



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
& ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Εργαστήριο Δομικής και
Λειτουργικής Βιοχημείας

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ
ΓΙΑ ΤΗΝ
ΠΕΡΙΚΕΚΟΜΜΕΝΗ
ΚΙΝΑΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ
LOTUS JAPONICUS
ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ
ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ 3-B

Μπόμπας Χαράλαμπος
ΛΑΡΙΣΑ, 2019



ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ
ΤΗΝ ΠΕΡΙΚΕΚΟΜΜΕΝΗ ΚΙΝΑΣΗ
ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ LOTUS JAPONICUS
ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ
ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ 3-B

PLASMID CONSTRUCTION FOR THE
TRUNCATED KINASE OF LOTUS
JAPONICUS HOMOLOGOUS TO
THE HUMAN GLYCOGEN KINASE
SYNTHASE 3-B

ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΙΚΕΚΟΜΜΕΝΗ
ΚΙΝΑΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ LOTUS JAPONICUS ΟΜΟΛΟΓΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΙΝΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ 3-
B

ΟΝΟΜΑ: ΜΠΟΜΠΑΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ, ΤΜΗΜΑ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

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

Περιεχόμενα

1.1 Τα ψυχανθή.....	8
1.2 Το φυτό μοντέλο <i>Lotus japonicus</i>	9
1.3 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση	10
1.4 Η κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (<i>GSK3</i>).....	11
1.4.1 Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3-β (<i>GSK3β</i>).....	12
1.4.2: Η δομή της Κινάσης της Συνθάσης του Γλυκογόνου 3-β (<i>GSK3β</i>)	14
1.4.3 Ρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3-β (<i>GSK3β</i>)	15
1.5 Οι <i>SHAGGY-like</i> κινάσες των φυτών.....	16
1.5.1 Οι <i>SHAGGY-like</i> κινάσες στο φυτό <i>Lotus japonicus</i>	18
1.5.2 Η <i>Lj-GSK3β</i>	19
1.5.3 Η περικεκομμένη <i>Lj-GSK3β</i>	20
3.1 Υλικά.....	23
3.1.1 Αντιδραστήρια	23
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη	24
3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς.....	25
3.1.4 Χρωματογραφία	26
3.2 Όργανα	26
3.3 Θρεπτικά μέσα.....	27
3.4 Παρασκευαστικές μέθοδοι	27
3.4.1 Κλωνοποίηση.....	27
3.4.1.1 Τεχνικές κλωνοποίησης	27
3.4.1.2 Μέθοδος <i>In-Fusion</i>	28
3.4.1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (<i>PCR</i>).....	32
3.4.1.5 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	34
3.4.1.6 Εξαγωγή και καθαρισμός <i>DNA</i> από πήκτωμα αγαρόζης (<i>gel extraction</i>).....	34
3.4.1.7 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού.....	35
3.4.1.8 Μετασχηματισμός Βακτηρίων <i>E. coli XL1-Blue</i> με ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα.....	35
3.4.1.8 Απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (<i>MiniPrep</i>).....	36
3.4.2 Μελέτες έκφρασης της <i>Lj-GSK3β</i> ₉₃₋₄₆₇	36
3.4.2.1 Επαγωγή υπερέκφρασης στους 37°C συναρτήσει της συγκέντρωσης επαγωγέα	37
3.4.2.2 Επαγωγή υπερέκφρασης στους 16°C συναρτήσει της συγκέντρωσης επαγωγέα	38
3.4.3 Χρωματογραφία	39

3.4.3.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (<i>FPLC</i>)	39
3.4.3.2 Χρωματογραφία Συγγένειας	40
3.4.3.2.1 Στήλη πρόσδεσης <i>GST</i>	41
3.4.3.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	42
3.5 Πειραματική διαδικασία	42
3.6 Αναλυτικές μέθοδοι.....	45
3.6.1 Ηλεκτροφόρηση <i>DNA</i> σε πηκτική αγαρόζη	45
3.6.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδιου παρουσία <i>SDS</i> (<i>SDS-PAGE</i>)	47
3.6.3 Στύπωμα κατά <i>Western</i> (<i>Western-Blot</i>).....	49
4.1 Αποτελέσματα Τεχνικών Κλωνοποίησης	54
4.1.1 Ενίσχυση γονιδίου της <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i> με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (<i>PCR</i>).	54
4.1.2 Πέψη πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης <i>PGEX-6P-1</i> με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRI</i>	54
4.1.3 Αντίδραση σύνδεσης με ένζυμο <i>In-Fusion</i>	55
4.2 Μελέτες έκφρασης της <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i>	56
4.2.1 Μελέτες έκφρασης <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i> σε βακτηρία <i>E.coli</i> του στελέχους <i>Rosetta</i>	56
4.3 Εμφάνιση σήματος με ανασοανίχνευση κατά <i>Western</i>	59
4.4 Αλληλούχηση.....	59
4.5 Επανάληψη Τεχνικών Κλωνοποίησης	60
4.5.1 Ενίσχυση γονιδίου <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i> της με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (<i>PCR</i>).	60
4.5.2 Πέψη πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης <i>PGEX-6P-1</i> με την περιοριστική ενδονουκλεάση <i>EcoRI</i>	61
4.5.3 Αντίδραση σύνδεσης με το ένζυμο <i>In-Fusion</i>	62
4.5.4. Μελέτες έκφρασης της <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i> <i>E.coli</i> των στελεχών <i>Rosetta</i> (DE3) και <i>B834 plysS</i>	63
4.5.5 Αποτελέσματα αλληλούχησης.....	64
4.6 Απομόνωση και καθαρισμός της <i>Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇</i>	65
5. Συζήτηση.....	69
6. Βιβλιογραφία.....	70
7. Παράρτημα.....	78

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Σεπτέμβριο του 2018 έως τον Ιούνιο του 2019, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη βελτιώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο σημαντικά το επιστημονικό μου υπόβαθρο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ακόμη θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, την Αν. Καθηγήτρια Παπαδοπούλου Καλλιόπη, (αρχικά για την παροχή του γονιδίου της Lj-GSK3β) αλλά και την Επίκουρο Καθηγήτρια Σκαμνάκη Βασιλική για την αμέριστη βοήθεια σε κάθε λογής πρόβλημα που μου δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια αυτής, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Σε αυτό το σημείο θα ήταν αδύνατο να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ από καρδιάς την υποψήφια διδάκτορα Θεοδώρα Σολοβού για τη βοήθεια, υποστήριξη και υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο και τους υποψήφιους διδάκτορες Κούλα Συμεών, Κυριάκη Ευθύμιο, Παπαϊωάννου Όλγα, Τσαγκαράκου Αναστασία για το υπέροχο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο καθώς και του προπτυχιακού φοιτητές Δαλκίδη Δημήτρη και Νάκη Άγγελο.

Τέλος δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου, την μητέρα μου και τον αδερφό μου από τους οποίους εισέπραξα απεριόριστη αγάπη και στήριξη. Χωρίς τις θυσίες τους δεν θα είχα φτάσει στο σημείο που είμαι τώρα. Για αυτούς ένα ευχαριστώ είναι λίγο.

Περίληψη

Το φυτό *Lotus japonicus* ανήκει στην οικογένεια των ψυχανθών (*Leguminosae*), μια εξαιρετικά μεγάλη και ετερογενής οικογένεια που αποτελείται από περίπου 700 γένη και γύρω στα 20.000 είδη και αποτελούν σημαντική πηγή τροφής τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα, ενώ παράλληλα προσφέρουν πρώτες ύλες στην βιομηχανία [1,2]. Το φυτό *Lotus japonicus*, αποτελεί ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της βιολογίας των ψυχανθών λόγω συγκεκριμένων χαρακτηριστικών του (κύκλος ζωής, διπλοειδία, αυτογονιμοποίηση) [3], δίνοντας την δυνατότητα μελέτης σημαντικών διαδικασιών όπως η συμβιωτική αζωτοδέσμευση, μια διαδικασία η οποία είναι υπεύθυνη για το 90% της μετατροπή του ατμοσφαιρικού αζώτου σε αμμωνία (NH_3) που αποτελεί και την αφομοιώσιμη μορφή του αζώτου από τα φυτά [4,5]. Πρόσφατα δεδομένα αποκάλυψαν την έκφραση πρωτεϊνικών κινασών στα φυμάτια του φυτού *Lotus japonicus*, που ελέγχουν την διαδικασία του σχηματισμού των φυματίων και επομένως τη διαδικασία της συμβιωτικής αζωτοδέσμευσης [6,7]. Μία από αυτές της πρωτεϊνικές κινάσες και πιο συγκεκριμένα η *Lj-GSK3β*, παρουσίασε μεγάλη ομολογία με την ανθρώπινη κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (*GSK3β*) και πιο συγκεκριμένα με την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (*GSK3β* EC:2.7.11.26). Η *Lj-GSK3β* σχετίζεται με την καταστολή του σχηματισμού των φυματίων [6] που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην συμβιωτική αζωτοδέσμευση κατά την οποία το φυτό έχει προσβληθεί από κάποιο αζωτοδεσμευτικό βακτήριο. Η σημαντικότερη διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές πρωτεϊνικές κινάσες είναι στο N- τελικό τους άκρο στο οποίο και διαφοροποιούνται περίπου κατά 90 αμινοξέα. Για αυτόν τον λόγο στην παρούσα διπλωματική εργασία κατασκευάστηκε πλασμιδιακός φορέας για την ετερόλογη έκφραση της περικκεκομένης κινάσης του φυτού *Lotus japonicus* (*Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇) στην οποία απουσιάζουν τα 92 πρώτα κατάλοιπα. Η παραγωγή

αυτού του μεταλλάγματος θα επιτρέψει μελέτες για τη δράση της *Lj-GSK3β* στο φυτό *Lotus japonicus*.

Abstract

Lotus japonicus belongs to the *Leguminosae* family, an extremely large and heterogeneous family of about 700 genera and about 20,000 species and an important source of food for both humans and animals, while providing raw materials in industry [1,2]. *Lotus japonicus* is an ideal model for the study of legume biology due to its specific characteristics (life cycle, diploidy, self-fertilization) [3] and for the study important processes such as the symbiotic nitrogen fixation. This process is responsible for 90% of the conversion of atmospheric nitrogen to ammonia (NH_3), which is the assimilable form of nitrogen from plants [4,5]. Recent data have revealed the expression of protein kinases in *Lotus japonicus*, that control nodule formation and hence, the symbiotic nitrogen-binding process [6,7]. One of these protein kinases, *Lj-GSK3β*, is highly homologous to human glycogen synthase kinase-β (*GSK3β*) (*GSK3β* EC: 2.7.11.26). *Lj-GSK3β* is responsible for suppressing nodule formation [6]. The most significant difference between these two protein kinases occurs at their N-termini, which differ by 90 amino acids. For this reason, in the present thesis, a plasmid vector was constructed for the heterologous expression of the truncated kinase *Lj-GSK3β* lacking the first 92 residues to allow subsequent studies on its function in *Lotus japonicus*.

1. Εισαγωγή

1.1 Τα ψυχανθή

Τα ψυχανθή (*Leguminosae*) είναι μια εξαιρετικά μεγάλη και ετερογενής οικογένεια που αποτελείται από περίπου 700 γένη και γύρω στα 20.000 είδη. Η οικογένεια αυτή υποδιαιρείται σε τρεις υπο-οικογένειες (*Papilionoideae*, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae*) με αξιοσημείωτη ποικιλομορφία [8]. Το μεγαλύτερό τους πλεονέκτημα είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με τα βακτήρια *Rhizobium*, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να παρέχει στα ίδια τα φυτά καθώς και σε μεταγενέστερες σοδειές μεγάλες ποσότητες αφομοιώσιμου αζώτου [9].

Τα ψυχανθή είναι πολύ σημαντικά φυτά καθώς αποτελούν σημαντική πηγή τροφής τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα, ενώ παράλληλα προσφέρουν πρώτες ύλες στην βιομηχανία [1]. Αποτελούν περίπου το 27% της παγκόσμιας φυτικής παραγωγής του ανθρώπινου διαιτολογίου σε πρωτεΐνες και του επεξεργασμένου φυτικού ελαίου. Τα ψυχανθή παγκόσμιας διατροφικής αξίας περιλαμβάνουν το φασόλι (*Phaseolus vulgaris*), τη φακή (*Lensculenta*), τη σόγια (*Glycine max*), το μπιζέλι (*Pisum sativum*), το ρεβίθι (*Cicer arietinum*) και τα κουκιά (*Vicia faba*) [10]. Εκτός από την σημασία που έχουν τα ψυχανθή στη διατροφή σημαντική είναι και η προσφορά τους στη διατήρηση του εδάφους, στη φυτοεξυγίανση, στην παραγωγή ξυλείας, τσίχλας, προσθετικών τροφίμων αλλά και η χρήση τους ως καλλωπιστικά φυτά. Επιπροσθέτως, τα ψυχανθή έχουν την ικανότητα να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως τα ισοφλαβονοειδή, με ευεργετικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία [11,12].

Παρόλο που η έρευνα σε μη-ψυχανθή φυτά μοντέλα όπως το *Arabidopsis thaliana* και το *Oryza sativa* (ρύζι) έχει αποφέρει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την θεμελιώδη βιολογία των φυτών, δεν έχει καταφέρει να διαλευκάνει σημαντικές πτυχές της βιολογίας των ψυχανθών όπως η συμβιωτική αζωτοδέσμευση. Δυστυχώς, τα καλλιεργούμενα ψυχανθή δεν αποτελούν ιδανικά φυτά μοντέλα για την μελέτη των γονιδιωμάτων και των γονιδίων τους. Κάποια από αυτά είναι τετραπλοειδή (π.χ.

φιστίκι), έχουν μεγάλα γονιδιώματα (π.χ. μπιζέλι, φάβα) και κάποια άλλα είναι δύσκολα στον μετασχηματισμό και την αναγέννηση (π.χ. φασόλι, σόγια, μπιζέλι). Τα περισσότερα ψυχανθή διαθέτουν μεγάλους και σχετικά λίγους σπόρους ανά φυτό καθώς και μεγάλα φυτάρια τα οποία εμποδίζουν την καλλιέργειά τους σε μεγάλη πυκνότητα. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλα ψυχανθή, τα οποία δεν διαθέτουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, τουναντίον διαθέτουν κάποια άλλα τα οποία τα καθιστούν ιδανικά ώστε να χρησιμοποιηθούν ως φυτά μοντέλα, μεταξύ αυτών είναι και το φυτό *Lotus japonicus* [13].



Εικόνα 1.3: Φυμάτια στην ρίζα του φυτού *Lotus japonicus* Επεξεργασμένη [24]

1.2 Το φυτό μοντέλο *Lotus japonicus*

Το φυτό *Lotus japonicus* ανήκει στον φυλογενετικό κλάδο *Hologalegina*, ο οποίος περιέχει επίσης τα *Robinieae*, *Trifolieae*, *Viceae* και τα *Cicereae* [14]. Αποτελεί εποχιακό είδος εύκρατου κλίματος και παρουσιάζει χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό στην έρευνα. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι ο μικρός κύκλος ζωής (2-3) μήνες, η αυτογονιμοποίηση, η διπλοειδία του ($n=6$) και το μικρό μέγεθος του γονιδιώματός του (472,1 Mb) [3]. Τα νεαρά φυτά έχουν μικρό μέγεθος και μπορούν να μεγαλώνουν *in vitro* σε δοκιμαστικούς σωλήνες αλλά και σε μεγάλη πυκνότητα στο έδαφος [15]. Τα ώριμα φυτά είναι θαμνώδη και παρουσιάζουν πολλές διακλαδώσεις, με το μέγεθος του ενήλικου φυτού να ανέρχεται περίπου στα 30 cm [16].

Το φυτό *Lotus japonicus* σχηματίζει συμβιωτικές σχέσεις με το ριζόβια “ταχείας ανάπτυξης” *mesorhizobium loti* και “βραδείας ανάπτυξης” *Bradyrhizobium sp.* Τα ριζόβια “ταχείας ανάπτυξης” έχουν την ικανότητα να επάγουν τον σχηματισμό φυματίων στα οποία πραγματοποιείται η αζωτοδέσμευση ενώ τα ριζόβια “βραδείας ανάπτυξης” φαίνεται να μην έχουν την ικανότητα να επάγουν τον σχηματισμό πλήρως λειτουργικών φυματίων [13].

1.3 Συμβιωτική αζωτοδέσμευση

Κατά την διαδικασία του σχηματισμού των φυματίων στις ρίζες των ψυχανθών, τα ριζόβια γίνονται αντιληπτά από τα ριζικά τριχίδια, τα οποία στην συνέχεια δημιουργούν το μολυσματικό νημάτιο. Τα ριζόβια περνούν στο εσωτερικό του ριζικού τριχιδίου μέσω του νεοσχηματισμένου μολυσματικού νηματίου και μολύνουν τα κύτταρα του φλοιού, μέσα στα μολυσμένα κύτταρα του φλοιού σχηματίζονται τα βακτηριοειδή, τα οποία τελικά θα οδηγήσουν στον σχηματισμό του φυματίου [17].

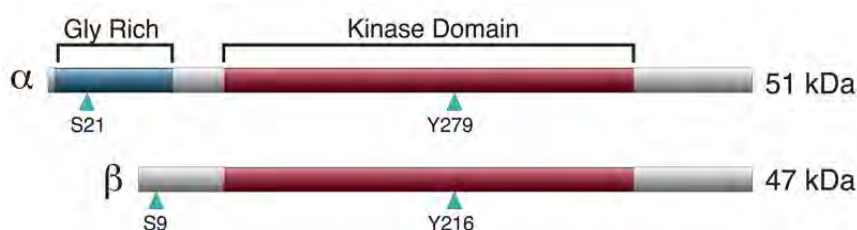
Το φυτό *Lotus japonicus* σχηματίζει καθορισμένα φυμάτια. Η αζωτοδέσμευση ξεκινά ταυτόχρονα σε όλα τα μολυσμένα κύτταρα, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η διόγκωση των κυττάρων. Όταν τελειώσει η διαφοροποίηση του φυματίου αυτό σταματά να αναπτύσσεται με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ώριμο κυκλικό φυμάτιο με καθορισμένη ζώνη αζωτοδέσμευσης [18].

Ο σχηματισμός του φυματίου είναι μια διαδικασία κατά την οποία το φυτό ξενιστής πρέπει να διατηρήσει στενό χωροχρονικό έλεγχο τόσο στην αρχική μόλυνση από τα ριζόβια όσο και στις προκύπτουσες κυτταρικές διαιρέσεις που απαιτούνται για την ανάπτυξη ώριμων φυματίων, ενώ επιπλέον περιορίζει τον τελικό αριθμό φυματίων που τελικά σχηματίζονται. Αυτή η λειτουργία είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί μια περιττή αποστράγγιση μεταβολικών πόρων και μια δυνητική μεταβολική ανισορροπία που προκύπτει από την ανεξέλεγκτη χρήση του φωτοσυνθετικού άνθρακα για αφομοίωση του αζώτου πέρα από τις πραγματικές απαιτήσεις των φυτών. Ο έλεγχος του αριθμού των φυματίων ως απόκριση στα επίπεδα των ριζοβίων και του αζώτου διεξάγεται από έναν μηχανισμό ανατροφοδότησης ο οποίος ονομάζεται αυτορρύθμιση της φυματιογένεσης (AON). Η διαδικασία σχηματισμού των φυματίων απαιτεί την ενσωμάτωση πολλαπλών κοινών αναπτυξιακών σημάτων, όπως οι φυτοορμόνες αυξίνη και κυτοκίνη, με εξειδικευμένα μόρια σηματοδότησης που ανταποκρίνονται στη μόλυνση από συμβιωτικά βακτήρια και στα διαθέσιμα επίπεδα αζώτου [19].

Στα φυτά *Lotus japonicus* έχει παρατηρηθεί ότι ένα τμήμα ενός μεταγράφου μιας *Shaggy-like* κινάσης παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης στα ώριμα φυμάτια του φυτού σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης στο ριζικό σύστημα του φυτού ίδιας ηλικίας, εύρημα το οποίο δεν έχει διερευνηθεί περαιτέρω [6]. Ωστόσο πριν αναφερθούμε στις λειτουργίες και τις δράσεις των *Shaggy-like* κινασών θα πρέπει πρώτα να συζητήσουμε για την πρώτη από αυτές τις κινάσες που ανακαλύφθηκε, την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (*GSK3*).

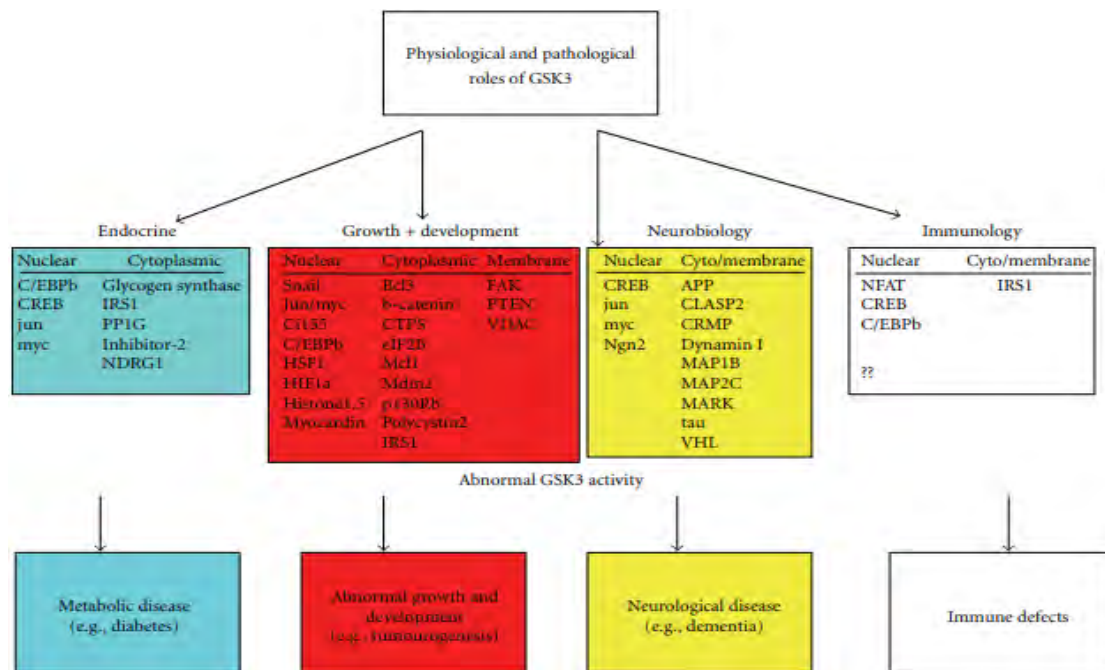
1.4 Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (*GSK3*)

Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (*GSK3*) είναι ένα ένζυμο το οποίο ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών *Ser/Thr* και καταλύει την αντίδραση μεταφοράς της γ-φωσφορικής ομάδας του ATP σε κατάλοιπα σερίνης (*Serine*) *θρεονίνης* (*Threonine*) μιας άλλης πρωτεΐνης στόχου [20]. Η συγκεκριμένη κινάση παρουσιάζεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως τα πρώτιστα, οι μύκητες, τα φυτά, τα σπονδυλωτά και τα ασπόνδυλα. Ομόλογή της *GSK3* στην *Drosophila melanogaster* αποτελεί η *SHAGGY* [21]. Απαντάται σε δύο ισομορφές στα θηλαστικά οι οποίες κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια, στην κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3-α (*GSK3α*) και στην κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3-β (*GSK3β*) [22]. Οι δύο αυτές ισομορφές παρουσιάζουν περίπου 97% ομολογία στην επικράτεια κινάσης και είναι μονομερείς πρωτεΐνες με την *GSK3α* να έχει μοριακό βάρος 51 kDa και να αποτελείται από 483 αμινοξικά κατάλοιπα και την *GSK3β* να έχει μοριακό βάρος 47kDa και να αποτελείται από 433 αμινοξικά κατάλοιπα [22].



Εικόνα 1.4 α.: Σχηματική απεικόνιση των δύο ισομορφών της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου των θηλαστικών (α και β). Με τα γαλάζια τρίγωνα παρατίθενται τα κατάλοιπα *Ser* και *Tyr* που φωσορυλιώνονται, με κόκκινο χρώμα φαίνεται η συντηρημένη επικράτεια κινάσης και στις δύο ισομορφές, και με μπλε φαίνεται ένα μοτίβο πλούσιο σε *Gly* που υπάρχει μόνο στην α ισομορφή [23].

Όπως θα αναφερθεί και παρακάτω η *GSK3* εμπλέκεται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, η απορρύθμιση της οποίας έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων όπως ο καρκίνος, το *Alzheimer's*, η διπολική διαταραχή και ο διαβήτης, για αυτόν τον λόγο ερευνάται ως πιθανός θεραπευτικός στόχος [23].



Εικόνα 1.4 β.: Οι φυσιολογικοί και παθολογικοί ρόλοι της *GSK3* στα θηλαστικά [25].

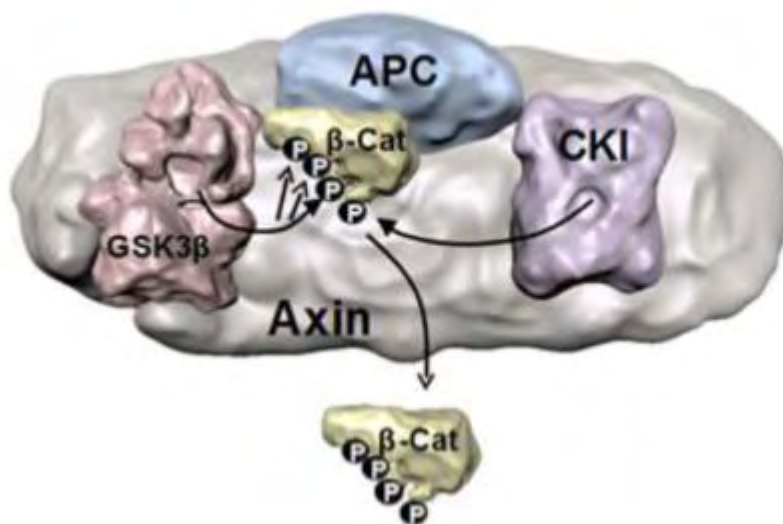
1.4.1 Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3- β (*GSK3 β*)

Η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3- β (*GSK3 β*) (EC: 2.7.11.26) εμπλέκεται σε πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια, με τα κυριότερα να αποτελούν το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης και του *Wnt* [36]. Πρόκειται για μία ασυνήθιστη κινάση λόγω κάποιων χαρακτηριστικών της, όπως το γεγονός ότι είναι ιδιοσυστάτα ενεργή, ότι τα υποστρώματα που φωσφορυλιώνει πρέπει να είναι προ-φωσφορυλιωμένα σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα από μία άλλη κινάση και τέλος ότι η φωσφορυλίωσή της έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηρότητάς της [36].

Στην σηματοδότηση της ινσουλίνης η *GSK3 β* φωσφορυλιώνει την συνθάση του γλυκογόνου, τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης *eIF2B* [26], και τον μεταγραφικό παράγοντα *C/EBP α* και τους αναστέλλει [27,28]. Όταν ένα μόριο

ινσουλίνης συνδεθεί στον υποδοχέα του τότε ενεργοποιείται ένας καταρράκτης αντιδράσεων φωσφορυλίωσης ο οποίος μέσω την *PKB/Akt* θα οδηγήσει στην αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της *GSK3β* στην *Ser₉* [29], αναστέλλοντάς την με επακόλουθο οι καθοδικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες να παραμένουν μη-φωσφορυλιωμένες και να συνεχίζεται η μεταγωγή του σήματος προκειμένου να υπάρξει απόκριση [30].

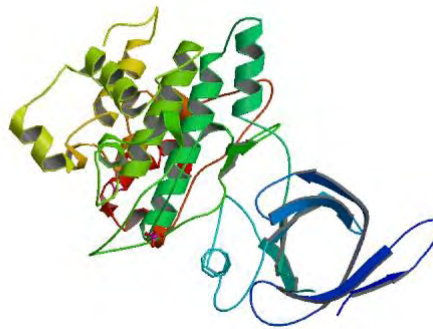
Όσον αφορά το καλά μελετημένο σηματοδοτικό μονοπάτι *Wnt*, η *GSK3β* μαζί με την β-κατενίνη, την κινάση της καζεΐνης I (*CKI*) και την *Adenomatous Polyposis Coli Protein (APC)* είναι συνδεδεμένες στην πρωτεΐνη ικριώματος *Axin*, σχηματίζοντας ένα σηματοδοτικό σύμπλοκο, στο οποίο η κινάση της καζεΐνης I (*CKI*) φωσφορυλιώνει την β-κατενίνη [31,32,33], επιτρέποντας την επακόλουθη φωσφορυλίωση της από την *GSK3β* οδηγώντας στην ουβικουιτίνωσή της και επομένως την αποδόμησή της [34]. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα *Frizzled* από την γλυκοπρωτεΐνη *Wnt* οδηγεί στην απενεργοποίηση της κινάσης από την *Dishelved*, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης η οποία με την σειρά της θα επάγει την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως το *c-Myc* [35].



Εικόνα 1.4.1: Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση του πρωτεϊνικού συμπλέγματος της *Axin*, *Adenomatous Polyposis Coli (APC)*, κινάσης της καζεΐνης I (*CKI*), *GSK3β* και της β-κατενίνης που επιτρέπει στην *GSK3β* να φωσφορυλιώσει την β-κατενίνη στα κατάλοιπα *Ser₄₁*, *Ser₃₇*, *Ser₃₃*. Η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωσή της από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και την αποικοδόμησή της στα πρωτεασώματα [36].

1.4.2: Η δομή της Κινάσης της Συνθάσης του Γλυκογόνου 3-β (*GSK3β*)

Όσον αφορά τη δομή της *GSK3β*, κρυσταλλογραφικά δεδομένα αποκάλυψαν ότι η δομή της κινάσης ακολουθεί το πρότυπο των κινασών που ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών *Ser/Thr* [37]. Δηλαδή αποτελείται από δύο λοβούς, τον N-τελικό και τον C-τελικό λοβό οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με μία περιοχή εύκαμπτου συνδέσμου, με την περιοχή σύνδεσης του *ATP*, και την περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος να είναι θαμμένες ανάμεσα από τους δύο λοβούς [39].



Εικόνα 1.4.3: Η τρισδιάστατη δομή της β ισομορφής της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου [40].

Η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος *GSK3β* βρίσκεται σε μία περιοχή ανάμεσα στον N-τελικό και C-τελικό λοβό και απαρτίζεται από τρία θετικά φορτισμένα αμινοξέα την *Arg₉₆*, *Arg₁₈₀*, *Lys₂₀₅* [38]. Στην συγκεκριμένη κινάση συνδέονται πρωτεϊνικά υποστρώματα τα οποία έχουν προηγουμένως υποστεί φωσφορυλίωση από μία άλλη κινάση, ωστόσο το γεγονός αυτό δεν αποτελεί κανόνα καθώς έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχουν υποστρώματα τα οποία υπό συνθήκες μπορούν να προσανατολιστούν σωστά στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος χωρίς προηγουμένως να έχουν υποστεί φωσφορυλίωση [36].

Στην περιοχή ενεργοποίησης του ενζύμου (activation segment) εντοπίζονται με σειρά από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο ένας βρόχος στον οποίον συνδέεται το Mg^{2+} , ένας μικρό β-κλώνος, ο βρόχος ενεργοποίησης και ο P+1 βρόχος. Αξίζει να

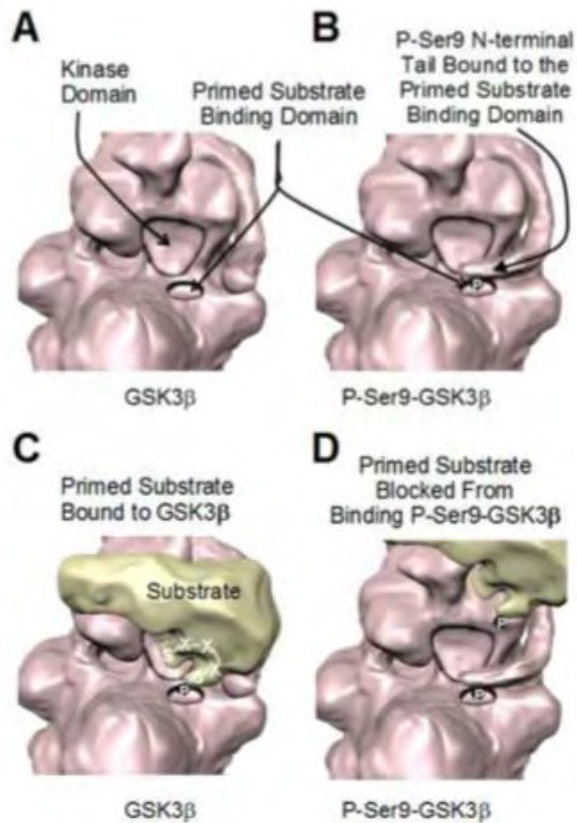
αναφερθεί ότι παρόλο που η συγκεκριμένη κινάση είναι ιδιόσυστατα ενεργή, η φωσφορυλίωση του καταλοίπου *Tyr₂₁₆* έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την ενζυμική δραστικότητα της κινάσης, χωρίς ωστόσο να είναι ικανή να επάγει σημαντική αύξηση της δραστικότητάς της [37].

1.4.3 Ρύθμιση της δραστικότητας της κινάσης της συνθάσης του γλυκογόνου 3-β (*GSK3β*)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος της *GSK3β* μπορούν να συνδεθούν τόσο φωσφορυλιωμένα όσο και μη φωσφορυλιωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την σύνδεση των φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων είναι η ύπαρξη μίας αλληλουχίας *Ser/Thr-X-X-X-Ser/Thr(P)*, όπου *X* οποιοδήποτε αμινοξύ [41]. Μέσω της αλληλουχίας αυτής το υπόστρωμα θα συνδεθεί στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος και η *Ser/Thr* η οποία θα βρίσκεται τέσσερα αμινοξέα πιο κοντά προς το N-τελικό άκρο θα προσανατολιστεί κατάλληλα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της φωσφομεταφοράς, η ύπαρξη πολλαπλών συνεχόμενων αλληλουχιών πάνω σε ένα πρωτεϊνικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση πολλαπλών καταλοίπων *Ser/Thr* ακολουθώντας το πρότυπο του μοτίβου (n+4), αφού κάθε φωσφορυλίωση θα δημιουργεί ένα κατάλοιπο (*P*) *Ser/Thr* πιο κοντά στο N-τελικό άκρο το οποίο θα συνδέεται στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος. Τα παραδείγματα των μη φωσφορυλιωμένων υποστρωμάτων της κινάσης είναι εξαιρετικά λίγα ωστόσο υπάρχει η δυνατότητα φωσφορυλίωσης σε μοτίβα *Ser-Pro* αν θεωρήσουμε ότι αντί κάποιου καταλοίπου *Ser/Thr(P)* συναντάται κάποιο όξινο αμινοξύ [36].

Ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός ρύθμισης της δραστικότητας της *GSK3β* είναι αυτός που περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση του καταλοίπου *Ser₉*. Η φωσφορυλίωση αυτού του καταλοίπου, που καταλύεται από κινάσες με την κυριότερη να είναι η *PKB/Akt*, έχει ως αποτέλεσμα το N-τελικό άκρο της κινάσης να

στρέφεται στο εσωτερικό του μορίου, και η (P)Ser₉ να αλληλοεπιδρά με τα κατάλοιπα της περιοχής σύνδεσης του υποστρώματος, εμποδίζοντας έτσι την δράση της κινάσης, λειτουργώντας ως ψευδο-υπόστρωμα [37].



Εικόνα 1.4.3: Μηχανισμός αναστολής της δραστηριότητας της *GSK3β* από την (P)Ser₉ του N-τελικού άκρου της κινάσης [36].

Ο μηχανισμός αυτός αυτο-αναστολής, δεν αναιρεί τελείως την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου καθώς πρόκειται για συναγωνιστική αναστολή. Πράγμα το οποίο σημαίνει ότι αυτός ο ενδομοριακός αποκλεισμός της περιοχής σύνδεσης του υποστρώματος μπορεί να αρθεί αν η συγκέντρωση του φωσφορυλιωμένου υποστρώματος ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο κατώφλι [37].

1.5 Οι *SHAGGY-like* κινάσες των φυτών

Στα φυτικά γονιδιώματα υπάρχουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν κινάσες ομόλογες με την *GSK3β*. Ωστόσο παρόλο που ο ρόλος, οι λειτουργίες καθώς και οι

αλληλεπιδράσεις των ζωικών *GSK3β* είναι καλά χαρακτηρισμένες, λόγω του ότι η συγκεκριμένη κινάση εμπλέκεται σε πληθώρα μονοπατιών μεταγωγής σήματος η οποία αφορά το μεταβολισμό του γλυκογόνου, διάφορα αναπτυξιακά στάδια καθώς και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, οι *SHAGGY-like* κινάσες των φυτών έχουν ξεκινήσει να μελετώνται πρόσφατα ώστε να υπάρξουν πληροφορίες όσον αφορά τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία εμπλέκονται στα φυτά καθώς και τα υποστρώματά τους.

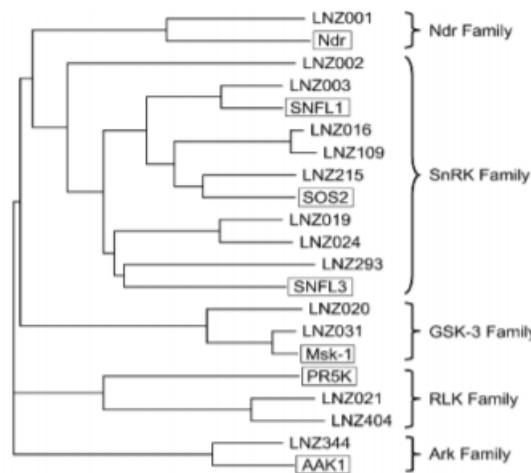
Στα φυτά κωδικοποιούνται πολλές *SHAGGY-like* κινάσες οι οποίες ανάλογα με την ομολογία της αμινοξικής τους αλληλουχίας κατατάσσονται σε τέσσερις ομάδες (Ομάδες: I-IV) [42]. Σε όλες τις φυτικής προέλευσης *SHAGGY-like* κινάσες που έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής παρουσιάζεται μεγάλη ομολογία στην επικράτεια κινάσης τους. Στο φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* εκφράζονται δέκα μέλη της οικογένειας αυτής, οι οποίες παρόλο που εμφανίζουν ομολογία στην επικράτεια κινάσης τους τα N- τελικά και C- τελικά τους άκρα παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια με τα πρώτα να είναι υπεύθυνα για τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και τα τελευταία να παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα [42].

Όσον αφορά την ομοιότητά τους με την ανθρώπινη *GSK3β*, οι *SHAGGY-like* κινάσες των φυτών διαθέτουν το συντηρημένο κατάλοιπο *Tyr* στο βρόχο ενεργοποίησης που αντιστοιχεί στην *Tyr₂₁₆* της ανθρώπινης και τα τρία θετικά φορτισμένα αμινοξέα στην περιοχή σύνδεσης του υποστρώματος για τα πρωσφορυλιωμένα πρωτεϊνικά υποστρώματα, που αντιστοιχούν στα κατάλοιπα *Arg₉₆*, *Arg₁₈₀*, *Lys₂₀₅* της ανθρώπινης [43]. Η απουσία του καταλοίπου *Ser* σε αυτές τις κινάσες το οποίο είναι ομόλογο με αυτό της *Ser₉* στην ανθρώπινη, αποτελεί μία σημαντική δομική διαφορά τους. Μελέτες οι οποίες έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της καταλυτικής δραστηριότητας των *SHAGGY-like* κινάσων των φυτών, απέδειξαν ότι προκειμένου να δράσουν δεν είναι απαραίτητη η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνικών τους υποστρωμάτων από άλλες κινάσες, γεγονός που αποτελεί βασική προϋπόθεση για την σύνδεσή τους στην κινάση των θηλαστικών, ούτε είναι αναγκαίο να συνδεθούν σε πρωτεΐνες σκαλωσιάς, υποδεικνύοντας έτσι ένα διαφορετικό τρόπο ελέγχου της δραστηριότητάς τους [44].

Οι φυτικές λειτουργίες στις οποίες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται οι φυτικές *SHAGGY-like* κινάσες είναι: ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του ριζικού και του αγγειακού συστήματος, η ανάπτυξη των ανθών και των στομάτων καθώς και η απόκριση των φυτών σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το βιοτικό και το αβιοτικό stress. Οι φυτικές *SHAGGY-like* κινάσες δρουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια κυρίως ως αρνητικοί ρυθμιστές, όπως οι *GSK3β* των θηλαστικών [45,46].

1.5.1 Οι *SHAGGY-like* κινάσες στο φυτό *Lotus japonicus*

Στο φυτό *Lotus japonicus* δεν υπάρχουν πάρα πολλές πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίον οι *SHAGGY-like* κινάσες εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Το 2005 οι *Kameshita et al.* κατάφεραν να απομονώσουν από φυμάτια του φυτού *Lotus japonicus* 15 *cDNA* κλώνους με παρόμοια δομή κινάσης *Ser/Thr*. Από τους 15 κλώνους κωδικοποιούνται πρωτεΐνες με δράση κινάσης *Ser/Thr*, με την αλληλουχία τους να μην έχει ξαναπομονωθεί από το φυτό *Lotus japonicus*. Ύστερα από φυλογενετική ανάλυση οι 15 πιθανές κινάσες κατατάχθηκαν σε 5 διαφορετικές οικογένειες κινασών *Ser/Thr* μεταξύ των οποίων οι δύο ανήκαν στην οικογένεια των κινασών *GSK3/SHAGGY-like*. Πρόσφατα μέσω *BLAST* ανακαλύφθηκαν επιπλέον 4 κλώνοι οι οποίοι κωδικοποιούν για *GSK3/SHAGGY-like* κινάσες στο φυτό *Lotus japonicus* με την λειτουργία τους να μην είναι πλήρως κατανοητή [6]. Στην παρούσα διπλωματική εργασία το γονίδιο το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την κατασκευή του πλασμιδίου της περικεκομμένης κινάσης ανήκει στον κλώνο *LNZ020*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αυτό το γονίδιο είναι μια κινάση *Ser/Thr* που ανήκει στην οικογένεια των *GSK3/SHAGGY-like* κινασών και θα αναφαιρέται ως *Lj-GSK3β*.



Εικόνα 1.5.1: Φυλογενετική ανάλυση των πιθανών κινασών *Ser/Thr* με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους που προκύπτει από την αλληλουχία των *cDNA* κλώνων. Σε κουτιά εμφανίζονται οι συγγενικές κινάσες άλλων φυτών (Προσαρμοσμένο [7]).

Μετά από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας προέκυψε ότι οι 6 γνωστές *GSK3β/SHAGGY-like* κινάσες του φυτού *Lotus japonicus* διαθέτουν συντηρημένη *GSK3β/SHAGGY-like* επικράτεια κινάσης, συμπεριλαμβανομένου την περιοχή πρόσθεσης του *ATP* καθώς και το ρυθμιστικό αμινοξικό κατάλοιπο *Tyr*, που αντιστοιχεί στο κατάλοιπο *Tyr₂₁₆* της ανθρώπινης *GSK3β* [6]. Επιπλέον αυτές διαθέτουν τα *CDFGSAK* και *SYICSR* μοτίβα τα οποία εντοπίζονται σε όλες τις *GSK3β/SHAGGY-like* κινάσες, καθώς και το μοτίβο *TREE* που εντοπίζονται σε όλες τις *GSK3β/SHAGGY-like* κινάσες των φυτών [6].

1.5.2 Η *Lj-GSK3β*

Πρόκειται για μία πρωτεϊνική κινάση *Ser/Thr* η οποία κωδικοποιείται από τον *LNZ020* κλώνο, που απομονώθηκε από φυμάτια του φυτού *Lotus japonicus*. Είναι μία πρωτεΐνη 467 αμινοξέων [7] και όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της διαθέτει τις ίδιες συντηρημένες περιοχές με τις υπόλοιπες *GSK3β/SHAGGY-like* κινάσες των φυτών με διαφορά ότι το N- τελικό άκρο της, είναι περίπου 40 αμινοξέα μεγαλύτερο από αυτό των υπόλοιπων *GSK3β/SHAGGY-like* κινασών του φυτού και διαθέτει ένα *GRTSIS* μοτίβο, το οποίο πιθανόν να είναι υπεύθυνο για τον υποκυτταρικό της εντοπισμό στα μιτοχόνδρια [6]. Το γεγονός ότι έχει δραστηριότητα κινάσης επιβεβαιώθηκε με

πειράματα αυτό-φωσφορυλίωσης [6]. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι η έκφραση της *Lj-GSK3β*, αυξάνεται σημαντικά μία ώρα μετά τον εμβολιασμό ριζών του *Lotus japonicus* με το συμβιωτικό του βακτήριο *Mesorhizobium loti*, αλλά μειώνεται μετά από 48 ώρες υποδεικνύοντας τη συμμετοχή της στην εγκαθίδρυση της συμβιωτικής σχέσης [6].

1.5.3 Η περικεκομμένη *Lj-GSK3β*

Πολλές φορές για να γίνει γνωστή η δομή και επομένως η λειτουργία μιας πρωτεΐνης, είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν μελέτες σε ορισμένα λειτουργικά τμήματά της [47]. Για αυτόν τον λόγο και στην παρούσα διπλωματική εργασία, εφόσον δεν υπάρχουν δομικά δεδομένα για την *Lj-GSK3β*, κατασκευάστηκε ένα πλασμίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για την *Lj-GSK3β* στην οποία απουσιάζει ένα μεγάλο τμήμα του N- τελικού της άκρου. Πιο συγκεκριμένα το *cDNA* του κλώνου *LNZ020* χρησιμοποιείται ως μήτρα για την κατασκευή ενός πλασμιδίου με τις μεθόδους του ανασυνδυασμένου *DNA*, το οποίο θα κωδικοποιεί την *Lj-GSK3β*, στην οποία θα απουσιάζουν τα 92 πρώτα αμινόξια του N- τελικού της άκρου. Το πεπτίδιο το οποίο προκύπτει θα αναφέρεται ως *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇, και θα φέρει μεγάλη ομολογία με την ανθρώπινη *GSK3β*. Η υπερέκφραση και η απομόνωση του οποίου σε μεγάλη κλίμακα θα μπορούσε να αποφέρει πληροφορίες για την δομή ολόκληρης της *Lj-GSK3β* και ως εκ τούτου για τη λειτουργία και τη δράση της στα φυτά *Lotus japonicus*.

2. Σκοπός

Κατά την διάρκεια του σχηματισμού των φυματίων είναι αναγκαίο να γίνει σύνδεση πολλών κοινών αναπτυξιακών σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία απορρέουν από την λειτουργία των φυτο-ορμονών [48, 49, 50, 51], με συγκεκριμένα σηματοδοτικά μόρια που αποκρίνονται στην μόλυνση της ρίζας του φυτού από τα ριζόβια και τα επίπεδα αζώτου στο έδαφος [52, 53, 54]. Οι *SHAGGY-like* κινάσες των φυτών μπορούν να θεωρηθούν οι κύριοι “συνδέτες” αυτής της διαδικασίας εφόσον έχει ξεκαθαριστεί η εμπλοκή τους σε διάφορα αναπτυξιακά μονοπάτια των φυτών, όπως: η ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα [55], των καταφρακτικών κυττάρων [56, 57], των ανθών [58] καθώς και των ριζικών τριχιδίων [59] καθώς έχουν την δυνατότητα να αποκρίνονται και να συνδυάζουν ορμονικά σήματα με μεταβολές στο περιβάλλον του φυτού.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η κατασκευή πλασμιδίου για την περικεκομμένη κινάση του φυτού *Lotus japonicus* ομόλογη με την ανθρώπινη κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3-β. Η περικεκομμένη κινάση (αμινοξύ 93 έως 467), αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 374 αμινοξέων, με μοριακό βάρος το οποίο ανέρχεται περίπου στα 43087 Da και θεωρητικό *pI* 8,23 (Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προέκυψαν με την χρήση διαδικτυακού εργαλείου που παρέχεται από την ιστοσελίδα *ExPASy*).

Η κατασκευή του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε στον βακτηριακό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* με την χρήση του κατοχυρωμένου από την εταιρία *Clontech* ενζύμου *In-Fusion*, με σκοπό την κατασκευή ενός πλασμιδίου που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί την ετερόλογη έκφραση της περικεκομμένης κινάσης σε βακτηριακά κύτταρα σε μεγάλη κλίμακα. Μετέπειτα ακολούθησε έλεγχος για τις βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* (*Rosetta*, *B834 pLysS*) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων επαγωγέα (*IPTG*) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής. Γεγονός που τελικά οδήγησε στην υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα και τον καθαρισμό της με την χρήση του υγρής χρωματογραφίας με την βοήθεια δύο χρωματογραφικών στηλών: *Protino GST 4B agarose (Macherey-Nagel)*, *Gel-filtration*

Superdex 75 (GE Healthcare). Η επιτυχημένη υπερέκφραση και καθαρισμός της συγκεκριμένης κινάσης αποσκοπεί στην εκπόνηση δομικών μελετών με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
AceticAcid	Fluka, Panreac
Acrylamide	SERVA
Agarose	SIGMA
AmmoniumPersulfate (APS)	SIGMA
Ampicillin	SERVA
BisAcrylamide	SERVA
Bradfordproteinassay 5X	Bio-Rad
BromophenolBlue	Research organics
Chloroamphenicol	Applichem
Cloning primers (Forward, Reverse)	VBC Biotech
CoomassieBrilliantBlue R-250	Fluka
D-(+)- Glucose	SIGMA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Panreac AppliChem
DNA Ladder RTU (1Kb) - Ready to use	NipponGenetics
diPotassiumHydrogenPhosphate	MERCK
diSodiumHydrogenPhosphate	PanreacApplichem
EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)	Scharlau
EthanolAbsolute	SIGMA
Glycerol	Panreac
HydrochloricAcid (HCl)	Merck
Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂)	Applichem
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)	SERVA
L- Glutathione reduced (GSH)	Applichem
LB Agar, Powder	SERVA
LB Medium-powder according to Miller	PanreacApplichem
Luminol	SIGMA
Magnesiumchloride, anhydrous, 99%	Alfa Aesar
Mark12™ Unstained Standard	Invitrogene
MTG (3-Mercapto-1,2-propanediol)	SIGMA
p-cumaricacid	SIGMA
Page Ruler™Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Ponceau S	Sigma
PotassiumChloride (KCl)	Merck
SDS (SodiumdodecylSulfate)	SERVA
SodiumChloride (NaCl)	CHEM-LAB
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)	MERCK

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	SERVA
Tween-20	SIGMA
Tryptone	SIGMA
Yeastextract	SERVA

Πίνακας 3.1.1.α: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Τα kit που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία:

Kit	Εταιρία
In-Fusion® HD Cloning Kit	Clonetech
KAPA HiFi HotStart Ready Mix PCR Kit	KAPABIOSYSTEMS
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey- Nagel
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	Macherey- Nagel

Πίνακας 3.1.1.β: Τα kit που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* τόσο για την κλωνοποίηση και υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, όσο και για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για την κλωνοποίηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Βακτηριακά στελέχη	Εταιρία
Escherichia coli B834 plysS	Novagen
Escherichia coli Rosetta	Novagen
Escherichia coli XL1- Blue	Agilent Technologies

Πίνακας 3.1.2.1: Βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική

Το βακτήριο *Escherichia coli* που ανήκει στο στέλεχος *XL1-Blue* είναι γενετικά τροποποιημένο ώστε να επιτρέπει τον εύκολο μετασχηματισμό και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων [60].

Η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε βακτήρια *Escherichia coli* που ανήκουν στα στελέχη *Rosetta* και *B834plysS*. Τα συγκεκριμένα στελέχη της *Escherichia coli* περιέχουν κάποια επιπλέον κωδικόνια που χρησιμοποιούνται από την *Escherichia coli* σπάνια. Δεν διαθέτουν *Lon* και *OmpT* πρωτεάσες γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για αυτό τον σκοπό. Το στέλεχος *Rosetta* είναι ειδικό για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς χρησιμοποιεί τον εκκινητή της *T7 RNA* πολυμεράσης για την άμεση έκφραση σε υψηλά επίπεδα και περιέχει ένα επιπλέον πλασμίδιο το *pRARE2* που παρέχει *tRNAs* για επτά επιπλέον κωδικόνια. Το στέλεχος *B834 plysS* διαθέτει ένα επιπλέον πλασμίδιο (*plys*) που του επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης [60].

3.1.3 Πλασμιδιακοί φορείς

Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλινα μόρια *DNA*, που συνυπάρχουν με το κύριο χρωμόσωμα σε ένα βακτηριακό κύτταρο, ενώ αντιγράφονται ανεξάρτητα από αυτό. Διαθέτουν γονίδια, που συνήθως δεν υπάρχουν στο κύριο χρωμόσωμα, αν και συχνά τα γονίδια αυτά δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση του βακτηρίου. Προσδίδουν επιπλέον ιδιότητες στο βακτήριο καθώς κωδικοποιούν ιδιαίτερα στοιχεία του, όπως η αντοχή σε αντιβιοτικά. Πολλά πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο, ενώ συχνά, τα ίδια τα πλασμίδια βρίσκονται σε βακτήρια διαφορετικών ειδών [61].

Τα πλασμίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς κλωνοποίησης παρέχοντας την αντιγραφική ικανότητά τους που επιτρέπει στο κλωνοποιημένο γονίδιο να πολλαπλασιαστεί μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Κάθε πλασμιδιακός φορέας διαθέτει μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής (*origin of replication*), την οποία αναγνωρίζουν οι *DNA* πολυμεράσες καθώς και άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον αντιγραφικό μηχανισμό του κύριου χρωμοσώματος. Συνεπώς ένα πλασμίδιο αντιγράφεται και πολλαπλασιάζεται μαζί με οποιοδήποτε γονίδιο έχει ενσωματωθεί σε αυτό με τη συνδρομή ενζύμων του κυττάρου ξενιστή [61].

Η παρουσία ενός γονιδίου ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό είναι ένα άλλο χαρακτηριστικό των πλασμιδιακών φορέων γεγονός που καθιστά εφικτό το διαχωρισμό των κυττάρων-ξενιστών που προσέλαβαν το πλασμίδιο από αυτά που δεν το προσέλαβαν. Το γονίδιο που μας ενδιαφέρει μπορεί να ενσωματωθεί σε συγκεκριμένη περιοχή του πλασμιδίου η οποία ονομάζεται πολυσυνδέτης (*multiple cloning site, MCS*) και διαθέτει πολλές θέσεις αναγνώρισης και πέψης από περιοριστικές ενδονουκλεάσες γεγονός που καθιστά εύκολη την εισαγωγή *DNA* τμήματος που έχει υποστεί πέψη με περιοριστικά ένζυμα [61].

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν ο *pGEX-6P-1* στον οποίο έγινε ένθεση του περιεκεκομένου γονιδίου της *Lj-GSK3β*. Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* έχει μήκος 4984 ζεύγη βάσεων και διαθέτει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Αμπικιλίνη (*Amp*). Οι πλασμιδιακοί φορείς *PGEX* είναι εφοδιασμένοι με τον κατάλληλο επίτοπο ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να εκφράζεται συγχωνευμένη με την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (*GST*) μέσω του πρωτεολυτικού κέντρου (*LEVLFGQP*) που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση *Rhinovirus 3C (PreScission Protease)*. Οι πρωτεΐνες που είναι συζευγμένες με την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης απομονώνονται εύκολα με τη χρήση συμπλέγματος σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη. Η έκθεση του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου στην πρωτεάση *PreScission*, έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή της ετικέτας S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης από την προς μελέτη πρωτεΐνη. Ο φορέας περιέχει έναν προαγωγέα *tac* ώστε να είναι δυνατή η χημική επαγωγή με μεγάλη απόδοση της έκφρασης και παραγωγής της προς μελέτη πρωτεΐνης [62].

3.1.4 Χρωματογραφία

Στήλη χρωματογραφίας	Εταιρία
Protino GST 4B agarose	Macherey-Nagel
Gel-filtration Superdex 75	GE Healthcare

Πίνακας 3.1.4: Στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν.

3.2 Όργανα

Όργανο	Εταιρία
--------	---------

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Dry Block heat bath	Thermoleader
Mastercycler gradient (for PCR)	Eppendorf
Ultrasonic processor UP400S (400 W, 24kHz)	
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Nichiryo
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Συσκευή απεικόνισης πηκτών	Protein Simple Cambridge
Φυγόκεντροι	Eppendorf Centrifuge 5810R, HermLe Z36HK
SpeedVach	Thermo Scientific
Vortex	Kisker
Yrdimes Semi-dry Transfer	Weal-Tech

Πίνακας 3.2.: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

3.3 Θρεπτικά μέσα

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Τρυπτόνη	2 gr
Yeast extract	0,5 gr
NaCl	0,05 gr
KCl	250 mM
MgCl ₂	0,01 M
Glucose	0,08 M

Πίνακας 3.3: Υγρό θρεπτικό μέσο SOC medium, Τελικός όγκος υγρού θρεπτικού μέσου είναι 100 mL, pH= 7,6.

LB Agar: Η τελική σύσταση του στερεού θρεπτικού μέσου LB Agar θα πρέπει να έχει σύσταση $35 \frac{gr}{L}$.

LB Broth: Η τελική σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth θα πρέπει να έχει σύσταση $25 \frac{gr}{L}$.

3.4 Παρασκευαστικές μέθοδοι

3.4.1 Κλωνοποίηση

3.4.1.1 Τεχνικές κλωνοποίησης

Η εισαγωγή του ενθέματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* πραγματοποιήθηκε μέσω μιας τεχνικής που στηρίζεται στη μέθοδο του

ομόλογου ανασυνδυασμού, δηλαδή στη σύνδεση φορέα και ενθέματος μέσω του κατοχυρωμένου από την εταιρεία *Clontech* ενζύμου *In-Fusion* [63].

3.4.1.2 Μέθοδος *In-Fusion*

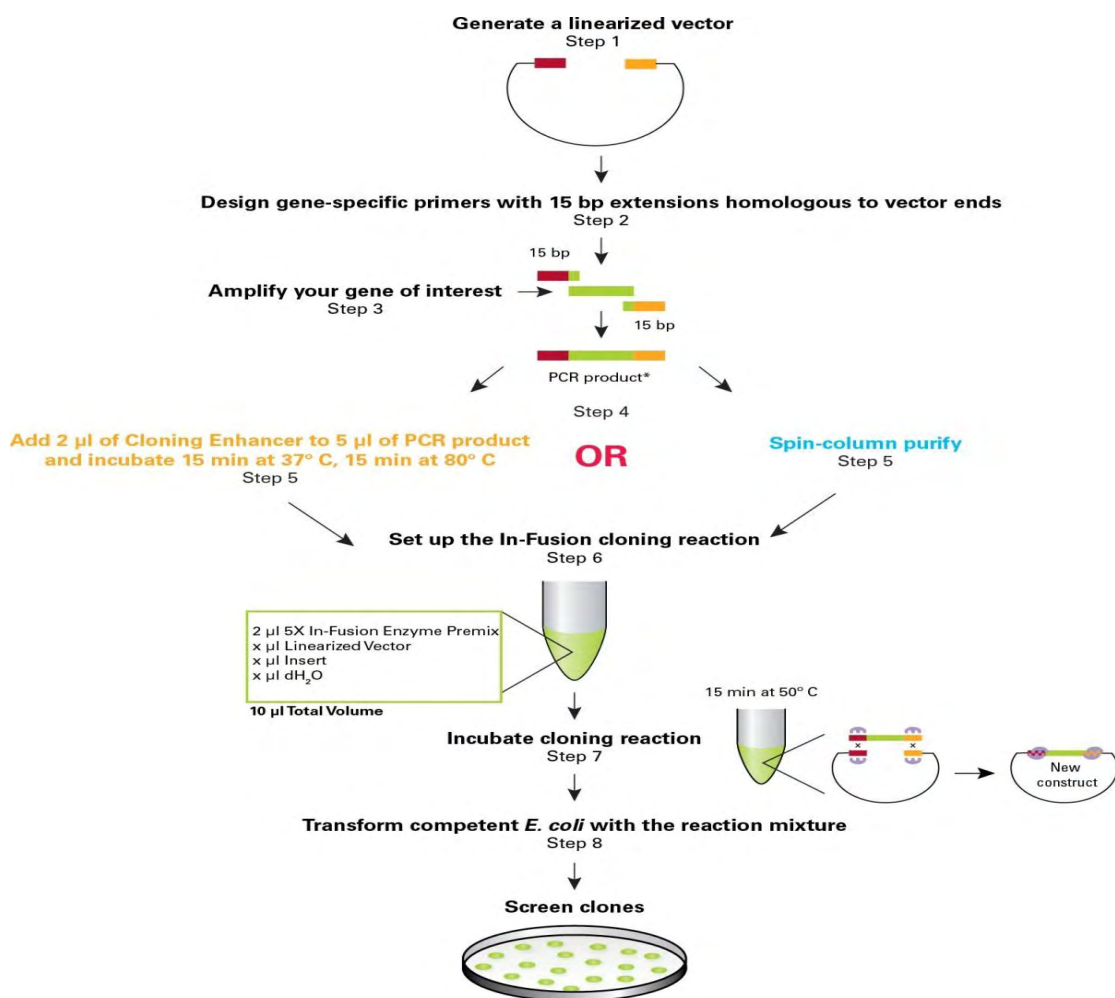
Με τη μέθοδο αυτή έγινε ένθεση του γονιδίου της *Lj-GS3β₉₃₋₄₆₇* στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1*. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι σχεδιασμένο για γρήγορη και κατευθυνόμενη κλωνοποίηση ενός ή περισσότερων τμημάτων *DNA* σε έναν φορέα, καθώς κάνει χρήση του κατοχυρωμένου από την *Clontech* ενζύμου *In-Fusion*, το οποίο συνδέει τμήματα *DNA* μεταξύ τους (όπως είναι ένα προϊόν *PCR* και ένας γραμμικός πλασμιδιακός φορέας) τα οποία έχουν μια αλληλοεπικάλυψη 15bp στα άκρα τους, με ακρίβεια και με το σωστό προσανατολισμό. Η αντίδραση καταλύεται από μία ρεκομπινάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα που έχουν ο φορέας και το ένθεμα. Η συγκεκριμένη αλληλοεπικάλυψη μπορεί να δημιουργηθεί κατά το σχεδιασμό των εκκινητών για την αντίδραση της *PCR* [63].

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

1. Ενίσχυση του τμήματος που θα κλωνοποιηθεί με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*PCR*) χρησιμοποιώντας ως μήτρα *DNA* το *cDNA* του επιθυμητού τμήματος του γονιδίου με ειδικούς *In-Fusion* εκκινητές.
2. Πέψη του φορέα (*PGEX-6P-1*) με περιοριστική ενδονουκλεάση, για την οποία έχει επιβεβαιωθεί ότι περιέχει μόνο μία θέση αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα (στην περιοχή του πολυσυνδέτη) όπου θα κλωνοποιηθεί το ένθεμα.
3. Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων *DNA* του φορέα και του ενθέματος σε πηκτή αγαρόζης για την ταυτοποίηση της παρουσίας τους και την ποσοτικοποίησή τους.
4. Έκπλυση και ανάκτηση των τμημάτων *DNA* από την πηκτή αγαρόζης (*Gel*

& PCR clean up kit, Macherey-Nagel)

5. Αντίδραση επίδεσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα (*Ligation*) με τη χρήση του ενζύμου *In-Fusion*
6. Μετασηματισμός σε επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα
7. Επιλογή μετασηματισμένων βακτηριακών κλώνων και ταυτοποίηση αλληλούχηση.



* If you obtain PCR product with non-specific background, isolate the target fragment by gel extraction first, then spin-column purify.

Εικόνα 3.4.1.1: Βασικά βήματα της διαδικασίας που πραγματοποιείται για την ένθεση του επιθυμητού τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα [64].

3.4.1.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές είναι απαραίτητοι για την σωστή ενίσχυση ενός γονιδίου ή τμήματός του με τη χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αποτέλεσμα το προϊόν που προκύπτει να είναι εξειδικευμένο και με γνωστά άκρα. Η επιτυχία ή μη των μετέπειτα βημάτων του πειράματος καθορίζονται από τον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών, για αυτό τον λόγο απαιτείται μεγάλη προσοχή στη λεπτομέρεια κατά την κατασκευή τους [65].

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν οι εξής παράγοντες:

- Αλληλουχία εκκινητών: Ο εκκινητής πρέπει να έχει εξειδίκευση και ευαισθησία και ειδικά στο 3' άκρο του, κάτι που αυξάνει την ευαισθησία και την εξειδίκευση της *PCR*. Έτσι ο εκκινητής δεν πρέπει να έχει:
- 3 ή περισσότερες βάσεις *G* ή *C* στη σειρά στο άκρο αυτό. Κάτι τέτοιο θα σταθεροποιούσε τυχόν μη-εξειδικευμένη σύνδεση.
- Μια 3'-θυμιδίνη, η οποία είναι επιρρεπής σε λάθος συνδέσεις σε σύγκριση με άλλα νουκλεοτίδια.
- Αποφεύγεται οι εκκινητές να είναι συμπληρωματικοί στο 3' άκρο, γεγονός που θα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών.
- Το μήκος του εκκινητή: Επιθυμητό μήκος: 18-30 βάσεις. Μικρότερο μήκος θα οδηγήσει στην ενίσχυση μη επιθυμητών περιοχών κατά την *PCR*.
- Θερμοκρασία τήξης (*T_m*): Η ιδανική θερμοκρασία τήξης ξεπερνά τους 60°C και πρέπει να είναι παρόμοια και στους δύο εκκινητές (διαφορά περίπου 5°C). Υπολογισμός *T_m*: $T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (G+C)$. Όμως για τα πειράματα οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του *T_m Calculator* από το site της *NEB* (neb.com) καθώς και του *oligo-calc* (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo-calc) που χρησιμοποιούν διαφορετικούς αλγορίθμους.

- Η περιεκτικότητα σε G και C πρέπει να είναι μεταξύ 40-60%

Κατά τον σχεδιασμό του εκκινητή που υβριδοποιείται στο 5' άκρο (συνδέεται με το 5' άκρο του γονιδίου που μας ενδιαφέρει). Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε αυτός να διαθέτει:

- Περιοχή αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση. Η περιοχή αυτή θα ταυτίζεται με την περιοχή αναγνώρισης που διαθέτει ο φορέας στον οποίο θα εισάγουμε το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.
- Μια προέκταση προς την 5' περιοχή που αυξάνει την αποτελεσματικότητα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 βάσεις).
- Περιοχή επικάλυψης με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει. Η περιοχή αυτή πρέπει να δίνει T_m από 60°C και άνω.

Κατά τον σχεδιασμό του εκκινητή που υβριδοποιείται στο 3' άκρο πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή ώστε αυτός να διαθέτει:

- Περιοχή αναγνώρισης από περιοριστική ενδονουκλεάση (ομοίως με 5' άκρο)
- Συμπληρωματική αλληλουχία κωδικονίου λήξης (συνήθως TAA) σε περίπτωση που δεν διατίθεται από το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (2-3 αλληλουχίες)
- Περιοχή επικάλυψης με την αλληλουχία που είναι συμπληρωματική του 3' άκρου του γονιδίου μας. ($T_m \geq 60^\circ\text{C}$)
- Μια προέκταση προς την 5' περιοχή (ομοίως με 5' άκρο)

Για την ενίσχυση του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ έγινε σχεδιασμός εκκινητών σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες. Είναι απαραίτητο οι εκκινητές να διαθέτουν μια αλληλουχία 15 νουκλεοτιδίων που αλληλεπικαλύπτεται με την αντίστοιχη του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης. Η υπόλοιπη αλληλουχία του εκκινητή κατασκευάζεται βάση των παραπάνω οδηγιών. Επιπλέον για την κατασκευή τους πέρα από τα παραπάνω χρησιμοποιήθηκε και το διαδικτυακό εργαλείο της *Clonetech*. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ αναγράφονται στον πίνακα 3.4.1.3.

Oligo Name	Sequence	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Gene Specific Tm (°C)
Oligo 1 (EcoRI) (Insert 1) Forward	GGGATCCCCGGAATTC ATGAAAATCAAAGATG AGAAAAGCA	41	41	69	58,1
Oligo 2 (Insert 1) (EcoRI) Reverse	GTCGACCCGGGAATTC TCAACTCCTTGCATGCT CAG	36	56	74,9	60,5

Πίνακας 3.4.1.3: Αλληλουχία και ιδιότητες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του cDNA της Lj-GSK3β⁹³⁻⁴⁶⁷.

Οι εκκινητές ελέγχθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος *OligoCalc* (www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc) για δημιουργία τυχόν διμερών ή διαμορφώσεων φουρκέτας. Οι θερμοκρασίες τήξης υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του *Tm Calculator* (www.tmcalculator.neb.com).

3.4.1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) οδηγεί στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή της περιοχής ενδιαφέροντος ενός μορίου DNA. Η αντίδραση διεξάγεται *in vitro* και αποτελεί μία εξαιρετικά ευαίσθητη διαδικασία, για αυτό τον λόγο μπορεί να λειτουργήσει ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα DNA. Οι εκκινητές προσδένονται

στο DNA στόχο και στις δύο πλευρές του τμήματος προς αντιγραφή. Άρα οι αλληλουχίες αυτών των θέσεων πρόσδεσης πρέπει να είναι γνωστές.

Η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του μείγματος προς αποδιάταξη των αλληλουχιών DNA (98°C) όπου γίνεται διάσπαση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τη διπλή έλικα και σχηματισμός μονόκλωνων αλυσίδων. Στη συνέχεια έχουμε μείωση της θερμοκρασίας στην θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (T_m) ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές στο DNA. Τέλος γίνεται αύξηση της θερμοκρασίας στους 72°C που είναι η θερμοκρασία δράσης της Hot Start πολυμεράσης η οποία ξεκινά την αντιγραφή του DNA. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για κατάλληλο αριθμό κύκλων (συνήθως 30) και η ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά [66]. Στην παρούσα διπλωματική εργασία προκειμένου να προκύψει υψηλής πιστότητας προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ η αντίδραση επαναλήφθηκε σε 25 κύκλους [67].

Το γονίδιο της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ ενισχύεται με τους παραπάνω εκκινητές. Τα προϊόντα που προκύπτουν διαθέτουν άκρα κατάλληλα για ομόλογο ανασυνδυασμό με το κατοχυρωμένο από την εταιρεία Clontech ένζυμο *In-Fusion*.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Hot start ready mix	25
Forward primer	1,5
Reverse primer	1,5
Πλασμιδιακός φορέας PGEX-6P-1	1,78
Water for injection	20,22
Τελικός όγκος (V _{ΤΕΛ})	50

Πίνακας 3.4.1.4 α: Σχεδιασμός αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση του κάθε εκκινητή μέσα στον όγκο της αντίδρασης ανέρχεται στα 10 μM και η τελική ποσότητα του πλασμιδιακού φορέα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 1 ng.

Βήματα	Θερμοκρασία (T°C)	Χρονική Διάρκεια	Κύκλοι
1. Initial Denaturation	95	3'	
2. Denaturation	98	20''	25
3. Annealing	68	15''	25

4. Extention	72	72''	25
5. Final Extention	72	6'	

Πίνακας 3.4.1.4 β: Πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Η χρονική διάρκεια του σταδίου 4 προκύπτει ανάλογα με το μήκος σε ζεύγη βάσεων του εκμαγείου (για κάθε 1 kb απαιτείται χρόνος 60'').

3.4.1.5 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* έγινε με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI*, η οποία αναγνωρίζει μία μοναδική αλληλουχία στην περιοχή πολυσυνδέτη του πλασμιδίου (*GAATTC*). Τα επιμέρους συστατικά και οι όγκοι της αντίδρασης πέψης, ορίστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (*Takara*). Πιο συγκεκριμένα, οι όγκοι ορίστηκαν ώστε το υπόστρωμα *DNA* να έχει ποσότητα $\leq 1\mu\text{g}$. Στη συνέχεια, έγινε επώαση της αντίδρασης σε θερμοκρασία 37°C για 2 ώρες.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Φορέας κλωνοποίησης PGEX-6P-1	8
Buffer 10X	2
EcoRI	1
Water for Injection	9

Πίνακας 3.4.1.5: Αντίδραση πέψης του κυκλικού φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Η ποσότητα του προς πέψη φορέα πρέπει να είναι περίπου 1μg.

Με το πέρας της επώασης η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη κατάλληλου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 6x (*6x loading buffer*), ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για ποσοτικοποίηση του γραμμικού πλέον φορέα.

3.4.1.6 Εξαγωγή και καθαρισμός *DNA* από πήκτωμα αγαρόζης (*gel extraction*)

Χρησιμοποιήθηκε το *kit* της εταιρείας *Macherey-Nagel*.

3.4.1.7 Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, η διαδικασία σύνδεσης του τμήματος του ενθέματος με τον γραμμικό πλέον φορέα βασίζεται στον ομόλογο ανασυνδυασμό και καταλύεται από μία ανασυνδετάση που αναγνωρίζει με ακρίβεια και εξειδίκευση τα κοινά άκρα των 15bp που έχουν ο φορέας και το ένθεμα. Η αναλογία της ποσότητας του ενθέματος προς αυτή του φορέα κλωνοποίησης ορίστηκε ως 3 προς 1 αντίστοιχα σύμφωνα με το *In-Fusion HD cloning kit* [63]. Ο λόγος για τον οποίο η ποσότητα του ενθέματος ορίζεται 3 φορές περισσότερη από την ποσότητα του φορέα είναι έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες ο φορέας να επανακυκλοποιηθεί χωρίς να λάβει ένθεμα (*In-Fusion*). Στη συνέχεια, γίνεται επώαση της αντίδρασης σε θερμοκρασία 50 °C για 30 min. Μετά τα 30 min επώασης, η αντίδραση περατώνεται και μπορεί να αποθηκευτεί στον πάγο (0 °C).

Στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli XL1 Blue*, απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα και έλεγχος.

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

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* στελέχους *XL1 Blue* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (*heat shock*). Σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli XL1-Blue* (100 μ L), προστίθενται 90 ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Τα κύτταρα, έπειτα από ελαφριά ανάδευση τοποθετούνται σε θερμοκρασία 0 °C για 30 min, στη συνέχεια θερμαίνονται σε θερμοκρασία 42°C για 45 sec και τέλος τοποθετούνται ξανά σε θερμοκρασία 0 °C για 2 min. Μετά το πέρας των 2 min προστίθενται στο διάλυμα των κυττάρων 900 μ L SOC θρεπτικού (η σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου αναγράφεται στον πίνακα 3.3) μέσου και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ποσότητα της

υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία *petri* με θρεπτικό μέσο *LB Agar*, στα οποία έχουν προστεθεί τα αντιβιοτικά Αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, με γυάλινο διανομέα (πιπέτα *pasteur*). Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 12-16 h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται υπό στείρες συνθήκες.

3.4.1.8 Απομόνωση πλασμιδίου σε μικρή κλίμακα (*MiniPrep*)

Σε σωλήνες τύπου *Falcon*, που περιέχουν θρεπτικό μέσον *LB Broth* με αμπικιλλίνη (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και χλωραμφαινικόλη (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) γίνεται εμβολιασμός με μία αποικία των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E. coli* (*XL1-Blue*) που διαθέτουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Στη συνέχεια γίνεται επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 12-16 h και υπό συνεχή ανάδευση (210 *rpm*).

Για την εξαγωγή του πλασμιδίου από τα κύτταρα ακολουθείται το πρωτόκολλο που διατίθεται από την εταιρεία *Macherey-Nagel*.

3.4.2 Μελέτες έκφρασης της *Lj-GSK3 β* ₉₃₋₄₆₇

Πραγματοποιείται μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* διαφορετικών στελεχών *Rosetta* και *B834 pLysS* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (*heat shock*). Στα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* (100 μL), προστίθενται 1,5 μL διαλύματος ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 0 °C για 30min. Στη συνέχεια θερμαίνονται σε θερμοκρασία 42 °C για 45 sec και τέλος τοποθετούνται ξανά σε θερμοκρασία 0 °C για 2min. Μετά το πέρας των 2 min προστίθενται στο διάλυμα των κυττάρων 900 μL *LB* θρεπτικού μέσου άνευ αντιβιοτικού και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37 °C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (210 *rpm*). Μετά το πέρας της επώασης ποσότητα της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλία *petri* με θρεπτικό μέσο *LB Agar*, στα οποία έχει

προσθεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ και χλωραμφαινικόλη σε τελική συγκέντρωση $34 \mu\text{g}/\text{mL}$, με γυάλινο διανομέα (πιπέττα *pasteur*). Τα τρυβλία τοποθετούνται για επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 h σε ξηρό θερμαινόμενο θάλαμο.

Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα (*IPTG*), σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους.

Μετά το πέρας του μετασηματισμού των βακτηριακών στελεχών έγινε επιλογή μια μοναδικής στικτής αποικίας από το τρυβλίο *Petri* και μεταφορά σε σωληνάριο τύπου *falcon* (θρεπτικό μέσο 5 mL) που περιείχε αμπικιλίνη ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) και χλωραμφαινικόλη ($34 \mu\text{g}/\text{mL}$) και επώαστηκαν για 16 h σε θερμοκρασία 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Εφόσον τα κύτταρα αναπτύχθηκαν ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα (θρεπτικό μέσο 80 mL) με αναλογία 1:100 για κάθε κυτταρική σειρά. Στην συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία της επαγωγής σε συγκέντρωση $0,1 \text{ mM IPTG}$ και χωρίς επαγωγέα σε θερμοκρασία 37°C .

Το θρεπτικό μέσο ήταν το *LB Broth* και όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε στείρες συνθήκες.

3.4.2.1 Επαγωγή υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 37°C ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του επαγωγέα

Σε θρεπτικό μέσο *LB Broth* στο οποίο έχει προσθεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν 1/100 από μία καλλιέργεια των 10 mL που έχει αναπτυχθεί για 16h. Επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει $OD_{600\text{nm}}=0,5-0,8$. Στο σημείο αυτό όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη του επαγωγέα *IPTG*. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 37°C υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm) για 3 h. Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργείων στα 5000 rpm , 4°C για 5 min το υπερκείμενο

απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 10 sec με παραγωγή υπερήχων εύρους 70%. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας από τους υπέρηχους, οι σωλήνες τύπου *Eppendorf* που περιέχουν το δείγμα είναι τοποθετημένοι σε πάγο. Μέρος του δείγματος αφαιρείται μετά τη λύση για να γίνει ανάλυσή του σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου(*SDS-PAGE*) (*TOTAL*). Το υπόλοιπο δείγμα που περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 13000 *rpm*, 4 °C για 30 *min*. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο (*SOLUBLE*) ώστε να αναλυθεί σε *SDS-PAGE*.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Tris-HCL	50mM
NaCl	0,2 mM
MTG	0,1%
Glycerol	5%
PMSF	1mM

Πίνακας 3.4.2.1: Σύσταση Διαλύματος λύσης κυττάρων. $V_{\text{τελ}}$: 50 mL, pH= 7,0.

3.4.2.2 Επαγωγή υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 16 °C ως συνάρτηση της συγκέντρωσης επαγωγέα

Σε θρεπτικό μέσο *LB Broth* στο οποίο έχει προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάστηκαν 1/100 από μία καλλιέργεια των 10 *mL* που έχει αναπτυχθεί για 16 *h*. Επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση (210 *rpm*) μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει $OD_{600nm}=0,5-0,8$. Στο σημείο αυτό όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης ακολουθεί επαγωγή της υπερέκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με προσθήκη του επαγωγέα *IPTG*. Η καλλιέργεια διαιρείται σε κωνικές φιάλες (10 *mL* καλλιέργειας) ανάλογα με την συγκέντρωση επαγωγέα (*IPTG*). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 16°C υπό συνεχή ανάδευση (210 *rpm*) για 3 *h*. Μετά το πέρας της επαγωγής γίνεται φυγοκέντρηση των καλλιεργειών στα 5000 *rpm*, 4 °C για 5 *min* το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης. Κατόπιν γίνεται πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο

των 10 sec με παραγωγή υπερήχων εύρους 70%. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας από τους υπέρηχους, οι σωλήνες τύπου *Eppendorf* που περιέχουν το δείγμα είναι τοποθετημένοι σε πάγο. Μέρος του δείγματος αφαιρείται μετά τη λύση για να γίνει ανάλυσή του σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (*SDS-PAGE*) (*TOTAL*). Το υπόλοιπο δείγμα που περιέχει τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρείται στα 13000 rpm, 4 °C για 30 min. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέγεται το υπερκείμενο (*SOLUBLE*) ώστε να αναλυθεί σε *SDS-PAGE*. Η συγκεκριμένη δοκιμή πραγματοποιήθηκε και στις κυτταρικές σειρές *Rosetta*, *B834 plysS*. Στην συγκεκριμένη περίπτωση έγινε χρήση διαφορετικού διαλύματος λύσης των κυττάρων του οποίου η σύσταση αναγράφεται παρακάτω (Πίνακας 3.4.2.2).

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Tris-HCL	50mM
NaCl	0,2 mM
MTG	0,1%
Glycerol	5%
PMSF	1mM

Πίνακας 3.4.2.2: Σύσταση Διαλύματος λύσης κυττάρων. $V_{\text{τελ}}$: 50 μL , pH= 7,6.



Οι κατάλληλες συνθήκες για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης από τα ευρήματα των δοκιμών, ορίστηκαν ως εξής: Κυτταρική σειρά: *B834 plysS*, συγκέντρωση επαγωγέα (*IPTG*) 0,5 mM, θερμοκρασία 16 °C

3.4.3 Χρωματογραφία

3.4.3.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (*FPLC*)

Το σύστημα *ÄKTA FPLC* (*GEHealthcare*) αποτελεί το πιο διαδεδομένο σύστημα που χρησιμοποιείται στο καθαρισμό πρωτεϊνών. Είναι ένα αυτοματοποιημένο σύστημα όπου τα διαλύματα περνούν μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας

αντλίες θετικής μετατόπισης οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα από το σύστημα υπό υψηλή πίεση. Για την απομόνωση πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται διάφορα είδη χρωματογραφικών τεχνικών όπως η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, μοριακής διήθησης και συγγένειας. Μετά την λύση και φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων το υπερκείμενο πέρασε από φίλτρο 0,45 μm και τοποθετήθηκε στον σωλήνα *superloop*. Επίσης τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν πριν την χρήση τους φιλτραρίστηκαν υπό κενό με φίλτρο 0,45 μm και απαερώθηκαν με την χρήση υπερήχων και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στις αντίστοιχες αντλίες. Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα *UNICORNTM* [68].

3.4.3.2 Χρωματογραφία Συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας (*affinity chromatography*) εκμεταλλεύεται την υψηλή συγγένεια πολλών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που έχουν σχεδιαστεί για να εμφανίζουν συγγένεια με ειδικές χημικές ομάδες. Το δείγμα περνά μέσω της στήλης και όποια βιομόρια εμφανίζουν συγγένεια με το ακινητοποιημένο υλικό (προσδέτη) θα παραμείνουν προσδεδεμένα στη στήλη, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες που δεν έχουν συγγένεια θα περάσουν από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη στόχος που έχει συνδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη, θα αποσυνδεθεί από αυτόν μέσω κάποιας αλλαγής στις πειραματικές συνθήκες, όπως αλλαγή του *pH*, της ιοντικής ισχύος ή της σύστασης του διαλύματος [69].

Κατά τη διαδικασία καθαρισμού των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα [67]:

- Εξισορρόπηση: Κατά την εξισορρόπηση γίνεται χρήση του διαλύματος A (Στην συγκεκριμένη περίπτωση η σύστασή του αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.3 β) το οποίο απομακρύνει την αιθανόλη από τη στήλη. Το διάλυμα αυτό είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων ώστε να υπάρχει ομοιογένεια μεταξύ του δείγματος που θα αναλυθεί και του διαλύματος εξισορρόπησης.
- Εισαγωγή δείγματος (*injection*): Το δείγμα εισάγεται στη στήλη, υπό συνθήκες

που ευνοούν την ειδική σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στο υλικό της στήλης με το οποίο εμφανίζει συγγένεια, λόγω της ύπαρξης ενός ακινητοποιημένου προσδέτη. Τα συστατικά που δεν συνδέονται απομακρύνονται από τη στήλη με αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης του *UV* (*Flowthrough*). Το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη στόχος θα πρέπει να έχει το ίδιο *pH* και ιοντική ισχύ με το διάλυμα το οποίο έχει εξισορροπηθεί η στήλη.

- Πλύση: Οι προσμίξεις που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στην στήλη απομακρύνονται με το διάλυμα πλύσης, ώστε να μείνει μόνο η πρωτεΐνη που εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τον ακινητοποιημένο προσδέτη. Στο χρωματογράφημα συνήθως το στάδιο αυτό απεικονίζεται ως μια μεγάλη πτώση και στην συνέχεια σταθεροποίηση της απορρόφησης του *UV*. Η πλύση της στήλης γίνεται με το διάλυμα A.
- Έκλυση: Η ειδικά προσδεμένη πρωτεΐνη απομακρύνεται από την στήλη είτε με σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης (διαβάθμιση συγκέντρωσης), είτε με εφαρμογή 100 % του διαλύματος έκλυσης (*Buffer B*, η σύσταση του οποίου αναφέρεται στον πίνακα 3.4.3.3 γ). Αυτό οδηγεί σε απομάκρυνση της πρωτεΐνης που έχει μείνει προσδεμένη στο υλικό της στήλης. Με τον τρόπο, αυτόν, συλλέγεται η πρωτεΐνη στόχος σε καθαρή μορφή.

3.4.3.2.1 Στήλη πρόσδεσης *GST*

Ένας διαδεδομένος τρόπος για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, που στηρίζεται στη συγγένεια μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη, είναι η προσθήκη ετικέτας της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (*GST-Tag*, 26 kDa). Η έκφραση πρωτεΐνης σε πλασμιδιακό φορέα *P-GEX* έχει ως αποτέλεσμα το προϊόν της έκφρασης του γονιδίου να έχει είτε στο NH_2 - είτε στο COOH - άκρο του, προσδεμένη την S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, η οποία εμφανίζει συγγένεια με την γλουταθειόνη (*GSH*). Με αυτό τον τρόπο η πρωτεΐνη δεσμεύεται στη στήλη που διαθέτει ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν έχουν συγγένεια απομακρύνονται μετά την έκπλυση της στήλης. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκλύεται με χρήση ανηγμένης γλουταθειόνης (*GSH*) [70].

3.4.3.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης βασίζεται στο ταχύ διαχωρισμό μορίων ανάλογα με το μέγεθος. Είναι μια χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση (*gel*) και υγρή κινητή φάση (υδατικό). Ο διαχωρισμός ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος γίνεται κυρίως σε στήλες που έχουν σαν υλικό πλήρωσης διάφορες πηκτές. Οι πηκτές έχουν πολύ ανοιχτά τρισδιάστατα επίπεδα πλέγματα, που σχηματίζονται με διασταυρούμενους συνδυασμούς από μεγάλες αλυσίδες και δημιουργούν οπές οι οποίες έχουν κάποια συγκεκριμένη διάμετρο. Με αυτό τον τρόπο τα μεγάλα μόρια διέρχονται από την στήλη χωρίς να εισχωρήσουν στα πηκτές ενώ τα μικρότερα εισχωρούν ανάλογα με το μέγεθος τους. Με κατάλληλη επιλογή της στήλης μοριακής διήθησης μπορούμε έτσι να διαχωρίσουμε τις πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος καθώς τα μεγαλύτερα μόρια θα εκλουστούν πρώτα [71].

3.5 Πειραματική διαδικασία

Πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα (καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων σε υγρό θρεπτικό μέσο όγκου 2 L), σε κύτταρα *B834 rlysS*, σε θερμοκρασία 18 °C με συγκέντρωση επαγωγέα *IPTG* 0,5 mM. Με το πέρας της επαγωγής το κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 6000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C για 30 min. Έπειτα ακολούθησε λύση των κυττάρων με νέας σύστασης διαλύματος λύσης (Πίνακας 3.5 α). Προστέθηκαν 21 mL διαλύματος λύσης και στη συνέχεια στο σύνολο του κυτταρολύματος προστέθηκαν 2 μL διαλύματος βενζονάσης. Το κυτταρόλυμα μεταφέρθηκε σε σωλήνες τύπου *falcon* όπου και υπέστη ξαφνικό πάγωμα σε αιθανόλη σε θερμοκρασία -80°C (*flash freeze*) προκειμένου να αποθηκευτεί για μετέπειτα χρήση. Για να προετοιμαστεί κατάλληλα το δείγμα την ημέρα που ξεκινάει ο καθαρισμός πρέπει να ξεπαγώσει το *pellet* το οποίο στην συνέχεια εκτίθεται σε υπερήχους του 1 κύκλου, εύρους 70% για 3 min με παύσεις 15

sec. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση για 55 min σε 18000 rpm σε θερμοκρασία 6 °C, όπου το ίζημα μεταφέρεται σε νέους σωλήνες τύπου *falcon*.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
Tris-HCL	50mM
NaCl	0,2 mM
MTG	0,1%
Glycerol	5%
Protease inhibitors	0,001%

Πίνακας 3.5 α.: Σύσταση Διαλύματος λύσης κυττάρων. V_{τελ}: 150 mL, pH= 7,5.

Η πρώτη στήλη η οποία χρησιμοποιήθηκε ήταν η *Protino GST/4B* όγκου 1 mL, για να γίνει η σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου που φέρει συνδεδεμένη την ετικέτα της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης στα ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης της στήλης. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες στην συνέχεια θα απομακρυνθούν με την έκπλυση της στήλης, αφού δεν έχουν σχέση συγγένειας με κάποιο από τα υλικά της στήλης.

Σε πρωταρχικό στάδιο η στήλη εξισορροπήθηκε με την χρήση διαλύματος εξισορρόπησης *Buffer A* (Πίνακας 3.5.β) Ακολούθησε η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με ροή 0,3 mL/min και συλλέχθηκαν αρχικά κλάσματα όγκου 5 mL (*flow through*). Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα πλύσης *Wash Buffer* (Πίνακας 3.5.δ), η ροή αυξήθηκε στα 0,4 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL (*wash*). Έπειτα ακολούθησε η προσθήκη της πρωτεάσης *Rhinovirus 3C* επάνω στην στήλη με την μέθοδο *partial filling*. Η πρωτεάση *Rhinovirus 3C* παρέμεινε στην στήλη για 16 h προκειμένου να κόψει την αλληλουχία μεταξύ της πρωτεΐνης και της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Τέλος ακολούθησε η έκλυση της στήλης με 10 όγκους στήλης (V= 10 mL) *Buffer B* (Πίνακας 3.5.γ). Η ροή ορίστηκε στα 0,3 mL/min, και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris-HCl	50 mM
NaCl	0,2 mM

MTG	0,1%
Glycerol	5 %
EDTA	1 mM

Πίνακας: 3.5 β: *Buffer A* (Διάλυμα εξισορρόπησης), pH= 7,5

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris-HCl	50 mM
NaCl	0,2 mM
MTG	0,1%
Glycerol	5 %
EDTA	1 mM
GSH	20 mM

Πίνακας: 3.5 γ: *Buffer B* (Διάλυμα έκλουσης), pH= 8

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris-HCl	50 mM
MTG	0,1%
EDTA	1 mM

Πίνακας: 3.5 δ: *Wash Buffer* (Διάλυμα πλύσης), pH= 8

Μετά την συλλογή των κλασμάτων ακολούθησε συμπύκνωση της απομονωμένης πρωτεΐνης με τη μέθοδο της εξάχνωσης ατμών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ελεγχόταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Τελικά με το πέρας 5 h και 45 min επιτεύχθηκε συγκέντρωση πρωτεΐνης 14,4 mg/mL, η οποία υπολογίστηκε με την μέθοδο *Bradford*.

Σε επόμενο στάδιο 250 μL του δείγματος που προέκυψε από την συμπύκνωση φορτώθηκε σε στήλη μοριακής διήθησης, προκειμένου να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες του δείγματος με βάση το μοριακό τους βάρος. Το δείγμα φορτώθηκε στην στήλη με την μέθοδο *partial filling*. Το διάλυμα εξισορρόπησης που χρησιμοποιήθηκε αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.2., για 1 όγκο στήλης ($V_{στήλης} = 120 \text{ mL}$).

3.6 Αναλυτικές μέθοδοι

Ηλεκτροφόρηση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μόριο (π.χ. πρωτεΐνη ή νουκλεϊκό οξύ) που διαθέτει καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί κατά μήκος ενός ηλεκτρικού πεδίου (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων). Το φαινόμενο αυτό προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για τον διαχωρισμό μακρομορίων (π.χ. πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα). Η ταχύτητα κίνησης των μορίων που ηλεκτροφορούνται μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο του μορίου και τον συντελεστή τριβής. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σχεδόν πάντοτε σε πηκτή η οποία λειτουργεί ως μοριακός ηθμός, ενισχύοντας τον διαχωρισμό. Τα μόρια ανάλογα με το μέγεθος τους (ως προς το μέγεθος των πόρων της πηκτής) κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες διαμέσου της, αφού τα μικρότερα μόρια είναι σε θέση να διαπερνάνε πολύ εύκολα τους πόρους [72].

3.6.1 Ηλεκτροφόρηση *DNA* σε πηκτή αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό μορίων *DNA* με διαφορετικό μήκος σε ζεύγη βάσεων χρησιμοποιείται η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα μόρια διαμέσου της πηκτής αγαρόζης καθορίζεται από το μήκος των μορίων. Η πηκτή αποτελεί ένα δίκτυο με πόρους μέσα από τους οποίους τα μόρια *DNA* πρέπει να διέλθουν ώστε να φτάσουν στον θετικό πόλο (αφού η φωσφορική ομάδα των νουκλεοτιδίων τους αποδίδει αρνητικό φορτίο). Αυτό το γεγονός έχει ως συνέπεια τα μικρότερα μόρια (σε σχέση με την διάμετρο των πόρων) να κινούνται ταχύτερα διαμέσου της πηκτής σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα μόρια τα οποία απαιτούν περισσότερο χρόνο για να φτάσουν στον θετικό πόλο.

Η αγαρόζη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη, του οποίου το μονομερές είναι ένας δυσσακχαρίτης L- και D- γαλακτόζης (αγαροβιόζη) [73], που έχει την ικανότητα να σχηματίζει πηκτή με πόρους διαμέτρου από 100 *nm* μέχρι 500 *nm* ανάλογα με τη συγκέντρωση της αγαρόζης [74]. Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα (*TAE*) στο οποίο προστίθεται σε συγκεκριμένη

ποσότητα προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή διάμετρος των πόρων. Στην συνέχεια έπεται θέρμανση του μείγματος αγαρόζης-ρυθμιστικού διαλύματος TAE για 1-3 min μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως η αγαρόζη. Ακολουθεί η προσθήκη ειδικής χρωστικής (*Midori Green*), η οποία δεσμεύεται στο DNA και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA εκπέμποντας πράσινο φθορισμό όταν αυτή είναι προσδεμένη σε DNA ή RNA (~530 nm), αφού διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία χαμηλού μήκους κύματος (~270 nm) [75]. Αφού κρυώσει το μίγμα προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα της χρωστικής *Midori Green* (χρωστική που παρεμβάλλει ανάμεσα στις αζωτούχες βάσεις του DNA, αντίστοιχη με το Βρωμιούχο Αιθίδιο *EtBr*, χωρίς όμως καρκινογόνο δράση), γίνεται ανάδευση και το διάλυμα τοποθετείται σε θήκη ηλεκτροφόρησης μέχρι να αποκτήσει την μορφή της πηκτής. Κατόπιν η θήκη τοποθετείται σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης. Τα προς ανάλυση δείγματα προετοιμάζονται με προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας *Loading dye* 6x και τοποθετούνται σε ειδικές θέσεις (*wells*) της πηκτής. Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται και ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών (*Ladder*).

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Tris	242 gr
Οξικό οξύ	57,1 mL
EDTA 0,5 M pH= 8	100 mL

Πίνακας 3.6.1 α: Σύσταση διαλύματος TAE 50X, Τελικός όγκος: 1L, pH= 8.6.

Το διάλυμα TAE 1X προκύπτει από την αραίωση του διαλύματος TAE 50X.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα
Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X	100 mL
Agarose	1 gr
Midori Green	7μL

Πίνακας 3.6.1 β: Σύσταση πηκτών αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκαν.

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

Η τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS (SDS-PAGE) βασίζεται στην Παρασκευή δύο πηκτών οι οποίες τελικά θα αποτελέσουν μία πηκτή. Αυτή θα αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοιβάξης (*stacking gel*), η οποία πάντοτε απαντάται με πυκνότητα 5% και την πηκτή διαχωρισμού (*separation gel*) της οποίας τη πυκνότητα μπορούμε να μεταβάλλουμε ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του πειράματος. Οι δύο πηκτές είναι διαφορετικές μεταξύ τους αφού έχουν διαφορετική διάμετρο πόρων, *pH* καθώς και ιονική ισχύ. Η πηκτή επιστοιβάξης, έχει μεγαλύτερη διάμετρο πόρων και μικρότερο *pH* (6,8) από την πηκτή διαχωρισμού (*pH*= 8,8) και έχει ως στόχο να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Στην πηκτή διαχωρισμού η διάμετρος των πόρων του πλέγματος ασκεί επιρροή στην κίνηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες κινούνται πιο αργά από τις μικρότερες [76].

Η παρασκευή της πηκτής βασίζεται στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και δι-ακρυλαμιδίου με την παρουσία του υπερθειικού αμμωνίου (APS) και της τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED ή TMEDA). Το APS δημιουργεί ελεύθερες ρίζες θείου ενώ το TEMED λειτουργεί επιταχύνοντας την παραγωγή τους. Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες θείου τελικά θα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης και του bis-ακρυλαμιδίου [76].

Η πηκτή παρασκευάζεται ανάμεσα σε δύο παράλληλες γυάλινες πλάκες (10 x 8 cm) με την μεταξύ τους απόσταση να είναι 1 mm. Αρχικά παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού, με την πήξη της οποίας τοποθετείται η πηκτή επιστοιβάξης στην οποία τελικά σχηματίζονται 10 ή 15 υποδοχές (ή αλλιώς πηγάδια) με τη βοήθεια ειδικής “χτένας”. Μόλις είναι έτοιμη ολόκληρη η πηκτή, θα τοποθετηθεί σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Για να μπορέσει να ολοκληρωθεί όλη η διαδικασία θα πρέπει να προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης *Running Buffer* 1x που θα πρέπει να είναι σε επαφή με την πηκτή σε όλη την επιφάνειά της [77].

Σύσταση πηκτών (%)

	5%	10%	12%
	Επιστοιβάξης (3mL)	Διαχωρισμού (5mL)	Διαχωρισμού (5mL)
dH2O	2,1 mL	1,9 mL	1,6 mL
30% Acrylamidemix	500 μL	1,7 mL	2 mL
Tris 1.5 M, pH8.8	-	1,3 mL	1,3 mL
Tris 1.0 M, pH 6.8	380 mL	-	-
SDS (10%)	30 μL	50 μL	50 μL
APS 10%	30μL	50 μL	50 μL
TEMED	3 μL	2 μL	2 μL

Πίνακας 3.6.2 α: Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμίδης

Τα δείγματα των πρωτεϊνών προς ηλεκτροφόρηση αναμειγνύονται με 4x *SDS Protein Sample Buffer* με σκοπό σε όλα τα δείγματα να υπάρχει ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης και η συγκέντρωση του *SDS Protein Sample Buffer* να είναι 1x [77]. Το δωδεκακυλο-θειικό νάτριο (*SDS*) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών και συνδέεται στις κύριες αλυσίδες των αμινοξέων με αναλογία 1 μόριο *SDS* σε 2 αμινοξέα. Επίσης το *SDS* φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο βάσει του μοριακού τους βάρους [72]. Το 4x *SDS Protein Sample Buffer* περιέχει επίσης και β-μερκαπτοαιθανόλη η οποία οδηγεί στην πλήρη μετουσίωση της πρωτεΐνης αφού έχει την ικανότητα να ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς, εμποδίζοντας την εκ νέου αναδίπλωση της πρωτεΐνης μετά το βρασμό, επίσης οδηγεί στην αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της πρωτεΐνης σε υπομονάδες [72]. Τέλος το 4x *SDS Protein Sample Buffer* περιέχει κυανό της βρομοφαινόλης που καθιστά δυνατή την παρατήρηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης [77].

Το μίγμα πρωτεϊνών-*Loading Buffer* θερμαίνεται σε θερμοκρασία 95°C-98°C για 5 min ώστε όλες οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο μίγμα να αποδιαταχθούν πλήρως. Έπειτα

το μίγμα των πλέον αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών τοποθετείται στις ειδικές θέσεις (ή αλλιώς πηγάδια) με τη χρήση πιπέτας. Τέλος η κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό που δημιουργεί ρεύμα τάσης 120 V μέχρι να περάσει από την πηκτή επιστοιβάξης στην πηκτή διαχωρισμού, όπου σε εκείνο το σημείο ανεβάζουμε την τάση στα 180 V.

Σε επόμενο στάδιο οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες με το τέλος της ηλεκτροφόρησης ανιχνεύονται με χρώση *Coomassie Blue* (Πίνακας 3.6.2 β). Η χρώση της πηκτής πραγματοποιείται σε όξινο περιβάλλον (οξικό οξύ 10% v/v). Η πηκτή πολυακρυλαμίδης επωάζεται σε διάλυμα *Coomassie Blue* και θερμαίνεται μέχρι το σημείο βρασμού. Έπειτα αφήνεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Τελικά απορρίπτεται το διάλυμα χρώσης και ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις της πηκτής πολυακρυλαμίδης σε διάλυμα 10% v/v οξικού οξέος μέχρι αυτή να αποχρωματιστεί πλήρως και να γίνουν διακριτές ζώνες των πρωτεϊνών [77].

Σύσταση διαλύματος χρώσης <i>Coomassie Blue</i>	Ποσότητα
Brilliant blue R-250	0,1 % w/v
Μεθανόλη	50 %
οξικό οξύ	5 %

Πίνακας 3.6.2 β: Σύσταση διαλύματος χρώσης *Coomassie Blue*.

3.6.3 Στύπωμα κατά *Western* (*Western-Blot*)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης εφαρμόζεται στην τεχνική του στυπώματος κατά *Western*. Στη συγκεκριμένη τεχνική πρωτεϊνικά μόρια που έχουν διαχωριστεί σε πηκτή *SDS*-πολυακρυλαμίδης 10% μπορούν να μεταφερθούν και να δεσμευτούν σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (*PVDF*) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Στην συνέχεια δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης της πρωτεΐνης: είτε μετά την επώαση με ένα σημασμένο αντίσωμα κατάλληλο για την πρωτεΐνη, είτε με την χρήση δύο αντισωμάτων (το πρώτο αντίσωμα θα αναγνωρίζει την πρωτεΐνη και το δεύτερο θα είναι εξειδικευμένο για την ανίχνευση της μη μεταβλητής περιοχής του πρώτου αντισώματος). Η οπτικοποίηση της ειδικής

πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος γίνεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας, δηλαδή την εκπομπή φωτός που προέρχεται από την απελευθέρωση ενέργειας από ένα υπόστρωμα που βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επηρεάζεται από μια χημική αντίδραση [78].

Μετά το πέρα της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου η πηκτή αφαιρείται από την συσκευή ηλεκτροφόρησης και αποκόπτεται η πηκτή επιστοιβάξης. Η μεμβράνη *PVDF* επώάζεται σε μεθανόλη 100% για χρονικό διάστημα 25-30 *sec* προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Έπειτα, η μεμβράνη *PVDF*, τα έξι διηθητικά χαρτιά *Whatman* και η πηκτή εμβαπτίζονται σε *Transfer Buffer 1x* για 10 *min*. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η μέθοδος *Semi-dry Yrdimes Semi-dry Blotter, Wealtec*. Αρχικά τα τρία διηθητικά χαρτιά *Whatman* με την μεμβράνη *PVDF* τοποθετήθηκαν με προσανατολισμό προς τον θετικό πόλο, στην συνέχεια πάνω από την μεμβράνη τοποθετήθηκε η πηκτή και τελικά από επάνω της άλλα τρία διηθητικά χαρτιά *Whatman*. Ο προσανατολισμός της μεμβράνης *PVDF* και της πηκτής είναι τέτοιος ώστε τα σύμπλοκα *SDS*-πρωτεϊνών που βρίσκονται στην πηκτή να μετακινηθούν προς τον θετικό πόλο και να εγκατασταθούν στην μεμβράνη *PVDF* μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Να σημειωθεί ότι σε όλο το σύστημα (διηθητικά χαρτιά *Whatman*, μεμβράνη *PVDF*, πηκτή) δεν πρέπει να παρεμβάλλονται φυσαλίδες, καθώς παρεμποδίζεται η ομαλή διέλευση του ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη *PVDF* πραγματοποιήθηκε με την διέλευση ρεύματος σταθερής έντασης (0,27 *A*) για χρονικό διάστημα 55 *min*. Για την επιβεβαίωση της μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη *PVDF* έγινε με την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα *Ponceau S*.

Με το πέρα της ηλεκτρομεταφοράς και έπειτα από την επιβεβαίωση ότι οι πρωτεΐνες είχαν μεταφερθεί στη μεμβράνη *PVDF*, ακολούθησε η προετοιμασία της μεμβράνης για την σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε επώαση με *Blocking Buffer* (Πίνακας 3.6.3 β) για 1 *h* υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό έχει ως στόχο να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης του πρωτογενούς αντισώματος από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Μετά το τέλος των 1 *h* προστέθηκε το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος με το οποίο επώαστηκε η μεμβράνη *PVDF* για 16h σε

θερμοκρασία 4 °C υπό συνεχή ανάδευση. Στην συνέχεια ακολούθησαν οι διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα *PBS-T* (Πίνακας 3.6.3 γ) (για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος. Ο αριθμός και η διάρκεια των πλύσεων είναι μεταβλητός και εξαρτάται από το εκάστοτε αντίσωμα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν πέντε πλύσεις, καθεμία από τις οποίες είχε διάρκεια 5 *min*. Αφού τελείωσαν οι πλύσεις ακολούθησε η επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 *h* σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση και με το πέρας του χρόνου πραγματοποιήθηκαν πάλι πέντε πλύσεις των 5 *min* υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα *PBS-T* ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος [78].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων στηρίχθηκε στο γεγονός ότι το δευτερογενές αντίσωμα ήταν συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (*HRP*). Το ένζυμο αυτό παρουσία H_2O_2 είναι σε θέση να οξειδώνει την λουμινόλη, σε αλκαλικό περιβάλλον, με ταυτόχρονη απελευθέρωση φωτονίων τα οποία αποτυπώνονται με την μορφή σκοτεινής ζώνης σε ακτινολογικό *film*. Αφού ολοκληρωθούν λοιπόν και οι πλύσεις μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη επάζεται για τρία λεπτά στο σκοτάδι με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (*ECL*) [78]. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται είτε με έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, είτε σε μηχάνημα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος της εμφάνισης μπορεί να ποικίλλει (30sec- 1 *h*), ανάλογα με την ένταση του σήματος, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από την ποσότητα της πρωτεΐνης προς ανίχνευση (Στην παρούσα διπλωματική εργασία οι αντιδράσεις ενίσχυσης της χημειοφωταύγειας πραγματοποιήθηκαν για 10 *min* και 30 *min*).

→ Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της παρακάτω διαδικασίας.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (gr)
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,15

KH₂PO₄	0,2
-------------------------------------	------------

Πίνακας 3.6.3 α: Διάλυμα *PBS 1X*, Τελικός όγκος είναι ίσος με 1L, *pH*= 7,4

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα
Tween 20	0,1%
Άπαχο γάλα σε σκόνη	5%

Πίνακας 3.6.3 β: Διάλυμα Κορεσμού (*Blocking Buffer*) σε *PBS*.

Αντιδραστήριο	Περιεκτικότητα
Tween 20	0,1%

Πίνακας 3.6.3 γ Διάλυμα *PBS-T*: Η προσθήκη του *Tween 20* πραγματοποιείται σε διάλυμα *PBS 1X*.

Αντιδραστήριο	Εταιρία
GST Antibody (B-14): sc-138 (Μονοκλωνικό αντίσωμα IgG ποντικού)	Santa Cruz Biotechnology
HRP-conjugated secondary goat anti- mouse IgG (Δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με περοξειδάση του χρένου)	Pierce

Πίνακας 3.6.3 δ: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια του στυπώματος κατά *Western*. Τα αντισώματα αραιώνονται σε διάλυμα κορεσμού. Το πρώτο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1: 10.000 ενώ το δεύτερο σε αραιώση 1: 25.000.

Για την αντίδραση χημειοφωταύγειας:

Διάλυμα: λουμινόλης/*p*-κουμαρικού/*H₂O₂*: *luminol* 0,022 % : διαλύεται σε 100 *mM Tris pH* 8,5, υπό ανάδευση στο σκοτάδι), *p-cumaric acid* 0,0112 %: διαλύεται σε *DMSO* 100%), 3% *H₂O₂*: αραιώνεται κατάλληλα σε νερό.

Διαλύματα για την εμφάνιση του *film*:

Διάλυμα	Εταιρία
Fixer	Kodak
Developer	Kodak

Πίνακας 3.6.3.δ: Διαλύματα εμφάνισης ακτινολογικού *Film*

4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα Τεχνικών Κλωνοποίησης

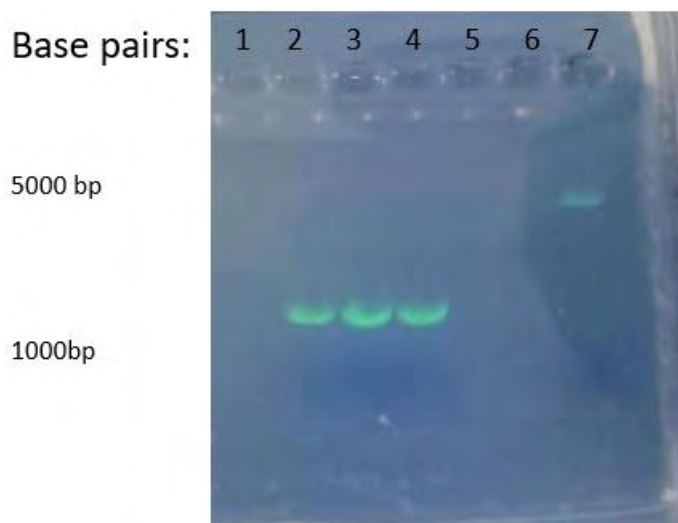
4.1.1 Ενίσχυση γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*PCR*).

Το πρώτο βήμα του πειράματος ήταν η κατασκευή του γονιδίου της περικεκομμένης κινάσης του φυτού *Lotus japonicus* ομόλογης *GSK3β* (*Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇). Το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών και Περιβάλλοντος στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, μας παραχώρησε το πλασμίδιο στο οποίο ήταν εντεθημένη ολόκληρη η κωδική αλληλουχία του γονιδίου της *Lj-GSK3β*. Το τμήμα του γονιδίου στην συνέχεια εντέθηκε σε φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* με την δράση του ενζύμου *In-Fusion* (κατοχυρωμένο από την εταιρία *Clontech*). Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται προσδίδουν άκρα στο τμήμα του γονιδίου τα οποία είναι ομόλογα με περίπου 15bp του φορέα κλωνοποίησης. Το συνολικό μέγεθος του κλωνοποιημένου γονιδίου αναμένεται να ανέρχεται στις 1137bp συν τις βάσεις που προσθέτουν οι εκκινητές. Από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που πραγματοποιήθηκε με το *kit* της εταιρείας *Clontech* προέκυψε τελικά δείγμα τελικού όγκου 50 μ l που έπειτα από την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας *Loading dye* 6x φορτώθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της ενίσχυσης του ενθέματος. Έπειτα ακολούθησε ανάκτηση και καθαρισμός με το *kit* της εταιρείας *Macherey-Nagel* (Εικόνα 4.1.1).

4.1.2 Πέψη πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*.

Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης *pGEX-6P-1* υπέστη πέψη από το ένζυμο *EcoRI* που αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία *GAATTC* η οποία εντοπίζεται μόνο μία φορά εντός της περιοχής του πολυσυνδέτη. Στη συνέχεια φορτώθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη πέψη του φορέα

κλωνοποίησης. Ο πλασμιδιακός φορέας είχε το αναμενόμενο μοριακό βάρος. Έπειτα ακολούθησε ανάκτηση και καθαρισμό με το *kit* της εταιρείας *Macherey-Nagel*.



Εικόνα 4.1.2: Πηκτή αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που βρίσκονται στις ειδικές υποδοχές της πηκτής αγαρόζης. Στις διαδρομές 2, 3, 4 έχουμε το προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου της *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇*. Στην διαδρομή 7 έχουμε το προϊόν της πέψης του φορέα κλωνοποίησης *pGEX-6P-1* από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Τόσο το τμήμα του γονιδίου όσο και ο φορέας κλωνοποίησης διακρίνονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε, φορτώθηκε στην διαδρομή 1. Ωστόσο λόγω κάποιας αδιευκρίνιστης αιτίας δεν ήταν τελείως ορατός, παρά μόνο σε σημείο που μπορούσε να επιβεβαιώσει την επιτυχία της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος της *Lj-GSK3β*.

4.1.3 Αντίδραση σύνδεσης με ένζυμο *In-Fusion*.

Η σύνδεση του κατασκευασμένου γονιδίου και του φορέα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου *In-Fusion*. Ο λόγος της ποσότητας του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης προς την ποσότητα του ενθέματος στον όγκο της αντίδρασης ήταν 1:3. Με το πέρας της αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού κατά την οποία έγινε η σύνδεση του γονιδίου με τον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του προϊόντος της αντίδρασης σε επιδεκτικά βακτήρια *E.coli* που ανήκουν στο στέλεχος *XL1 Blue* με τη μέθοδο θερμικού σοκ. Τελικά έγινε απομόνωση του πλασμιδίου με την χρήση *kit NucleoSpin® Plasmid* της εταιρείας *Macherey-Nagel* από συνολικά οκτώ βακτηριακές αποικίες. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις βακτηριακές αποικίες *E.coli* αριθμήθηκαν από το 1-8 και με βάση την συγκέντρωση των απομονωμένων πλασμιδίων επιλέχθηκαν οι αποικίες 1, 5, 6, 8 να αποσταλούν

για αλληλούχηση προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχία της ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Ένθεμα	0,41
Γραμμικός φορέας κλωνοποίησης	10,56
Ένζυμο In- Fusion 5X HD cloning	4
Water for Injection	5,03

Πίνακας 4.1.3 α: Αντίδραση ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των άκρων του γραμμικού φορέα κλωνοποίησης PGEX-6P-1 και του γονιδίου Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇, να σημειωθεί ότι ο όγκος της αντίδρασης δεν πρέπει να ξεπερνά τα 20 μL.

4.2 Μελέτες έκφρασης της Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇.

4.2.1 Μελέτες έκφρασης Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇ σε βακτηρία *E.coli* του στελέχους Rosetta.

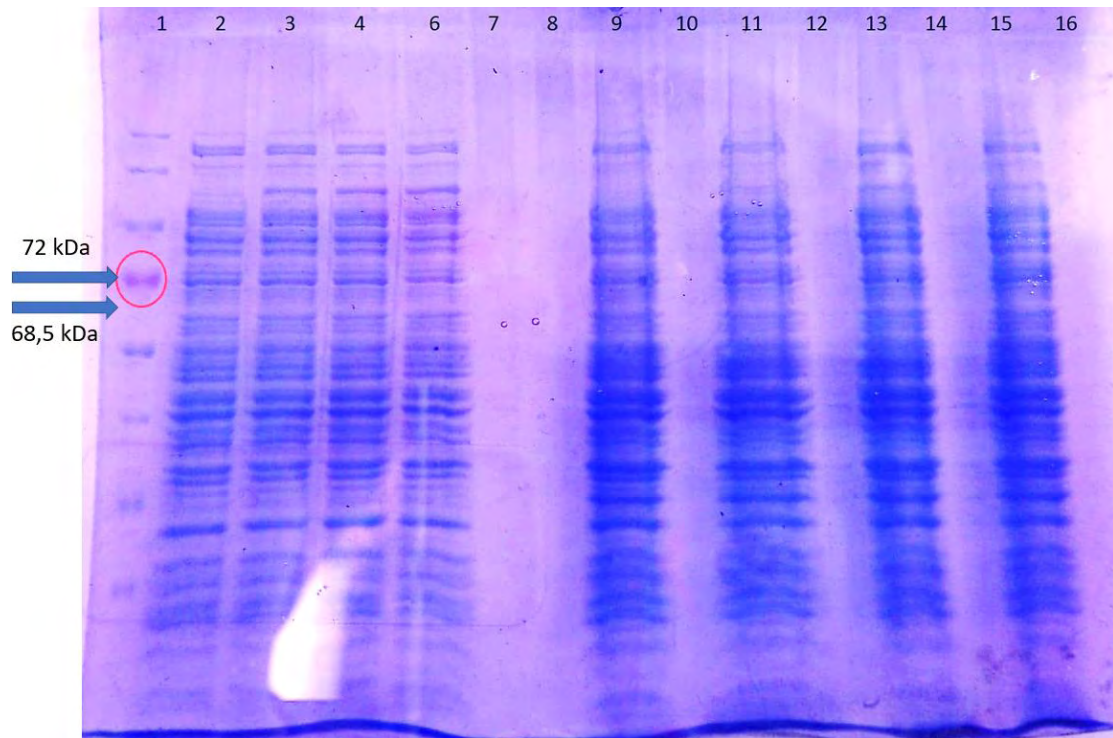
Με σκοπό την απομόνωση της της Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇ σε μεγάλη κλίμακα, αλλά και την επιβεβαίωση του επιτυχημένης ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης PGEX-6P-1 πραγματοποιήθηκε μελέτη για την βέλτιστη έκφραση του γονιδίου σε διάφορες συνθήκες βακτηριακής καλλιέργειας. Ο έλεγχος αρχικά πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* που ανήκουν στο στέλεχος Rosetta (DE3) σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω (Παράγραφος: 3.4.2). Το γονιδιακό προϊόν (πρωτεΐνη+ S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, που θα χρησιμοποιηθεί ως ετικέτα για μετέπειτα απομόνωση) έχει μοριακό βάρος περίπου 68,5 kDa. Τα 100 mL του υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth που περιείχε αντιβιοτικά: χλωροφαινικόλη σε περιεκτικότητα 34 μg/mL και αμπικιλίνη σε περιεκτικότητα 50 μg/mL εμβολιάστηκε με 1 mL αρχικής καλλιέργεια των 10mL (με ίδιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών) που είχε αναπτυχθεί προηγουμένως για 16h υπό ανάδευση σε επωαστικό θάλαμο σε 210 rpm. Μετά τον εμβολιασμό επώαστηκαν μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει OD_{600nm}=0,6 -0,8 (σημείο που θεωρείται ότι τα βακτηριακά

κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους) όπου και τελικά έγινε η προσθήκη του επαγωγέα της έκφρασης (*IPTG*).

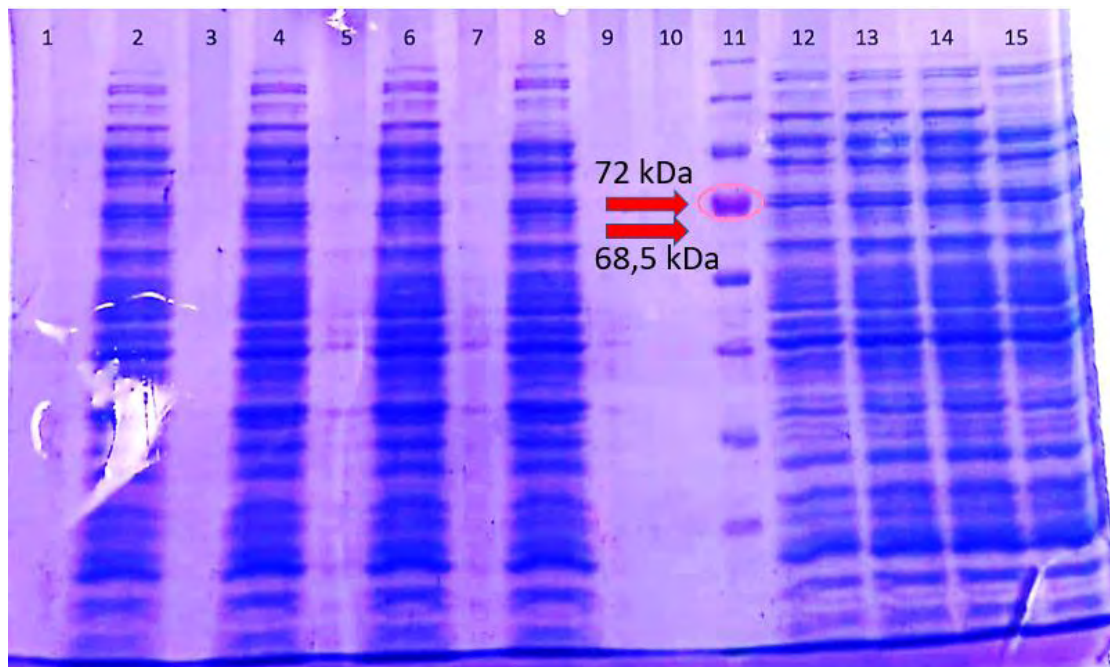
Για την διεξαγωγή της δοκιμής, τα 100 mL του υγρού θρεπτικού μέσου διαχωρίστηκε σε 8 κωνικές φιάλες (με 10 mL καλλιέργειας η καθεμία) ανάλογα με τις συνθήκες διεξαγωγής της επαγωγής της υπερέκφρασης (θερμοκρασία, συγκέντρωση επαγωγέα). Οι συγκεντρώσεις επαγωγέα που δοκιμάστηκαν ήταν 0 mM, 0,1 mM, 0,2 mM και 0,5 mM και η θερμοκρασία επώασης ήταν 37°C για 4 h και 18°C για 16 h (όλες οι συνθήκες βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση σε επωαστικό θάλαμο στα 210 rpm). Με το τέλος της επαγωγής πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των καλλιιεργειών στα 5000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 5 min. Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (η σύσταση του διαλύματος λύσης αναγράφεται στον πίνακα 3.4.2.2).

Μετά την προσθήκη 1 mL διαλύματος λύσης στα βακτηριακά κύτταρα τα οποία προέκυψαν από καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο 10 mL (που προκύπτουν ως αποτέλεσμα διαφορετικών συνθηκών επαγωγής της έκφρασης), μεταφέρθηκε περίπου 1 mL από την κάθε κωνική φιάλη σε σωλήνες τύπου *Eppendorf*. Ακολούθησε η πλήρης λύση των κυττάρων σε συσκευή υπερήχων για 1 κύκλο των 10 sec με παραγωγή υπερήχων εύρους 70%. Ένα μέρος των δειγμάτων από κάθε σωλήνα τύπου *Eppendorf* (50 µL) μεταφέρονται σε νέους σωλήνες τύπου *Eppendorf*, ώστε να αποτελέσουν τα δείγματα Total (λυμένα βακτηριακά κύτταρα πριν από την φυγοκέντρηση) κατά την ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή *SDS* πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Το υπόλοιπο δείγμα που περιείχε το κυτταρόλυμα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 13000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 30 min. Μετά τη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε το διαλυτό μέρος (*Soluble*) και μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες τύπου *Eppendorf* και στην συνέχεια αναλύθηκε η σύσταση των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος του διαλυτού κλάσματος (τα δείγματα ονομάστηκαν Soluble) σε *SDS-PAGE* (Εικόνα 4.2.1 α, β).



Εικόνα 4.2.1 α: Ανάλυση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης του προτύπου έκφρασής της σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους *Rosetta (DE3)* και επαγωγή της υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 18°C και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα. Διαδρομές: 1. Μάρτυρας μοριακού βάρους, 2. *Soluble* (-) IPTG, 3. *Soluble* 0,1 mM IPTG, 4. *Soluble* 0,2 mM IPTG, 5. *Soluble* 0,5 mM IPTG, 8. *Total* (-) IPTG, 10. *Total* 0,1 mM IPTG, 12. *Total* 0,2 mM IPTG, 14. *Total* 0,5 mM IPTG.



Εικόνα 4.2.1 β: Ανάλυση σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης του προτύπου έκφρασής της *Lj-GSK3b₉₃₋₄₆₇* σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους *Rosetta (DE3)* και επαγωγή της υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 37°C και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα. Διαδρομές: 2. *Total* (-) IPTG, 4. *Total* 0,1 mM IPTG, 6. *Total* 0,2 mM

IPTG, 8. *Total* 0,5 mM *IPTG*, 11. Μάρτυρας μοριακού βάρους, 12. *Soluble* (-) *IPTG*, 13. *Soluble* 0,1 mM *IPTG*, 14. *Soluble* 0,2 mM *IPTG*, 15. *Soluble* 0,5 mM *IPTG*.



Σε καμία από της παραπάνω συνθήκες που πραγματοποιήθηκε το πείραμα δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της πρωτεΐνης. Αυτό διαπιστώνεται από την απουσία έντονης ζώνης στο μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη (68,5 KDa)

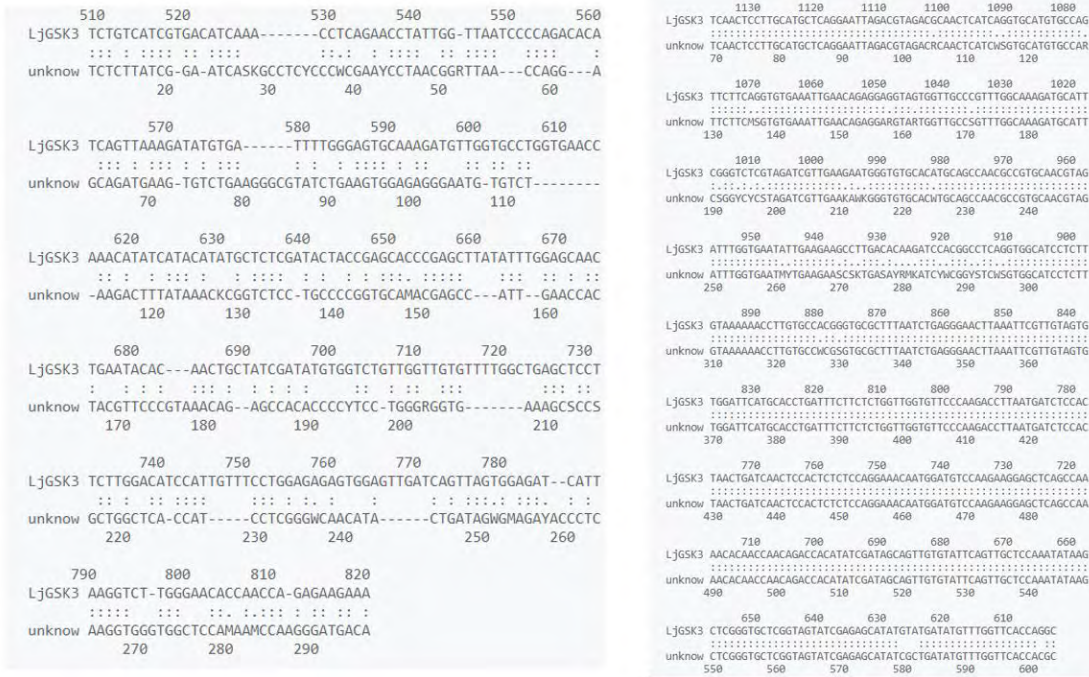
4.3 Εμφάνιση σήματος με ανασοανίχνευση κατά *Western*

Εφόσον στις μελέτες έκφρασης δεν παρατηρήθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης, τουλάχιστον σε υποτυπώδες επίπεδο, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί στύπωμα κατά *Western* προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει έστω η παραμικρή έκφραση της πρωτεΐνης. Γεγονός που θα σήμαινε ότι ο βακτηριακός φορέας θα είχε προσλάβει το γονίδιο. Η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.3.

Από τα αποτελέσματα 3 διαφορετικών εμφανίσεων σε ακτινολογικό φιλμ παρατηρήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις απουσία σκιασμού (σήματος) από την αντίδραση ενίσχυσης της χημειοφωταύγειας. Γεγονός, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι απουσιάζει η πρωτεΐνη, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των δοκιμών έκφρασης.

4.4 Αλληλούχηση

Τα αποτελέσματα από την αλληλούχηση επιβεβαίωσαν την επιτυχημένη ένθεση του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα. Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα απότελέσματα της στοίχισης της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο (*LjGSK3*) και των αλληλουχιών που προέρχονται από την αλληλούχηση (αλληλουχία πλασμιδίου νο.8 που χρησιμοποιήθηκε για τις μελέτες έκφρασης της *Lj-GSK3β₉₂₋₄₆₇*) (*unknown*). Η στοίχιση των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του διαδικτυακού εργαλείου *LAlign* (ExPASy.org).



Εικόνα 4.4: Αποτελέσματα που προκύπτουν από την στοίχιση των αλληλουχιών που προήλθαν από την αλληλούχηση (μια αντίδραση για την φορά που πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση κατά την αλληλούχηση του δείγματος, *Forward, Reverse*). Στην αριστερή πλευρά της εικόνας φαίνεται η στοίχιση του προϊόντος που προήλθε από την αντίδραση *Forward*, ενώ στην δεξιά πλευρά το προϊόν της *Reverse*. Στην αριστερή εικόνα είναι εμφανές ότι η αλληλουχία δεν φέρει μεγάλη ομοιότητα με αυτή του εκμαγείου, αντιθέτως στην δεξιά πλευρά παρατηρείται εξαιρετικά μεγάλη ομοιότητα, ωστόσο στην δεύτερη περίπτωση, αποδεικνύεται η λανθασμένη φορά ένθεσης του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇, γεγονός που δικαιολογία και την απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης.

4.5 Επανάληψη Τεχνικών Κλωνοποίησης

4.5.1 Ενίσχυση γονιδίου *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ της με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (*PCR*).

Εφόσον η πρώτη απόπειρα κλωνοποίησης ήταν ανεπιτυχής κρίθηκε αναγκαία η επανάληψη της διαδικασίας με διαφοροποίηση των βημάτων που αναλύθηκαν στην παράγραφο 3.4.1.4.

Τα βήματα τα οποία διαφοροποιήθηκαν αφορούσαν τον όγκο των συστατικών της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του επιθυμητού

τμήματος του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ και αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 4.5.1).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Ready mix	25
Forward Primer	1,5
Reverse Primer	1,5
Plasmid template	1,7
Water for injection	20,3

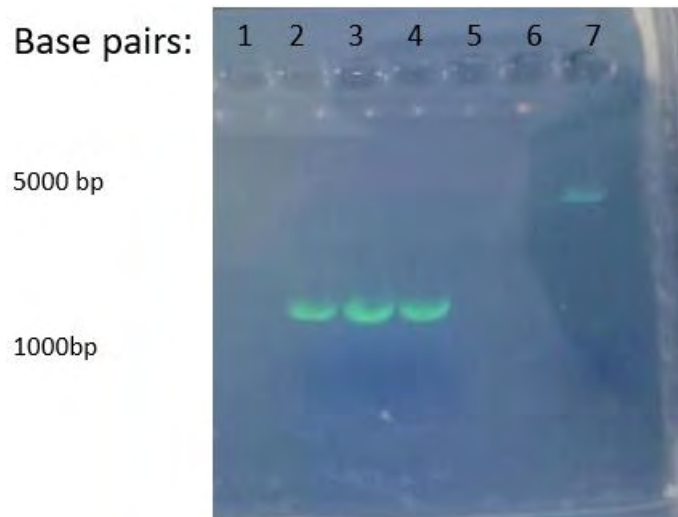
Πίνακας 4.5.1: Ποσότητες αντιδραστηρίων 2^{ης} ενίσχυσης του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇.

4.5.2 Πέψη πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*.

Η πέψη του πλασμιδιακού φορέα *PGEX-6P-1* πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς αναγράφεται στην παράγραφο 3.4.1.5 με τις εξής διαφοροποιήσεις των όγκων της αντίδρασης. Οι νέοι όγκοι των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 4.5.2).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
EcoRI	1
Buffer 10X	2
Φορέας κλωνοποίησης <i>PGEX-6P-1</i>	6
Water for injection	11

Πίνακας 4.5.2: Ποσότητες αντιδραστηρίων 2^{ης} πέψης του φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1*.



Εικόνα 4.5.2: Πηκτή αγαρόζης 1% έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων που βρίσκονται στις ειδικές υποδοχές της πηκτής αγαρόζης. Στις διαδρομές 2, 3, 4 έχουμε το προϊόν της ενίσχυσης του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇. Στην διαδρομή 7 έχουμε το προϊόν της πέψης του φορέα κλωνοποίησης *pGEX-6P-1* από την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Τόσο το τμήμα του γονιδίου όσο και ο φορέας κλωνοποίησης διακρίνονται στα αναμενόμενα μοριακά βάρη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο μάρτυρας μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε, φορτώθηκε στην διαδρομή 1. Ωστόσο λόγω κάποιας αδιευκρίνιστης αιτίας δεν ήταν τελείως ορατός, παρά μόνο σε σημείο που μπορούσε να επιβεβαιώσει την επιτυχία της ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος της *Lj-GSK3β*.

4.5.3 Αντίδραση σύνδεσης με το ένζυμο *In-Fusion*.

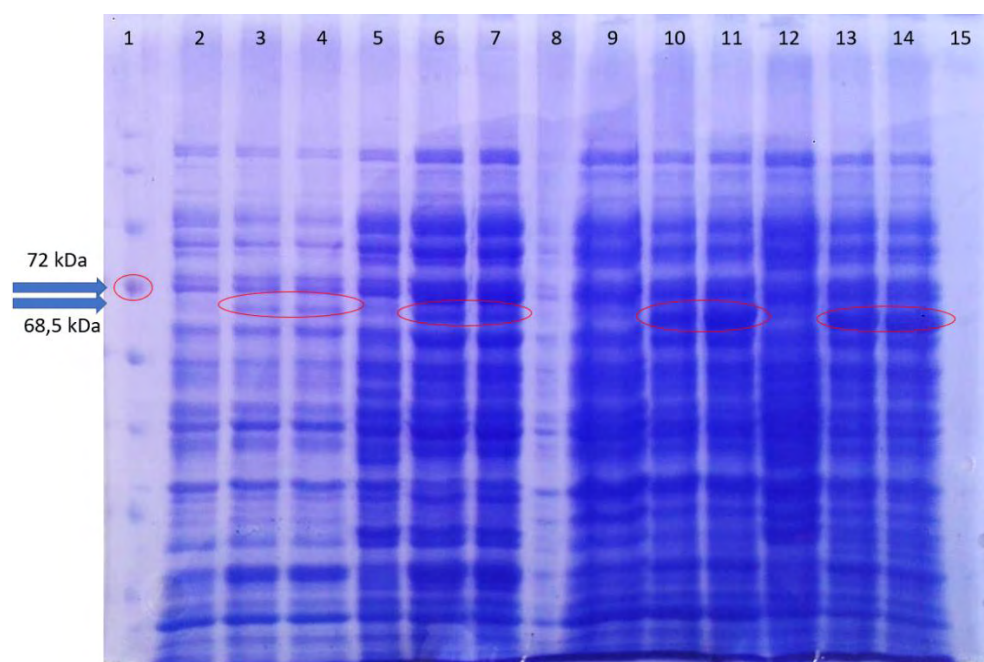
Η διαδικασία ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στον γραμμικό πλέον φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* και του γονιδίου της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς αναγράφεται στην παράγραφο 3.4.1.7. Οι διαφορές στην εκτέλεση της τεχνικής αφορούν μόνο τους όγκους της αντίδρασης οι οποίοι αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 4.5.3).

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μL)
Ένθεμα	3,1
Γραμμικός φορέας κλωνοποίησης <i>PGEX-6P-1</i>	5,3
Ένζυμο <i>In-Fusion 5X</i>	4
Water for injection	7,6

Πίνακας 4.5.3: Ποσότητες αντιδραστηρίων 2^{ns} αντίδρασης ομόλογου ανασυνδυασμού ανάμεσα στον γραμμικό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* και του γονιδίου της *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇*.

4.5.4. Μελέτες έκφρασης της *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇* *E.coli* των στελεχών *Rosetta* (DE3) και *B834 plysS*.

Με σκοπό την απομόνωση της *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇* σε μεγάλη κλίμακα, αλλά και την επιβεβαίωση του επιτυχημένης ένθεσης του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1* πραγματοποιήθηκε μελέτη για την βέλτιστη έκφραση του γονιδίου σε διάφορες συνθήκες βακτηριακής καλλιέργειας. Ο έλεγχος αυτή την φορά πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* που ανήκουν στο στέλεχος *Rosetta* και στο και *B834 plysS* σύμφωνα με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω. Στην προκειμένη περίπτωση διαφοροποιήθηκαν οι παράμετροι που πραγματοποιήθηκε η μελέτη έκφρασης. Η επαγωγή της έκφρασης έλαβε χώρα σε επωαστικό θάλαμο, ρυθμισμένο στους 16°C για όλα τα θρεπτικά μέσα. Οι νέες συνθήκες συγκέντρωσης του επαγωγέα της έκφρασης (*IPTG*) ήταν (-) mM, 0,2 mM, 0,5 mM. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα ίδια με αυτά που αναφέρονται στην 3.4.2 παράγραφο. Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής (Εικόνα 4.5.4).



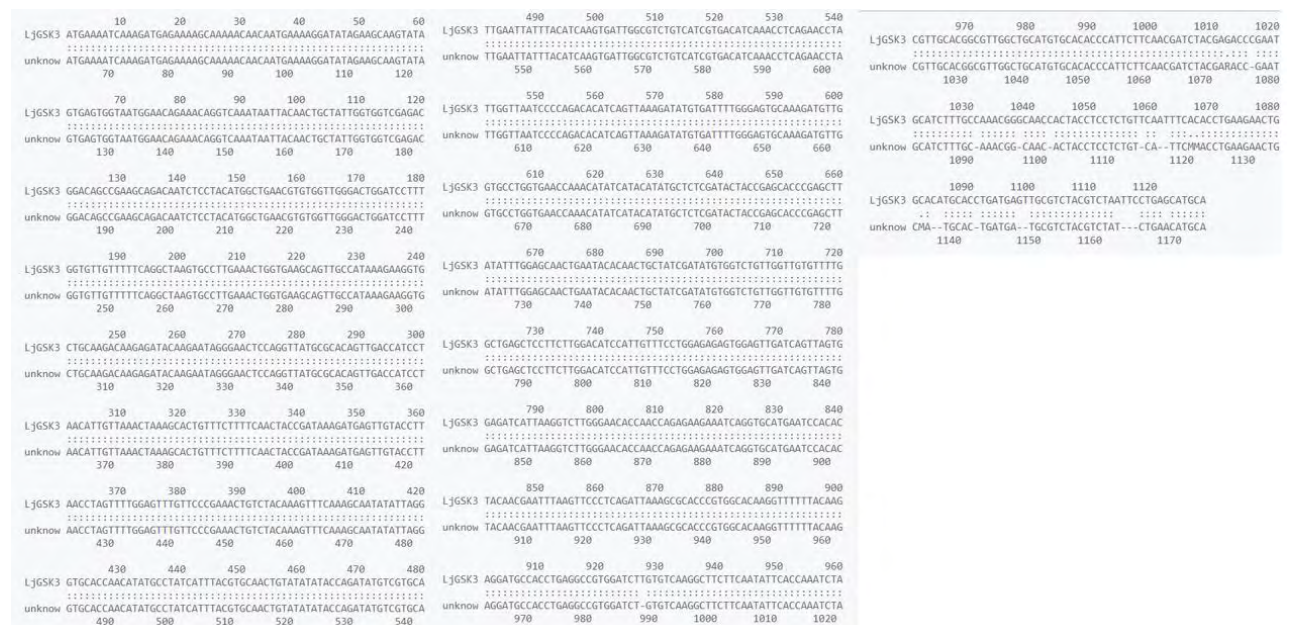
Εικόνα 4.5.4:Ανάλυση σε πηκτή *SDS*-πολυακρυλαμίδης του προτύπου έκφρασης *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇* σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* του στελέχους *Rosetta* και *B834 plysS*. Η επαγωγή της υπερέκφρασης έγινε σε θερμοκρασία 16°C

και διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα. Διαδρομές: 1. Μάρτυρας μοριακού βάρους, 2. Soluble (-) IPTG Rosetta, 3. Soluble 0,2 Mm IPTG Rosetta, 4. Soluble 0,5 mM IPTG Rosetta, 5. Soluble(-) mM IPTG B834 plysS, 6. Soluble 0,2 mM IPTG B834 plysS, 7. Soluble 0,5 mM IPTG B834 plysS, 9. Total (-) IPTG Rosetta, 10. Total 0,2 mM IPTG Rosetta 11. Total 0,5 mM IPTG Rosetta 12. Total(-) IPTG B834 plysS, 13. Total 0,2 mM IPTG B834 plysS, 14. Total 0,5 mM IPTG B834 plysS.

Σε αυτήν την περίπτωση διαπιστώνεται η επιτυχημένη έκφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο, είναι εμφανής σε όλες τις συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η επαγωγή,. Ωστόσο ως βέλτιστη επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 16°C με συγκέντρωση επαγωγέα (IPTG) ίση με συγκέντρωση 0,5 mM.

4.5.5 Αποτελέσματα αλληλούχησης

Τα αποτελέσματα αλληλούχησης επιβεβαίωσαν την ένθεση του επιθυμητού γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της στοίχισης της αλληλουχίας που προήλθε από την αλληλούχηση και αυτής που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο. Η στοίχιση των 2 αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το διαδικτυακό εργαλείο *LAlign (ExpASy.org)*.



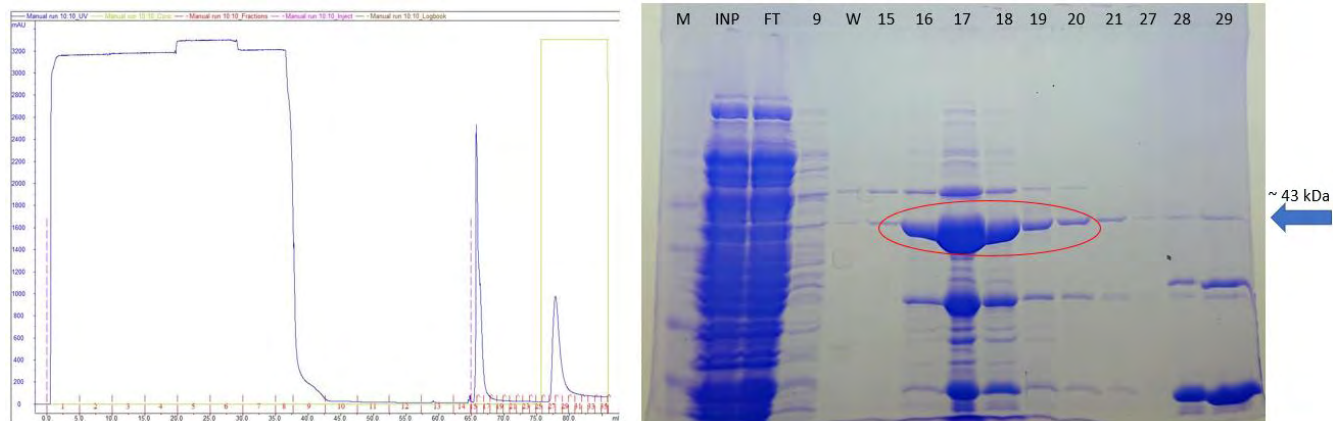
Εικόνα 4.5.5: Αποτελέσματα της στοίχισης της αλληλουχίας που προήλθε από την αλληλούχηση και αυτής που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο. Η στοίχιση των 2 αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε με το διαδικτυακό εργαλείο

LAlign (ExPASy.org). Ως *LjGSK3* ονομάστηκε η αλληλουχία πρότυπο και ως *unknown* η αλληλουχία που προήλθε από την αλληλούχηση. Η ομολογία ανάμεσα στις 2 αλληλουχίες είναι 98%.

4.6 Απομόνωση και καθαρισμός της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇

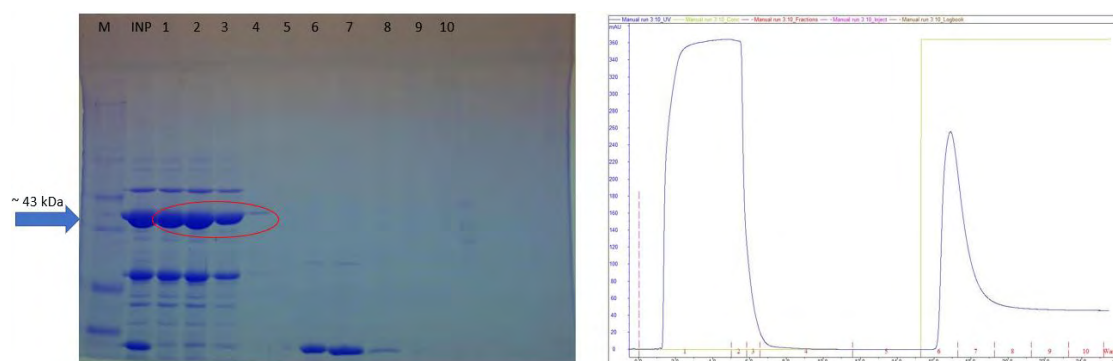
Η επιτυχία της απομόνωσης και του καθαρισμού της πρωτεΐνης απεικονίζεται στα παρακάτω χρωματογραφήματα:

Στο πρώτο στάδιο καθαρισμού η στήλη *Protino GST/4B* 1mL εξισορροπήθηκε με *Buffer A* (10 όγκοι στήλης, σύσταση αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.3 β), έπειτα φορτώθηκε το δείγμα όγκου 10 mL με ροή 0,3 mL/min (τα κλάσματα τα οποία συλλέχθηκαν είχαν όγκο 5 mL), για να γίνει η σύνδεση της *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ που φέρει συνδεδεμένη την ετικέτα της S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης στα ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης της στήλης, πριν φορτωθεί το δείγμα στην *superloop* έγινε προσθήκη 1 μL βενζονάσης. Εφόσον πέρασε το δείγμα από την στήλη έγινε έκπλυση της στήλης με την χρήση *Wash Buffer* (η σύσταση του οποίου αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.3 δ). Σε αυτό το σημείο η ροή ορίστηκε σε 0,4 mL/min, χωρίς να μεταβάλλουμε τον όγκο των κλασμάτων που συλλέγαμε. Το βήμα αυτό είχε ως αφενός την προετοιμασία της στήλης για την εναλλαγή του pH (από τιμή 7,5 σε τιμή 8) και αφετέρου την απομάκρυνση μορίων τα οποία δεν είχαν προσδεθεί στην στήλη. Έπειτα μέσω *partial filling* φορτώθηκε στην στήλη 2 mL διαλύματος πρωτεάσης *3C Rhinovirus*, τα οποία παρέμειναν στην στήλη για 16 h προκειμένου να γίνει η κοπή της ετικέτας S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης, που είναι συνδεδεμένη στην *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇. Με το πέρας των 16 συνέχεια ακολούθησε έκπλυση της στήλης με το *Buffer B* για 10 όγκους στήλης (10 mL) (η σύσταση του οποίου αναφαίρετε στον παραπάνω πίνακα 3.4.3.3 γ) προκειμένου να γίνει η απομάκρυνση: της προσδεδεμένης ετικέτας στην στήλη, καθώς και τυχόν μορίων *Lj-GSK3β*₉₃₋₄₆₇ από τα οποία δεν απομακρύνθηκε η ετικέτα S- τρανσφεράσης της γλουταθειόνης. Τα κλάσματα τα οποία συλλέχθηκαν αναλύθηκαν σε πηκτή SDS-πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%, τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



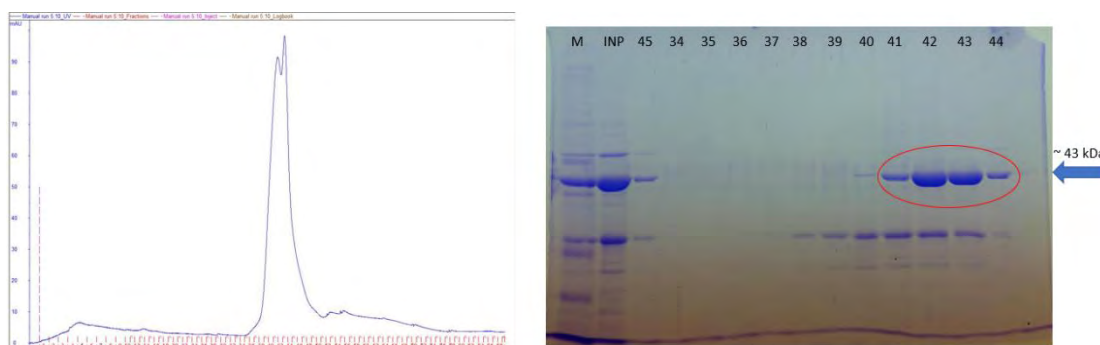
Εικόνα 4.6 α: Από το χρωματογράφημα του πρώτου σταδίου φαίνεται ότι τα κλάσματα στα οποία εκλούστηκε η πρωτεΐνη είναι τα 15,16,17,18, 19, 20. Αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% ώστε να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Ροζ γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος Μ: μάρτυρας μοριακών μαζών, **INP**: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (*In put*), **FT**: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (*flowthrough*), **W**: το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (*wash*). Τα κλάσματα τα οποία κρατήθηκαν και αναμείχθηκαν είναι τα: 15, 16, 17, 18, 19, 20. Έτσι προέκυψε δείγμα όγκου 5 mL με συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,62 mg/mL συνολικό όγκο δείγματος 5 mL.

Με το τέλος των 16 h Το πρωτεϊνικό διάλυμα από το δεύτερο βήμα εφαρμόστηκε σε στήλη βαρύτητας της οποίας το υλικό αποτελούταν από σφαιρίδια που είχαν προσροφημένη γλουταθειόνη και είχαν εξισορροπηθεί με το *Buffer A* (για 10 όγκους στήλης, η σύστασή του αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.3 β) . Η *Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇* δεν προσδέεται στα σφαιρίδια και απομακρύνεται στο *flow through*, ενώ η πρωτεάση *3C Rhinovirus*, η οποία διαθέτει ετικέτα *GST*, θα πρέπει να συνδεθεί πάνω στη στήλη. Στη συνέχεια έγινε πλύση της στήλης με *Buffer A* (πίνακας 3.4.3.3 β) και έκλουση των συνδεδεμένων πρωτεϊνών με το διάλυμα έκλουσης (*Buffer B* πίνακα 3.4.3.3 γ). Τα κλάσματα τα οποία συλλέχθηκαν αναλύθηκαν σε πηκτή *SDS*- πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10%, τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

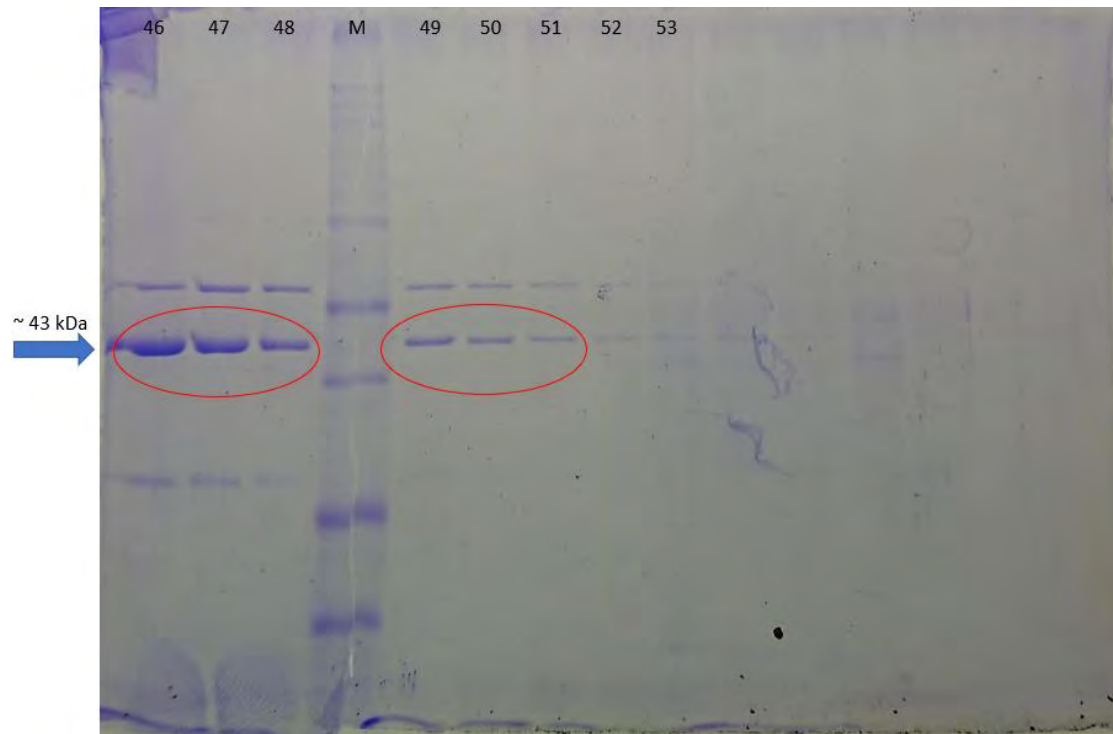


Εικόνα 4.6 β: Στην συγκεκριμένη περίπτωση η χρήση της στήλης αποσκοπούσε στον καθαρισμό της πρωτεΐνης από την S- τρανσφεράση της γλουταθειόνης και από την πρωτεάση *Rhinovirus 3C*. Το δεύτερο στάδιο της απομόνωσης ήταν επιτυχημένο καθώς η πρωτεΐνη που δεν προσδέθηκε στη στήλη, βρίσκεται στα κλάσματα 1,2 και 3, δηλαδή στο *flow through*. Η ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10% επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που απεικονίζει το χρωματογράφημα. Διακεκομμένη γραμμή: η αρχή εισαγωγής του δείγματος, Πράσινη γραμμή: η συγκέντρωση άλατος. M: Μάρτυρας μοριακών μαζών, **INP**: το αρχικό δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη (*Input*), **FT**: ότι δεν κατάφερε να προσδεθεί στη στήλη (*flowthrough*), : το κλάσμα εκπλύσης της στήλης (*wash*). Σε αυτό το στάδιο η απόδοση καθαρισμού ήταν ίση με 0,57 mg/mL σε συνολικό όγκο δείγματος 6,5 mL.

Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε η στήλη *Gel-filtration Superdex 75* που παρέχεται από την εταιρία *GE Healthcare*. Το δείγμα όγκου 200 μ L που προέκυψε έπειτα από την συμπύκνωση με το μηχάνημα *SpeedVach* προστέθηκαν 50 μ L από το *Wash Buffer* (σύσταση αναγράφεται στον πίνακα 3.4.3.3 δ). Το δείγμα 250 mL το οποίο προκύπτει στην συνέχεια φορτώνεται στην στήλη *Gel-filtration Superdex 75* η οποία έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με το *Wash Buffer* της στήλης που χρησιμοποιήθηκε στο προηγούμενο στάδιο καθαρισμού για 1 όγκο στήλης (120 mL), ώστε οι πρωτεΐνες του δείγματος να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν είχαν όγκο 1 mL. Η ανάλυση των κλασμάτων αναλύεται σε πηκτή *SDS*-πολυακρυλαμίδιου 10%, με τα αποτελέσματα να απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4.6 γ: Από το χρωματογράφημα το οποίο προκύπτει συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στα κλάσματα: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51. Ωστόσο παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη δεν απομονώθηκε χωρίς προσμίξεις. Η ανάλυση των κλασμάτων 34-59 πραγματοποιήθηκε σε πηκτή *SDS*- πολυακρυλαμίδης 10% σε συγκέντρωση 0,01mg/mL σε 11 mL (που αποτελεί τον συνολικό όγκο των κλασμάτων στα οποία εμφανίζεται η *Lj-GSK3 β* ₉₃₋₄₆₇).



Εικόνα 4.6 δ: Αποτελέσματα ανάλυσης κλασμάτων 34-59 κατά την απόπειρα καθαρισμού με στήλη μοριακής διήθησης. Πηκτή *SDS* πολυακρυλαμίδης 10%.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία κατασκευάστηκε πλασμίδιο το οποίο περιέχει την κωδική αλληλουχία Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇. Η ένθεση της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *PGEX-6P-1*. Η διαδικασία κατασκευής του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε δύο φορές, καθώς, την πρώτη φορά τα αποτελέσματα της αλληλούχησης αποκάλυψαν την λανθασμένη ένθεση της κωδικής αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης, ενώ η δεύτερη πραγματοποιήθηκε με επιτυχία. Γεγονός το οποίο οδήγησε στην δημιουργία πλασμιδίου κατάλληλο για ετερόλογη έκφραση της πρωτεΐνης σε βακτηριακά συστήματα. Στην συνέχεια ακολούθησε έλεγχος για τις βέλτιστες συνθήκες υπερέκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* (*Rosetta*, *B834 pLysS*) παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων επαγωγέα (*IPTG*) και σε διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής. Η διαδικασία αυτή είχε ως αποτέλεσμα να καταδειχθούν ως κατάλληλες οι παρακάτω συνθήκες επαγωγής της έκφρασης: Βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli*: *B834 pLysS*, συγκέντρωση επαγωγέα (*IPTG*): 0,5 mM, Θερμοκρασία επαγωγής: 16°C για σύνολο 16 h. Έπειτα ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός της πρωτεΐνης με υγρή χρωματογραφία (Χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης). Τα αποτελέσματα από την παραπάνω απόπειρα δεν ήταν τα επιθυμητά καθώς δεν μπορέσαμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη σε εντελώς καθαρή μορφή, και μεγάλη περιεκτικότητα.

Μελλοντικά, για τον πλήρη καθαρισμό και απομόνωση της πρωτεΐνης σε ικανοποιητική περιεκτικότητα, προκειμένου να δοθεί η δυνατότητα κρυστάλλωσης, θα μπορούσαν να γίνουν κάποιες αλλαγές στο ίδιο το πρωτόκολλο της απομόνωσης καθώς και στην προσθήκη περισσότερων βημάτων κατά την ίδια τη διαδικασία, όπως: χρήση στήλης ιοντοανταλλαγής, προκειμένου να γίνει ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης από το υπόλοιπο μίγμα με βάση το φορτίο της, καθώς και χρήση διαλυμάτων χαμηλότερου pH από αυτό του ίσο-ηλεκτρικού της σημείου (Θεωρητικό $pI = 8,23$).

6. Βιβλιογραφία

- [1] Graham P.H. and Vance C.P. (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131, 872-877.
- [2] Smil V (1999) Nitrogen in crop production: an account for global flows. *Global Biogeochem. Cycles* 13, 647-662.
- [3] Sato S and Tabata S (2006) Lotus japonicus as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 128-132.
- [4] Daniel J. Gage (2004), Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, Vol. 68, No. 2, , p. 280–300.
- [5] ROBERT H. SOCOLOW (1999), Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 96, pp. 6001–6008.
- [6] Constantine Garagounis, Daniela Tsikou, Panagiota K. Plitsi, Ioanna S. Psarrakou, Marianna Avramidou, Catalina Stedel, Maria Anagnostou, Maria E. Georgopoulou and Kalliope K. Papadopoulou (2019) Lotus SHAGGY-like kinase 1 is required to suppress nodulation in Lotus japonicus *he Plant Journal* 98, 228–242.
- [7] Kameshita, I., Nishida, T., Nakamura, S., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Umehara, Y., Nomura, M. and Tajima, S. (2005) Expression cloning of a variety of novel protein kinases in Lotus japonicus. *J. Biochem.* 137, 33–39.
- [8] Dolye, J.J. and Luckow, M.A. (2003) The rest of the iceberg. Legumediversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131, 900–910.
- [9] Hellriegel, H, and Wilfarth, H. (1888) Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. *Beilageheft zuder Zeitschrift des Vereins für Rübenzucker-Industrie des Deutschen Reichs*, 234.
- [10] Wang T.L, Domoney C, Hedley CL, Casey R, Grusak MA (2003) Can we improve the nutritional quality of legume seeds? *Plant Physiology* 131, 886-891.

- [11] Dixon, R.A. and Sumner, L.W. (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiology* 131, 878-885.
- [12] Dixon, R.A. (2004) Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology* 55, 225-261.
- [13] A.J. MÁRQUEZ *Lotus japonicus Handbook*, 2005 Springer.
- [14] Szczyglowski K and Stougaard J (2008) Lotus genome: pod of gold for legume research. *TRENDS in Plant Science* 13, 515 – 517.
- [15] Handberg K. and Stougaard J (1992) Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular-genetics. *Plant Journal* 2, 487-496.
- [16] Streeter J.G (1991) Transport and metabolism of carbon and nitrogen in legume nodules. *Advances in Botanical Research* 18, 129–187.
- [17] Kouchi H, Shimomura K, Hata S, Hirota A, Wu GJ, Kumagai H, Tajima S, Suganuma N, Suzuki A, Aoki T, et al. (2004) Large scale analysis of gene expression profiles during early stages of root nodule formation in a model legume. *DNA Research* 11, 263-274.
- [18] Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Garzaniga, A., Soussi, M., Lucas, M.M., et al. (2005) Legume nodule senescence: Roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 165: 683- 701.
- [19] Hojin Ryu, Hyunwoo Cho, Daeseok Choi, & Ildoo Hwang (2012) Plant Hormonal Regulation of Nitrogen-Fixing Nodule Organogenesis *Mol. Cells* 34, 117-126.
- [20] Embi, N., Rylatt, D. B. and Cohen, P. (1980) Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur. J. Biochem.* 107, 519–527.
- [21] Bourouis, M., Moore, P., Ruel, L., Grau, Y., Heitzler, P., and Simpson, P (1990) *EMBO J.* 9.2877-2884.
- [22] Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431-2438.

- [23] Doble, B.W., & Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116:1175–1186.
- [24] Rafal Zgadzaj, Ruben Garrido-Oter, Dorte Bodker Jensen, Anna Koprivova, Paul Schulze-Lefert, and Simona Radutoiu (2016) Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. *PNAS* (49), E7996-E8005.
- [25] Sutherland, C. (2011) What are the bona fide GSK3 substrates? *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011:505607.
- [26] C.G. Proud (2006) Regulation of protein synthesis by insulin *Biochemical Society Transactions* Apr 01,34(2) p.213-216;
- [27] Plyte, S.E., Hughes, K., Nikolakaki, E., Pulverer, B.J., and Woodgett, J.R. (1992). Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta* 1114, 147–162.
- [28] Ross, S.E., Erickson, R.L., Hemati, N., and MacDougald, O.A. (1999) Glycogen synthase kinase 3 is an insulin-regulated C/EBP α kinase. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8433–8441.
- [29] Sutherland C., Leighton I.A., Cohen P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296(Pt 1), 15–19 Szczyglowski K and Stougaard J (2008) Lotus genome: pod of gold for legume research. *TRENDS in Plant Science* 13, 515 – 517.
- [30] Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., & Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- [31] MacDonald, B.T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9–26.

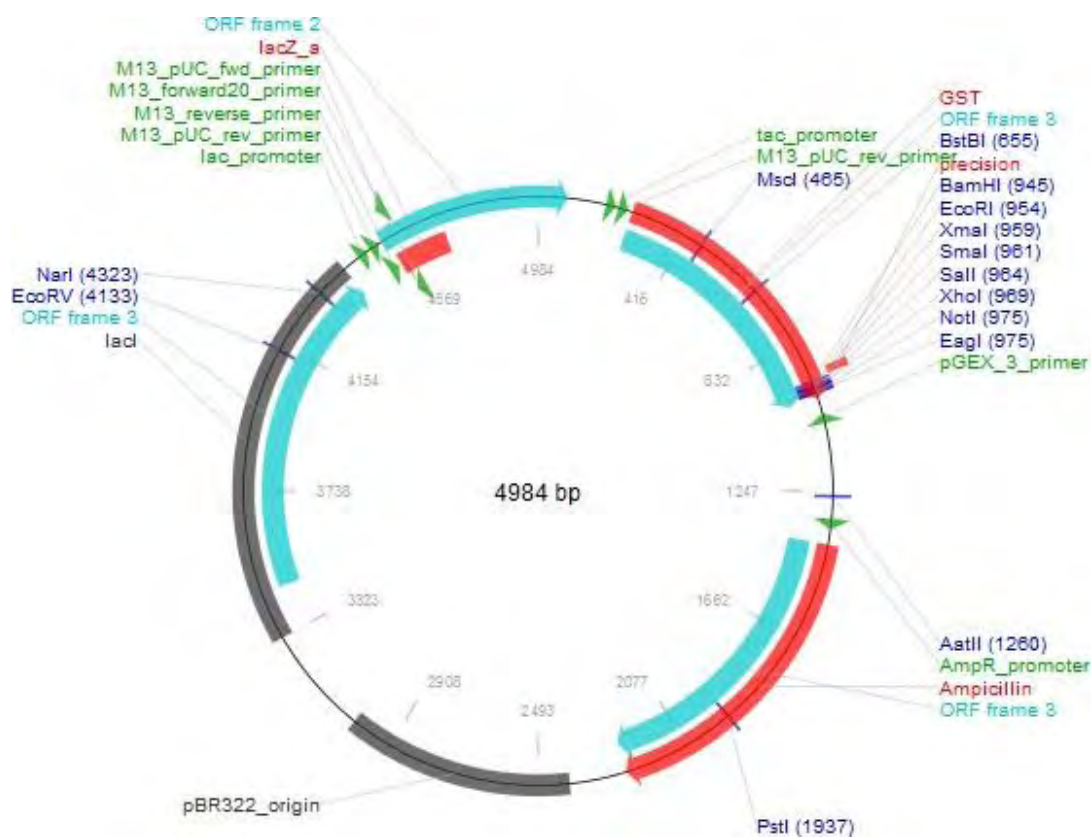
- [32] Valvezan, A.J., Zhang, F., Diehl, J.A., & Klein, P.S. (2012). Adenomatous polyposis coli (APC) regulates multiple signaling pathways by enhancing glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) activity. *J Biol Chem* 287, 3823–3832.
- [33] Willert, K., & Nusse, R. (2012). Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007864.
- [34] Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*16, 3797–3804.
- [35] He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, LT., Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a target for APC pathway. *Science* 281, 1509- 1512.
- [36] Eleonore Beurel, Steven F. Grieco, and Richard S. Jopea (2015) Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases *Pharmacol Ther.* 2015 April ; 0: 114–131.
- [37] Rana Dajani, Elizabeth Fraser, S. Mark Roe, Neville Young, Valerie Good, Trevor C. Dale & Laurence H. (2001) Pearl Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3- β : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition *Cell* 105, 721- 732.
- [38] Frame, S. et al.(2001) A common phosphatebinding site explains the unique substratespecificity of GSK3 and its inactivation byphosphorylation. *Mol. Cell*7, 1321–132.
- [39] Αιμιλία Ζίφα Διακυτταρική Επικοινωνία - Μεταγωγή Σήματος, 2017 3^η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- [40] Δομή από Protein Data Bank.
- [41] Thomas, G.M., Frame,S., Goedert,M., Nathke,I., Polakis,P., Cohen, P. (1999) A GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin. *FEBS Lett.* 458, 247–251.
- [42] Youn J.H. & Kim T.W. (2015) Functional Insights of Plant GSK3-like Kinases: Multi-Taskers in Diverse Cellular, Signal Transduction Pathways. *Mol. Plant.* 8, 552–565.

- [43] Jonak, C. & Hirt, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci.* 7, 457–461.
- [44] Forde, J.E., and Dale, T.C.(2007). Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol. Life Sci.*64:1930–1944.
- [45] Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroids. *Arabidopsis Book* 9:e0151.
- [46] Wang, Z.Y., Bai, M.Y., Oh, E., and Zhu, J.Y.(2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu. Rev.Genet.*46:701–724.
- [47] Mousheng Wu, Michael Reuter , Hauke Lilie, Yuying Liu , Elmar Wahle and Haiwei Song (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN, *EMBO* 24, p: 4082–4093.
- [48] Hirsch, A.M., Bhuvaneswari, T.V., Torrey, J.G. and Bisseling, T. (1989) Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86, 1244–1248.
- [49] Held, M., Hou, H., Miri, M. et al. (2014) Lotus japonicus cytokinin receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. *Plant Cell*, 26, 678–694.
- [50] Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H. and Kawaguchi, M. (2014) Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nat. Commun.* 5, 4983.
- [51] Reid, D.E., Heckmann, A.B., Novak, O., Kelly, S. and Stougaard, J. (2016) CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE3 maintains cytokinin homeostasis during root and nodule development in Lotus japonicus. *Plant Physiol.* 170, 1060–1074.
- [52] Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S. and Downie, J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45, 119–144.
- [53] Soyano, T., Shimoda, Y. and Hayashi, M. (2015) NODULE INCEPTION antagonistically regulates gene expression with nitrate in Lotus japonicus. *Plant Cell Physiol.* 56, 368–376.

- [54] Nishida, H., Tanaka, S., Handa, Y. et al. (2018) A NIN-LIKE PROTEIN mediates nitrate-induced control of root nodule symbiosis in *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* 9, 499.
- [55] Tichtinsky, G., Tavares, R., Takvorian, A., Schwebel-Dugue, N., Twell, D. and Kreis, M. (1998) An evolutionary conserved group of plant GSK-3/ shaggy-like protein kinase genes preferentially expressed in developing pollen. *Biochem. Biophys. Acta.* 1442, 261–273.
- [56] Casson, S and Hetherington, M. (2012). GSK3-like kinases integrate brassinosteroid signaling and stomatal development. *Sci. Signal.* 5, p: 30.
- [57] Khan, M., Rozhon, W., Bigeard, J., Pflieger, D., Husar, S., Pitzschke, A., Teige, M., Jonak, C., Hirt, H. and Poppenberger, B. (2013) Brassinosteroid-regulated GSK3/Shaggy-like kinases phosphorylate mitogen-activated protein (MAP) kinase kinases, which control stomata development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 288, 7519–7527.
- [58] Claisse, G., Charrier, B. and Kreis, M. (2007) The *Arabidopsis thaliana* GSK3/Shaggy like kinase AtSK3-2 modulates floral cell expansion. *Plant Mol. Biol.* 64, 113–124.
- [59] Cheng, Y., Zhu, W., Chen, Y., Ito, S., Asami, T. and Wang, X. (2014) Brassinosteroids control root epidermal cell fate via direct regulation of a MYBbHLH-WD40 complex by GSK3-like kinases. *Elife*, e02525.
- [60] Novagen, Competent cells.
- [61] Brown T. A, *Genomes 3*, εκδόσεις Π. Χ.Πασχαλίδης.
- [62] GE Healthcare, *Affinity Chromatography Vol. 3: Specific Groups of Biomolecules*.
- [63] Clontech-. *In-Fusion® HD Cloning Kit User Manual, PT5162-1 (PR133833) April 2011*.
- [64] PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up User manual, February 2017 / Rev. 04.
- [65] CloningR STRATEGY PRIME RDESIGN.

- [66] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986;51 Pt 1:263-73.
- [67] KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR Kit, KAPABIOSYSTEMS, KR0370 – v8.17.
- [68] GE Healthcare. Ion Exchange Chromatography Principles and Methods.
- [69] Waugh DS. Making the most of affinity tags, Trends in biotechnology, 2005 Jun;23(6):316-202005.
- [70] Macherey-Nagel, Purification of GST-tagged Proteins User Manual, 2010.
- [71] GE Healthcare Gel filtration Principles and Methods.
- [72] L. Stryer, J. M. Berg, J. L. Tymoczko, Biochemistry, Fifth edition 2013.
- [73] Pei Yun Lee, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, Yong Hoon Kim, (2012), Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. J. Vis. Exp. (62), e3923.
- [74] Jean-Louis Viovy (2000) Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes, Reviews of Modern Physics, Vol. 72, No. 3 p. 813-872.
- [75] Aich P, Patra M, Chatterjee AK, Roy SS, Basu T. Calcium chloride made E. coli competent for uptake of extraneous DNA through overproduction of OmpC protein. The protein journal, 2012 Jun;31(5):366-73.
- [76] Weber K, Osborn M, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The Journal of biological chemistry, 1969 Aug 25;244(16):4406-12
- [77] Bio-Rad, A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection
- [78] Tahrin Mahmood and Ping-Chang Yang, Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting, N Am J Med Sci., 2012 Sep; 4(9): 429–434.

7. Παράρτημα



Εικόνα 7.1:Χάρτης πλασμιδιακού φορέα PGEX-6P-1.

Αμινοξική αλληλουχία της Lj-GSK3β₉₃₋₄₆₇:

MKIKDEKSKNNNEKDIEASIVSGNGTETGQIITTAIGGRDGQPKQTISYMAERVVGTGSFGVVFQAKCLET
 GEAVAIKKVLQDKRYKNRELQVMRTVDHPNIVKLKHCFFSTTDKDELYLNLVLEFVPETVYKVSQYIRVH
 QHMPIIYVQLYIYQICRALNYLHQVIGVCHRDIKPQNLLVNPQTHQLKICDFGSAKMLVPGEPNISIYICSR

YRAPELIFGATEYTTAIDMWSVGCVLAELLGHPLFPGESGVDQLVEIHKVLGTPTREEIRCMNPHYNEFKF
PQIKAHPWHKVFYKRMPPPEAVDLVSRLLQYSPNLRCTALAACAHPFFNDLRDPNASLPNGQPLPPLFNFT
PEELAHAPDELRLRIPEHARSS

Νουκλεοτιδική αλληλουχία (κωδική) της Lj-GSK3 β ₉₃₋₄₆₇:

ATGAAAATCAAAGATGAGAAAAGCAAAAACAACAATGAAAAGGATATAGAAGCAAGTATAGTGAG
TGGTAATGGAACAGAAACAGGTCAAATAATTACAACCTGCTATTGGTGGTCGAGACGGACAGCCGAA
GCAGACAATCTCCTACATGGCTGAACGTGTGGTTGGGACTGGATCCTTTGGTGTGTTTTTCAGGCTA
AGTGCCTTGAAACTGGTGAAGCAGTTGCCATAAAGAAGGTGCTGCAAGACAAGAGATACAAGAATA
GGGAACTCCAGGTTATGCGCACAGTTGACCATCTAACATTGTTAAACTAAAGCACTGTTTCTTTTCA
ACTACCGATAAAGATGAGTTGTACCTAACCTAGTTTTGGAGTTTGTCCCGAAACTGTCTACAAAGT
TTCAAAGCAATATATTAGGGTGCACCAACATATGCCTATCATTTACGTGCAACTGTATATATACCAGA
TATGTCGTGCATTGAATTATTTACATCAAGTGATTGGCGTCTGTCATCGTGACATCAAACCTCAGAAC
CTATTGGTTAATCCCCAGACACATCAGTTAAAGATATGTGATTTTGGGAGTGCAAAGATGTTGGTGC
CTGGTGAACCAAACATATCATAATATGCTCTCGATACTACCGAGCACCCGAGCTTATATTTGGAGCA
ACTGAATACACAACCTGCTATCGATATGTGGTCTGTTGGTTGTGTTTTGGCTGAGCTCCTTCTGGACA
TCCATTGTTTCTGGAGAGAGTGGAGTTGATCAGTTAGTGGAGATCATTAAAGTCTTGGGAACACCA
ACCAGAGAAGAAATCAGGTGCATGAATCCACACTACAACGAATTTAAGTTCCCTCAGATTAAAGCGC
ACCCGTGGCACAAGGTTTTTTACAAGAGGATGCCACCTGAGGCCGTGGATCTTGTGTCAAGGCTTCT
TCAATATTCACCAAATCTACGTTGCACGGCGTTGGCTGCATGTGCACACCCATTCTTCAACGATCTAC
GAGACCCGAATGCATCTTTGCCAAACGGGCAACCACTACCTCCTCTGTTCAATTTACACCTGAAGAA
CTGGCACATGCACCTGATGAGTTGCGTCTACGTCTAATTCCTGAGCATGCAAGGAGTTGA