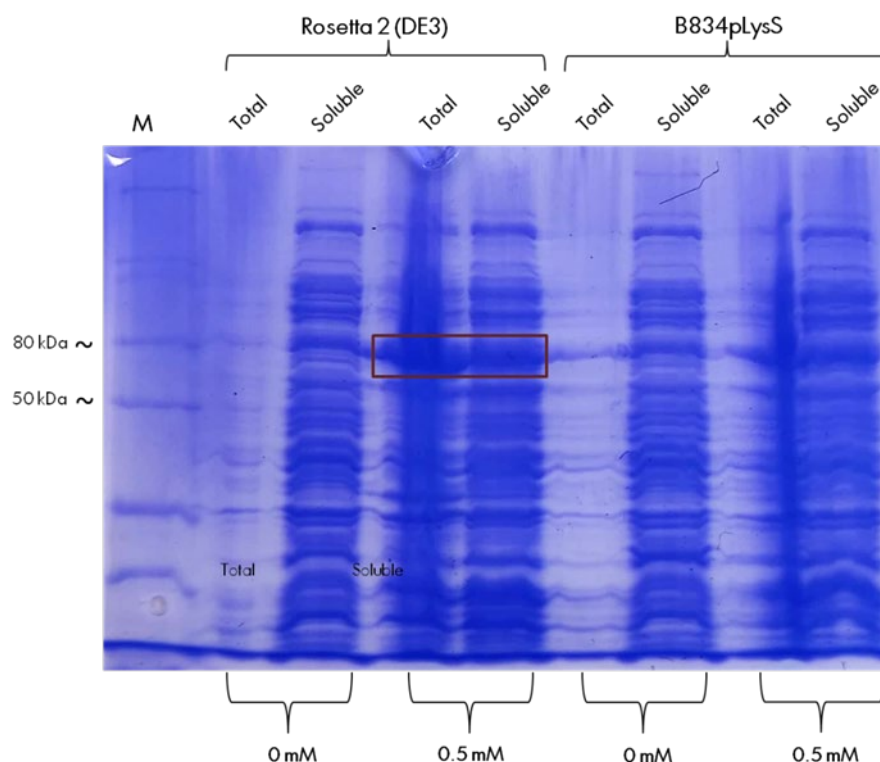


Εικόνα 79. Πηκτή αγαρόζης 0.8 %. Όπου *M* είναι ο δείκτης. Στη διαδρομή 1 είναι το άδειο πλασμίδιο *pGEX-6P-1*. Στη διαδρομή 2 είναι το πλασμίδιο που φέρει τη συνθετική πρωτεΐνη *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*, σε μοριακό βάρος 6334 *bp*.

4.3.2. Δοκιμές έκφρασης για παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*

Εφόσον ο πλασμιδιακός φορέας που φέρει την *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* κατασκευάστηκε με επιτυχία, ακολούθησε έλεγχος της έκφρασης στα βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2(DE3)* και *B834pLysS*. Στόχος ήταν να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες που οδηγούν στην παραγωγή διαλυτής συνθετικής πρωτεΐνης. Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε με 0.5 *mM IPTG*, στους 18 °C για 16 *h*, τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου [Εικόνα 80]. Η *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* βρέθηκε να εκφράζεται τόσο στο αδιάλυτο όσο και στο διαλυτό και για τα δύο βακτηριακά στελέχη, με την περίπτωση των *Rosetta 2(DE3)*

να παρουσιάζουν ελαφρώς καλύτερη εικόνα και άρα προτιμήθηκαν για την συνέχεια των πειραματικών διαδικασιών.



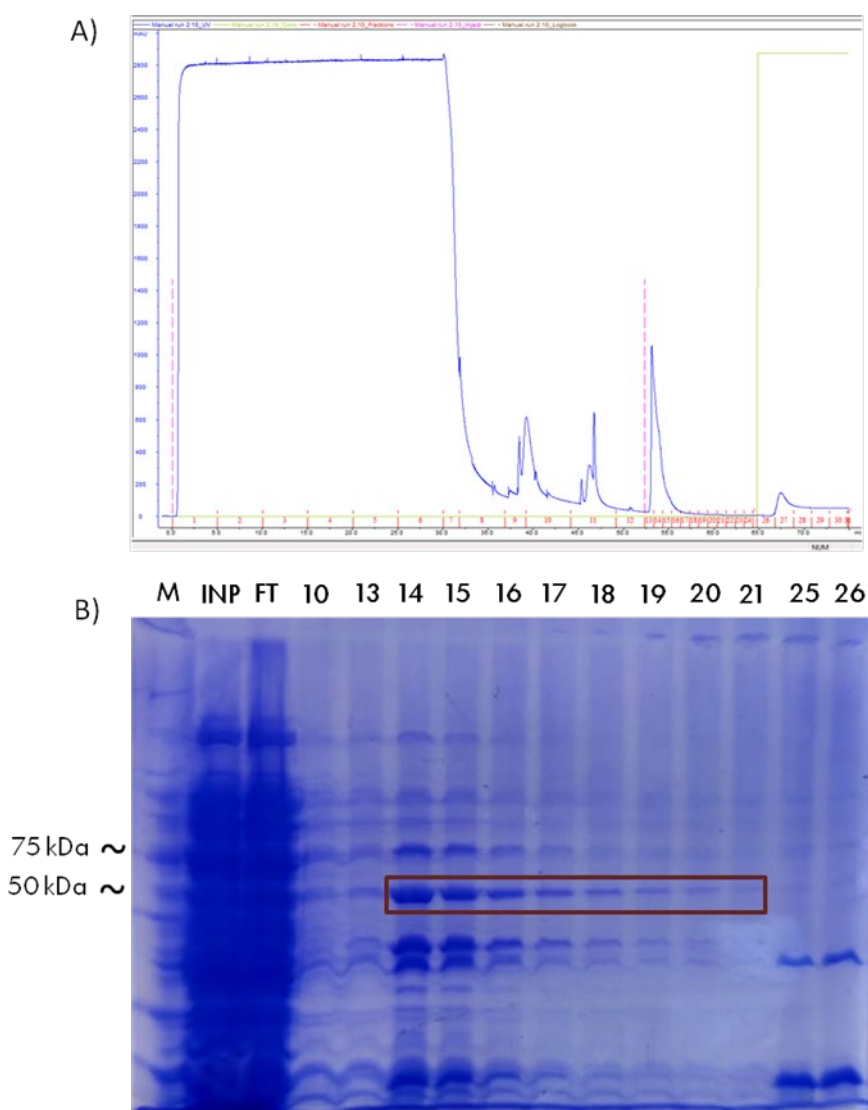
Εικόνα 80. Δοκιμή έκφρασης της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* στα βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2* και *B834pLysS*. Ως *Total* αναφέρεται το δείγμα των συνολικών πρωτεϊνών που συλλέγεται ύστερα από μηχανική λύση με υπερήχους και ως *Soluble* αναφέρεται το δείγμα που προκύπτει ύστερα από φυγοκέντρηση των συνολικών πρωτεϊνών. Και στα δύο βακτηριακά στελέχη παρατηρούμε έκφραση της πρωτεΐνης τόσο στο αδιάλυτο όσο και στο διαλυτό κομμάτι, με την περίπτωση των *Rosetta 2* να παρουσιάζουν ελαφρώς περισσότερη έκφραση, όπως επισημαίνεται από το κόκκινο πλαίσιο. Το μοριακό βάρος της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* είναι 51 kDa και μαζί με την ετικέτα συγγένειας *GST* φτάνει τα 77 kDa.

4.3.3. Υπερέκφραση και απομόνωση της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇*

Η *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* εκφράστηκε σε κάθε περίπτωση σε βακτηριακά στελέχη *Rosetta 2*, με καλλιέργεια 2 L. Για τον καθαρισμό της, δοκιμάστηκαν διάφορες παραλλαγές του τελικού πρωτοκόλλου καθαρισμού της *LjSK1*, καθώς και προηγούμενων πρωτοκόλλων, ενώ στο τέλος δοκιμάστηκε και η στήλη υδρόφοβης αλληλεπίδρασης *HiTrap Phenyl FF*. Σε όλες τις προσπάθειες, η απόδοση της απομόνωσης ήταν σχετικά μειωμένη και απαιτείται βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου.

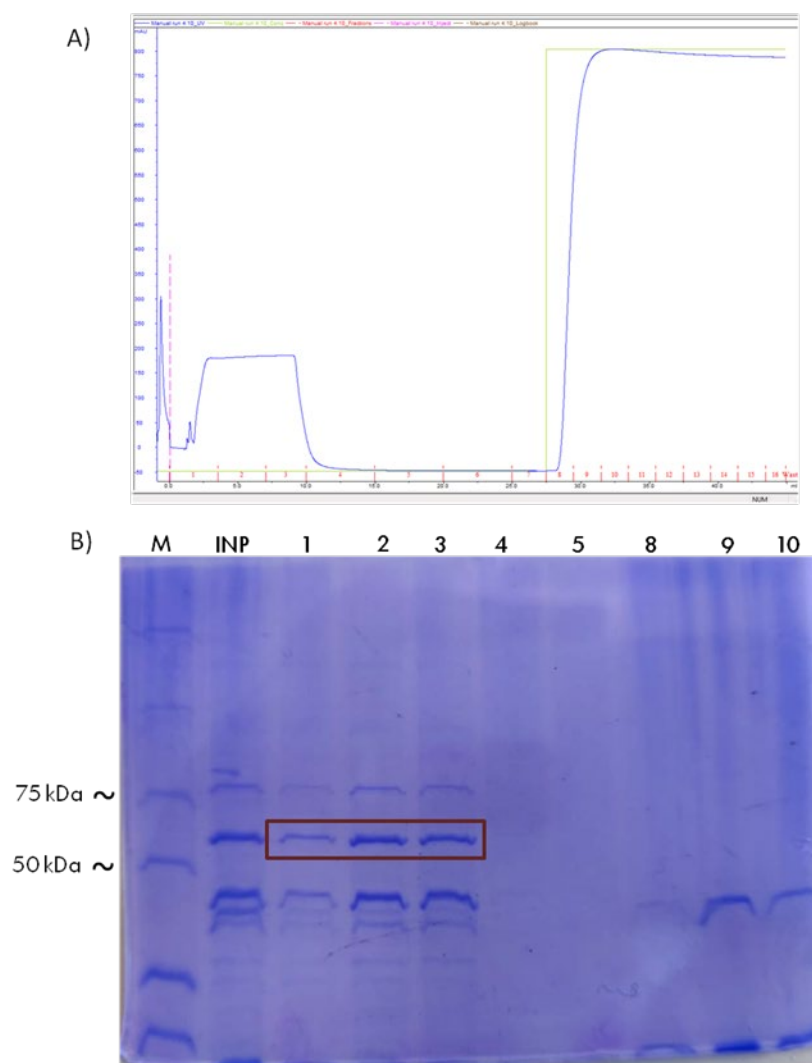
4.3.3.1. Πρωτόκολλο καθαρισμού *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ No.1

Στο πρώτο στάδιο του καθαρισμού το κυτταρόλυμα διήλθε από στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* [Εικόνα 81.A.], ακολούθησε εκτεταμένη έκπλυση και στη συνέχεια προστέθηκε εντός της στήλης η πρωτεάση 3C, όπου και αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν για τουλάχιστον 16 h. Η ελεύθερη ετικέτας *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ εξήλθε από τη στήλη και ακολούθησε έκλυση με το αντίστοιχο διάλυμα στο 100% της συγκέντρωσής του. Μέσω *SDS-PAGE* [Εικόνα 81.B.] τα κλάσματα που περιέχουν την ελεύθερη ετικέτας (*GST-tag*), *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ ταυτοποιήθηκαν και συλλέχθηκαν για το επόμενο στάδιο.



Εικόνα 81. 1^ο στάδιο πρωτόκολλου καθαρισμού *CALM-LjSK1*₉₀₋₄₆₇ No.1. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B*, ενώ στο B) η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η πρωτεάση 3C είχε εισαχθεί εντός της στήλης. Τα κλάσματα 14-21 περιείχαν την ελεύθερη ετικέτας πρωτεΐνη, συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο στάδιο.

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ήταν τα 14-21, τα οποία στη συνέχεια εισήλθαν ξανά σε στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 82.A.], ώστε να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα της πρωτεάσης 3C και της *CALM-LjSK190-467* που μπορεί να φέρει ακόμα την ετικέτα συγγένειας (*GST-tag*) και τέλος αναλύονται με *SDS-PAGE* [Εικόνα 82.B.]. Από αυτό το στάδιο απομόνωσης συλλέχθηκαν τα κλάσματα 1-3. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 82.B., δυστυχώς η απόδοση του καθαρισμού είναι μειωμένη καθώς μαζί με την *CALM-LjSK190-467* απομονώνεται και κάποια άλλη πρωτεΐνη χαμηλότερου μοριακού βάρους. Παρόλα αυτά, το δείγμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C και πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω δοκιμές δραστικότητας παρουσία Ca^{2+} .

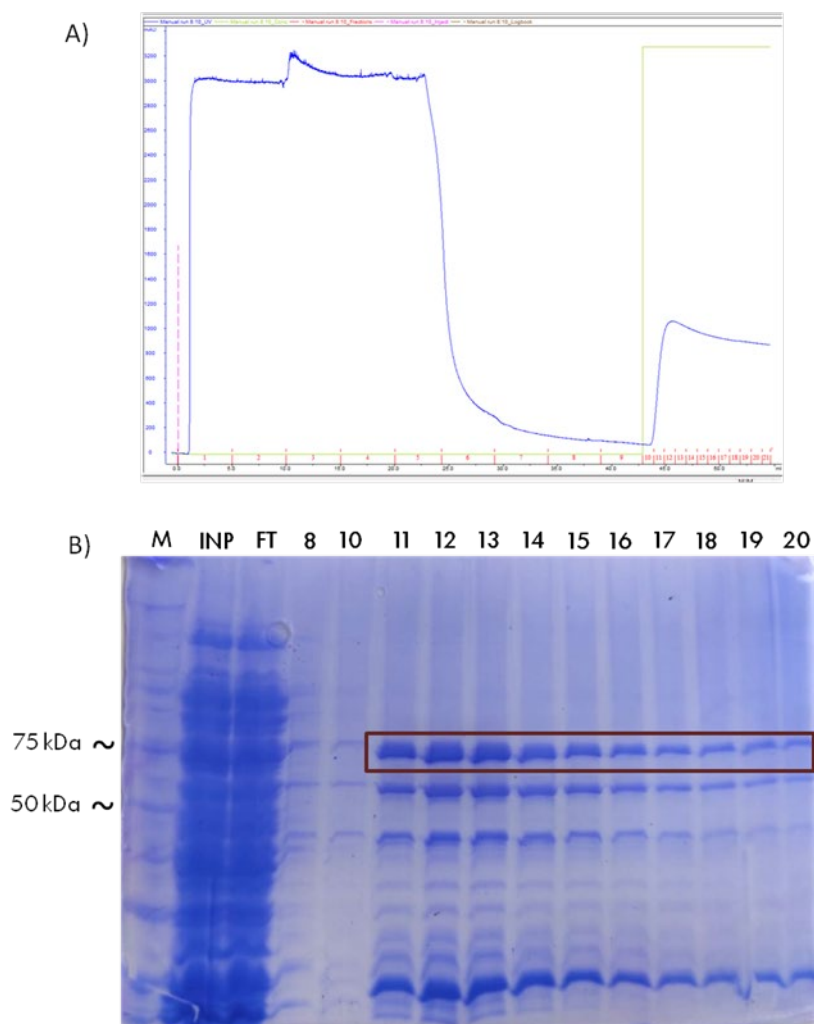


Εικόνα 82. Στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεάση 3C και τυχόν υπολείμματα *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* που φέρουν ακόμα την ετικέτα αγκιστείας, *GST-tag*. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα και στο B) η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η απόδοση της απομόνωσης είναι αρκετά χαμηλή αλλά τα κλάσματα 1-3 συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν.

4.3.3.2. Πρωτόκολλο καθαρισμού *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* No.2

Κατά το 2^ο πρωτόκολλο καθαρισμού της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* επιλέχθηκε σαν πρώτο στάδιο, πάλι η χρήση στήλης συγγένειας *Protino GST 4B* με την παραλλαγή όμως η πρωτεάση 3C να μην εισαχθεί εντός της στήλης αλλά να επωαστεί μαζί με το δείγμα μας μετά το πέρας του 1^{ου} σταδίου. Από το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B* [Εικόνα 83.A.] σε συνδυασμό της ανάλυσης των κλασμάτων σε *SDS-PAGE*

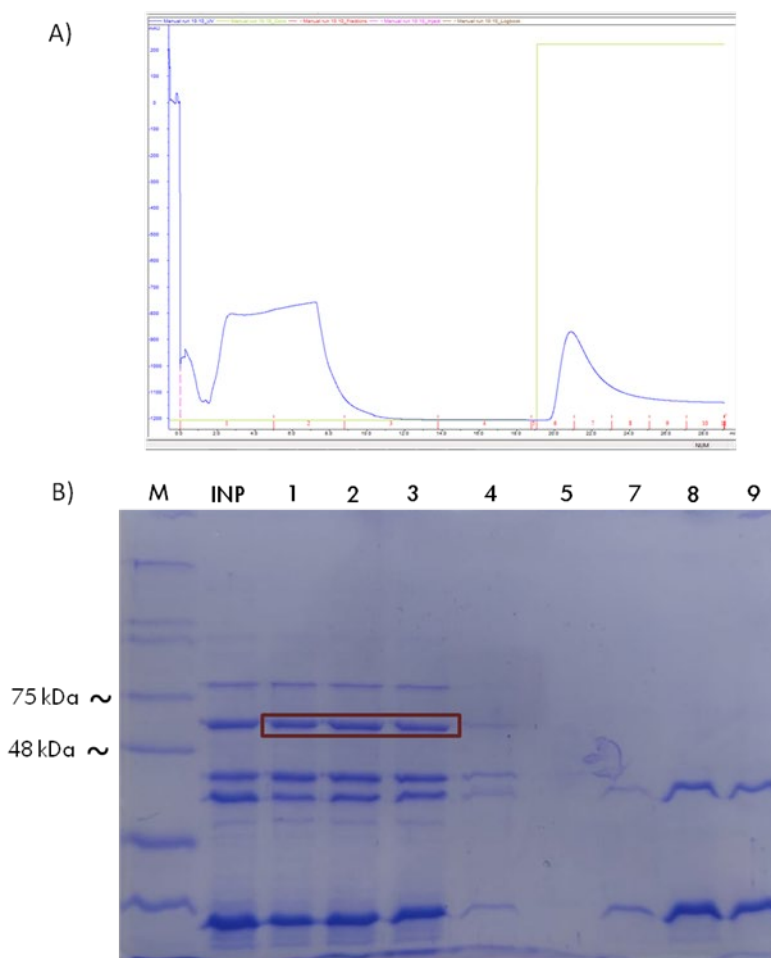
[Εικόνα 83.B.], επιλέχθηκαν τα κλάσματα 11-20 τα οποία υποβλήθηκαν σε διαπίδυση με ανάλογο διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί το *NaCl* και η *GSH* και ταυτόχρονα προστέθηκε και η πρωτεάση 3C.



Εικόνα 83. 1^ο στάδιο πρωτόκολλου καθαρισμού *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇ No.2*. Στο Α) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B* ενώ στο Β) απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Τα κλάσματα 11-20 συλλέχθηκαν και επωάστηκαν μαζί με την πρωτεάση 3C ώστε να απομακρυνθεί η ετικέτα αγκιστείας, *GST-tag*.

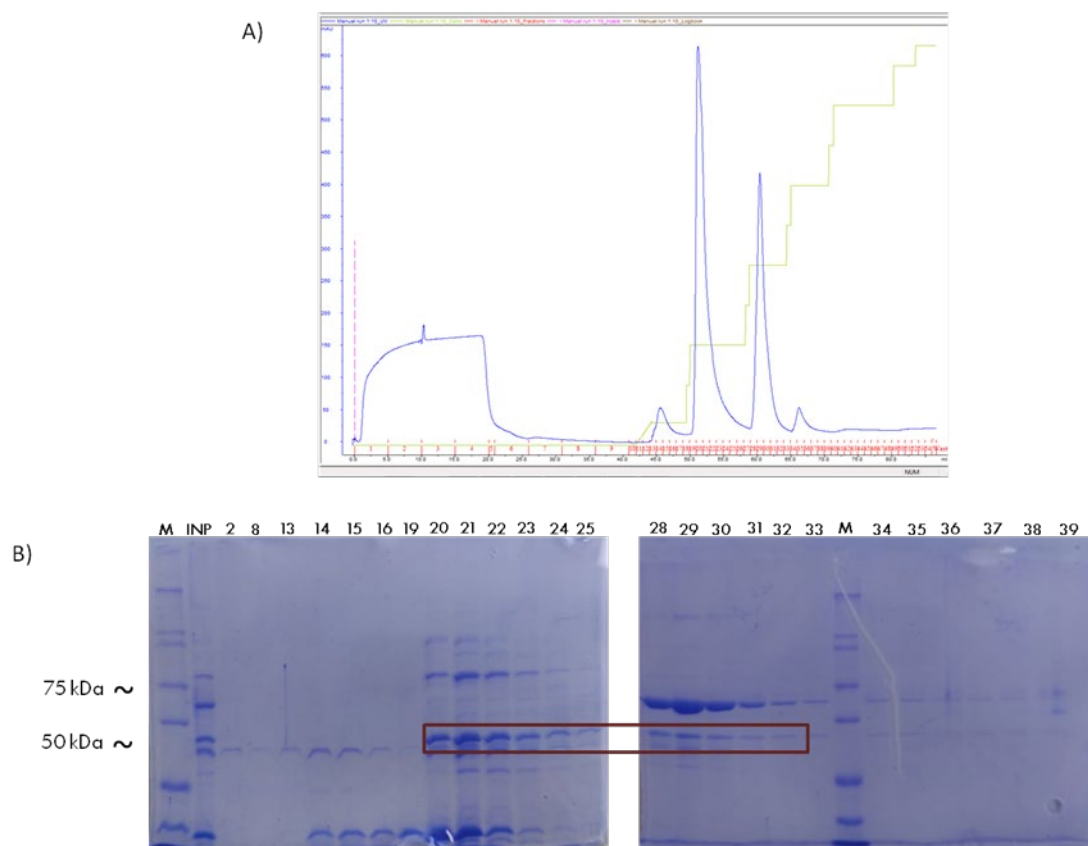
Μετά και το πέρας τουλάχιστον 16 h, το δείγμα μας εισήλθε ξανά σε στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεάση 3C και τυχόν υπολείμματα *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* που φέρουν ακόμα την ετικέτα αγκιστείας, *GST-tag*. Από το χρωματογράφημα της 2^{ης} στήλης *Protino GST 4B* [Εικόνα 84.A.] σε

συνδυασμό της ανάλυσης των δειγμάτων σε *SDS-PAGE* [Εικόνα 84.Β.], επιλέχθηκαν τα κλάσματα 1-3 τα οποία παρουσίασαν την καλύτερη εικόνα.



Εικόνα 84. Στήλη συγγένειας *Protino GST 4B* ώστε να απομακρυνθεί η πρωτεάση 3C και τυχόν υπολείμματα *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* που φέρουν ακόμα την ετικέτα αχιστείας, *GST-tag*. Στο Α) απεικονίζεται το χρωματογράφημα και στο Β) η πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

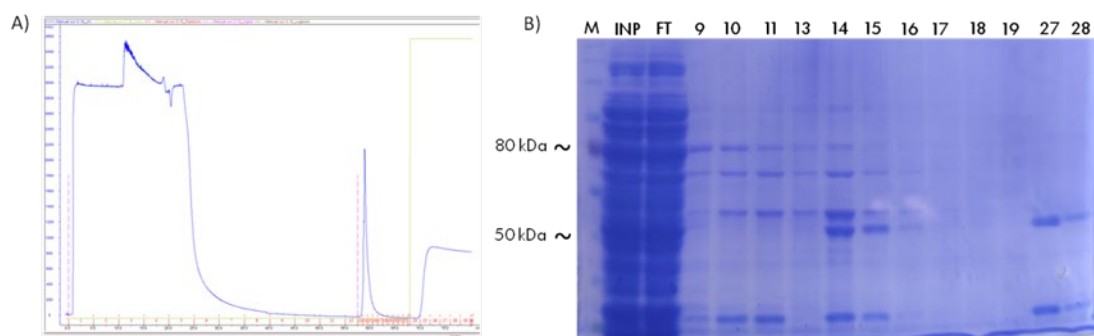
Τα κλάσματα του προηγούμενου σταδίου εισήλθαν σε στήλη ανιοανταλλαγής *Resource Q* [Εικόνα 85.Α.] κατά την οποία πραγματοποιήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος. Μέσω της ανάλυσης των κλασμάτων σε *SDS-PAGE* [Εικόνα 85.Β] ταυτοποιήθηκαν τα κλάσματα που φέρουν την επιθυμητή πρωτεΐνη αλλά επίσης έγινε ξεκάθαρο ότι το συγκεκριμένο πρωτόκολλο παρουσιάζει ακόμα πιο μειωμένη απόδοση στη απομόνωση και για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να μην επαναληφθεί.



Εικόνα 85. Στήλη ανισοανταλλαγής *Resource Q*. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα ενώ στο B) η πηκτή πολυακρυλαμίδιου. Η απόδοση της απομόνωσης είναι αρκετά μειωμένη.

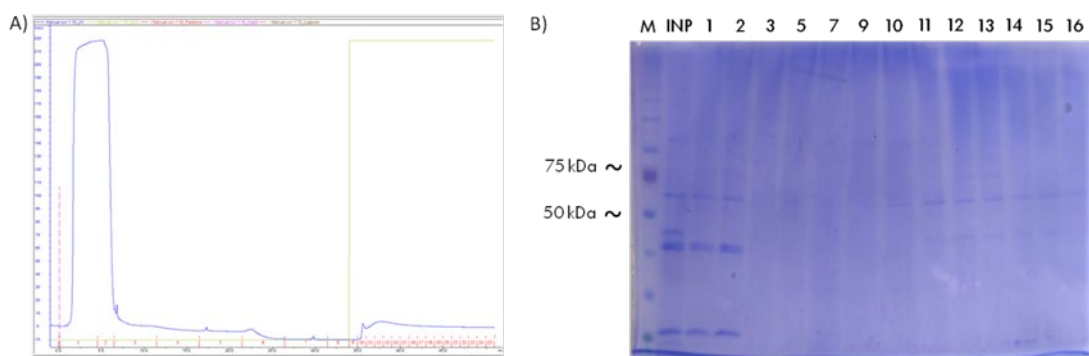
4.3.3.3. Πρωτόκολλο καθαρισμού *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* No.3

Στο 1^ο στάδιο του πρωτοκόλλου No.3, χρησιμοποιείται στήλη συγγένειας. Το κυτταρόλυμα εισήλθε στη στήλη *Protino GST 4B* [Εικόνα 86.A.] και ύστερα από έκπλυση προστέθηκε η πρωτεάση 3C. Εφόσον αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν για τουλάχιστον 16 h, η ροή της στήλης συνεχίστηκε και τα κλάσματα αναλύθηκαν σε *SDS-PAGE* [Εικόνα 86.B.].



Εικόνα 86. 1^ο στάδιο πρωτόκολλου καθαρισμού *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* No.3. Στο A) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης *Protino GST 4B*. Στο B) απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η απόδοση της απομόνωσης ήταν χαμηλή, τα κλάσματα όμως 13-17 συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο στάδιο.

Στα κλάσματα 13-17 του 1^{ου} σταδίου προστέθηκε CaCl_2 σε τελική συγκέντρωση 5 mM και χρησιμοποιήθηκε η στήλη *HiTrap Phenyl FF* [Εικόνα 87.A.]. Από την εικόνα της πηκτής πολυακρυλαμιδίου [Εικόνα 87.B.] φαίνεται ότι η απόδοση της απομόνωσης είναι χαμηλή, όμως τα κλάσματα 10-16 συλλέχθηκαν, πραγματοποιήθηκε διαπίδυση με κατάλληλο διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί το *EGTA* και στην συνέχεια συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν για περαιτέρω δοκιμές δραστηριότητας παρουσία Ca^{2+} .



Εικόνα 87. Τελικό στάδιο πρωτόκολλου καθαρισμού *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* No.3. Στο Α) απεικονίζεται το χρωματογράφημα της στήλης *HiTrap Phenyl FF*. Στο Β) απεικονίζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Η απόδοση της απομόνωσης ήταν χαμηλή, τα κλάσματα όμως 10-16 συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν και αποθηκεύτηκαν.

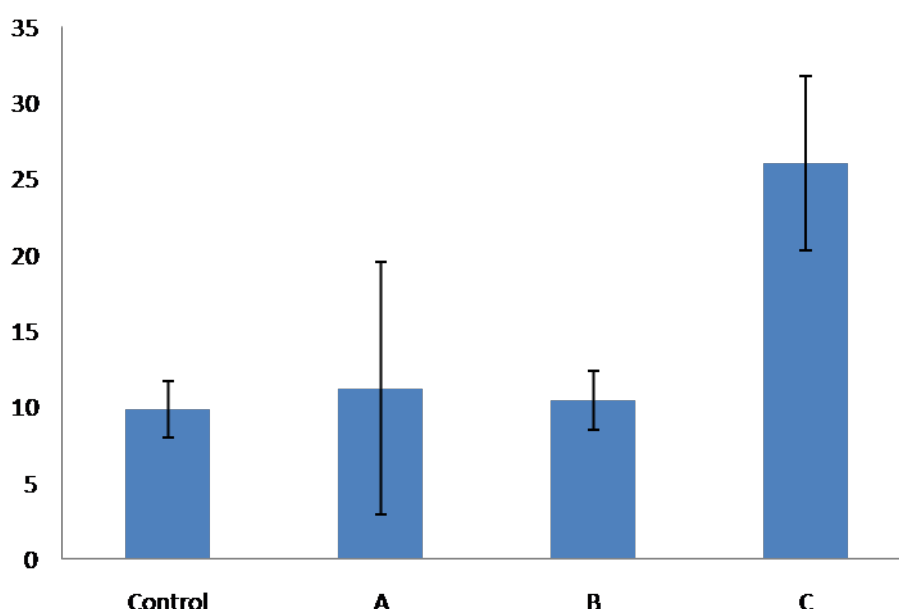
4.3.4. Έλεγχος δραστικότητας της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* παρουσία Ca^{2+}

Για να κριθεί η επιτυχία της κατασκευής μια ασβεστοεξαρτώμενης κινάσης, ήταν απαραίτητο να ελεγχθεί η δραστικότητά της παρουσία Ca^{2+} . Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο χημειοφωταύγειας που αναφέρεται αναλυτικά στην Ενότητα 3.3.4. και πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω 5 διαφορετικές αντιδράσεις:

- ✚ παρουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και απουσία ενζύμου, λειτουργεί ως το Τυφλό της πειραματικής διαδικασίας
- ✚ απουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου, λειτουργεί ως το Control της πειραματικής διαδικασίας
- ✚ παρουσία Mg^{2+} / απουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου,
- ✚ παρουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου
- ✚ απουσία Mg^{2+} / παρουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου.

Για κάθε αντίδραση έγιναν πολλαπλές επαναλήψεις και λήφθηκαν τα αποτελέσματα της χημειοφωταύγειας. Στην Εικόνα 88. απεικονίζεται το γράφημα των μέσων τιμών από το σήμα που λήφθηκε για κάθε διαφορετική αντίδραση. Αυτό που παρατηρείται είναι πως η επίδραση του Ca^{2+} στη δραστικότητα της πρωτεΐνης είναι σημαντική καθώς τη διπλασιάζει. Παράλληλα βλέπουμε και μία μικρή αύξηση

της δραστικότητας στην περίπτωση που η αντίδραση εκτελείται παρουσία μόνο Mg^{2+} ενώ στην περίπτωση που μέσα στην αντίδραση υπάρχουν και τα δύο, Mg^{2+} και Ca^{2+} , η δραστικότητα δεν έχει επηρεαστεί καθόλου καθώς είναι στα ίδια επίπεδα με του control. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί από το γεγονός ότι τα ιόντα Mg^{2+} έχουν υψηλότερη πυκνότητα φορτίου και δρουν ανταγωνιστικά ως προς τα ιόντα Ca^{2+} και ταυτόχρονα οδηγούν σε διαμορφωτικές αλλαγές, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται στα ιόντα Ca^{2+} να προσδεθούν στην πρωτεΐνη [289]. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η κατασκευή της νέας ασβεστοεξαρτώμενης κινάσης ήταν επιτυχής, καθώς η δραστικότητά της αυξάνεται παρουσία Ca^{2+} .



Εικόνα 88. Γράφημα για τον έλεγχο δραστικότητας της *CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇* παρουσία Ca^{2+} . Το A αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των αποτελεσμάτων της αντίδρασης που πραγματοποιείται παρουσία Mg^{2+} /απουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου. Το B αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται παρουσία Mg^{2+}/Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου. Το C αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των αποτελεσμάτων των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται απουσία Mg^{2+} /παρουσία Ca^{2+} και παρουσία ενζύμου.

Summary

The glycogen synthase kinases 3 family remains conserved throughout the eukaryotic evolution, from yeasts to plants and mammals. We studied the LjSK1 kinase of the *Lotus japonicus* plant, which is similar to the mammalian GSK3 and had previously been shown to be involved in nodule development. Purification of the enzyme was based on standard liquid protein chromatography methods and enzyme kinetics and mutagenesis studies were performed to compare LjSK1 with homologous mammalian kinases. Using a prime-phosphorylated peptide as substrate, LjSK1 showed optimal kinase activity at pH 8.0 and 20 °C, following Michaelis-Menten kinetics with kinetic parameters K_m and V_{max} , 8.2 μM and 111.6 $nmol/min/mg$ respectively, for ATP.

Site directed mutations were carried out and Lys167 was proven to be a key amino acid of the enzyme catalytic triad, while at the same time it was clarified that the residues related to the specificity of the substrate in the human enzyme, do not have the same key role in the regulation of the specificity of LjSK1. Additional studies performed on the truncated LjSK1₉₀₋₄₆₇, indicated a different regulatory mechanism of LjSK1, by proteolysis of a domain located in the N-terminus, as the removal of 89 residues almost doubled its catalytic efficiency. At the same time, the effect of Lupeol, Betulinic acid and Hederacoside C triterpenes on the activity of LjSK1 was studied, revealing a strong inhibition.

The 3D structure of LjSK1₉₀₋₄₆₇ was determined at 2.90 Å resolution, providing, for the first time, structural data for a plant GSK3 like kinase. Comparative structural analysis to the human GSK3 β homologue, revealed significant differences at the N- and C-termini of LjSK1₉₀₋₄₆₇, supporting the notion for a different regulatory mechanism in plant GSK3-like kinases. Similarly, structural similarities of important functional domains, such as the catalytic center and the ATP binding site, explain the similarity in the function of these two proteins.

We also evaluated the alteration of LjSK1 kinase activity in planta, by overexpressing mutant variants K167A and Y298A, as well as truncated LjSK1₉₀₋₄₆₇ in hairy roots of modified plants and a phenotype in nodulation and lateral root development was

verified. Finally, by employing synthetic biology techniques, a new synthetic calcium-dependent protein kinase, CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇, which carries functional domains of both LjSK1, and human calmodulin, was produced. The aim of this new protein was to have a protective effect against plant infestation. Kinetic studies with CALM-LjSK1₉₀₋₄₆₇ showed a significant increase of enzymatic activity in the presence of Ca²⁺.

Παράρτημα

Αλληλουχίες κατά Singer για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της κατασκευής των νέων πλασμιδίων.

Forward

```
100.0% identity in 181 residues overlap; Score: 938.0; Gap frequency: 0.0%

90-467      1 KIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQIITTAIGGRDGQPKQTISYMAERVVGTGSFG
LSK1       91 KIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQIITTAIGGRDGQPKQTISYMAERVVGTGSFG
          *****

90-467      61 VVFQAKCLETGEAVAIAKKVLQDKRYKNRELQVMRTVDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLN
LSK1      151 VVFQAKCLETGEAVAIAKKVLQDKRYKNRELQVMRTVDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLN
          *****

90-467      121 LVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLL
LSK1      211 LVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLL
          *****

90-467      181 V
LSK1      271 V
          *
```

Reverse

```
100.0% identity in 285 residues overlap; Score: 1544.0; Gap frequency: 0.0%

90-467      1 MRTVDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLY
LSK1      183 MRTVDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLY
          *****

90-467      61 IYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSR
LSK1      243 IYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSR
          *****

90-467      121 YYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLLGHPLFPGESGVDQLVEIHKVLGTPTREE
LSK1      303 YYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLLGHPLFPGESGVDQLVEIHKVLGTPTREE
          *****

90-467      181 IRCMNPYNEFKFPQIKAHPIHKVIFYKRMPEAVDLVSRLQYSPNLRCTALAAAHPPFF
LSK1      363 IRCMNPYNEFKFPQIKAHPIHKVIFYKRMPEAVDLVSRLQYSPNLRCTALAAAHPPFF
          *****

90-467      241 NDLRDPNASLPNGQPLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRIPEHARS
LSK1      423 NDLRDPNASLPNGQPLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRIPEHARS
          *****
```

Εικόνα 89. Αλληλούχιση κατά Singer για την επιβεβαίωση της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που φέρει την περικεκομμένη LjSK1₉₀₋₄₆₇. Μήτρα σύγκρισης BLOSUM62. Αριθμός υπολογισμένων αλληλουχίσεων 20. Ποινή ανοικτού κενού 12. Ποινή εκτεταμένου κενού 12.

Forward

100.0% identity in 258 residues overlap; Score: 1381.0; Gap frequency: 0.0%

```
139-467      1 MAERVVGTGSFGVVFQAKCLETGEAVAIAKKVLQDKRYKNRELQVMRTVDHPNIVKLKHC
LSK1         139 MAERVVGTGSFGVVFQAKCLETGEAVAIAKKVLQDKRYKNRELQVMRTVDHPNIVKLKHC
*****

139-467      61 FSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIG
LSK1         199 FSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIG
*****

139-467     121 VCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTT
LSK1        259 VCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTT
*****

139-467     181 AIDMWSVGCVLAELLGHPLFPGESGVDQLVEIIKVLGTPTREEIRCMNPHYNEFKFPQI
LSK1        319 AIDMWSVGCVLAELLGHPLFPGESGVDQLVEIIKVLGTPTREEIRCMNPHYNEFKFPQI
*****

139-467     241 KAHPWHKVFYKRMPEAV
LSK1        379 KAHPWHKVFYKRMPEAV
*****
```

Reverse

100.0% identity in 180 residues overlap; Score: 978.0; Gap frequency: 0.0%

```
139-467      1 MLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLGHPLFPGESGVDQ
LSK1         288 MLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLGHPLFPGESGVDQ
*****

139-467      61 LVEIIKVLGTPTREEIRCMNPHYNEFKFPQIKAHPWHKVFYKRMPEAVDLVSRLQYSP
LSK1         348 LVEIIKVLGTPTREEIRCMNPHYNEFKFPQIKAHPWHKVFYKRMPEAVDLVSRLQYSP
*****

139-467     121 NLRCTALAACAHPFFNDRDPNASLPNGQPLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRIPEHARS
LSK1        408 NLRCTALAACAHPFFNDRDPNASLPNGQPLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRIPEHARS
*****
```

Εικόνα 90. Αλληλούχηση κατά Singer για την επιβεβαίωση της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που φέρει την περικεκομμένη LJSK1₁₃₉₋₄₆₇. Μήτρα σύγκρισης BLOSUM62. Αριθμός υπολογισμένων αλληλουχίσεων 20. Ποινή ανοικτού κενού 12. Ποινή εκτεταμένου κενού 12.

Forward

100.0% identity in 323 residues overlap; Score: 1685.0; Gap frequency: 0.0%

```
CALM-LSK1_      1 MKIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQIITTAIGGRDGPQKQTISYMAERVVGTGSF
Seq_For         1 MKIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQIITTAIGGRDGPQKQTISYMAERVVGTGSF
                  *****

CALM-LSK1_     61 GVVFQAKCLETGEAIVAIKKVLQDKRYKNRELQVMRTVLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDT
Seq_For        61 GVVFQAKCLETGEAIVAIKKVLQDKRYKNRELQVMRTVLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDT
                  *****

CALM-LSK1_    121 ITTKELGTVMRSLGQNPTAEELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKDHPNIVKLKHC
Seq_For       121 ITTKELGTVMRSLGQNPTAEELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKDHPNIVKLKHC
                  *****

CALM-LSK1_    181 FFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVI
Seq_For       181 FFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVI
                  *****

CALM-LSK1_    241 GVCHRDIPQNLNLPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYT
Seq_For       241 GVCHRDIPQNLNLPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYT
                  *****

CALM-LSK1_    301 TAIDMWSVGCVLAEALLGHPLFP
Seq_For       301 TAIDMWSVGCVLAEALLGHPLFP
                  *****
```

Reverse

99.7% identity in 306 residues overlap; Score: 1646.0; Gap frequency: 0.0%

```
CALM-LSK1_    145 MINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVY
Seq_Rev        1 MINEVDADGNGTIDFREFLTMMARKDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVY
                  *****

CALM-LSK1_    205 KVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIPQNLNLPQTHQLKIC
Seq_Rev        61 KVSQYIRVHQHMPPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIPQNLNLPQTHQLKIC
                  *****

CALM-LSK1_    265 DFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAEALLGHPLFP
Seq_Rev       121 DFGSAKMLVPGEPNISYICSRYYRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAEALLGHPLFP
                  *****

CALM-LSK1_    325 ESGVDQLVEIIVKVLGTPTRREEIRCMNPHYNEFKFPQIKAHPWKVFYKRMPEAVDLVSR
Seq_Rev       181 ESGVDQLVEIIVKVLGTPTRREEIRCMNPHYNEFKFPQIKAHPWKVFYKRMPEAVDLVSR
                  *****

CALM-LSK1_    385 LLQYSPNLRCTALAACAHPFFNDLRDPNASLPNGQLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRLI
Seq_Rev       241 LLQYSPNLRCTALAACAHPFFNDLRDPNASLPNGQLPPLFNFTPEELAHAPDELRLRLI
                  *****

CALM-LSK1_    445 PEHARS
Seq_Rev       301 PEHARS
                  *****
```

Εικόνα 91. Αλληλούχηση κατά Singer για την επιβεβαίωση της κατασκευής του πλασμιδιακού φορέα που φέρει τη νέα συνθετική πρωτεΐνη CALM-LjSK1⁹⁰⁻⁴⁶⁷. Μήτρα σύγκρισης BLOSUM62. Αριθμός υπολογισμένων αλληλουχίσεων 20. Ποινή ανοικτού κενού 12. Ποινή εκτεταμένου κενού 12.

Βιβλιογραφία

1. Walsh, C.T., S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto, Jr., *Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(45): p. 7342-72.
2. Liu, Q., et al., *Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome*. Chem Biol, 2013. **20**(2): p. 146-59.
3. Ubersax, J.A. and J.E. Ferrell, Jr., *Mechanisms of specificity in protein phosphorylation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 530-41.
4. Cheetham, G.M., *Novel protein kinases and molecular mechanisms of autoinhibition*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(6): p. 700-5.
5. Kondapalli, L., K. Soltani, and M.E. Lacouture, *The promise of molecular targeted therapies: protein kinase inhibitors in the treatment of cutaneous malignancies*. J Am Acad Dermatol, 2005. **53**(2): p. 291-302.
6. <https://www.bellbrooklabs.com/how-does-a-biochemical-kinase-assay-work/>.
7. Shchemelinin, I., L. Sefc, and E. Necas, *Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases*. Folia Biol (Praha), 2006. **52**(3): p. 81-100.
8. Knighton, D.R., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. Science, 1991. **253**(5018): p. 407-14.
9. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
10. Blume-Jensen, P. and T. Hunter, *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
11. Cohen, P., *The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture*. Eur J Biochem, 2001. **268**(19): p. 5001-10.
12. Lahiry, P., et al., *Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 60-74.
13. Fehm, T., et al., *Prognostic significance of serum HER2 and CA 15-3 at the time of diagnosis of metastatic breast cancer*. Anticancer Res, 2004. **24**(3b): p. 1987-92.
14. Dar, A.C. and K.M. Shokat, *The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 769-95.
15. Knighton, D.R., et al., *Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase*. Science, 1991. **253**(5018): p. 414-20.
16. Cox, S., E. Radzio-Andzelm, and S.S. Taylor, *Domain movements in protein kinases*. Curr Opin Struct Biol, 1994. **4**(6): p. 893-901.
17. Bossemeyer, D., *Protein kinases--structure and function*. FEBS Lett, 1995. **369**(1): p. 57-61.
18. Taylor, S.S., et al., *Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1602): p. 2517-28.
19. Shaw, A.S., et al., *Kinases and pseudokinases: lessons from RAF*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(9): p. 1538-46.
20. Huse, M. and J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. Cell, 2002. **109**(3): p. 275-82.
21. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh, *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 661-75.
22. Endicott, J.A., M.E. Noble, and L.N. Johnson, *The structural basis for control of eukaryotic protein kinases*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 587-613.

23. Kobe, B. and B.E. Kemp, *Active site-directed protein regulation*. Nature, 1999. **402**(6760): p. 373-6.
24. Kobe, B. and B.E. Kemp, *Chapter 74 - Principles of Kinase Regulation*, in *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*, R.A. Bradshaw and E.A. Dennis, Editors. 2010, Academic Press: San Diego. p. 559-563.
25. Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. J Mol Biol, 1963. **6**: p. 306-29.
26. Kemp, B.E. and R.B. Pearson, *Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1094**(1): p. 67-76.
27. Dajani, R., et al., *Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition*. Cell, 2001. **105**(6): p. 721-32.
28. ter Haar, E., et al., *Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 593-6.
29. Kheifets, V. and D. Mochly-Rosen, *Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function*. Pharmacol Res, 2007. **55**(6): p. 467-76.
30. Bayliss, R., T. Haq, and S. Yeoh, *The Ys and wherefores of protein kinase autoinhibition*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1854**(10 Pt B): p. 1586-94.
31. Jeffrey, P.D., et al., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-20.
32. Modi, V. and R.L. Dunbrack, Jr., *Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(14): p. 6818-6827.
33. Spitaler, M., et al., *Unique structural and functional properties of the ATP-binding domain of atypical protein kinase C- ι* . J Biol Chem, 2000. **275**(43): p. 33289-96.
34. Hunter, T., *Why nature chose phosphate to modify proteins*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1602): p. 2513-6.
35. Ardito, F., et al., *The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review)*. Int J Mol Med, 2017. **40**(2): p. 271-280.
36. Chaffey, N., Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. *Molecular biology of the cell. 4th edn*. Annals of Botany, 2003. **91**(3): p. 401-401.
37. Kole, H.K., M. Abdel-Ghany, and E. Racker, *Specific dephosphorylation of phosphoproteins by protein-serine and -tyrosine kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(16): p. 5849-53.
38. Fukami, Y. and F. Lipmann, *Reversal of Rous sarcoma-specific immunoglobulin phosphorylation on tyrosine (ADP as phosphate acceptor) catalyzed by the src gene kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(7): p. 1872-6.
39. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(11): p. 407-12.
40. Zhang, Z.Y., *Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 209-34.
41. Stern, D.F., *Phosphoproteomics for oncology discovery and treatment*. Expert Opin Ther Targets, 2005. **9**(4): p. 851-60.
42. Brautigan, D.L., *Protein Ser/Thr phosphatases--the ugly ducklings of cell signalling*. FEBS J, 2013. **280**(2): p. 324-45.
43. Liu, Y. and M.R. Chance, *Integrating phosphoproteomics in systems biology*. Comput Struct Biotechnol J, 2014. **10**(17): p. 90-7.
44. Jin, J. and T. Pawson, *Modular evolution of phosphorylation-based signalling systems*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1602): p. 2540-55.
45. <https://raybiotech.com/learning-center/7-ways-to-study-protein-phosphorylation/>.

46. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 769-76.
47. Embi, N., D.B. Rylatt, and P. Cohen, *Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase*. Eur J Biochem, 1980. **107**(2): p. 519-27.
48. Grimes, C.A. and R.S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(4): p. 391-426.
49. Woodgett, J.R., *Judging a protein by more than its name: GSK-3*. Sci STKE, 2001. **2001**(100): p. re12.
50. Beurel, E., S.F. Grieco, and R.S. Jope, *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases*. Pharmacol Ther, 2015. **148**: p. 114-31.
51. Woodgett, J.R., *Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A*. Embo j, 1990. **9**(8): p. 2431-8.
52. Woodgett, J.R., *cDNA cloning and properties of glycogen synthase kinase-3*. Methods Enzymol, 1991. **200**: p. 564-77.
53. Rayasam, G.V., et al., *Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake*. Br J Pharmacol, 2009. **156**(6): p. 885-98.
54. Hoeflich, K.P., et al., *Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation*. Nature, 2000. **406**(6791): p. 86-90.
55. Ruel, L., et al., *Drosophila shaggy kinase and rat glycogen synthase kinase-3 have conserved activities and act downstream of Notch*. Nature, 1993. **362**(6420): p. 557-560.
56. Lee, H.C., et al., *Glycogen synthase kinase 3 alpha and 3 beta have distinct functions during cardiogenesis of zebrafish embryo*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 93.
57. Markou, T., et al., *Glycogen synthase kinases 3alpha and 3beta in cardiac myocytes: regulation and consequences of their inhibition*. Cell Signal, 2008. **20**(1): p. 206-18.
58. Mukai, F., et al., *Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta*. J Neurochem, 2002. **81**(5): p. 1073-83.
59. Siegfried, E., et al., *Putative protein kinase product of the Drosophila segment-polarity gene zeste-white3*. Nature, 1990. **345**(6278): p. 825-9.
60. Patel, P. and J.R. Woodgett, *Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways?* Curr Top Dev Biol, 2017. **123**: p. 277-302.
61. Swarup, S. and E.M. Verheyen, *Wnt/Wingless signaling in Drosophila*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
62. Ali, A., K.P. Hoeflich, and J.R. Woodgett, *Glycogen synthase kinase-3: properties, functions, and regulation*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2527-40.
63. Hubbard, S.R., et al., *Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 746-54.
64. Sicheri, F., I. Moarefi, and J. Kuriyan, *Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 602-9.
65. Xu, W., S.C. Harrison, and M.J. Eck, *Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 595-602.
66. Wang, Z., et al., *The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-A resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2327-32.
67. Zhang, F., et al., *Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 A resolution*. Nature, 1994. **367**(6465): p. 704-11.
68. Cole, A.R., et al., *GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50176-80.
69. Singh, K.K., *An emerging role for Wnt and GSK3 signaling pathways in schizophrenia*. Clin Genet, 2013. **83**(6): p. 511-7.

70. Frame, S., P. Cohen, and R.M. Biondi, *A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation*. Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1321-7.
71. Stamos, J.L., et al., *Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6*. Elife, 2014. **3**: p. e01998.
72. Patel, P. and J.R. Woodgett, *Chapter Eight - Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways?*, in *Current Topics in Developmental Biology*, A. Jenny, Editor. 2017, Academic Press. p. 277-302.
73. Jope, R.S. and G.V. Johnson, *The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(2): p. 95-102.
74. Goñi-Oliver, P., et al., *N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22406-13.
75. Goñi-Oliver, P., J. Avila, and F. Hernández, *Calpain-mediated truncation of GSK-3 in post-mortem brain samples*. J Neurosci Res, 2009. **87**(5): p. 1156-61.
76. Kandasamy, A.D. and R. Schulz, *Glycogen synthase kinase-3beta is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(4): p. 698-706.
77. Monteserin-Garcia, J., et al., *Sirt1 inhibits the transcription factor CREB to regulate pituitary growth hormone synthesis*. Faseb j, 2013. **27**(4): p. 1561-71.
78. Feijs, K.L., et al., *ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3β by mono-ADP-ribosylation*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 5.
79. Stadler, S.C., et al., *Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3β activates TGF-β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(29): p. 11851-6.
80. Beurel, E., *Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 18.
81. Beurel, E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1391-8.
82. Kwok, J.B., et al., *GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2005. **58**(6): p. 829-39.
83. Schaffer, B., M. Wiedau-Pazos, and D.H. Geschwind, *Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues*. Gene, 2003. **302**(1-2): p. 73-81.
84. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
85. Dominguez, I., K. Itoh, and S.Y. Sokol, *Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in Xenopus embryos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8498-502.
86. He, X., et al., *Glycogen synthase kinase-3 and dorsoventral patterning in Xenopus embryos*. Nature, 1995. **374**(6523): p. 617-22.
87. Parker, P.J., F.B. Caudwell, and P. Cohen, *Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle; effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo*. Eur J Biochem, 1983. **130**(1): p. 227-34.
88. Nüsslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
89. Hooper, J.E. and M.P. Scott, *Communicating with Hedgehogs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 306-17.
90. Østerlund, T. and P. Kogerman, *Hedgehog signalling: how to get from Smo to Ci and Gli*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(4): p. 176-80.
91. Jia, J., et al., *Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 548-52.

92. Han, X., J.H. Ju, and I. Shin, *Glycogen synthase kinase 3- β phosphorylates novel S/T-P-S/T domains in Notch1 intracellular domain and induces its nuclear localization*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(2): p. 282-8.
93. Jope, R.S., *Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 16.
94. Sachs, B.D., et al., *The effects of brain serotonin deficiency on behavioural disinhibition and anxiety-like behaviour following mild early life stress*. Int J Neuropsychopharmacol, 2013. **16**(9): p. 2081-94.
95. Beaulieu, J.M., et al., *Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1333-8.
96. Klein, P.S. and D.A. Melton, *A molecular mechanism for the effect of lithium on development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8455-9.
97. Stambolic, V., L. Ruel, and J.R. Woodgett, *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells*. Curr Biol, 1996. **6**(12): p. 1664-8.
98. Martinez, A. and D.I. Perez, *GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease?* J Alzheimers Dis, 2008. **15**(2): p. 181-91.
99. Phiel, C.J., et al., *GSK-3 α regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 435-9.
100. Himmelstein, D.S., et al., *Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease*. Pharmacol Ther, 2012. **136**(1): p. 8-22.
101. Mines, M.A., E. Beurel, and R.S. Jope, *Regulation of cell survival mechanisms in Alzheimer's disease by glycogen synthase kinase-3*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 861072.
102. Mines, M.A. and R.S. Jope, *Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 35.
103. De Sarno, P., et al., *Lithium prevents and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 338-45.
104. Beurel, E., S.M. Michalek, and R.S. Jope, *Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3)*. Trends Immunol, 2010. **31**(1): p. 24-31.
105. Leis, H., et al., *Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3 β during mouse skin tumorigenesis*. Mol Carcinog, 2002. **35**(4): p. 180-5.
106. Dembowy, J., et al., *Effect of glycogen synthase kinase-3 inactivation on mouse mammary gland development and oncogenesis*. Oncogene, 2015. **34**(27): p. 3514-26.
107. Garcea, G., et al., *Glycogen synthase kinase-3 β ; a new target in pancreatic cancer?* Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(3): p. 209-15.
108. Chin, D. and A.R. Means, *Calmodulin: a prototypical calcium sensor*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(8): p. 322-8.
109. Hoeflich, K.P. and M. Ikura, *Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms*. Cell, 2002. **108**(6): p. 739-42.
110. Klee, C.B. and T.C. Vanaman, *Calmodulin*. Adv Protein Chem, 1982. **35**: p. 213-321.
111. Kretsinger, R.H. and C.E. Nockolds, *Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description*. J Biol Chem, 1973. **248**(9): p. 3313-26.
112. LaPorte, D.C., B.M. Wierman, and D.R. Storm, *Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin*. Biochemistry, 1980. **19**(16): p. 3814-9.
113. Babu, Y.S., C.E. Bugg, and W.J. Cook, *Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution*. J Mol Biol, 1988. **204**(1): p. 191-204.
114. Ban, C., et al., *Structure of the recombinant Paramecium tetraurelia calmodulin at 1.68 Å resolution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1994. **50**(Pt 1): p. 50-63.

115. Ranty, B., D. Aldon, and J.P. Galaud, *Plant calmodulins and calmodulin-related proteins: multifaceted relays to decode calcium signals*. Plant Signal Behav, 2006. **1**(3): p. 96-104.
116. Fürstenberg-Hägg, J., M. Zagrobelny, and S. Bak, *Plant defense against insect herbivores*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(5): p. 10242-97.
117. de la Fuente van Bentem, S., et al., *Site-specific phosphorylation profiling of Arabidopsis proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis*. J Proteome Res, 2008. **7**(6): p. 2458-70.
118. Jonak, C. and H. Hirt, *Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions*. Trends Plant Sci, 2002. **7**(10): p. 457-61.
119. Saidi, Y., T.J. Hearn, and J.C. Coates, *Function and evolution of 'green' GSK3/Shaggy-like kinases*. Trends Plant Sci, 2012. **17**(1): p. 39-46.
120. Youn, J.H. and T.W. Kim, *Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways*. Mol Plant, 2015. **8**(4): p. 552-65.
121. Mao, J., et al., *Versatile Physiological Functions of Plant GSK3-Like Kinases*. 2021. **12**(5).
122. Kim, T.W., et al., *Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 419-22.
123. Khan, M., et al., *Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 2013. **288**(11): p. 7519-7527.
124. Pillitteri, L.J. and K.U. Torii, *Mechanisms of stomatal development*. Annu Rev Plant Biol, 2012. **63**: p. 591-614.
125. Lampard, G.R., C.A. Macalister, and D.C. Bergmann, *Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS*. Science, 2008. **322**(5904): p. 1113-6.
126. Gudesblat, G.E., et al., *SPEECHLESS integrates brassinosteroid and stomata signalling pathways*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(5): p. 548-54.
127. Houbaert, A., et al., *POLAR-guided signalling complex assembly and localization drive asymmetric cell division*. Nature, 2018. **563**(7732): p. 574-578.
128. Li, T., et al., *Brassinosteroids regulate root meristem development by mediating BIN2-UPB1 module in Arabidopsis*. 2020. **16**(7): p. e1008883.
129. Tsukagoshi, H., W. Busch, and P.N. Benfey, *Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root*. Cell, 2010. **143**(4): p. 606-16.
130. Cheng, Y., et al., *Brassinosteroids control root epidermal cell fate via direct regulation of a MYB-bHLH-WD40 complex by GSK3-like kinases*. Elife, 2014. **3**.
131. Wei, Z. and J. Li, *Brassinosteroids Regulate Root Growth, Development, and Symbiosis*. Mol Plant, 2016. **9**(1): p. 86-100.
132. Borassi, C., et al., *A cell surface arabinogalactan-peptide influences root hair cell fate*. 2020. **227**(3): p. 732-743.
133. Cho, H., et al., *A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 66-76.
134. Tamaki, T., S. Oya, and M. Naito, *VISUAL-CC system uncovers the role of GSK3 as an orchestrator of vascular cell type ratio in plants*. 2020. **3**(1): p. 184.
135. Kondo, Y., et al., *Plant GSK3 proteins regulate xylem cell differentiation downstream of TDIF-TDR signalling*. Nature Communications, 2014. **5**(1): p. 3504.
136. Han, S., et al., *BIL1-mediated MP phosphorylation integrates PXY and cytokinin signalling in secondary growth*. 2018. **4**(8): p. 605-614.

137. To, J.P., et al., *Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling*. Plant Cell, 2004. **16**(3): p. 658-71.
138. Li, J., et al., *A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis*. Science, 1996. **272**(5260): p. 398-401.
139. Jonak, C., E. Heberle-Bors, and H. Hirt, *Inflorescence-specific expression of AtK-1, a novel Arabidopsis thaliana homologue of shaggy/glycogen synthase kinase-3*. Plant Mol Biol, 1995. **27**(1): p. 217-21.
140. Dornelas, M.C., A.A. Van Lammeren, and M. Kreis, *Arabidopsis thaliana SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development*. Plant J, 2000. **21**(5): p. 419-29.
141. Tian, H. and S. Wang, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1, a Key Regulator in Plants with Multiple Roles and Multiple Function Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(14).
142. Chen, Y. and S. Song, *SHAGGY-like kinase 12 regulates flowering through mediating CONSTANS stability in Arabidopsis*. 2020. **6**(24): p. eaaw0413.
143. Claisse, G., B. Charrier, and M. Kreis, *The Arabidopsis thaliana GSK3/Shaggy like kinase AtSK3-2 modulates floral cell expansion*. Plant Mol Biol, 2007. **64**(1-2): p. 113-24.
144. Li, Z. and Y. He, *Roles of Brassinosteroids in Plant Reproduction*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
145. Decroocq-Ferrant, V., et al., *Petunia hybrida homologues of shaggy/zeste-white 3 expressed in female and male reproductive organs*. Plant J, 1995. **7**(6): p. 897-911.
146. Tichtinsky, G., et al., *An evolutionary conserved group of plant GSK-3/shaggy-like protein kinase genes preferentially expressed in developing pollen*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1442**(2-3): p. 261-73.
147. Einzenberger, E., et al., *Isolation and expression during pollen development of a tobacco cDNA clone encoding a protein kinase homologous to shaggy/glycogen synthase kinase-3*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1260**(3): p. 315-9.
148. Pay, A., et al., *The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shaggy/glycogen synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and development*. Plant J, 1993. **3**(6): p. 847-56.
149. Hu, Z., et al., *A Novel QTL qTGW3 Encodes the GSK3/SHAGGY-Like Kinase OsGSK5/OsSK41 that Interacts with OsARF4 to Negatively Regulate Grain Size and Weight in Rice*. Mol Plant, 2018. **11**(5): p. 736-749.
150. Che, R., et al., *Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses*. Nat Plants, 2015. **2**: p. 15195.
151. Hughes, P.W., *Round Effects: Tasg-D1 Is Responsible for Grain Shape in Indian Dwarf Wheat*. Plant Cell, 2020. **32**(4): p. 789-790.
152. Zeng, J. and M.S. Haider, *Functional Characterization of VvSK Gene Family in Grapevine (Vitis vinifera L.) Revealing their Role in Berry Ripening*. 2020. **21**(12).
153. Verma, S., S. Nizam, and P. Verma, *Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants*. 2013. p. 25-49.
154. Gull, A., Ahmad Lone, A., & Ul Islam Wani, N. (2019). *Biotic and Abiotic Stresses in Plants. Abiotic and Biotic Stress in Plants*.
155. Piao, H.L., et al., *An Arabidopsis GSK3/shaggy-Like Gene That Complements Yeast Salt Stress-Sensitive Mutants Is Induced by NaCl and Absciscic Acid*. Plant Physiology, 1999. **119**(4): p. 1527-1534.
156. Piao, H.L., et al., *Constitutive over-expression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis*. Plant J, 2001. **27**(4): p. 305-14.

157. Charrier, B., et al., *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Plant Physiol, 2002. **130**(2): p. 577-90.
158. De Rybel, B., et al., *Chemical inhibition of a subset of Arabidopsis thaliana GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling*. Chem Biol, 2009. **16**(6): p. 594-604.
159. Dal Santo, S., et al., *Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis*. Plant Cell, 2012. **24**(8): p. 3380-92.
160. Esposito, S., *Nitrogen Assimilation, Abiotic Stress and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: The Full Circle of Reductants*. Plants (Basel), 2016. **5**(2).
161. Thitisaksakul, M., et al., *Overexpression of GSK3-like Kinase 5 (OsGSK5) in rice (Oryza sativa) enhances salinity tolerance in part via preferential carbon allocation to root starch*. Funct Plant Biol, 2017. **44**(7): p. 705-719.
162. Kempa, S., et al., *A plastid-localized glycogen synthase kinase 3 modulates stress tolerance and carbohydrate metabolism*. Plant J, 2007. **49**(6): p. 1076-90.
163. Zhang, C., et al., *Isolation and characterization of a novel glycogen synthase kinase-3 gene, GmGSK, in Glycine max L. that enhances abiotic stress tolerance in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(6): p. 861-6.
164. Christov, N.K., et al., *TaSK5, an abiotic stress-inducible GSK3/shaggy-like kinase from wheat, confers salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis*. Plant Physiol Biochem, 2014. **84**: p. 251-260.
165. Koh, S., et al., *T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses*. Plant Mol Biol, 2007. **65**(4): p. 453-66.
166. Huang, S.H., et al., *Genome-wide identification and expression analysis of the GSK gene family in Solanum tuberosum L. under abiotic stress and phytohormone treatments and functional characterization of StSK21 involvement in salt stress*. Gene, 2021. **766**: p. 145156.
167. Yang, Y. and Y. Guo, *Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses*. New Phytol, 2018. **217**(2): p. 523-539.
168. Jiang, H., et al., *GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates RD26 to potentiate drought signaling in Arabidopsis*. 2019. **100**(5): p. 923-937.
169. Li, R., et al., *Mulberry (Morus alba) MmSK gene enhances tolerance to drought stress in transgenic mulberry*. Plant Physiol Biochem, 2018. **132**: p. 603-611.
170. Qiu, A., et al., *CaSK23, a Putative GSK3/SHAGGY-Like Kinase of Capsicum annuum, Acts as a Negative Regulator of Pepper's Response to Ralstonia solanacearum Attack*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
171. Wrzaczek, M., W. Rozhon, and C. Jonak, *A Proteasome-regulated glycogen synthase kinase-3 modulates disease response in plants*. J Biol Chem, 2007. **282**(8): p. 5249-55.
172. Stampfl, H., M. Fritz, and S. Dal Santo, *The GSK3/Shaggy-Like Kinase ASK α Contributes to Pattern-Triggered Immunity*. 2016. **171**(2): p. 1366-77.
173. Garagounis, C., et al., *Lotus SHAGGY-like kinase 1 is required to suppress nodulation in Lotus japonicus*. Plant J, 2019. **98**(2): p. 228-242.
174. He, C., et al., *GSK3-mediated stress signaling inhibits legume-rhizobium symbiosis by phosphorylating GmNSP1 in soybean*. Mol Plant, 2021. **14**(3): p. 488-502.
175. Hirakawa, Y., et al., *Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15208-13.
176. Yang, C.J., et al., *The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development*. Mol Plant, 2011. **4**(4): p. 588-600.

177. Gudesblat, G.E. and E. Russinova, *Plants grow on brassinosteroids*. Curr Opin Plant Biol, 2011. **14**(5): p. 530-7.
178. Li, J., et al., *Conservation of function between mammalian and plant steroid 5alpha-reductases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3554-9.
179. Li, J. and J. Chory, *A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase Involved in Brassinosteroid Signal Transduction*. Cell, 1997. **90**(5): p. 929-938.
180. Li, J. and K.H. Nam, *Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase*. Science, 2002. **295**(5558): p. 1299-301.
181. Wang, Z.Y., et al., *Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 505-13.
182. Yin, Y., et al., *BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation*. Cell, 2002. **109**(2): p. 181-91.
183. He, J.X., et al., *The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10185-90.
184. Sun, Y., et al., *Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis*. Dev Cell, 2010. **19**(5): p. 765-77.
185. Peng, P., et al., *Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation*. Mol Plant, 2008. **1**(2): p. 338-46.
186. Ingham, P.W., Y. Nakano, and C. Seger, *Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(6): p. 393-406.
187. Planas-Riverola, A., et al., *Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress*. Development, 2019. **146**(5).
188. Zhao, J., et al., *Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling*. Plant Physiol, 2002. **130**(3): p. 1221-9.
189. Peng, P., et al., *A direct docking mechanism for a plant GSK3-like kinase to phosphorylate its substrates*. J Biol Chem, 2010. **285**(32): p. 24646-53.
190. Forde, J.E. and T.C. Dale, *Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(15): p. 1930-44.
191. Kaidanovich-Beilin, O. and J.R. Woodgett, *GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 40.
192. Youn, J.H., et al., *Structural and functional characterization of Arabidopsis GSK3-like kinase AtSK12*. Mol Cells, 2013. **36**(6): p. 564-70.
193. USDA, Agricultural Research Service, *National Plant Germplasm System. 2021. Germplasm Resources Information Network (GRIN Taxonomy). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.*
194. A.J. Márquez (ed.), *Lotus japonicus Handbook*, 3-24., 2005 Springer.
195. Jiang, Q. and P.M. Gresshoff, *Classical and molecular genetics of the model legume Lotus japonicus*. Mol Plant Microbe Interact, 1997. **10**(1): p. 59-68.
196. Hayashi, M., Tansengco, M. L., Suganuma, N., Szczyglowski, K., Krusell, L., Ott, T., Udvardi, M., *Methods for studying nodule development and function, Lotus japonicus handbook*, A.J. MÁRQUEZ.
197. By Ninjaticoshell - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7382248>.
198. Oldroyd, G.E., et al., *The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis*. Annu Rev Genet, 2011. **45**: p. 119-44.

199. Sulieman, S. and L.S. Tran, *Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: metabolism and regulatory mechanisms*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 19389-93.
200. *Symbiotic Nitrogen Fixation*. (2021, January 1). Tufts University & Harvard. <https://bio.libretexts.org/@go/page/5822>.
201. Dénarié, J., F. Debellé, and J.C. Promé, *Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 503-35.
202. Long, S.R., *Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective*. The Plant Cell, 1996. **8**(10): p. 1885-1898.
203. Oláh, B., et al., *Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in Medicago truncatula via the DMI1/DMI2 signalling pathway*. Plant J, 2005. **44**(2): p. 195-207.
204. Singh, P., et al., *A Deeper Insight into the Symbiotic Mechanism of Rhizobium spp. from the Perspective of Secondary Metabolism*. 2019. p. 265-291.
205. Mus, F., et al., *Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(13): p. 3698-3710.
206. Stougaard, J., *Lotus japonicus: A Model Plant for the Legume Family*. 2017.
207. Zgadzaj, R., et al., *Root nodule symbiosis in Lotus japonicus drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(49): p. E7996-e8005.
208. Lorite, M.J., et al., *The Rhizobia-Lotus Symbioses: Deeply Specific and Widely Diverse*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2055.
209. Parniske, M., *Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(10): p. 763-775.
210. Lohar, D.P. and D.M. Bird, *Lotus japonicus: a new model to study root-parasitic nematodes*. Plant Cell Physiol, 2003. **44**(11): p. 1176-84.
211. Parniske, M., *Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease?* Curr Opin Plant Biol, 2000. **3**(4): p. 320-8.
212. Lindberg Møller, B & Seigler, DS 1998, *Biosynthesis of cyanogenic glycosides, cyanolipids, and related compounds*. in BK Singh (ed.), *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. Marcel Dekker, New York, Books in soils, plants and the environment, vol. 69, pp. 563-609.
213. Zagrobelny, M., et al., *Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions*. Phytochemistry, 2004. **65**(3): p. 293-306.
214. Pichersky, E. and J. Gershenzon, *The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense*. Curr Opin Plant Biol, 2002. **5**(3): p. 237-43.
215. Morris, P., et al., *Distribution of condensed tannins in flowering plants of Lotus corniculatus var. japonicus and tannin accumulation by transformed root cultures*. Lotus Newsletter, 1993. **24**: p. 60-63.
216. Robertson, J., *Historical atlas of crystallography edited by J. Lima-de-Faria*. Acta Crystallographica Section B, 1992. **48**(3): p. 339-340.
217. Perrakis, A. and T.K. Sixma, *AI revolutions in biology: The joys and perils of AlphaFold*. 2021. **22**(11): p. e54046.
218. Γλυκός NM. Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών.
219. Durbin, S.D. and G. Feher, *PROTEIN CRYSTALLIZATION*. Annual Review of Physical Chemistry, 1996. **47**(1): p. 171-204.
220. Heldt, C. *Constraint-based methods for phasing in crystallography*. 2010.
221. Silverstein, T.P., *Principles of Physical Biochemistry (van Holde, Kersal E.; Johnson, W. Curtis; Ho, P. Shing)*. Journal of Chemical Education, 1999. **76**(4): p. 474.

222. McPherson, A. and J.A. Gavira, *Introduction to protein crystallization*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014. **70**(Pt 1): p. 2-20.
223. Ferré-D'Amaré, A.R., *Crystallization of Biological Macromolecules*, by Alexander McPherson. 1999. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hardcover, 586 pp. \$97. RNA, 1999. **5**(7): p. 847-848.
224. Chayen, N.E., *Turning protein crystallisation from an art into a science*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(5): p. 577-83.
225. <https://research.csiro.au/crystal/user-guide/soluble-proteins/c3-vapour-diffusion/>.
226. Bergfors, T., *Seeds to crystals*. Journal of Structural Biology, 2003. **142**(1): p. 66-76.
227. Junius, N., et al., *A crystallization apparatus for temperature-controlled flow-cell dialysis with real-time visualization*. J Appl Crystallogr, 2016. **49**(Pt 3): p. 806-813.
228. Russo Krauss, I., et al., *An overview of biological macromolecule crystallization*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 11643-91.
229. Gao, W., *The Fabrication of Structurally Coloured Textile Materials Using Uniform Spherical Silica Nanoparticles*. 2016.
230. https://health.uconn.edu/bioinformatics/wp-content/uploads/sites/162/2017/12/XRayDiffraction_2016.pdf.
231. Britannica, T.E.o.E.M.i.E.B., February 1, 2018. <https://www.britannica.com/science/Miller-indices>.
232. Waesermann, N., *Structural transformations in complex perovskite-type relaxor and relaxor-based ferroelectrics at high pressures and temperatures*. 2012.
233. Hunter, S., *A structural and reactivity study of lithium molybdenum nitride*. 2022.
234. Κωνσταντίνος Α. Καβούνης, Ε.σ.κ., Εκδόσεις Σοφία.
235. Wlodawer, A., et al., *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures*. The FEBS Journal, 2008. **275**(1): p. 1-21.
236. Jedrzejczak, R., et al., *Structure of DraD invasin from uropathogenic Escherichia coli: a dimer with swapped beta-tails*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2006. **62**(Pt 2): p. 157-64.
237. Blow, D.M.O.o.c.f.b.O.U.P., Oxford. 248 pp.
238. McRee, D.E.P.p.c.S.e.A.P., San Diego. 477 pp.
239. Arkhipova, V., A. Guskov, and D.-J. Slotboom, *Analysis of the quality of crystallographic data and the limitations of structural models*. Journal of General Physiology, 2017. **149**(12): p. 1091-1103.
240. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
241. Daber, R., et al., *Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors*. J Mol Biol, 2007. **370**(4): p. 609-19.
242. Mónico, A., et al., *Drawbacks of Dialysis Procedures for Removal of EDTA*. 2017. **12**(1): p. e0169843.
243. Pham, V.C., et al., *Chapter Fourteen - Complementary Methods for the Identification of Substrates of Proteolysis*, in *Methods in Enzymology*, A. Ashkenazi, J. Yuan, and J.A. Wells, Editors. 2014, Academic Press. p. 359-380.
244. AB., H.-S.E.C.P.a.M.G.H.B.-S.
245. Harper, S. and D.W. Speicher, *Purification of proteins fused to glutathione S-transferase*. Methods Mol Biol, 2011. **681**: p. 259-80.
246. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
247. 2007., H.G.A.C.-P.a.M.

248. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
249. Beta, R.A.A., et al., *Biochemical and in silico identification of the active site and the catalytic mechanism of the circadian deadenylase HESPERIN*. FEBS Open Bio. **n/a**(n/a).
250. https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/In/In-Fusion%20HD%20Cloning%20Kit%20User%20Manual_102518.pdf.
251. Knape, M.J., et al., *Divalent metal ions control activity and inhibition of protein kinases*. Metallomics, 2017. **9**(11): p. 1576-1584.
252. Proß, S., et al., *Modeling a bacterium's life: a Petri-net library in Modelica*. 2009.
253. Leatherbarrow, R.J., GraFit version 4.06. Erithacus Software Ltd Staines, 1998.
254. Majumder, S., A. Ghosh, and M. Bhattacharya, *Natural anti-inflammatory terpenoids in Camellia japonica leaf and probable biosynthesis pathways of the metabolome*. Bulletin of the National Research Centre, 2020. **44**(1): p. 141.
255. Chowdhury, A.R., et al., *Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives*. Med Sci Monit, 2002. **8**(7): p. Br254-65.
256. By Ed (Edgar181) - Own work, P.D., <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14669605>.
257. Public Domain, h.c.w.o.w.i.p.c.
258. <https://www.chemfaces.com/natural/Hederacoside-C-CFN90183.html>.
259. Keegan, R.M. and M.D. Winn, *Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2007. **63**(Pt 4): p. 447-57.
260. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-55.
261. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
262. Landy, A., *Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 913-49.
263. Katzen, F., *Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system*. Expert Opin Drug Discov, 2007. **2**(4): p. 571-89.
264. Maekawa, T., et al., *Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in Lotus japonicus*. Mol Plant Microbe Interact, 2008. **21**(4): p. 375-82.
265. Potter, H., *Transfection by electroporation*. Curr Protoc Mol Biol, 2003. **Chapter 9**: p. Unit 9.3.
266. Delis, C., et al., *Role of lupeol synthase in Lotus japonicus nodule formation*. New Phytologist, 2011. **189**(1): p. 335-346.
267. Kumagai, H., et al., *RNAi knock-down of ENOD40s leads to significant suppression of nodule formation in Lotus japonicus*. Plant Cell Physiol, 2006. **47**(8): p. 1102-11.
268. Kumagai, H. and H. Kouchi, *Gene silencing by expression of hairpin RNA in Lotus japonicus roots and root nodules*. Mol Plant Microbe Interact, 2003. **16**(8): p. 663-8.
269. Maeda, D., et al., *Knockdown of an Arbuscular Mycorrhiza-inducible Phosphate Transporter Gene of Lotus japonicus Suppresses Mutualistic Symbiosis*. Plant and Cell Physiology, 2006. **47**(7): p. 807-817.
270. <https://international.neb.com/protocols/2014/11/26/nebuilder-hifi-dna-assembly-reaction-protocol>.

271. Korbie, D.J. and J.S. Mattick, *Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification*. Nature Protocols, 2008. **3**(9): p. 1452-1456.
272. Lorch, M., et al., *Effects of mutations on the thermodynamics of a protein folding reaction: implications for the mechanism of formation of the intermediate and transition states*. Biochemistry, 2000. **39**(12): p. 3480-5.
273. Prabantu, V.M., N. Naveenkumar, and N. Srinivasan, *Influence of Disease-Causing Mutations on Protein Structural Networks*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021. **7**.
274. Knape, M.J., et al., *Divalent Metal Ions Mg²⁺ and Ca²⁺ Have Distinct Effects on Protein Kinase A Activity and Regulation*. ACS Chemical Biology, 2015. **10**(10): p. 2303-2315.
275. Hadzipasic, A. and C. Wilson, *Ancient origins of allosteric activation in a Ser-Thr kinase*. 2020. **367**(6480): p. 912-917.
276. Ma, S., et al., *Site-specific phosphorylation protects glycogen synthase kinase-3 β from calpain-mediated truncation of its N and C termini*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 22521-32.
277. Jin, N., et al., *C-terminal truncation of GSK-3 β enhances its dephosphorylation by PP2A*. FEBS Letters, 2017. **591**(7): p. 1053-1063.
278. Azoulay-Alfaguter, I., et al., *Distinct molecular regulation of glycogen synthase kinase-3 α isozyme controlled by its N-terminal region: functional role in calcium/calpain signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13470-80.
279. Goñi-Oliver, P., J. Avila, and F. Hernández, *Calpain regulates N-terminal interaction of GSK-3 β with 14-3-3 ζ , p53 and PKB but not with axin*. Neurochemistry International, 2011. **59**(2): p. 97-100.
280. Kandasamy, A.D. and R. Schulz, *Glycogen synthase kinase-3 β is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts*. Cardiovascular Research, 2009. **83**(4): p. 698-706.
281. Bertrand, J.A., et al., *Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors*. J Mol Biol, 2003. **333**(2): p. 393-407.
282. Adams, J.A., *Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2271-90.
283. Prati, F., et al., *Optimization of Indazole-Based GSK-3 Inhibitors with Mitigated hERG Issue and In Vivo Activity in a Mood Disorder Model*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2020. **11**(5): p. 825-831.
284. Wagner, F.F., et al., *Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3 with Exquisite Kinome-Wide Selectivity and Their Functional Effects*. ACS Chemical Biology, 2016. **11**(7): p. 1952-1963.
285. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**(1): p. 235-242.
286. Aoki, M., et al., *Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β* . Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 3): p. 439-46.
287. Steinberg, S.F., *Post-translational modifications at the ATP-positioning G-loop that regulate protein kinase activity*. Pharmacological Research, 2018. **135**: p. 181-187.
288. Taylor, S.S., H.S. Meharena, and A.P. Kornev, *Evolution of a dynamic molecular switch*. 2019. **71**(6): p. 672-684.
289. Jing, Z., et al., *Many-body effect determines the selectivity for Ca²⁺ and Mg²⁺ in proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(32): p. E7495-E7501.