

Περίληψη

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

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

Επιλύθηκε η τρισδιάστατη δομή της *LjSK1₉₀₋₄₆₇* σε ευκρίνεια 2.90 Å, παρέχοντας για πρώτη φορά πληροφορίες και δεδομένα που αφορούν μία κινάση που προέρχεται από τα φυτά και ομοιάζει με τις *GSK3* των θηλαστικών. Οι σημαντικότερες διαφορές με την ανθρώπινη ομόλογη *GSK3β* παρατηρήθηκαν στο *N*- και *C*-λοβό της *LjSK1₉₀₋₄₆₇*, υποδεικνύοντας την πιθανότητα ύπαρξης ενός διαφορετικού μηχανισμού ρύθμισης των φυτικών *GSK3*. Παράλληλα, οι ομοιότητες στην αρχιτεκτονική σημαντικών λειτουργικών περιοχών, όπως το καταλυτικό κέντρο και η θέση πρόσδεσης της *ATP* εξηγούν τις κοινές λειτουργίες που εμφανίζουν οι δύο πρωτεΐνες.

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