

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην «Πρωτεϊνική
Βιοτεχνολογία»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΗΡΡΑ ΑΠΟ ΤΟ ΤΥΠΟΥ III ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ
ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*
PV. PHASEOLICOLA

Η Επιστημονική Ερευνητική Εργασία
υποβάλλεται από την

Ειρήνη Γκουγκουλιά

ως μέρος των υποχρεώσεων για τη λήψη του
Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης
στην Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία

Ηράκλειο 2009

Ειρήνη Γκουγκουλιά
Τμήμα Βιολογίας
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τ. Θ. 2208, GR 710 03 Ηράκλειο
email: egkougko@edu.biology.uoc.gr

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Μιχαήλ Κοκκινίδης
Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Δεύτερη εξετάστρια: Άννα Μητράκη
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών Πανεπιστημίου Κρήτης

*Στο Μαρικόκι που με έμαθε να αγωνίζομαι,
στη Ζωή που μαθαίνει να αγωνίζεται,
στον Παναγιώτη που έφυγε αγωνιστής ...*

Γράφοντας με το αριστερό χέρι ...

Ας υποθέσουμε, πως αφού έχεις περάσει μια ζωή γράφοντας με το δεξί σου, σε μια αιφνίδια παρόρμηση έμπνευσης και με μόνο σκοπό τη δημιουργία εκ του μηδενός, πιάνεις και γράφεις με το αριστερό. Στην αρχή αντικρίζεις ο,τι περιμένεις: караγκιοζάκια που έχουν μια μακρινή συγγένεια με τους αλφαβητικούς χαρακτήρες. Μετά από λίγο διάστημα όμως δε μπορείς να αντισταθείς στην απόλαυση του να καταφέρεις να γράφεις λεξούλες και προτάσεις που αν τις έφτιαχνες με το «καλό» σου χέρι, θα σου δημιουργούσαν στην καλύτερη περίπτωση απέχθεια για την κενότητα και τη στερεοτυπία τους.

Η έλλειψη στην ποιότητα γραφής του αριστερού σου χεριού μεταβάλλεται ξαφνικά στο αντικείμενο του θαυμασμού σου.

Τότε ακριβώς είναι που πρέπει να ξαναπιάσεις το μολύβι με το δεξί σου και να θεωρήσεις το περιστατικό ως απλώς διασκεδαστικό. Γιατί άμα δεν το κάνεις, θα ερωτευτείς αυτά τα πρωτόγονα караγκιοζάκια ... την ομορφιά τους και τον τρόπο που αποπνέουν ...

Κοπεγχάγη, Ιούλιος 1994

Lars von Trier

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη δυο μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης HrpA από το φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Η HrpA, η οποία είναι πιλίνη της *Pseudomonas syringae*, είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpA*. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το καρβοξυτελικό άκρο της θεωρείται υπεύθυνο για τον πολυμερισμό της καθώς και τον αμφιπαθητικό χαρακτήρα της καρβοξυτελικής προβλεπόμενης α-έλικας της HrpA από *P. syringae* pv. *phaseolicola*, σχεδιάστηκαν δυο γονιδιακές κατασκευές με 8 και 18 υπολειπόμενα αμινοξικά κατάλοιπα (HrpADC8, HrpADC18, αντίστοιχα), προκειμένου να αποφευχθεί αυθόρμητος πολυμερισμός, ο οποίος θα εμπόδιζε τη κρυστάλλωσή τους.

Τα δυο αυτά μεταλλάγματα υπερεκφράστηκαν και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και στη συνέχεια με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Επιπλέον, μελέτη της δευτεροταγούς δομής τους σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης και *pH*, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κυκλικού διχρωισμού. Σύμφωνα με την ανάλυση δεδομένων κυκλικού διχρωισμού, υπάρχει ένα πολύ μικρό προβλεπόμενο ποσοστό α-έλικας (10%), ενώ τα προβλεπόμενα ποσοστά των β-πτυχωτών και τυχαίου σπειράματος είναι παρόμοια (20-30%), ανεξάρτητα από τις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν κάτι που έρχεται σε αντίθεση με την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής με τη βοήθεια του αλγόριθμου *PSIPRED*. Παράλληλα, έγιναν πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης των μεταλλαγμάτων, τα οποία έρχονται σε αντίθεση με τη θεωρία της εύπλαστης σφαίρας για την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Επιχειρήθηκε προκαταρκτική δομική μελέτη με τη μέθοδο σκέδασης ακτίνων Χ από διάλυμα σε μικρές γωνίες, ωστόσο οι μετρήσεις δεν ήταν επαρκείς ώστε να αποδώσουν τρισδιάστατα μοντέλα των μεταλλαγμάτων. Τέλος, οι υπό μελέτη πρωτεΐνες ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους στην παραγωγή κρυστάλλων με διαφορετικές τεχνικές, και σε ποικίλες συνθήκες.

ABSTRACT

The subject of this master thesis is the study of two deleted mutants of the HrpA protein from the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. HrpA, which is the pilin of the *Pseudomonas syringae*, is a small hydrophilic protein. Taking under consideration that the carboxy-terminal part of the protein is responsible for its polymerization and also the amphipathic profile of the carboxy-predicted α -helix of the HrpA from the *P. syringae* pv. *phaseolicola*, two constructs with the last 8 and 18 residues deleted were produced, in order to avoid any spontaneous polymerization, which could prevent crystallization.

Both of the mutant proteins were overexpressed and purified by affinity chromatography and size exclusion chromatography. Moreover, study of the secondary structure of both mutants took place under different conditions of temperature, concentration and *pH* with CD. According to the CD data analysis, there is not high predicted percentage of α -helix (10 %), while the predicted percentages of β -strand and random coil are similar (20-30%) under different conditions, which is contrary to *PSIPRED* results. In addition to this, thermal denaturation experiments took place for both mutant proteins, which are just the opposite of the molten globule hypothesis for protein folding. Primary structural studies were attempted with the method of SAXS, but the original data were not sufficient to give 3D models of the mutant proteins. Finally, crystallization was attempted with different methods and under various conditions without the desired diffracted crystals.

ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΕΣ ΚΑΙ ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ανατέθηκε από το *Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας* υπό την επίβλεψη του Καθηγητή *Μιχαήλ Κοκκινίδη* και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας *Άννα Μητράκη*. Οι μοριακές εργασίες κλωνοποίησης των γονιδίων σε κατάλληλο φορέα ετερόλογης έκφρασης έγιναν στο *Εργαστήριο Βιοτεχνολογία Φυτών*, τα πειράματα SAXS έλαβαν χώρα στη γραμμή ακτινοβολίας X33 17 του γερμανικού συγχροτρονίου (*DESY*) του *Αμβούργου* σε συνεργασία με τον εκεί εξωτερικό σταθμό του *Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL-Hamburg Outstation)*, ενώ η βιοχημική ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, τα πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης και τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού πραγματοποιήθηκαν στο *Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας*. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω, ...

... το Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών *Πρωτεϊνικής Βιοτεχνολογίας* που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω ένα από τα όνειρα μου,

... το *Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών*, για τη διετή υποτροφία που μου παρείχε χάρη στην οποία κατάφερα να συνεχίσω τις σπουδές μου. Χωρίς αυτή θα ήταν αδύνατη η προσπάθεια μου.

... ιδιαίτερα τον Καθηγητή και Δάσκαλο μου *Μιχάλη Κοκκινίδη*, για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη που μου έδειξε με το να με δεχτεί και να μου δώσει αυτή την εργασία, την υπομονή, την ευρηματικότητα, την έμπνευση και το αστείρευτο χιούμορ του από την πρώτη κιόλας στιγμή που έκανα την πρακτική μου άσκηση στο εργαστήριο του. Επίσης, για τη συστηματική παρακολούθηση της προσπάθειας κι ολοκλήρωσης της εργασίας αυτής, τη φροντίδα του να μη μας λείπει τίποτα από άποψη αναλώσιμων κι υλικοτεχνικού εξοπλισμού, τη μύηση στο χώρο της κρυσταλλογραφίας, τις συμβουλές του (και για τα ψιλά γράμματα) καθώς και δεν πρόκειται να ξεχάσω ποτέ το «Όλα λάθος Γκουγκουλιάάάά, για όλα φταις εσύύύ!!!». Είστε αληθινός επιστημονικός πατέρας!

... τον Καθηγητή *Νικόλαο Πανόπουλο* για την παροχή υλικοτεχνικού εξοπλισμού όσον αφορά τα μοριακά και τη μύηση στα μυστικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III,

... την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια και Δασκάλα μου *Άννα Μητράκη* ως δεύτερο επιβλέποντα αυτής της εργασίας, για τις εύστοχες παρατηρήσεις, για την υποστήριξη της και για τη διαφορετική οπτική γωνία που μπορεί να δει τη συγκεκριμένη εργασία,

... την ομάδα του TTSS και πιο συγκεκριμένα τη Δρ *Αναστασία Δ. Γαζή* (κατ' εμένα η «μεγάλη ερευνήτρια»), την υποψήφια διδάκτορα *Σπυριδούλα Χαρόβα*, τη Δρ *Βασιλική Φαδούλογλου* για το ότι με δέχτηκαν στην ομάδα τους και με εμπιστεύτηκαν, καθώς και το νεότερο μέλος τον *Άκη Χαρετίδη*. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την *Τάνυα*, για την τόδωση μεγάλη υποστήριξη και πίστη για μένα μολονότι ήμουν ανασφαλής λόγω της ασχετοσύνης μου με βιολογικό εργαστήριο. Για τις ατέλειωτες, επικοινωνιακές συζητήσεις που με ξελάσπωσε ουκ ολίγες φορές, για τα μυστικά των πρωτεϊνών, καθώς και για την αυστηρότητα της και για την υπομονή της με τις γκρίνιες μου. Η *Spy* έπαιξε το ρόλο της δασκάλας στα πρώτα μου βήματα στον εντελώς άγνωστο κόσμο της μοριακής βιολογίας. Αν κι

ανίδει από πειράματα κλωνοποίησης, πέψων, μου έμαθε τόσα πολλά και δεν ξέρω πως να την ευχαριστήσω για την υπομονή της και για το χρόνο της. Τέλος, η *Βίκυ* πάντα πρόθυμη να συζητήσει επιστημονικά και να με συμβουλέψει.

... Όλον τον κόσμο (Μαρία, Ντίνα-Κούγια, Μαίρη, Κατερίνα, Άρτεμης, Αναστασία, Θανάσης, Ανθή, Αλέκα, Γιάννης, Κλειώ, Βάνια) που μοιραστήκαμε το εργαστήριο κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, όπου ο καθένας τους με βοήθησε με το δικό του τρόπο χωρίς πολλές φορές να το έχουν καταλάβει,

... τους ανθρώπους που δουλεύουν στα εργαστήρια: *Κρυσταλλογραφίας II, Βιοτεχνολογία Φυτών, Φυσιολογία Φυτών και Βιοτεχνολογίας*

... την αξιοθαύμαστη ομάδα ιστιοπλοΐας ανοικτής θαλάσσης του *ΙΟΗ*, που φάγαμε κύμα κι αλάτι, που ζήσαμε έντονες εμπειρίες και με βοηθήσανε να συγκεντρώνομαι, να μην πανικοβάλλομαι και να παίρνω πρωτοβουλίες σε δύσκολες στιγμές. Η συγκεκριμένη ομάδα είναι ομάδα πρότυπο συνεργασίας για μένα. Χαίρομαι που η αγάπη μας για τη θάλασσα μας ένωσε και συνεχίζουμε να πορευόμαστε μαζί. Δεν θα πρέπει να παραλείψω και τους Δασκάλους μου *Μανώλη Βασιλειάδη, Μανώλη Αποστολάκη, Βασίλη Ταμπουράκη* και *Όλγα Παπαδάκη*.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κολλητή μου τσακαλοπαρέα από *Θεσσαλονίκη, Αθήνα, Ηράκλειο* και το *Φ. Ρ.* για την υποστήριξη, για το ότι δεν κάνουν έκπτωση στα όνειρα τους, τις συμβουλές και τα ταξίδια τους (επιστημονικά, πνευματικά και χιλιόμετρικά).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Εισαγωγή.....	13
1.1 Εκκριτικό σύστημα τύπου III.....	13
1.2 Μορφολογία της μηχανής έκκρισης τύπου III.....	15
1.3 Hrp A.....	17
1.4 Σκοπός της εργασίας.....	18
2 Μέθοδοι.....	19
2.1 <i>in silico</i> ανάλυση.....	19
2.2 Κλωνοποίηση.....	20
2.3 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών.....	25
2.4 Χρωματογραφία.....	27
2.5 Κυκλικός διχρωϊσμός.....	30
2.6 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	33
2.7 Σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.....	35
3 Αποτελέσματα.....	38
3.1 <i>in silico</i> ανάλυση.....	38
3.2 Κλωνοποίηση των HrpADC8, HrpADC18.....	40
3.3 Χρωματογραφία.....	41

3.4 Κυκλικός διχρωϊσμός.....	43
3.5 Κρυσταλλώσεις.....	45
3.6 Σκέδαση ακτίνων Χ σε μικρές γωνίες.....	45
4 Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	47
Παράρτημα Α.....	52
Παράρτημα Β.....	55
Παράρτημα Γ.....	59
Παράρτημα Δ.....	62
Βιβλιογραφία.....	73

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ύπαρξη μιας σειράς φυσικών εμποδίων διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα ενός βακτηρίου αρνητικού κατά *Gram* από τον εξωκυττάριο χώρο. Τα εμπόδια αυτά είναι η εσωτερική μεμβράνη, ο περιπλασματικός χώρος, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και τελικώς η εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου. Για την υπερσκέλιση των εμποδίων αυτών και την επικοινωνία με τον εξωκυττάριο χώρο και το περιβάλλον τους τα βακτήρια αρνητικά κατά *Gram* διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς με σκοπό την έκκριση πρωτεϊνών στο εξωτερικό περιβάλλον [1]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης που χαρακτηρίζονται ως τύπου I, II, III, IV και V [2]. Από αυτά το τύπου V είναι ελάχιστα χαρακτηρισμένο ενώ τα υπόλοιπα μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν η έκκριση γίνεται σε διακριτά στάδια ή είναι μια συνεχής πορεία. Ο τύπου II και IV έκκρισης πραγματοποιείται σε δυο διακριτά βήματα. Αρχικά, το εκκρινόμενο μόριο μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα του βακτηρίου διασχίζοντας την εσωτερική μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρεται, διασχίζοντας την εξωτερική μεμβράνη, στον εξωκυττάριο χώρο. Το πρώτο βήμα είναι κοινό στα δυο εκκριτικά μονοπάτια και πραγματοποιείται μέσω του Sec συστήματος μεταφοράς [3]. Το Sec εξαρτώμενο μονοπάτι διακρίνεται:

1. στον εντοπισμό της προς έκκριση πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα
2. στη μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης
3. στην απελευθέρωση της στο περίπλασμα

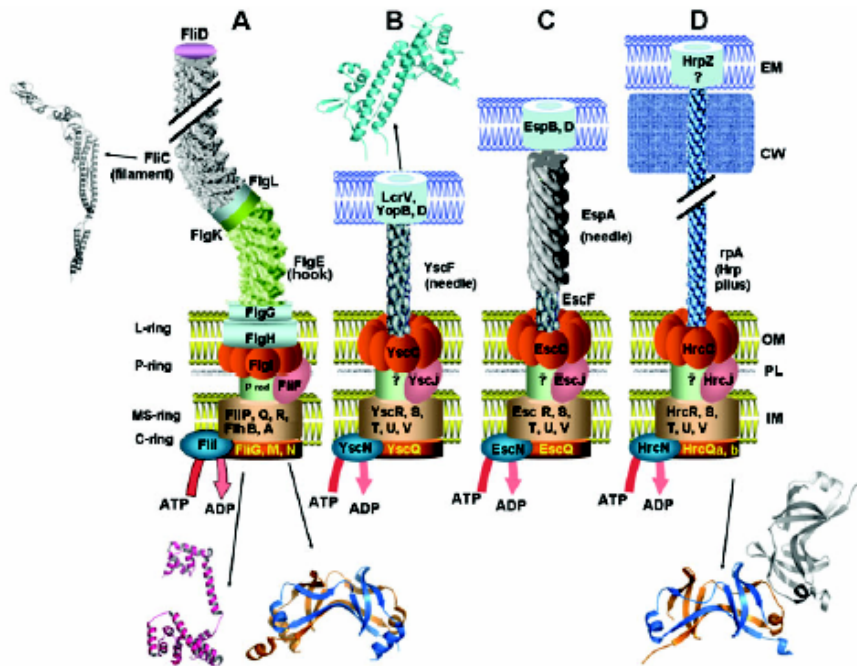
Τα υποστρώματα εδώ διαθέτουν ένα αποκοπτόμενο πεπτιδικό σινιάλο στο αμινοτελικό τους άκρο. Στα τύπου I (εδώ τα υποστρώματα διαθέτουν ένα μη αποκοπτόμενο πεπτιδικό σινιάλο στο καρβοξυτελικό τους άκρο) και III μονοπάτια η έκκριση πραγματοποιείται ως μια συνεχής πορεία χωρίς διακριτό περιπλασματικό ενδιάμεσο. Το τύπου I εκκριτικό μονοπάτι είναι ιδιαίτερα απλό αφού περιλαμβάνει μόνο τρεις πρωτεΐνες.

1.1 ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΥΠΟΥ III

Η ανακάλυψη ομόλογων αλληλουχιών μεταξύ πρωτεϊνών, κοινών σε ζωο- και φυτο-παθογόνα βακτήρια που εμπλέκονται στην έκκριση παραγόντων μολυσματικότητας (*virulence*) προτάσσει την ύπαρξη ενός κοινού μονοπατιού έκκρισης που ονομάζεται τύπου III [4].

Το τύπου III είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός για τη λειτουργία του οποίου απαιτείται η συνδυασμένη δράση περισσότερων από 20 πρωτεΐνες. Το σύστημα αυτό παρουσιάζει τρία χαρακτηριστικά [2], [5-10]:

1. οι προς εξαγωγή πρωτεΐνες δε διαθέτουν αποκοπτόμενο σινιάλο
2. απαιτούνται προσαρμοσμένες βοηθητικές πρωτεΐνες (σαπερόνες) για πολλές από τις προς εξαγωγή πρωτεΐνες
3. απαιτείται επαφή με το κύτταρο ξενιστή για πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού έκκρισης



Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση του βακτηριακού μαστιγίου (A) και των TTSS της *Yersinia* (B), της *E. coli* (C) και της *Pseudomonas syringae* (D). Το βασικό σωματίο του μαστιγίου αποτελείται από πρωτεΐνες που σχηματίζουν τους δακτυλίους C, MS, P και L. Έχουν σημειωθεί μόνο οι συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των τεσσάρων συστημάτων TTSS EM: ευκαρυωτική μεμβράνη. OM: εξωτερική μεμβράνη, PL: στρώμα πεπτιδογλυκάνης, IM: εσωτερική μεμβράνη, CW: κυτταρικό τοίχωμα [13].

Στα φυτικά παθογόνα ο μηχανισμός και τα σχετιζόμενα με αυτό γονίδια ονομάστηκαν Hrp και *hrp* αντίστοιχα (hypersensitive response and pathogenicity) επειδή συνδέθηκαν όχι μόνο με την εκδήλωση ασθένειας στους ξενιστές αλλά και με την εμφάνιση μιας αμυντικής αντίδρασης της λεγόμενης αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά [7], [9], [11-12].

Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι ορισμένα από τα *hrp* γονίδια παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με γονίδια που συμμετέχουν στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου κι επιβεβαιώθηκε ο υψηλός βαθμός συντήρησης τους σε όλα τα παθογόνα βακτηρία που διαθέτουν τύπου III εκκριτικά συστήματα. Τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hrc* (hypersensitive response and conserved) και τα προϊόντα τους θεωρείται ότι συνθέτουν τον πυρήνα της εκκριτικής μηχανής (Σχήμα 1.1) [5].

Όσον αφορά τη *Yersinia* και τη *Shigella flexneri* έχει δείχτει ότι ο τύπου III ελεγχόμενος μηχανισμός έκκρισης ενεργοποιείται μέσω φυσικής επαφής με την επιφάνεια του κυτάρου στόχου [2]. Επιπλέον, στη *Yersinia* ακόμη κι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με παθογένεια τύπου III παραμένει σε καταστολή μέχρι τη στιγμή της επαφής. Αντίθετα, η *Shigella flexneri* παράγει εκ των προτέρων κι αποθηκεύει στο κυτταρόπλασμα της τις προς έκκριση πρωτεΐνες. Σε αναλογία με τη *Yersinia*, η *Pseudomonas syringae* πιστεύεται πως δεν εκφράζει Hrp πρωτεΐνες μέχρι να βρεθεί στο φυτικό αποπλάστη (ο φυτικός αποπλάστης περιλαμβάνει την υδατική φάση που εντοπίζεται στον χώρο μεταξύ των κυττάρων και εκείνη που είναι προσροφημένη στα κυτταρικά τοιχώματα) [2], [8], [10], [12], [14-15].

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, όπως και τα περισσότερα μέλη της ομάδας, προκαλεί μία από τις εξής δύο αντιδράσεις σε φυτά:

1. είτε ασθένεια με χαρακτηριστικά συμπτώματα κηλίδωσης, σε όσα φυτά αποτελούν ξενιστές της (λ. χ. *Phaseolus vulgaris*, φασολιά) ή

2. αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε όλα τα υπόλοιπα φυτά μη ξενιστές της, όπως λ. χ. σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς, σε καπνό, ντομάτα

Στην περίπτωση της φασολιάς, τα συμπτώματα της ασθένειας (haloblight) εμφανίζονται στο φύλλωμα και στους λοβούς, υπό τη μορφή α) υδατωδών λιπαρών κηλίδων (πρωτογενή συμπτώματα) κι εξαρτώνται από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου [16], β) δια-συστηματικής χλώρωσης (δευτερογενές σύμπτωμα, εμφανίζεται ως χλωρωτικές κηλίδες γύρω από τις υδατώδεις κηλίδες κι οφείλεται στη δράση μιας εξωτοξίνης, που παράγει το βακτήριο, της φασεολοτοξίνης) και γ) νανισμού των φυτών. Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* επάγει την τοπική νεκρωτική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά μη ξενιστές (in compatible reaction), όπως καπνός και σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς. Η HR εκδηλώνεται μέσα σε 24 ώρες, στη διάρκεια της οποίας παρατηρείται περιορισμένος πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και παρεμποδίζεται η εξάπλωση του παθογόνου στο φυτό.

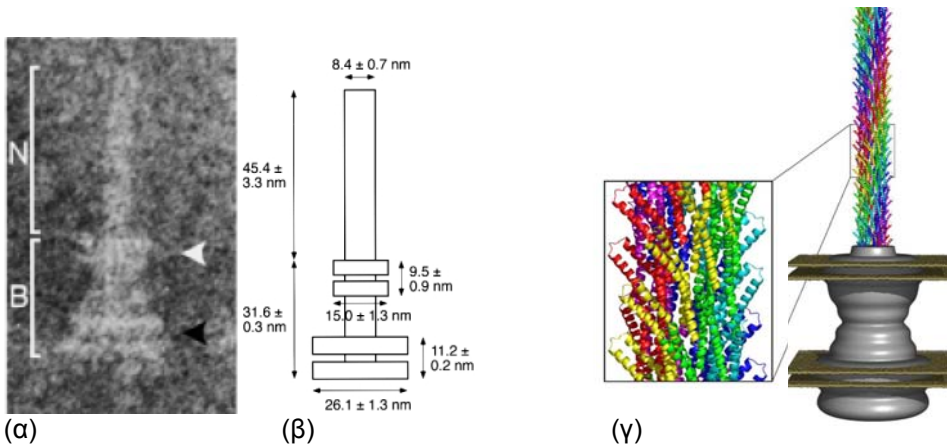
Μέχρι σήμερα δεν έχει προσδιοριστεί ένα εκκριτικό σήμα που να σηματοδοτεί την έκκριση υποστρωμάτων του τύπου III. Τα δεδομένα φαίνεται να αποκλίνουν υποστηρίζοντας την ύπαρξη τεσσάρων τουλάχιστον παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της έκκρισης. Οι παράγοντες αυτοί είναι [17-20]:

1. η αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου της εκκρινόμενης πρωτεΐνης
2. η πρόσδεση στην εκκρινόμενη πρωτεΐνη ενός ειδικού βοηθητικού παράγοντα
3. η δομή του 5' άκρου του mRNA της εκκρινόμενης πρωτεΐνης
4. η ευελιξία των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, των οποίων οι δομές ενεργοποιούνται δραστικά όταν προσδένονται σε συγκεκριμένες διπλωμένες πρωτεΐνες

1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΗΧΑΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΥΠΟΥ III

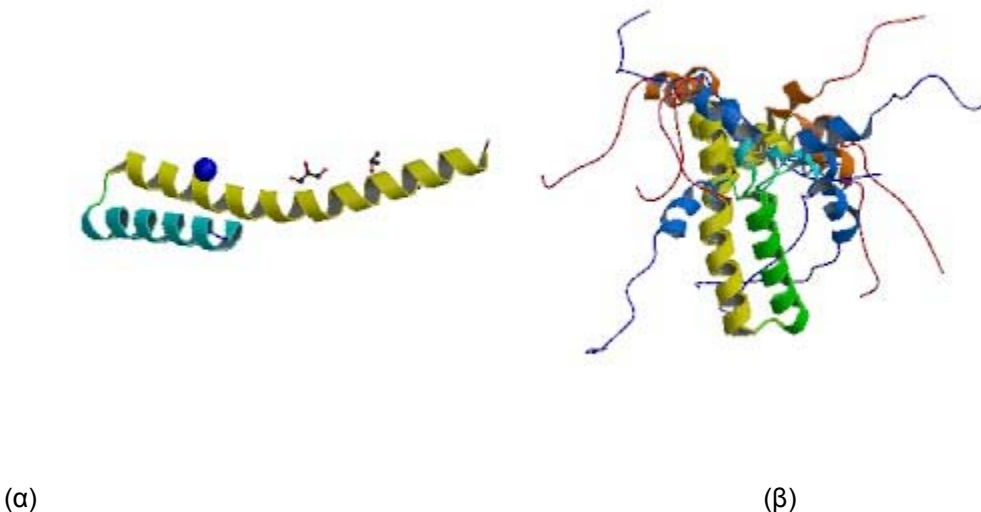
Όπως προαναφέρθηκε, όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωϊκών, φυτικών παθογόνων έχουν από κοινού έναν αριθμό κύριων δομικών συστατικών υψηλά συντηρημένων [2]. Αυτά τα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες.

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης στη μεμβράνη που παρουσιάζουν ομοιότητες με τη συσκευή εξαγωγής του μαστιγίου. Δομούν τον εσωτερικό-κυτταροπλασματικό δακτύλιο, τον δακτύλιο της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και το τμήμα της εκκριτικής συσκευής που βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο. Όσον αφορά τη μορφολογία του βασικού σώματος της εκκριτικής συσκευής των ζωοπαθογόνων *Salmonella* και *Shigella* είναι σήμερα γνωστή σε χαμηλή διακριτικότητα από πειράματα κρουστρονικής μικροσκοπίας που αποκαλύπτουν σημαντική μεταξύ τους ομοιότητα (γίνεται αναφορά στις επόμενες παραγράφους) [21-27]. Πρόκειται για μια κυλινδρική δομή που περιβάλλεται από δυο ζεύγη δακτυλίων. Το ένα ζεύγος εντοπίζεται στην περιοχή της εξωκυτταρικής μεμβράνης και το δεύτερο στην περιοχή της εσωτερικής. Στην περίπτωση του μαστιγίου η συσκευή απολήγει στο κυτταρόπλασμα του βακτηριδίου σε ένα δακτύλιο που ονομάζεται κυτταροπλασματικός δακτύλιος (C-ring) (Σχήμα 1.2).



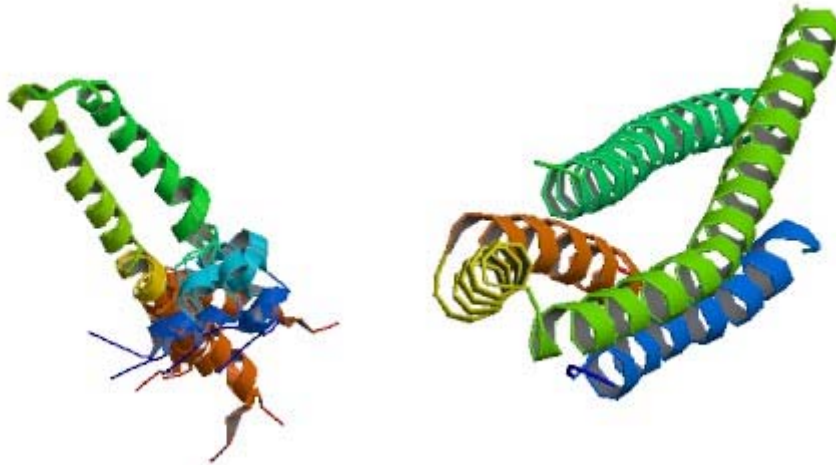
Σχήμα 1.2: (α) Σύμπλεγμα του εκκριτικού συστήματος τύπου III. N: βελονοειδής δομή, B: βάση, ανοιχτό βέλος άνω: (εξωτερικά) δακτύλια, σκούρο βέλος κάτω: (εσωτερικά) δακτύλια, (β) Προτεινόμενα μεγέθη της *S. Flexneri* [28], (γ) Βελονοειδής δομή της *S. flexneri* που αποτελείται από 120 αντίγραφα της μονομερούς πρωτεΐνης MxiH (EMDB ID: 1416) και βασικό σώμα (γκρι χρώμα, EMDB ID: 1422) [21].

Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν τον δακτύλιο της εξωτερικής μεμβράνης και τα εξωκυττάρια εξαρτήματα της συσκευής. Αυτό το τμήμα της συσκευής δε φέρει πρωτεΐνες με ομολογίες μεταξύ των δύο συστημάτων (μολυσματικού και μαστιγιακού) αφού έχει επιστρατευθεί για διαφορετική χρήση. Τα εξωκυττάρια εξαρτήματα της συσκευής διαφέρουν για τον ίδιο λόγο και μεταξύ ζωοπαθογόνων και φυτοπαθογόνων βακτηρίων έχοντας προσαρμοστεί ώστε να αντιμετωπίζουν τις διαφορετικές προκλήσεις των δύο τύπων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η εξωκυττάρια νηματοειδής κατασκευή των ζωοπαθογόνων *Gram* αρνητικών βακτηριδίων ονομάζεται βελονοειδής δομή (needle), ενώ των φυτοπαθογόνων ινίδιο (pilus) [25], [29]. Το ινίδιο είναι λεπτότερης διαμέτρου κι εξαιρετικά μακρύτερο από τη βελονοειδή δομή, φθάνοντας σε μήκος της τάξεως των μικρομέτρων. Κατ' αυτόν τον τρόπο εξυπηρετείται η μεταφορά δραστικών παραγόντων/πρωτεϊνών σε μεγάλες αποστάσεις με κύριο σκοπό τη διάτρηση και διέλευση διαμέσου ενός σημαντικού επιπρόσθετου εμποδίου: του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος [30]. Οι δομικές διαφορές που υπάρχουν στα εξωκυττάρια τμήματα των εκκριτικών συστημάτων τύπου III μεταξύ των ζωϊκών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων χαρακτηρίζει τη διαφορετική κυτταρική οργάνωση των ζωϊκών και φυτικών οργανισμών στους οποίους παρασιτούν.



(α)

(β)



(γ)

(δ)

Σχήμα 1.3: Κατατεθειμένες δομές στη PDB: (α) MxiH (*S. flexneri*) (PDB ID: 2ca5) [28], (β) BsaL (*B. pseudomallei*) (PDB ID: 2gou) [31], (γ) PrgI (*S. typhimurium*) (PDB ID: 2jow) [32], (δ) EspA (*E. coli*) (PDB ID: 1xou) [33].

Δομές είναι διαθέσιμες για τρεις υπομονάδες βελονοειδούς δομής προερχόμενες από ζωοπαθογόνα βακτήρια: MxiH (*S. flexneri*) (Σχήμα 1.3α) [28], BsaL (*B. pseudomallei*) (Σχήμα 1.3β) [31] και PrgI (*S. typhimurium*) (Σχήμα 1.3γ) [32]. Αυτές οι δομές διαθέτουν μια κεντρική περιοχή σπειραμένου σπειράματος. Έξω από αυτή την περιοχή, παρατηρείται το αμινοτελικό άκρο να είναι δραστήριο ενώ το καρβοξυτελικό να είναι αδύπλωτο.

Στις δομικές εξωκυττάρια πρωτεΐνες ανήκουν κι οι πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής (needle-tip proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέουν τη βελονοειδή δομή με τις πρωτεΐνες διάνοιξης-μεταφοράς της μεμβράνης του ξενιστή εξασφαλίζοντας τη συνέχεια του αγωγού έκκρισης με τον πόρο μεταφοράς του εκκριτικού συστήματος τύπου III στην ευκαρυωτική μεμβράνη. Επίσης οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ορθή τοποθέτηση, ενσωμάτωση κι ολιγομερισμό των πρωτεϊνών διάνοιξης-μεταφοράς κατά τη δόμηση του πόρου. Η EspA της *E. coli* (Σχήμα 1.3δ) [33] κι η YscF της *Yersinia pestis* [34] λύθηκαν μαζί με τις σαπερόνες τους CesaA και YscG/YscE αντίστοιχα. Η EspA αποτελείται από δυο α-έλικες οι οποίες έρχονται κοντά με το εκτενές σπειραμμένο σπείραμα της σαπερόνης της. Αντίστοιχες πρωτεΐνες από τη *S. flexneri* είναι η IpaD, η BipD της *Burkholderia pseudomallei* και η LcrV στην περίπτωση του Ysc εκκριτικού συστήματος (*Yersinia*) [35-36]. Κι οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν μία κεντρική περιοχή σπειραμένου σπειράματος 2 που αποτελείται από δύο α-έλικες μήκους περίπου 50 καταλοίπων.

1.3 HRP A

Η HrpA, η οποία είναι πιλίνη της *Pseudomonas syringae*, είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpA*, το οποίο βρίσκεται αμέσως πριν από το γονίδιο *hrpZ*, στο ίδιο σπερόνιο. Ενδιαφέρον είναι ότι η HrpA βρέθηκε να σχετίζεται με μία νέα σωληνοειδή δομή που ονομάστηκε Hrp pilus [37-38]. Ανάλυση μη πολικών μεταλλαγών στο *hrpA* έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HrpA είναι μια δομική πρωτεΐνη του αγωγού Hrp κι επιπλέον ο σχηματισμός του είναι απαραίτητος για τις αλληλεπιδράσεις φυτών-βακτηρίων (HR και παθογένεια), που ελέγχονται από το σύστημα Hrp. Η επιμήκυνση του αγωγού Hrp, ο οποίος έχει διάμετρο 5-6 nm και μήκος > 2 μm γίνεται με την προσθήκη νέων υπομονάδων HrpA στο πιο απόμακρο άκρο του από την επιφάνεια του κυττάρου κι ο μηχανισμός αυτός είναι παρόμοιος με τον τρόπο επιμήκυνσης του βακτηριακού

μαστιγίου [39]. Η πρωτεΐνη HrpA δε φαίνεται να διαθέτει ειδικό ζευγάρι σαπερονών για την παρεμπόδιση του πρώιμου πολυμερισμού της εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Τα μετάγραφα του γονιδίου *hrpA* φαίνεται να διαθέτουν εξαιρετική σταθερότητα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα [40]. Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συσχετίζεται άμεσα είτε με την υψηλή απαίτηση του βακτηρίου για την κύρια υπομονάδα που δομεί το ινίδιο, είτε με τη λειτουργία του mRNA ως εκκριτικού σιναλάου. Η τελευταία θεώρηση συναντά αρκετούς υποστηρικτές επίσης [18], αλλά στην περίπτωση των βελονοειδών δομών οι σαπερόνες τύπου III είναι απαραίτητες για την εμπόδιση του πολυμερισμού των μονομερών πρωτεϊνών μέσα στο κυτταρόπλασμα (για παράδειγμα οι σαπερόνες CsaA, PscE/PscG και YscE/YscG για την EspA (*E. coli*), την PscF (*P.aeruginosa*) και την YscF (*Yersinia* spp) αντίστοιχα).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο γενικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η δομή της HrpA του φυτοπαθογόνου βακτηριδίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Γνωρίζοντας από προηγούμενη προσπάθεια απομόνωσης της αγρίου τύπου HrpA (που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο *Βιοτεχνολογίας Φυτών*) ότι πολυμερίζεται όπως κι οι ομόλογες της, ο πρώτος στόχος ήταν ο σχεδιασμός μεταλλαγμάτων που εμποδίζουν τον πολυμερισμό. Σχεδιάστηκαν και κλωνοποιήθηκαν δυο μεταλλάγματα με τα οχτώ και δεκαοχτώ κατάλοιπα του καρβοξυλικού άκρου αποκομμένα. Τα δυο μεταλλάγματα υπερεκφράστηκαν και στη συνέχεια απομονώθηκαν με τη βοήθεια χρωματογραφίας συγγένειας και μοριακής διήθησης. Επίσης έγιναν μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών αυτών. Επιχειρήθηκε προκαταρκτική δομική μελέτη με τη μέθοδο σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες, ωστόσο οι μετρήσεις δεν ήταν επαρκείς ώστε να αποδώσουν τρισδιάστατα μοντέλα των μεταλλαγμάτων. Τέλος, οι υπό μελέτη πρωτεΐνες ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους στην παραγωγή κρυστάλλων.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έλαβαν χώρα τεχνικές κλωνοποίησης, καθαρισμού πρωτεϊνών, κυκλικού διχρωϊσμού, κρυστάλλωσης καθώς και μελέτες βιοπληροφορικής. Σε αυτό το κεφάλαιο αναλύονται οι μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν εκτενώς ενώ παρουσιάζεται το γενικό σχήμα της επεξεργασίας των δεδομένων για κάθε μέθοδο. Περιγράφονται τόσο οι αρχές που τις διέπουν όσο κι οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν σε γενικά πλαίσια. Όπου οι διαδικασίες υπέστησαν τροποποιήσεις, αυτές αναφέρονται στο επόμενο κεφάλαιο όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

2.1 *in silico* ΑΝΑΛΥΣΗ

Σαν κύρια μέθοδος αλληλουχικής σύγκρισης με τις πρωτογενείς βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η *PSI-BLAST*. Η μέθοδος *PSI-BLAST* περιέχει ένα αλγόριθμο τοπικής στοίχισης και είναι σε θέση να ταυτοποιήσει και να στοιχίσει περιοχές ομοιότητας (θετικές ταυτοσημίες) μεταξύ δύο αλληλουχιών ενώ επιτρέπει την παρουσία κενών κατά την στοίχιση. Μία σειρά μοτίβων που στηρίζεται σε κοινά χαρακτηριστικά προσδιορισμένων τρισδιάστατων δομών συμπεριλαμβάνεται στη μέθοδο στοίχισης. Τα μοτίβα αυτά ονομάζονται επίσης προφίλ ή πίνακες βαθμολόγησης ειδικών θέσεων ή κρυφά μοντέλα *Markov* (στατιστικά μοντέλα κατά τα οποία το υπό μοντελοποίηση σύστημα υποτίθεται ότι είναι μία ανέλιξη *Markov* αγνώστων παραμέτρων. Κατά την διαδικασία καθορίζονται οι κρυμμένες παράμετροι από τις παρατηρούμενες παραμέτρους του μοντέλου. Αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται περαιτέρω στην αναγνώριση μοτίβων). Η ικανότητα επιτυχούς έρευνας μέσω μοτίβων αυξάνει με την χρήση επαναληπτικών κύκλων. Σε αυτούς τους κύκλους οι νέες αλληλουχίες στοιχίζονται πολλαπλά με την υπό μελέτη αλληλουχία, νέα μοτίβα καθορίζονται και ξεκινά νέα έρευνα της βάσης δεδομένων [41-42]. Τα αποτελέσματα της *PSI-BLAST* κρίνονται βάση της τιμής E (E-value ή expected value) κάθε ομόλογης αλληλουχίας. Η τιμή - E ενός αναμενόμενου αποτελέσματος x αντιπροσωπεύει τις φορές που θα περιμέναμε να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα x τυχαία. Η τιμή-E εξαρτάται από δύο ποσότητες: τον αριθμό των επαναλήψεων της δοκιμής, N, (δηλαδή τον αριθμό των αλληλουχιών που συγκρίνεται με την υπό μελέτη-αλληλουχία) επί την πιθανότητα, p, να επιτευχθεί το αποτέλεσμα (ομοιότητα μεταξύ των συγκρινόμενων αλληλουχιών), $E=Np$. Ειδικά στην *BLAST* οι E-τιμές δεν αναφέρονται σε ολόκληρη την αλληλουχία αλλά στο τμήμα της αλληλουχίας (στην ομόλογη επικράτεια) που παρουσιάζει την ομοιότητα με την υπό μελέτη αλληλουχία. Αναζητήσεις ομόλογων αλληλουχιών στην συγκεκριμένη μελέτη έλαβαν χώρα μέσω *PSI-BLAST* χρησιμοποιώντας την βάση *NRDB* (non redundant database). Οι προεπιλεγμένες παράμετροι του διακομιστή χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις (πίνακας BLOSUM 65, τιμή-E = 0,005 για συνυπολογισμό των αποτελεσμάτων στους επόμενους κύκλους, ποινές κενού: δημιουργίας 11, επέκτασης 1: άνευ φίλτρου).

Η αμινοξική αλληλουχία εμπεριέχει πληροφορία για την τρισδιάστατη διεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο και τη σταθερότητα της. Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της υπό μελέτη πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος *PSIPRED* [43-44]. Η μέθοδος χρησιμοποιεί 4 ξεχωριστά νευρωνικά δίκτυα, τα οποία εκπαιδεύονται από τα μοτίβα αλληλουχίας που προκύπτουν από τη *PSI-BLAST*. Η μέθοδος της αναγνώρισης μοτίβου αναδίπλωσης (fold recognition ή threading) χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση απομακρυσμένων ομολόγων ή αναλόγων 7 αλληλουχιών, καθώς καμία από τις υπό μελέτη πρωτεϊνικές αλληλουχίες δεν παρουσίασε ομοιότητα με αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών της βάσης *NCBI* χωρίς εφεδρεία (non-redundant) [45]. Η χρήση της αναγνώρισης μοτίβου αναδίπλωσης στηρίζεται στο γεγονός ότι η δομή συντηρείται περισσότερο από ότι η αλληλουχία σε μακρινά συγγενικές πρωτεΐνες. Η μέθοδος διαπραγματεύεται το πόσο καλά ένα (δομικό) μοτίβο αναδίπλωσης ταιριάζει και μπορεί να υιοθετηθεί από την υπό μελέτη αμινοξική αλληλουχία. Αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση αλληλουχίας αναδίπλωσης τα καλά μελετημένα πρωτεϊνικά μοτίβα αλλά προτάθηκε η διαδικασία του threading κατά την οποία μία αλληλουχία συνταιριάζει σε μία δομή λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα των λεπτομερών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων που συμμετέχουν [45]. Για την αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων αυτών χρησιμοποιείται μία συνάρτηση ενέργειας όπως συμβαίνει και στις

περιπτώσεις προσομοιώσεων της *ab initio* πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Επιπλέον, μέσω του *ClustalW* [46] έγινε η πολλαπλή στοίχιση των ομολόγων της HrpA.

Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν ακόμα και για το κατά πόσον μπορούν να δομήσουν σφαιρικές πρωτεΐνες έχοντας ικανό ποσοστό υδρόφοβων αμινοξέων σε σχέση με τα φορτισμένα τους κατάλοιπα με τη χρήση του προγράμματος *FoldIndex*® [47]. Ο αλγόριθμος στηρίζεται στα αποτελέσματα του [48] για τη διάκριση μεταξύ διπλωμένων κι εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους: μέσο φορτίο */R/* (απόλυτη τιμή της διαφοράς μεταξύ του αριθμού των θετικά κι αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων σε *pH 7,0*, διαιρούμενο με το συνολικό αριθμό των καταλοίπων), και μέση υδροφοβικότητα *H*, (άθροισμα όλων των δεικτών υδροφοβικότητας των καταλοίπων κάνοντας χρήση της κλίμακας Kyte/Doolittle [48] διαιρούμενου με τον αριθμό των συνολικών καταλοίπων) καθόρισε το όριο μεταξύ των εγγενώς αδίπλωτων και των σφαιρικών πρωτεϊνών με την εξίσωση [47]

$$/R/=2,785H-1,151$$

Εξηγήθηκε ο δείκτης αναδίπλωσης *IF* (foldindex) [47]:

$$IF=2,785H-/R/-1,151$$

Θετικές τιμές του δείκτη αναπαριστούν σφαιρικές πρωτεΐνες ή επικράτειες ενώ οι αρνητικές αναπαριστούν πρωτεΐνες που πιθανότατα ανήκουν στην οικογένεια των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών [48]. Το θεωρητικό *pI* υπολογίστηκε με το πρόγραμμα *ProtParam* [49-50]. Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή όπου η πρωτεΐνη φέρει μηδενικό καθαρό ηλεκτρικό φορτίο αν βρισκόταν σε αδίπλωτη μορφή στο διάλυμα. Η πραγματική τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου εξαρτάται από τη δίπλωση της πρωτεΐνης κι αφορά την εξωτερική της επιφάνεια, η οποία έρχεται σε επαφή με το διαλύτη. Το πρόγραμμα *Matcher* [51] χρησιμοποιήθηκε για το καθορισμό της επανάληψης επτάδας. Οι επαναλήψεις επτάδας παρέχουν ισχυρές ενδείξεις για την ύπαρξη α-ελικοειδών σπειραμάτων. Τα αμινοξικά κατάλοιπα σε μια τέτοια επανάληψη επτάδας χαρακτηρίζονται συνήθως ως a-g. Τα κατάλοιπα στη θέση d και a είναι συνήθως υδρόφοβα και συμμετέχουν στο σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα κατά μήκος της υπερέλικας. Τα κατάλοιπα e και g, τα οποία συνορεύουν με τον υδρόφοβο πυρήνα είναι συνήθως φορτισμένα. Οι πλευρικές ομάδες αυτών των καταλοίπων συμμετέχουν σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ α-ελίκων, καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη σχετική στοίχιση και τον προσανατολισμό των αλυσίδων. Για ακριβώς τον ίδιο λόγο χρησιμοποιήθηκε και το *Helical Wheel* [52].

2.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Μία σειρά τεχνικών λαμβάνουν χώρα για την επίτευξη της κλωνοποίησης μιας αλληλουχίας DNA εντός πλασμιδιακού φορέα. Στην περίπτωση της εργασίας αυτής, πλασμίδιο που φέρει την προς κλωνοποίηση αλληλουχία από *E. coli* χρησιμοποιείται ως αρχική μήτρα, ενισχύεται το κατάλληλο τμήμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενώ κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινητές φέρουν περιοριστικές θέσεις. Ακολουθεί προετοιμασία του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και του φορέα με κατάλληλες πέψεις με περιοριστικά ένζυμα ώστε να προκύψουν συγκολλητικά άκρα και στη συνέχεια, αντίδραση λιγάσης ενώνει τα άκρα αυτά. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται ακολούθως για να μετασχηματίσει επιδεικτικά κύτταρα *E. coli* τα οποία μεγαλώνουν σε επιλεκτικό μέσο παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού κι οι αποικίες τους τέλος ελέγχονται για την παρουσία του επιθυμητού κλώνου.

2.2.1 Απομόνωση μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA

100 ml βακτηριακής καλλιέργειας φέρουσας το πλασμιδιακό DNA ενδιαφέροντος, η οποία επώαστηκε στους 37° C για 14-16 h, διαμοιράζεται σε προαποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες των 50 ml και φυγοκεντρείται για 30 min στα 1340 g. Από εδώ και στο εξής η διαδικασία συνεχίζεται στους 4° C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4 ml διαλύματος 50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg ml⁻¹ RNase A. Κατόπιν προστίθενται 4 ml διαλύματος 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v) κι ακολουθεί ελαφρά ανάδευση κι επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml παγωμένου διαλύματος 3 M CH₃COOK pH 5,5, το διάλυμα αναμιγνύεται ελαφρά κι ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 min. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 18513 g για 30 min στους 4° C και το υπερκείμενο φιλτράρεται σε υαλοβάμβακα. Ακολουθεί εξισορρόπηση της στήλης QIAGEN-tip100 με 4 ml διαλύματος 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15 % ισοπροπανόλη (v/v), 0,15 % Triton X-100 (v/v) σε θερμοκρασία δωματίου. Το υλικό της στήλης περιέχει θετικά φορτισμένες ομάδες DEAE που συγκρατούν τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό φωσφόρων του DNA. Παρουσία 750 mM NaCl στη στήλη δε μπορούν να κρατηθούν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, μεταβολίτες και χρωστικές. Το φιλτραρισμένο υπερκείμενο φορτώνεται στη στήλη κι αφήνεται να περάσει με τη βαρύτητα. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος 1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7 και 15 % ισοπροπανόλη (v/v) (παρουσία 1 M αλατιού απομακρύνονται από τη στήλη tRNA και rRNA που τυχόν κατακρατήθηκαν στο προηγούμενο βήμα). Η έκλουση του DNA γίνεται με 5 ml διαλύματος 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,5 και 15 % ισοπροπανόλη (v/v) (σε αυτό το βήμα αυξάνεται το pH για να εκλυθεί το πλασμιδίο σε μικρότερη συγκέντρωση NaCl, ίση με 1,25 M). Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 0,7 όγκων ισοπροπανόλης επί του όγκου του διαλύματος κι ακολουθεί φυγοκέντριση στα 18513 g για 30 min, στους 4° C (κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη μειώνει την κατακρήμνιση αλάτων). Το ίζημα ξεπλένεται με 2 ml 70 % αιθανόλης. Τέλος, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA στεγνώνεται κι επαναδιαλύεται σε 100 µl απιοντισμένου κι αποστειρωμένου H₂O.

2.2.2 PCR

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές αλληλουχίες. Οι γνωστές αυτές αλληλουχίες αποκρίνονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους, το περιεχόμενο σε GC πρέπει να είναι από 40 % ως 60 % και η χρήση περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται προς στο 5' άκρο. Μια από τις σημαντικές παραμέτρους είναι η συγκέντρωση των ιόντων Mg²⁺. Υψηλά ποσοστά του ιόντος προκαλούν μη ειδικό πολυμερισμό, ενώ πολύ λίγα καταστέλλουν την αντίδραση. Οι θερμοκρασίες ανοπτήσεως (T annealing) είναι επίσης κρίσιμες. Η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Pfu πολυμεράση *Promega*. Οι εκκινητές συντίθενται από το εργαστήριο *Μικροχημείας (IMBB-FORTH)* κατόπιν παραγγελίας.

Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται 35 φορές (κύκλοι). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα (thermal cycler), το οποίο είναι σε θέση να θερμαίνει και να ψύχει τις αντιδράσεις σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα:

1. αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της μήτρας DNA με επώαση στους 94° C: κατά την αποδιάταξη, η δίκλωνη έλικα ανοίγει σε δύο αλυσίδες μονόκλωνου DNA κι όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (για παράδειγμα, η επιμήκυνση του προηγούμενου κύκλου)
2. υβριδισμός των εκκινητών: οι εκκινητές υφίστανται στο διάλυμα σε διαρκή κίνηση *Brown*. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δίκλωνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες

βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μήτρας κι εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης

3. επιμήκυνση στους 72° C: η θερμοκρασία αυτή είναι η ιδεατή για τη δράση της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Οι εκκινητές όπου έχει γίνει η πρώτη προσθήκη βάσεων, έχουν ήδη αναπτύξει ισχυρή ιονική έλξη με τη μήτρα, πολύ ισχυρότερη σε σχέση με τις δυνάμεις αποδιάταξης. Εκκινητές που βρίσκονται σε θέσεις μη ειδικού υβριδισμού απελευθερώνονται από τη μήτρα σε αυτήν τη θερμοκρασία και δε δίνουν προϊόν επιμήκυνσης. Οι βάσεις τοποθετούνται στο 3' του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει dNTP στη διεύθυνση 5'-3', διαβάζοντας τη μήτρα από το 3' προς το 5' άκρο).

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται στοιχεία για τις αντιδράσεις που έλαβαν χώρα για κάθε μια από τις δύο γονιδιακές κατασκευές. Οι υπογραμμισμένες βάσεις στους εκκινητές υποδεικνύουν τις θέσεις περιορισμού.

Πίνακας 2.1: Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

	HrpADC8	HrpADC18
Πάνω εκκινητής (18 μ M)	5'-GGGTATCAC <u>CATATG</u> AACATCATGAG-3'	5'-GGGTATCAC <u>CATATG</u> AACATCATGAG-3'
Κάτω εκκινητής (18 μ M)	5'-GACCGAGTT <u>CTCGAG</u> CCTTG-3'	5'-GGTTGGACT <u>CTCGAG</u> TTCTTTCTTGT-3'
dNTP	5 mM	5 mM
Mg ²⁺	4 mM	4 mM
Πολυμεράση	Pfu 0,03 μ g μ l ⁻¹	Pfu 0,03 μ g μ l ⁻¹
Μήτρα DNA	HrpA/pET16b	HrpA/pET16b
Ρυθμιστικό διάλυμα	1X Pfu buffer	1X Pfu buffer
Θερμοκρασία ανοπτήσεως	55° C	55° C
Προϊόν	324 bp	294 bp

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου διά την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του. Στη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Στην ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτική αγαρόζης σε συγκεντρώσεις από 0,1 % ως 1,2 % ανάλογα με το μήκος του τμήματος ή των τμημάτων που θέλουμε να δούμε κάθε φορά. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε σε διάλυμα TBE (10 x TBE: 108 g Tris base, 55 g βορικό οξύ, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8, απιοντισμένο νερό μέχρι 1 l), ενώ η πηκτική είχε στερεοποιηθεί παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για να είναι ορατή η εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης.

2.2.4 Πέψεις DNA

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων και των ενθέτων (προϊόντα PCR) για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation) όπως επίσης και για την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μετά από το μετασχηματισμό, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα των εταιρειών *New England Biolabs* και *MINOTECH biotechnology*, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία $0,1 \mu\text{gml}^{-1}$ BSA όπου προτείνεται. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 2 h . Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά υπάκουαν στον κανόνα/ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως $1 \mu\text{g}$ DNA σε 1 h , στους 37°C . Για την κάθε μια από τις κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα δυο ένζυμα που αναγράφονται στον Πίνακα 2.2. Με τα ίδια ένζυμα υπέστησαν πέψεις οι πλασμιδιακοί φορείς. Μερικές πέψεις έλαβαν χώρα και στις δυο κατασκευές με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, διότι στο γονίδιο *hrpA* υπάρχει εσωτερική περιοριστική θέση του συγκεκριμένου ενζύμου (156 bp). Το ένζυμο μετά το πέρας της αντίδρασης απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 65°C για 20 min . Θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί άλλο ένζυμο στη θέση του XhoI, αλλά σε αυτή την περίπτωση θα υπήρχαν πέντε επιπλέον κατάλοιπα σε αντίθεση με τα δυο λόγω του XhoI.

Πίνακας 2.2: Περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν.

PCR Προϊόν	Περιοριστικό ένζυμο I	Περιοριστικό ένζυμο II
HrpADC8	NdeI	XhoI
HrpADC18	NdeI	XhoI

2.2.5 Αντίδραση λιγάσης

Η T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' ομάδας -OH μεταξύ δύο δίκλωνων άκρων DNA, είτε αυτά είναι τυφλά είτε προεξέχοντα. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, $25 \mu\text{gml}^{-1}$ BSA). Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση μπορεί να κυμανθεί από $0,1$ έως και $1 \mu\text{g}$. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι όσον το δυνατόν χαμηλός ($10 \mu\text{l}$) κι αρχικά αναμιγνύεται το νερό με το φορέα κι ένθεμα. Επωάζεται στους 65°C το πολύ 3 min ώστε να ανοίξουν δεσμοί υδρογόνου κι άλλες χαλαρές συνδέσεις. Αμέσως μετά βυθίζεται σε πάγο και προστίθενται τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση της *MINOTECH biotechnology*, στους 16°C για $14 \square 16 \text{ h}$.

2.2.6 Απομόνωση DNA

Με το πρωτόκολλο QIAquick PCR Purification Kit [*QIAGEN*] απομονώνονται τμήματα DNA από αντίδραση PCR ή άλλες ενζυματικές αντιδράσεις. Τμήματα που είναι μεταξύ 100 bp και 10 kb μπορούν να διαχωριστούν από εκκινητές, νουκλεοτίδια, ένζυμα κι αλάτια, χρησιμοποιώντας τις κολόνες φυγοκέντρισης QIAquick.

2.2.7 Απομόνωση ζώνης DNA

Με το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction [*QIAGEN*] απομονώνονται τμήματα DNA από 70 ως 10000 bp , από κοινή αγαρόζη ή από αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως. Είναι συμβατό επίσης είτε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE είτε με TBE.

2.2.8 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων

Ως επιδεκτικά κύτταρα θεωρούνται αυτά που έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε η κυτταρική μεμβράνη να είναι περισσότερο διαπερατή από ότι των φυσιολογικών κυττάρων.

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1 ml LB και 20 mM MgSO₄ κι ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37° C. Στη συνέχεια, εμβολιάζουμε με την ολονύκτια καλλιέργεια σε αναλογία 1:100, 100 ml θρεπτικού μέσου LB: (1 % tryptone, 0,5 % yeast extract, 1 % NaCl) και 20 mM MgSO₄ σε φλάσκα ενός λίτρου. Η καλλιέργεια επωάζεται για 2,5-3 h στους 37° C, 250 rpm μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου στο 0,6. Κατόπιν διαμοιράζεται σε δύο αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες των 50 ml κι επωάζεται στον πάγο για 10 min. Ακολουθεί φυγοκέντριση στα 1751 g για 10 min, στους 4° C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 15 με 20 ml παγωμένο διάλυμα TFB I (30 mM CH₃COOK, 50 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15 % γλυκερίνη) για κάθε σωλήνα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 min και φυγοκέντριση στις 4000 rpm για 10 min στους 4° C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 4 ml ανά σωλήνα παγωμένου διαλύματος TFB II (10 mM MOPS pH 7, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % γλυκερίνη). Τέλος, το κυτταρικό διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 100 μl ανά σωλήνα *Eppendorf*, μεταφέρεται αμέσως σε υγρό άζωτο και κατόπιν αποθηκεύεται στους -80° C.

2.2.9 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Μια ποσότητα 100 μl επιδεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80° C όπου φυλάσσονται κι αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται ποσότητα πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα (είτε 10 μl της αντίδρασης λιγάσης σε κύτταρα *E. coli* DH10b τα οποία είναι κατάλληλα για να διατηρούν το πλασμίδιο, είτε όπως θα αναφερθεί παρακάτω 1 μl θετικού κλώνου πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που είναι κατάλληλα για υπερέκφραση) κι επωάζονται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42° C για 90 s. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 5 min, ακολουθεί προσθήκη 900 μl LB κι επώαση στους 37° C για 3 h. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με 40 μgml⁻¹ καναμυκίνη και τα τριβλία επωάζονται στους 37° C για 14-16 h.

2.2.10 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες από τα τριβλία μετασχηματισμού της αντίδρασης λιγάσης και προστίθενται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εφοδιασμένο με 40 μgml⁻¹ καναμυκίνη. Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37° C υπό γρήγορη ανάδευση (250 rpm) για 14-16 h. Από τις μικρές αυτές καλλιέργειες απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο Boiling minipreps for plasmid DNA [53]. Μόλις απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA υφίσταται πέψη και με επιλεγμένα ένζυμα κι ύστερα από ηλεκτροφόρηση επιλέγονται οι θετικοί κλώνοι που φέρουν το ένθεμα. Οι θετικοί κλώνοι στέλνονται στο εργαστήριο *Μικροχημείας (IMBB-FORTH)* για αλληλούχιση DNA ώστε να διαπιστωθεί εάν έχουν γίνει σημειακά λάθη.

2.2.11 Μακρά αποθήκευση κυττάρων

Μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* DH10b από μικρές καλλιέργειες των θετικών κλώνων αναμιγνύονται με γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 40 % και φυλάσσονται στους -80° C για μακράς διάρκειας αποθήκευση. Τα απομονωμένα πλασμίδια από τους θετικούς κλώνους χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) τα οποία με τον ίδιο τρόπο

φυλάσσονται στους -80°C και χρησιμοποιούνται για το μπόλιασμα καλλιιεργειών για υπερέκφραση και παραγωγή ανασυνδυασμένου προϊόντος.

2.3 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η έκφραση στο φορέα pET-26b(+) [Novagen] ελέγχεται από το σύστημα του T7 εκκινήτη του βακτηριοφάγου. Η αλληλουχία του δεν αναγνωρίζεται από RNA πολυμεράσες του *E. coli* και για το λόγο αυτό, οι φορείς πρέπει να χρησιμοποιούνται συνδυαζόμενοι με κυτταρικές σειρές που φέρουν στο χρωμοσωμικό τους DNA γονίδιο που να κωδικοποιεί για την T7 RNA πολυμεράση (λDE3 lysogen). Τέτοιες σειρές είναι οι χαρακτηριζόμενες DE3. Η έκφραση της T7 πολυμεράσης από το κύτταρο ξεκινά με την προσθήκη IPTG, καθώς το γονίδιο υπόκειται σε έλεγχο από το lac εκκινήτη και το lac ρυθμιστή ο οποίος αναστέλλεται από το LacI αναστολέα. Ο ίδιος ρυθμιστής βρίσκεται και downstream του T7 εκκινήτη στον πλασμιδιακό φορέα. Επομένως υπάρχει διπλός έλεγχος για να μην ξεκινήσει η υπερέκφραση της ανασυνδεδεμένης πρωτεΐνης πριν την επαγωγή με IPTG με συνέπειες στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

2.3.1 Έκφραση πρωτεΐνης σε μικρή κλίμακα

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν το φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, χρησιμοποιούνται $0,5\text{ ml}$ κι εμβολιάζονται με 5 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, εφοδιασμένου με $40\text{ }\mu\text{gml}^{-1}$ καναμυκίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η OD_{600} της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ $0,5$ και $0,7$. Στο σημείο αυτό λαμβάνεται ένα δείγμα 1 ml από την καλλιέργεια, κι η κυτταρική πελέτα (με επαγωγίμο δείγμα) φυλάσσεται στον πάγο μέχρι το τέλος της επαγωγής. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης στους 22°C για 4 h , με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση $0,3\text{ mM}$. Μετά το πέρας της επαγωγής, λαμβάνεται ένα ακόμα δείγμα καλλιέργειας 1 ml (επαγωγίμο δείγμα). Τα δύο δείγματα επαναδιαλύονται σε 20 και $40\text{ }\mu\text{l}$ αντίστοιχα $2 \times \text{SB}$ διάλυμα, βράζονται για 15 min με ενδιάμεσες παύσεις για vortex και τέλος ηλεκτροφορούνται κατά SDS-PAGE (βλέπε παρακάτω).

2.3.2 Έκφρασης πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν το φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, εμβολιάζεται σε αναλογία $1:100$ υγρό θρεπτικό μέσο LB, εφοδιασμένο με $40\text{ }\mu\text{gml}^{-1}$ καναμυκίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η OD_{600} της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ $0,5$ και $0,7$. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση $0,3\text{ mM}$. Η καλλιέργεια κατόπιν επωάζεται στους 22°C για 4 h . Μετά το πέρας της επαγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 2737 g για 30 min στους 4°C και το ίζημα φυλάσσεται στους -80°C .

2.3.3 SDS-PAGE

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου διά την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του.

Στη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συμπολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά έστω κι αναμειγμένα αλλά πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί τη δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED πετυχαίνει τη διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού [54].

Κατά τη μη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτή συσσώρευσης). Το ρυθμιστικό διάλυμα του συστήματος περιέχει γλυκίνη κι είναι ρυθμισμένο σε pH 8,3. Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της πηκτής συσσώρευσης σε pH 6,8. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται μπροστά τους. Ακολούθως εισερχόμενες στη δεύτερη πηκτή (πηκτή διαχωρισμού) με pH 8,8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάση του φορτίου τους και του μεγέθους τους. Στην ηλεκτροφόρηση κατά *Laemmli* έχουμε πολυμερισμό της πηκτής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτή συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων [55].

Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης (750 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 % SDS, 52 % γλυκερίνη, bromphenolblue, 4 M 2-μερκαπτεθανόλη). Ακολουθεί πεντάλεπτος βρασμός των πρωτεϊνών και γρήγορη περιστροφή στη φυγόκεντρο πριν τη φόρτωση τους στην πηκτή.

Για την κατασκευή της πηκτής στήνεται πρώτα η συσκευή του πολυμερισμού [55]. Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού (10 % μείγματος ακρυλαμίδης (29 % ακρυλαμίδη, 1 % N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδη), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,2 % SDS, 0,2 % APS, TEMED) κι αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτή συσσώρευσης αποτελείται από 5 % μείγμα ακρυλαμίδης, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS και TEMED. Το ρυθμιστικό διάλυμα *Laemmli* αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη pH 8,3, 0,1 % SDS. Οι συνθήκες τιτλοδότησης του δείγματος στην πηκτή συσσώρευσης είναι στα 160 V και στην πηκτή διαχωρισμού στα 200 V.

2.3.4 Χρώση πηκτής

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Κατά αυτήν η πηκτή τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ, 2,5 % w/v Coomassie™ blue) όπου κι αφήνεται για 10 min σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (5 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ) για 1 h σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης κι αρωματικών αμινοξέων) κι έτσι εμφανίζονται οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

2.3.5 Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης

Εναλλακτικά το μοτίβο των πρωτεϊνών μπορεί να μεταφερθεί από την πηκτή (χωρίς να έχει υποστεί χρώση) σε στερεό υπόστρωμα (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) με σκοπό την ανισοανίχνευση ή την ανίχνευση με Ni-NTA AP conjugate. Αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Μέσα σε αυτό το διάλυμα θα κατασκευαστεί το σάντουιτς με προσοχή ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Για τη συγκεκριμένη κατασκευή χρησιμοποιούνται 2 σπογγάκια, 6 φύλλα διηθητικού χαρτιού *Whatman*, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης [*Protran*] και η πηκτή. Η συσκευή μεταφοράς τοποθετείται μέσα σε πάγο και εφαρμόζεται ρεύμα 300mA για μια ώρα.

2.4 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς οι υγρές χρωματογραφίες στήλης συγγένειας και μοριακής διήθησης.

2.4.1 Χρωματογραφία συγγένειας Ni-NTA αгарόζης

Βασίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση του ζητούμενου βιομορίου σε κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (μήτρα) που φέρει ειδικό σύμπλοκο (ligand). Έπειτα από τη φόρτωση του βιολογικού δείγματος το υλικό εκπλένεται για την απομάκρυνση των μη προσροφημένων βιομορίων κι εν συνεχεία γίνεται έκλουση της πρωτεΐνης-στόχου με περίσσεια διαλυτού δεσμευτή ή άλλης κατάλληλης ουσίας. Λόγω της παραγωγής των υπό μελέτη πρωτεϊνών με ακροφύσιο ιστιδινών χρησιμοποιήθηκε μήτρα φέρουσα κατάλληλη χημική ομάδα, NTA, η οποία έχει την ικανότητα να προσαρτά μέταλλα (Ni). Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης στη σφαίρα συναρμογής του Ni²⁺. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ιστιδίνη στην πρόσδεση Ni²⁺ και με τον τρόπο αυτό μπορεί να εξασφαλιστεί η μη ειδική πρόσδεση με προσθήκη μικρής ποσότητας ιμιδαζολίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα όπου φορτώνεται στην κολόνα Ni-NTA και με εκπλύσεις με διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου απομακρύνονται οι τυχόν μη ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες.

2.4.1.1 Απομόνωση πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας

Η κυτταρική πάστα που έχει προκύψει από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (4 l LB) επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα λύσης (buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 5 % γλυκερίνη). Στο διάλυμα προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (τελικοί όγκοι: benzamidine 150 mgml⁻¹, PMSF 1 mM, leupeptin 20 μgml⁻¹). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπέρηχους για συνολικό χρόνο 10 min. Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται (18513 g, Jouan MR-23, rotorAM100.13, 1 h, 6° C) για το διαχωρισμό των μη διαλυτών και διαλυτών σωματίων. Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη που περιέχει Ni-NTA αгарόζη το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 10 όγκους κολόνας buffer A. Ο όγκος κολόνας (cv) είναι 10 ml. Η ταχύτητα ροής μέσω της στήλης ελέγχεται από περισταλτική αντλία κι είναι 1 ml min⁻¹. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις της κολόνας με wash buffers που περιέχουν 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl κι αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, με μέγιστη τα 30 mM. Οι εκπλύσεις της His-tagged πρωτεΐνης πραγματοποιούνται σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου κατά περίπτωση, κι είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγγένεια που παρουσιάζει η κάθε His-πρωτεΐνη εγγενώς για το Ni²⁺ (Πίνακας 2.3). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στους 4° C. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται τη διαδικασία της διαπίδυσης έναντι 2 l διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl ή 20 mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100 mM NaCl για την ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου κι αλλαγής pH αντίστοιχα. Κατά τη διαδικασία αυτή το πρωτεϊνικό διάλυμα διαχωρίζεται από το εξωτερικό διάλυμα με μια ημιπερατή μεμβράνη που επιτρέπει ελεύθερη

διέλευση του μακρομορίου, ώστε στο τέλος οι συγκεντρώσεις να εξισορροπούνται και να αραιώνεται η συγκέντρωση ιμιδαζολίου στον όγκο των 2 l. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα συγκεντρώνεται σε τελικό όγκο που εξαρτάται από τη μετέπειτα χρήση της πρωτεΐνης. Όπου η διαδικασία παρεκκλίνει από αυτό το σχήμα, αυτό αναφέρεται στο κεφάλαιο 3 όπου γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 2.3: Πρωτόκολλο καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας.

	Tris-HCl pH 8,0	NaCl	Imidazole	c.v.
Wash 1	20 mM	100 mM	10 mM	10
Wash 1	20 mM	100 mM	20 mM	10
Wash 1	20 mM	100 mM	30 mM	5
Elution 1	20 mM	100 mM	80 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	100 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	150 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	200 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	250 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	300 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	350 mM	1
Elution 1	20 mM	100 mM	400 mM	1

2.4.1.2 Απομόνωση πρωτεΐνης μικρής κλίμακας

Η απομόνωση ξεκινά από μικρές καλλιέργειες (100-200 ml) κι έχει σκοπό διερευνητικό κι όχι παρασκευαστικό. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή της μεγάλης κλίμακας απομόνωση με τη διαφορά ότι δεν τηρούνται συνήθως τα μέτρα για την προστασία της πρωτεΐνης καθότι δε θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά διαλύματα lysis (Πίνακας 2.4). Ο όγκος κολόνας (cv) είναι 0,5 ml. Στη συνέχεια γίνονται τρεις (με 5 ml, 2 ml, 1 ml, αντίστοιχα) πλύσεις της κολόνας κι εκλύσεις πρωτεΐνης σε κλάσματα του ενός όγκου κολόνας. Στον Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται τα διαλύματα αυτά. Το lysis buffer που προτιμάται είναι το Β. Έπειτα τα κλάσματα έκλυσης ενώνονται κι υφίστανται διαπίδυση για να μειωθεί στο ελάχιστο η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά διαλύματα διαπίδυσης και στο διάλυμα εκείνο όπου υπήρχε η λιγότερη κατακρήμνιση πρωτεΐνης ήταν 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl και 20 mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100 mM NaCl.

Πίνακας 2.4: Lysis buffers (1,5 ml όγκος).

A	B	Γ	Δ	E
20 mM Tris pH8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0
100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
5 mM imidazole	5 mM imidazole	5 mM imidazole	5 mM imidazole	5 mM imidazole
5 % glycerol	5 % glycerol	-	-	-
0.1 % Triton	-	-	-	-

Πίνακας 2.5: Διαλύματα για τη χρωματογραφία συγγένειας.

Lysis buf	Wash 1	Wash 2	Wash 3	Elution 1	Elution 2	Elution 3
A, B, Γ	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0
A, B, Γ	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM

	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
A, B, Γ	10 mM imidazole	20 mM imidazole	50 mM imidazole	100 mM imidazole	200 mM imidazole	300 mM imidazole
Δ	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0
Δ	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl	200 mM NaCl
Δ	10 mM imidazole	20 mM imidazole	50 mM imidazole	100 mM imidazole	200 mM imidazole	300 mM imidazole
E	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0	20 mM Tris pH 8,0
E	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
E	10 mM imidazole	20 mM imidazole	50 mM imidazole	100 mM imidazole	200 mM imidazole	300 mM imidazole

2.4.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Σύμφωνα με αυτήν ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών εξαρτάται από την υδροδυναμική τους ακτίνα, η οποία είναι ανάλογη του μοριακού βάρους για σφαιρικές πρωτεΐνες. Τα συστατικά του προς διαχωρισμού μίγματος δεν αλληλεπιδρούν με το χρωματογραφικό υλικό, το οποίο αποτελείται από σφαιρίδια που φέρουν πόρους. Η κατανομή των πρωτεϊνών γίνεται μεταξύ δύο υγρών φάσεων. Τα μικρού μεγέθους μόρια κινούνται και στο χώρο εντός των πόρων των σφαιριδίων, ενώ τα μεγάλα μεγέθους μόρια αποκλείονται από αυτόν κινούμενα στο χώρο εκτός των σφαιριδίων. Ως νεκρός όγκος χαρακτηρίζεται ο όγκος εκτός των σφαιριδίων. Με αυτόν τον τρόπο η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά, οι μεγάλα μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκλύονται πρώτες από τη στήλη κι ακολούθως εκείνες με διαδοχικά μικρότερα μοριακά βάρη.

Τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πρωτεϊνών εξετάστηκαν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Για το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό υλικό Sephadex™ G-75 S-100 (*GE Healthcare Life Sciences*, η βέλτιστη ανάλυση για μία στήλη όγκου 100 cm^3 παρουσιάζεται σε όγκο έκλυσης ml [56]). Στη δεδομένη περίπτωση η στήλη είναι γύρω στα 160 cm^3 κι εκτιμάται ότι έχει βέλτιστη ανάλυση γύρω στα 96 ml όγκου έκλυσης. Από τη βαθμονόμηση της στήλης η βέλτιστη ανάλυση είναι για βιομόρια μεγέθους πλησίον των 43 kDa . Η συγκεκριμένη στήλη είχε βαθμονομηθεί με το GelFiltration LMW CalibrationKit [*GE Healthcare Life Sciences*]. Το υλικό πακεταρίστηκε σε στήλη XK 16/100 column [*GE Healthcare Life Sciences*] με τη βοήθεια του συστήματος ΆΚΤΑ™ purifier [*GE Healthcare Life Sciences*] σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας. Κάνοντας χρήση διάταξης προσαρμογής (adaptor) στο ένα άκρο της στήλης ο συνολικός όγκος στρώματος ήταν 160 cm^3 . Η στήλη ελέγχθηκε με δείγμα ακετόνης κι ο νεκρός της όγκος προσδιορίστηκε με δείγμα Blue Dextran 2000. Ακολούθως η στήλη βαθμονομήθηκε με τη βοήθεια των πρωτεϊνών αναφοράς: Ριβονουκλεάσης Α ($13,7\text{ kDa}$, $R_h = 16,4\text{ \AA}$), Χυμοθρυψινογόνου Α (25 kDa , $R_h = 20,9\text{ \AA}$), Οβαλβουμίνης (43 kDa , $R_h = 30,5\text{ \AA}$) και BSA, (67 kDa , $R_h = 35,5\text{ \AA}$). Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλυσης και του φαινομενικού μοριακού βάρους προσδιορίστηκε έμμεσα μέσω του συντελεστή

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

όπου V_e είναι ο όγκος έκλυσης, V_o ο νεκρός όγκος και V_t ο συνολικός όγκος της στήλης. Ο συντελεστής K_{av} καθορίζει το ποσοστό των πόρων του χρωματογραφικού υλικού που μπορούν να καταληφθούν από το συγκεκριμένου μεγέθους σωματίδιο.

Η ανάλυση μέσω μοριακής διήθησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 20°C . Η ροή ήταν $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ κι η απορρόφηση του εκλούσματος καταγραφόταν για δύο μήκη κύματος στα 280 και 254 nm με τη χρήση του λογισμικού UNICORN™ 3.0 [Amersham Biosciences]. Τα δείγματα φορτωνόντουσαν στην προεξισοροπημένη (με το ίδιο διάλυμα διαπίδυσης) στήλη με λούπτα των 2 ml .

2.4.3 Ανίχνευση His-Tagged πρωτεϊνών με Ni-NTA AP conjugate

Με αυτή την τεχνική ανιχνεύεται η ετικέτα με τις έξι ιστιδίνες και έμμεσα η πρωτεΐνη που την φέρει. Η ανίχνευση γίνεται με Ni-NTA συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση [Qiagen] η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με χρώση με 5% NBT (nitro blue tetrazolium), 5% BCIP (5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate) [Sigma]. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι αυτή που περιγράφεται στο εγχειρίδιο QiaExpress Detection & Assay Handbook, Qiagen 2002.

2.4.4 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford [57], προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε διάλυμα, βάσει της απορρόφησής της σε σύγκριση με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης πρωτεΐνης γνωστών συγκεντρώσεων. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην απευθείας πρόσδεση της χρωστικής Coomassie brilliant blue G-250 με την πρωτεΐνη στα αμινοξέα αργινίνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, ιστιδίνη και φαινυλαλανίνη. Αρχικά κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με BSA μετρώντας την απορρόφηση γνωστών της συγκεντρώσεων. Ακολούθως μετριέται η απορρόφηση του δείγματος, η τιμή της τοποθετείται πάνω στην πρότυπη καμπύλη της BSA κι ακολούθως προσδιορίζεται η συγκέντρωσή της. Το διάλυμα Bradford αποτελείται από 95 % αιθανόλη, 80 % φωσφορικό οξύ, 0,06 % διαλύματος Bradford-95 % αιθανόλη, 88 % φωσφορικό οξύ και $3,5 \text{ mg ml}^{-1}$ SERVA BlueG κι υπόκειται σε φιλτράρισμα. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε κατάλληλες κυψελίδες φωτομέτρησης ορατού φάσματος, και τέλος, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησής τους στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο.

Βασικό μειονέκτημα είναι ότι παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από την αμινοξική αλληλουχία με αποτέλεσμα για την πρωτεΐνη HrpA, η οποία δεν έχει αρωματικά κατάλοιπα, να χρησιμοποιηθεί και συμπληρωματική μέθοδος που είναι η σάρωση πηκτικής SDS-πολυακριαμίδης κι επεξεργασία με το πρόγραμμα ImageJ [58].

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και τρίτη μέθοδος για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κι αυτή είναι η Lowry μέθοδος [59], η οποία βασίζεται σε δυο διαφορετικές αντιδράσεις: η πρώτη αντίδραση είναι η μετατροπή του Cu^{2+} σε Cu^{1+} (Biuret αντίδραση), ενώ η δεύτερη είναι η αναγωγή του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu μέσω του αναγόμενου χαλκού αλλά και μέσω των αμινοξέων τυροσίνη και τρυπτοφάνη. Το αναγόμενο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu γίνεται μπλε χρώμα οπότε ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα $500-700 \text{ nm}$.

2.5 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΣ

Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένα κύματα, σε ένα δεξιόστροφο και σε ένα αριστερόστροφο ίδιας φάσης, μήκους κύματος και πλάτους ταλάντωσης. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να αναλυθεί σε δύο επίπεδα πολωμένα κύματα ίδιου μήκους κύματος και πλάτους ταλάντωσης με διαφορά φάσεως όμως $\pm 90^{\circ}$ τα οποία ταλαντώνονται σε κάθετα επίπεδα. Όταν η διαφορά φάσεως των δύο κυμάτων είναι $+90^{\circ}$ τότε το κυκλικά πολωμένο φως

κινείται δεξιόστροφα ενώ όταν η διαφορά τους είναι -90° κινείται αριστερόστροφα. Κατά τη διέλευση επίπεδα πολωμένου φωτός από μέσο που έχει την ιδιότητα να απορροφά διαφορετικά το αριστερά κυκλικά πολωμένο φως από το δεξιά κυκλικά πολωμένο φως, παράγεται ένα κύμα που αντί να ταλαντώνεται σε ένα επίπεδο, περιστρέφεται ελλειψοειδώς κι ονομάζεται ελλειπτικά πολωμένο φως [60]. Το φαινόμενο αυτό δημιουργείται από την ασύμμετρη μοριακή δομή της ύλης και σχετίζεται μέσω του μετασχηματισμού *Kramers-Kronig* (ο μετασχηματισμός *Kramers-Kronig* συσχετίζει το πραγματικό μέρος μίας αναλυτικής μιγαδικής συνάρτησης με το ολοκλήρωμα που εμπεριέχει το φανταστικό μέρος της συνάρτησης και το αντίστροφο). Στην περίπτωση διαλύματος μίας οπτικά ενεργής ουσίας ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις. Ο κυκλικός διχρωϊσμός ορίζεται ως:

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)$$

όπου $\epsilon_L(\lambda)$ κι $\epsilon_R(\lambda)$ είναι οι συντελεστές απόσβεσης για τα αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένα συστατικά του κύματος, όπου λ το μήκος κύματος. Το $\Delta\epsilon(\lambda)$ εκφράζεται σε μονάδες [$1 (M \text{ cm})^{-1}$], όπου M η γραμμομοριακή συγκέντρωση. Ο κυκλικός διχρωϊσμός μετατρέπεται σε γραμμομοριακή ελλειπτικότητα $[\theta]$ μέσω της σχέσης:

$$[\theta] = 3298,2 \Delta\epsilon$$

Η γραμμομοριακή ελλειπτικότητα είναι επίσης μία μέτρηση του φαινομένου του κυκλικού διχρωϊσμού κι εκφράζεται ως:

$$[\theta] = (100\theta)/(CL)$$

όπου C και L είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση και το μήκος διαδρομής [cm] του κύματος εντός του μέσου. Εκφράζεται σε μονάδες [$deg \text{ cm}^2 dmol^{-1}$] ή σε μονάδες [$l mol^{-1} cm^{-1}$]. Οι πρωτεΐνες είναι ασύμμετρα μόρια καθώς αποτελούνται από L-αμινοξέα ενώ οι δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν είναι επίσης ασύμμετρες και κατά συνέπεια οπτικά ενεργές. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού στις πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε τρία εύρη μηκών κύματος:

1. περιοχή του άπω υπεριώδους (κάτω των 250 nm) όπου κυριαρχεί η συνεισφορά των πεπτιδικών δεσμών
2. περιοχή του εγγύς υπεριώδους ($250-300 \text{ nm}$) όπου συμβάλλουν κυρίως οι πλευρικές αρωματικές ομάδες και
3. ορατή περιοχή ($300-700 \text{ nm}$) όπου συνεισφέρουν τα χρωματοφόρα που δυνητικά φέρουν μερικές πρωτεΐνες

Στην περιοχή του πεπτιδικού δεσμού το σήμα του κυκλικού διχρωϊσμού είναι σε θέση να δώσει πληροφορία για το είδος της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Οι α -έλικες και τα β -φύλλα χαρακτηρίζονται από ένα χαρακτηριστικό ζεύγος τιμών των διεδρων γωνιών τους που επαναλαμβάνεται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μία άλλη σημαντική δευτεροταγής δομή είναι η β -στροφή που σχηματίζεται από τρία αμινοξέα και σταθεροποιείται από ένα δεσμό υδρογόνου μεταξύ της πρώτης και τρίτης αμινομάδας. Συγκεκριμένες διέδρες γωνίες διαθέτει επίσης κι η έλικα πολυπρολίνης τύπου II, η οποία συναντάται σε μικρό βαθμό στις πρωτεΐνες. Οι δομές αυτές με τις επαναλαμβανόμενες ϕ και ψ γωνίες δίνουν χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού. Στην περίπτωση των α -ελίκων εμφανίζονται αρνητικές κορυφές στα 222 και 208 nm ενώ εμφανίζεται μία θετική κορυφή στα 192 nm . Στην περίπτωση των β -φύλλων εμφανίζονται δύο τυπικά φάσματα. Στο πιο συχνά απαντούμενο, παρατηρείται μία αρνητική κορυφή στα 215 nm και

μία θετική στα 198 nm. Στην περίπτωση των ελίκων πολυπρολίνης τύπου II εμφανίζεται μία αρνητική κορυφή στα 206 nm και μία θετική στα 226 nm. Αυτό το φάσμα χαρακτηρίζει συνήθως αρκετές περιπτώσεις πρωτεϊνών που θεωρούνται εγγενώς αδίπλωτες.

2.5.1 Επεξεργασία δεδομένων κυκλικού διχρωϊσμού

Όλες οι μέθοδοι ανάλυσης των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες στηρίζονται στην υπόθεση ότι το φάσμα μίας πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί από ένα γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων των δευτεροταγών δομών που την αποτελούν, συμπεριλαμβάνοντας έναν όρο σφάλματος που αντιστοιχεί στη συνεισφορά από τα αρωματικά χρωμοφόρα και τους δισουλφιδικούς δεσμούς στην περιοχή του άπω υπεριώδους:

$$C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda}$$

όπου C_λ το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού της πρωτεΐνης, B_k τα φάσματα των στοιχειωδών δευτεροταγών δομών και f_k το κλάσμα κάθε δευτεροταγούς δομής k .

Για ένα σύνολο N πρωτεϊνών αναφοράς γνωστής δομής και φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού διαθέτουμε N γραμμικές εξισώσεις με κοινά στοιχεία τα φάσματα των στοιχειωδών δευτεροταγών δομών, B_k . Ελαχιστοποιώντας τη διαφορά με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε τα B_k χρησιμοποιώντας ως περιορισμό ότι το άθροισμα των συνεισφορών των φασμάτων δευτεροταγούς δομής ισούται με 1. Παρόλα αυτά λόγω του μεγαλύτερου αριθμού των αγνώστων η λύση γίνεται εξαιρετικά ασταθής και κατά συνέπεια αναξιόπιστη. Αντί της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιείται η μέθοδος ψευδο-ορθογωνίας παλινδρόμησης μέσω του προγράμματος *CONTIN-CD* [61]. Η μέθοδος προσεγγίζει το πειραματικό φάσμα (C_λ) ως γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων αναφοράς ελαχιστοποιώντας τη συνάρτηση:

$$\sum_\lambda (C_\lambda^{\text{calc}} - C_\lambda^{\text{exp}})^2 + \alpha^2 \sum_{j=1}^N (v_j - N^{-1})^2$$

όπου α είναι η τιμή εξομάλυνσης και v_j είναι ο συντελεστής του φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού για τη j -οστή πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται για την κατασκευή του φάσματος C_λ . Οι δευτεροταγείς δομές που ανταποκρίνονται στο πειραματικό φάσμα υπολογίζονται με τη χρήση των συντελεστών v_j :

$$f_k^{\text{calc}} = \sum v_j f_k^j$$

Ως περιορισμοί χρησιμοποιούνται οι κανόνες $f_k \geq 0$ και $\sum f_k = 1$. Η μέθοδος δίνει ένα εύρος λύσεων εξαρτώμενο από την τιμή α , μικρές τιμές της α δίνουν λύσεις πλησιέστερες στη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων ενώ μεγαλύτερες τιμές τείνουν να δίνουν λύσεις μεροληπτώντας υπέρ συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα επιλέγει λύσεις βασισμένες σε συγκεκριμένα κριτήρια. Στο πρόγραμμα *CONTIN/LL* οι πρωτεΐνες του συνόλου αναφοράς διευθετούνται σε σειρά αυξανόμενης τιμής απόστασης από το πειραματικό/υπό μελέτη φάσμα κι οι πιο απομακρυσμένες τιμές απορρίπτονται ώστε να δημιουργηθεί ένα μικρότερο σύνολο αναφοράς. Σαν αποτέλεσμα καταλήγουμε με ένα σύνολο λύσεων για κάθε συνδυασμό. Η τελική λύση είναι η μέση λύση όλων των λύσεων που ικανοποιούν τους εξής κανόνες επιλογής:

1. το άθροισμα των κλασμάτων να είναι μεταξύ 0,95 και 1,05
2. κάθε κλάσμα να είναι μεγαλύτερο του -0,025
3. η τιμή RMSD μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος να είναι μικρότερη της 0,25 Δε

4. το κλάσμα σε α-έλικα εκτιμάται από το πλήρες σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς και καθορίζεται η μέγιστη κι η ελάχιστη τιμή αποδοχής ως το τέταρτο κριτήριο για τη σωστή λύση

Η απόδοση της ανάλυσης χαρακτηρίζεται από την τιμή της μέσης τετραγωνικής ρίζας της απόκλισης (RMSD) μεταξύ του πειραματικού κι ανασυσταμένου φάσματος. Η RMSD υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$RMSD = ((\sum_i^N (\theta_i^{exp} - \theta_i^{calc})^2) / N)^{1/2}$$

όπου θ_i^{exp} και θ_i^{calc} είναι τα πειραματικά κι ανασυσταμένα φάσματα αντίστοιχα. Το πρόγραμμα *SELCON3* περιλαμβάνει την τελευταία έκδοση της μεθόδου αυτο-συνέπειας (self-consistent) για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής [62]. Σε αυτή τη μέθοδο το υπό ανάλυση πειραματικό φάσμα περιλαμβάνεται σε έναν πίνακα φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού, *C*. Ο πίνακας *F* αποτελεί τον πίνακα αναφοράς γνωστών προτύπων δευτεροταγούς δομής και καθορίζεται με βάση αυτόν τον πίνακα ο πίνακας *X* έτσι ώστε:

$$F = XC$$

Ο πίνακας *X* φέρει την πληροφορία της σχέσης του πειραματικού φάσματος με αυτή της δευτεροταγούς δομής. Η αρχική υπόθεση για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής είναι συνήθως το φάσμα της πρωτεΐνης αναφοράς με τις περισσότερες ομοιότητες. Η λύση αντικαθιστά την αρχική εικασία κι η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κύκλους ώστε να φτάσει σε σύγκλιση. Η εξίσωση του πίνακα *C*, επιλύεται μέσω της μεθόδου ανάλυσης ιδιαιζουσών τιμών. Η ανάλυση ιδιαιζουσών τιμών (SVD, Singular Value Decomposition) είναι ένα ισχυρό υπολογιστικό εργαλείο για την μελέτη πινάκων με ποικίλες εφαρμογές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια γενική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των ανεξάρτητων συνιστωσών (διαφορετικών καταστάσεων της πρωτεΐνης) που εμφανίζονται λόγω χάρη στην διάρκεια μίας διαδικασίας μετάπτωσης. Η λύση μέσω αυτής της μεθόδου επιλέγεται ώστε να πληροί τα προαναφερθέντα 4 κριτήρια που ισχύουν και στην περίπτωση του προγράμματος *CONTIN/LL*. Στη μέθοδο που εμπεριέχεται στο πρόγραμμα *CDSSTR* [63] μόνο ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών αναφοράς απαιτείται για καλή ανάλυση των δεδομένων, οι οποίες επιλέγονται τυχαία. Ένας υψηλός αριθμός συνδυασμών πρωτεϊνών συντίθεται από ένα μεγάλο σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς δίνοντας ευκαμψία στη μέθοδο. Οι λύσεις εξασφαλίζονται επίσης μέσω μεθόδων αυτοσυνέπειας και χρήση αλγόριθμου ανάλυσης ιδιαιζουσών τιμών κι επιλέγονται για το αν πληρούν τα 4 προαναφερθέντα κριτήρια. Τα τρία παραπάνω προγράμματα και το σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς που απαιτούνται συνδυάζονται στο λογισμικό πακέτο *CDPro* [62], [64]. Στο πακέτο προγραμμάτων *CDPro* ανήκει και το πρόγραμμα καθορισμού της τριτοταγής δομικής κλάσης των πρωτεϊνών βασισμένο στα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, *CLUSTER* [65]. Το πρόγραμμα στηρίζεται στη μέθοδο των Venyaminov και Vassilenko [66]. Με τη χρήση 46 φυσικών πρωτεϊνών και 7 αποδιατεταγμένων στο εύρος μήκους κύματος 190-236 nm, κατασκευάζεται ένας χώρος 24 διαστάσεων που αντιπροσωπεύει τις τιμές της ελλειπτικότητας στα 24 μήκη κύματος. Πρωτεΐνες που ανήκουν σε διαφορετικές τριτοταγείς κλάσεις σχηματίζουν ξεχωριστές ομάδες σε αυτόν τον 24-D χώρο. Το *CLUSTER* καταχωρεί την υπό μελέτη πρωτεΐνη στην ανάλογη κλάση ($\alpha + \beta$, α / β , all α ή all β) στηριζόμενη στο πειραματικό της φάσμα κι επιλέγει το κατάλληλο σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς για την περαιτέρω ανάλυση του φάσματος από τα προγράμματα *CONTIN/LL*, *CDSSTR* και *SELCON3*.

2.6 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες διαθέτουν καλά καθορισμένη επιφάνεια με φορτισμένες και πολικές ομάδες, ώστε αν θεωρηθούν ως μεγάλα πολυσθενή μόρια, η διαλυτότητα τους να μπορεί να καθοριστεί σε σημαντικό βαθμό βάση της θεωρίας *Debye-Hückel* (η θεωρία αυτή έχει αναπτυχθεί για να

περιγράψει τις ιδιότητες των ιόντων) [67]. Η ιοντική ισχύς, το pH , η θερμοκρασία και οι οργανικοί διαλύτες είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών [68-70]. Οι παραπάνω παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης ώστε το διάλυμα να κορεστεί ή να υπερκορεστεί. Η πορεία της κρυστάλλωσης διακρίνεται χρονικά σε τρία στάδια: α) την πυρήνωση κατά την οποία σχηματίζονται οι πρώτες τακτικά διευθετημένες συναθροίσεις μοτίβων (πυρήνες κρυστάλλωσης), β) την αύξηση του κρυστάλλου και γ) την παύση της αύξησης. Η πυρήνωση συμβαίνει μόνο σε υπέρκορα ως προς την πρωτεΐνη διαλύματα. Ο υπερκορεσμός που είναι μια θερμοδυναμικά ασταθής κατάσταση, διακρίνεται σε μια μετασταθερή περιοχή όπου δεν μπορούν να σχηματιστούν πυρήνες αλλά μπορούν να μεγαλώσουν αν βρεθούν με κάποιο τρόπο σε αυτήν, σε μια περιοχή πυρήνωσης όπου οι πυρήνες μπορούν να σχηματιστούν και να μεγαλώσουν και στην περιοχή κατακρήμνισης όπου ο υπερκορεσμός είναι τόσο υψηλός που η περίσσεια πρωτεΐνης κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα [71-73]. Όλες οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών αποσκοπούν στο να φέρουν το διάλυμα του μακρομορίου σε υπερκορεσμό. Προβλήματα στην πορεία της κρυστάλλωσης προέρχονται συχνά από τις διαφορετικές απαιτήσεις της πυρήνωσης και της αύξησης.

2.6.1 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης που έχουν αναπτυχθεί είναι ποικίλες κι αποσκοπούν στο να φέρουν το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Αυτές είναι:

1. ολικής ανάμιξης (batch), όπου το βιομόριο διαλύεται σε συγκεκριμένο διάλυμα
2. εξάτμισης (evaporation), όπου το διάλυμα συμπυκνώνεται μέσω εξάτμισης
3. διαπίδωσης (dialysis), όπου το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και μέσω διαπίδωσης υποβάλλεται σε μεταβολή της συγκέντρωσης διαφόρων παραγόντων
4. διάχυσης ατμών (vapour diffusion) η οποία αναλύεται διεξοδικά στην επόμενη παράγραφο καθώς αποτέλεσε την κύρια μέθοδο με την οποία ερευνήθηκαν διαφορετικές συνθήκες για την κρυστάλλωση των βιομορίων της παρούσης εργασίας.

Διάχυση ατμών

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών περιλαμβάνει ένα κλειστό σύστημα δύο υδατικών διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των συστατικών τους. Τα διαλύματα αυτά εξισορροπούνται μέσω της τάσης των ατμών του νερού και των τυχόν πτητικών ουσιών που περιέχουν. Οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται συχνά είναι αυτές της κρεμαστής σταγόνας, της καθιστής σταγόνας και της εκατέρωθεν περιοριζόμενης σταγόνας (σταγόνα σάντουιτς).

Στην κρεμαστή σταγόνα το διάλυμα που περιέχει το βιομόριο συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος. Σε αυτό το διάλυμα περιέχονται κι οι απαιτούμενοι παράγοντες κρυστάλλωσης. Στο κάτω μέρος του συστήματος βρίσκεται το μεγαλύτερο, σε όγκο, διάλυμα της δεξαμενής, που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά όχι το προς κρυστάλλωση βιομόριο. Αποτέλεσμα της εξισορρόπησης της τάσης ατμών είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας έτσι ώστε η πρωτεΐνη να φτάσει βαθμιαία στον υπερκορεσμό. Αντίστοιχα γεγονότα συμβαίνουν και στα πειράματα καθιστής σταγόνας, εδώ όμως η σταγόνα στηρίζεται σ' ένα υπόβαθρο του κλειστού συστήματος.

2.6.2 Σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης

Για την αρχική σάρωση του πολυπαραμετρικού χώρου κρυστάλλωσης κάθε πρωτεΐνης στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μικτή προσέγγιση η οποία περιλάμβανε σαρώσεις τύπου σποραδικού πίνακα, συστηματικών συνθηκών και τύπου ίχνους καθώς έτοιμα διαλύματα των τριών αυτών προσεγγίσεων διατίθενται στο εμπόριο. Συγκεκριμένα τα CrystalScreen™, 2™ της Hampton Research και Wizard™ I & II της Emerald BioSystems χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν 96 συνθήκες της προσέγγισης τύπου σποραδικού πίνακα (sparse matrix). Στη συνέχεια τα συστηματικά screens του Θεϊκού Αμμωνίου/pH, PEG 6000™, MPD™, Index™, PEG/Ion™, Natrix™ screens της Hampton Research χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν 264 επιπλέον συνθήκες του πολυπαραγοντικού χώρου. Τέλος τα JBScreen Cryo 1, JBScreen Cryo 2, JBScreen Cryo 3, JBScreen Cryo 4, JBScreen Classic 3, JBScreen Classic 6, JBScreen Classic 7, JBScreen Classic 8, JBScreen Classic 9 και JBScreen Classic 10 της Jena Bioscience χρησιμοποιήθηκαν στην προσέγγιση ίχνους για να καλύψουν επιπλέον 240 συνθήκες (συνολικά 600 εμπορικές συνθήκες ελέχθησαν). Η συμβολή της θερμοκρασίας δοκιμάστηκε μόνο στους 18° C.

Τα πειράματα κρυστάλλωσης λαβαίνουν χώρα σε πλαστικά πιάτα Linbro™ τα οποία καλύπτονται με κατάλληλα σιλικοναρισμένες καλυπτρίδες με μήκος πλευρών 22 x 22 mm.

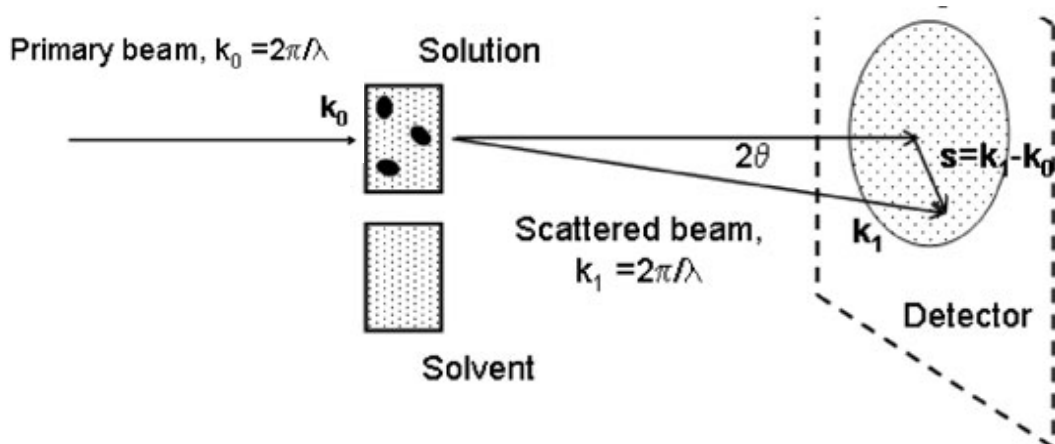
Τα αποτελέσματα των κρυσταλλώσεων λόγω του όγκου των πειραμάτων εξετάζονταν στις 7 ημέρες στο στερεοσκόπιο και σε όλο το εστιακό βάθος της σταγόνας. Στην περίπτωση παρουσίας σφαιρουλιτών που δίνουν διπλή διάθλαση αλλάζοντας τη διεύθυνση του πολωμένου φωτός (birefringence) στην υπό εξέταση σταγόνα, ακολουθούσε προσθήκη κατάλληλης χρωστικής (Izit CrystalDye™) για την εξακρίβωση της πρωτεϊνικής φύσης του κρυστάλλου.

2.7 ΣΚΕΔΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΣΕ ΜΙΚΡΕΣ ΓΩΝΙΕΣ

Η σκέδαση από ένα μονοδιάσπαρτο διάλυμα μακρομορίου δίνεται από τον τύπο

$$I_M(s) = N_M I(s) F(s)$$

όπου, N_M είναι ο αριθμός των μακρομορίων, $I(s)$ είναι η σκέδαση από ένα μακρομόριο/σωματίδιο στο διάλυμα στρογγυλοποιημένο στο μέσο όρο προς όλους τους προσανατολισμούς του, ή διαφορετικά ο παράγοντας σχήματος (ο οποίος εξαρτάται όχι μόνο από το σχήμα αλλά και από την εσωτερική δομή του μακρομορίου/σωματιδίου) και τέλος όπου $F(s)$ είναι ο παράγοντας δομής στο διάλυμα. Ο παράγοντας δομής συμπεριλαμβάνει τις ελκτικές ή απωστικές μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων και δύναται να διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα στις μικρές γωνίες. Σε ένα διάλυμα άπειρης αραίωσης όμως ο παράγοντας δομής τείνει στη μονάδα κι η ένταση της σκέδασης είναι ανάλογη του παράγοντα σχήματος.



Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα [74].

Τα πειράματα σκέδασης σε διαλύματα μακρομορίων περιλαμβάνουν ξεχωριστές μετρήσεις της σκέδασης από το διάλυμα και από τον διαλύτη. Θεωρώντας ότι ο διαλύτης είναι ένα ομοιογενές υπόστρωμα με σταθερή πυκνότητα ρ_s , η διαφορά ($\Delta\rho(r)$) στο πλάτος σκέδασης από ένα σωματίδιο ($\rho(r)$) σε σύγκριση με την σκέδαση από ισοδύναμο όγκο διαλύτη, καθορίζεται από τον μετασχηματισμό *Fourier* του επιπρόσθετου μήκους σκέδασης

$$\Delta\rho(r) = \rho(r) - \rho_s$$

$$F(s) = \int_V \Delta\rho(r) \exp(isr) dr$$

όπου η ολοκλήρωση εκτελείται σε όλο τον όγκο V του σωματιδίου. Σε ένα πείραμα σκέδασης η απευθείας καταγραφόμενη ποσότητα είναι η ένταση $I(s) = F(s)F^*(s)$ και όχι το πλάτος $F(s)$. Η ένταση είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που σκεδάζονται προς μια συγκεκριμένη διεύθυνση s (Σχήμα 2.1) [74]. Όπου $F^*(s)$ είναι ο συζυγής μιγαδικός του $F(s)$.

2.7.1 Η προσέγγιση *Guinier* κι η εξίσωση *Debye*

Στα ιστροπικά (radically symmetric) συστήματα που σκεδάζουν σε διάλυμα ισχύει η προσέγγιση *Guinier* για τιμές του s πλησίον του 0 [74].

$$I(s) = I(0) \exp((-R_g^2 s^2)/3)$$

όπου R_g είναι η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου, s είναι το άνυσμα σκέδασης ($4\pi \sin\theta/\lambda$) και $I(0)$ η ένταση στη μηδενική γωνία (σε ευθυγράμμιση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία). Η προσέγγιση *Guinier* έχει ισχύ για τιμές του $2\pi R_g s < 1,3$ στην περίπτωση σφαιροειδών σωματιδίων. Δηλώνει ότι στην περιοχή των πολύ μικρών γωνιών, η ένταση της σκέδασης μπορεί να προσεγγιστεί ως κανονική κατανομή, και το πλάτος της κατανομής αυτής σχετίζεται με τη γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου. Το διάγραμμα $\ln I(s)$ έναντι του s^2 είναι μία ευθεία σε αυτήν την περίπτωση όπου η κλίση της είναι η γυροσκοπική ακτίνα R_g και το σημείο τομής του άξονα y προσδιορίζει την τιμή $I(0)$. Ως γυροσκοπική ακτίνα ορίζεται η μέση τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των διαφορών των αποστάσεων όλων των ατόμων (N) από το κέντρο της μάζας τους:

$$R_g^2 = (1/N) \sum (r_k - r)^2$$

όπου r_k είναι το άνυσμα θέσης του k -οστού ατόμου και r το κέντρο μάζας του σωματιδίου.

Η σκεδαζόμενη ένταση στη μηδενική γωνία $I(0)$ είναι ανάλογη του αριθμού των ηλεκτρονίων του σωματιδίου και η τιμή της $I(0)$ δεν είναι πειραματικά δυνατό να παρατηρηθεί καθώς βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με την προσπίπτουσα (πρωτογενή) δέσμη ακτινοβολίας και προσεγγίζεται μέσω της εξίσωσης *Guinier* [75]. Στην περίπτωση σωματιδίων που αποκλίνουν από το σφαιρικό σχήμα το εύρος της προσέγγισης *Guinier* περιορίζεται στις ακόμα μικρότερες γωνίες $2\pi R_g s < 1,0$. Το διάγραμμα $\ln I(s)$ έναντι του s^2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί η γυροσκοπική ακτίνα της εγκάρσιας διατομής ενός ραβδοειδούς σωματιδίου (R_{gCS} , CS: Cross-Section). Σε περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες είναι αρκετά αποδιπλωμένες ώστε να προσεγγίζουν μία πολυμερή αλυσίδα, οι αποστάσεις μεταξύ στοιχειωδών τμημάτων της πρωτεΐνης μπορούν να είναι αρκετά μεγάλες κάνοντας μη πρακτική πλέον τη χρήση της προσέγγισης *Guinier*. Τότε η συνάρτηση $I(s)$ περιγράφεται στην περιοχή $R_g s < 3$ από την εξίσωση του Debye:

$$I(s)/I(0)=2[(s^2R_g^2)-1+\exp(-s^2R_g^2)]/(s^2R_g^2)$$

Η σχέση αυτή ισχύει για μία απείρως λεπτή αλυσίδα. Η περιοχή ισχύος της σχέσης περιορίζεται ανάλογα με το ποσοστό αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων τμημάτων της αλυσίδας.

2.7.2 Διάγραμμα *Kratky*

Πληροφορία σχετικά με την σφαιρικότητα του σωματιδίου μπορεί να εξαχθεί άμεσα με την απλή παρατήρηση του διαγράμματος *Kratky*, σχεδιάζοντας την συνάρτηση $I(s)s^2$ έναντι του s . Διαφορετικοί τύποι σωματιδίου μπορούν να ταυτοποιηθούν εύκολα με αυτού του είδους την αναπαράσταση των δεδομένων σκέδασης από διάλυμα. Για διπλωμένα σωματίδια το διάγραμμα *Kratky* μοιάζει με παραβολή. Στην περίπτωση μίας αλυσίδας το διάγραμμα *Kratky* μοιάζει να φτάνει σε ένα πλατό καθώς η $I(s)$ μεταβάλλεται ανάλογα του $1/s^2$. Τέλος στην περίπτωση μίας *Kratky-Porod* τύπου αλυσίδας χωρίς πάχος [76], το διάγραμμα *Kratky* διαθέτει επίσης πλατό (μεταβολή της έντασης ανάλογα του $1/s^2$) αλλά η περιοχή των μεγάλων γωνιών καταλαμβάνεται από μία μονοτονικά αυξανόμενη καμπύλη χαρακτηριστική της σκέδασης από σωματίδιο σχήματος ράβδου, [77].

2.7.3 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες

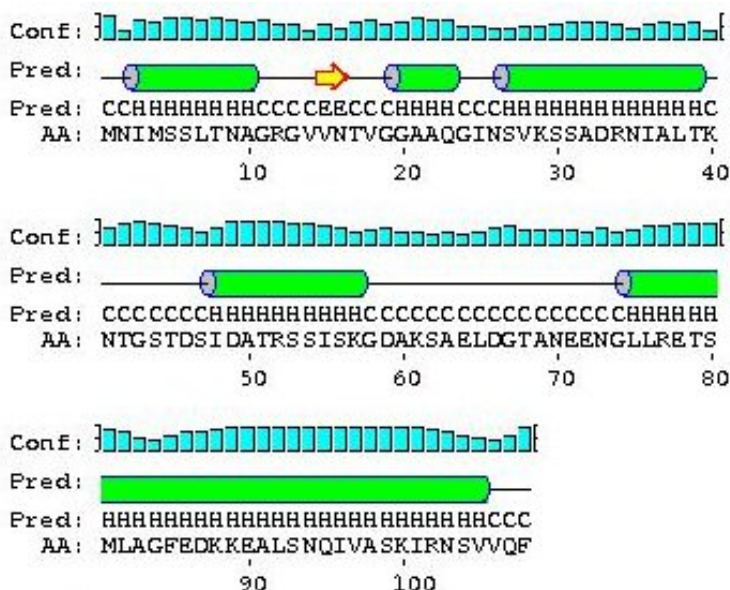
Δείγματα της HrpADC8 πρωτεΐνης σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις ($0,5 \text{ mgml}^{-1}$, 5 mgml^{-1} , 20 mM οξικό νάτριο $\text{pH } 5,5$, 100 mM NaCl) μετρήθηκαν στη γραμμή ακτινοβολήσης X33 17 του γερμανικού συγχροτρονίου (DESY) του Αμβούργου σε συνεργασία με τον εκεί εξωτερικό σταθμό του *Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας* (EMBL-Hamburg Outstation). Στα δείγματα προστέθηκε DTT (2 mM) και φυγοκεντρήθηκαν σε υψηλές στροφές (18000 g για 1 min) μόλις πριν την τοποθέτηση τους σε θερμοελεγχόμενη κυψελίδα mica. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 10° C . Η έκθεση στις ακτίνες X ήταν συνεχής. Τα δείγματα εναλλάσσονταν με το ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου η ένταση της σκέδασης επίσης καταγραφόταν για 3 min . Ο ανιχνευτής ήταν δίσκος ειδώλου MAR345 (*Mar Research*). Η ένταση της σκέδασης που καταγραφόταν στο δίσκο ειδώλου μετατρέποταν σε μονοδιάστατα δεδομένα μέσω του πακέτου προγραμμάτων *PRIMUS-MAR* [78].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη βιοϋπολογιστική ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της αγρίου τύπου HrpA *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, βιοϋπολογιστική μελέτη που έγινε για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες στα φυτοπαθογόνα και ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία, οι γονιδιακές κατασκευές των δυο μεταλλαγμάτων της HrpA *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Επιπλέον, παρατίθενται τα πρωτόκολλα υπερέκφρασης και καθαρισμού τους καθώς κι ανάλυση δεδομένων μέσω κυκλικού διχρωϊσμού, τεχνικές και συνθήκες κρυσταλλώσεων καθώς κι η πρώτη προσπάθεια για ανάλυση του ενός μεταλλάγματος μέσω σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες.

3.1 *in silico* ΑΝΑΛΥΣΗ

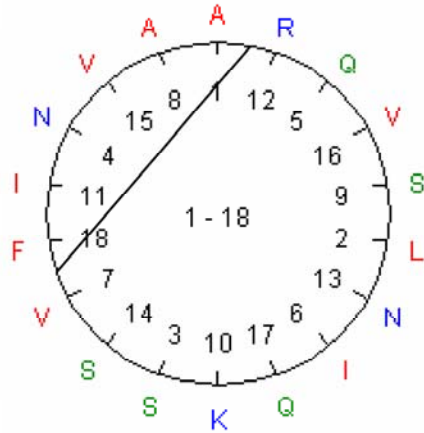
Διενεργώντας έρευνα *PSI-BLAST* [79] στη βάση *NRDB*, κάνοντας χρήση των προκαθορισμένων τιμών που τίθενται από τη *NCBI*, με αλληλουχία έρευνας την αμινοξική αλληλουχία της HrpA (κωδικός πρόσβασης AAF99291) από την *P. syringae* pv. *phaseolicola* ανιχνεύονται ως αληθή θετικά στους τρεις πρώτους κύκλους 27 αλληλουχίες. Όλες οι αλληλουχίες ανήκουν σε πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως HrpA από διάφορα βακτήρια, όλα του γένους *Pseudomonas*, ενώ υπάρχει μια αλληλουχία που να ανήκει σε γνωστή πρωτεΐνη, την HrpA *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str.DC3000 [80]. Κατά την επανέισοδο όλης της ομάδας στον τέταρτο κύκλο δεν ανιχνεύεται πλέον καμία καινούρια αλληλουχία κι η έρευνα λαμβάνει τέλος σε αυτό το σημείο (Παράρτημα Α).



Σχήμα 3.1: Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της HrpA *P. syringae* pv. *phaseolicola* μέσω *PSIPRED*.

Στη συνέχεια η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής έλαβε χώρα μέσω του προγράμματος *PSIPRED* [81] στην οποία υποδεικνύονται έξι προβλεπόμενες α-έλικες (Σχήμα 3.1). Εάν τα αμινοξέα που σχηματίζουν την καρβοξυλική α-έλικα τοποθετηθούν με τη σειρά σε μια κάτοψη της έλικας με τις ανάλογες αποστάσεις (μοντέλο *helical wheel*), τότε παρατηρείται ο αμφιπαθητικός χαρακτήρας της (Σχήμα 3.2).

Επιπρόσθετα, οι αμινοξικές αλληλουχίες των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από άλλα φυτοπαθογόνα και ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία υποβλήθηκαν σε προβλέψεις δευτεροταγούς δομής, σφαιρικότητας κι επτάδας, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2 (2.1). (Πίνακας 3.1, Πίνακας 3.2). Η πολλαπλή στοίχιση τους παρουσιάζεται στο Παράρτημα Β.



Σχήμα 3.2: Κάτοψη της προβλεπόμενης καρβοξυτελικής α-έλικας της HrpA *P. syringae* pv. *Phaseolicola*.

Πίνακας 3.1: Αντίστοιχες πρωτεΐνες της HrpA από άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία.

TTSS Family	Organism	Gene/Locus	Entrez Protein ID	N. of residues	Predicted disordered segments %	Predicted α -helix %	Predicted heptad repeats %	pI
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>hrpA</i>	AAF99291	108	25	61.1	45	6.22
<i>Hrc1</i>	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	<i>hrpA</i>	AAG01456	77	0	76.6	57	5.59
	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>hrpA</i>	Q46618	68	0	70.6	64	8.12
<i>Hrc2</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> GM11000	<i>hrpY</i>	NP_522416	82	0	74.4	45	8.10
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10	<i>hrpA</i>	YP_362148	93	0	61.3	41	5.08
<i>Rhizobiales</i>	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	<i>nopA</i>	YP_052973	71	0	78.9	57	9.52

Πίνακας 3.2: Αντίστοιχες πρωτεΐνες της HrpA από ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία.

TTSS Family	Organism	Gene/Locus	Entrez Protein ID	N. of residues	Predicted disordered segments %	Predicted α -helix %	Predicted heptad repeats %	pI
	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> A449	<i>ascF</i>	YP_001144276	85	41.2	81.2	37	5.63
	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>lscF</i>	AAO18031	101	25.7	76.2	54	6.53
<i>Ysc</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	<i>pscF</i>	AAG05108	85	5.9	65.9	34	6.53
	<i>Yersinia pestis</i> CO92	<i>yscF</i>	NP_395189	87	0	74.7	37	6.53

	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	VP1694	NP_798073	82	52.4	68.3	40	5.66
	<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	<i>bscF</i>	NP_880907	88	0	67.1	32	6.54
<i>Hrc2</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>BPSS15 48</i>	YP_111554	89	60.7	75.3	0	4.76
	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (SPI-2)	<i>sseB</i>	NP_460363	196	26.5	62.3	40	4.87
	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>eseB</i>	AAX55243	198	32.3	64.7	36	5.51
<i>Ssa-Esc</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933	<i>espA</i>	NP_290256	192	0	63.5	44	4.78
	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	<i>CV_25 83</i>	NP_902253	184	0	66.3	69	4.66
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Typhi str. CT18	<i>sseB</i>	NP_456130	196	26.5	62.3	40	4.87
	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 (SPI1)	<i>prgI</i>	NP_461794	80	0	83.8	46	4.76
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>bsaL</i>	2G0U_A	92	90.2	71.7	0	5.76
<i>Inv-Mxi-Spa</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. Sakai	<i>erpl</i>	NP_311745	79	59.5	88.6	65	4.26
	<i>Shigella flexneri</i>	<i>mxiH</i>	AAP79000	83	51.8	79.5	63	4.42
	<i>Sodalis glossinidius</i>	<i>SG0558</i>	YP_454238	85	34.1	83.5	0	4.69
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>yscF</i>	NP_783691	87	0	79.3	36	5.56

3.2 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΗΡΡΑΔC8, ΗΡΡΑΔC18

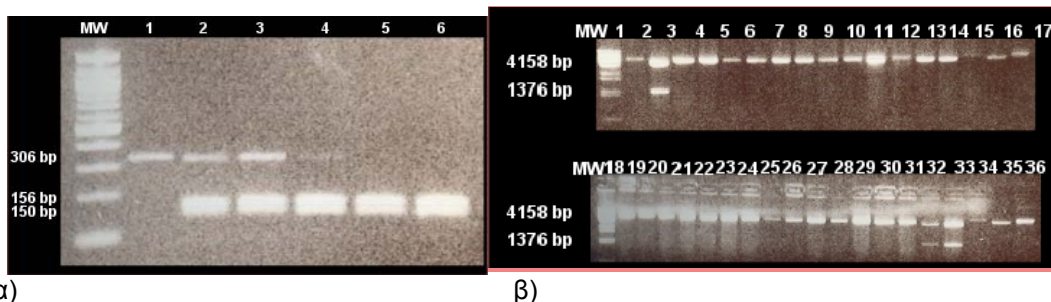
Βασικό αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας είναι το πρωτεϊνικό προϊόν δυο γονιδιακών κατασκευών. Η αγρίου τύπου HrpA είναι μειωμένη κατά οχτώ και δεκαοχτώ αμινοξέα στο καρβοξυλικό άκρο, με σκοπό την απομόνωση διαλυτών προϊόντων HrpAΔC8, HrpAΔC18, αντίστοιχα. Από αυτό το σημείο και μετά, οι αναφορές σε αυτά τα μεταλλάγματα της HrpA θα γίνονται με τον παραπάνω συμβολισμό.

3.2.1 Κλωνοποίηση, υπερέκφραση

Το πλήρες μήκος γονίδιο *hrpA* είχε κλωνοποιηθεί στο παρελθόν στο φορέα pET16b [Novagen] (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Π. Κ.). Η κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για τη κατασκευή της υπολειμματικής μορφής των μεταλλαγμάτων με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων κι ενίσχυση με τη μέθοδο PCR. Το γονίδιο *hrpA* έχει μια εσωτερική XhoI περιοριστική θέση στην 156η βάση, και για αυτό το λόγω μερική πέψη έλαβε μέρος και για τα δυο μεταλλάγματα. Τα νέα γονιδιακά προϊόντα PCR, τα οποία φέρνουν στα άκρα τους αλληλουχίες-στόχους περιοριστικών ενζύμων, κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pET26b(+) [Novagen], ο οποίος είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Τα δυο νέα πλασμιδιακά DNA ελέγχθησαν μέσω διαγνωστικών πέψεων (με το περιοριστικό ένζυμο HpaI), αλληλούχισης, και παραγωγή των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πιθανότητα για τις προαναφερόμενες γονιδιακές κατασκευές είναι περίπου 8,5 % (3 θετικοί κλώνοι στις 36 διαγνωστικές πέψεις για το *hrpAΔC8* και 6 θετικοί

κλώνοι στις 70 διαγνωστικές πέψεις για το *hrpADC18*). Αναλυτικό πρωτόκολλο υπερέκφρασης παρουσιάζεται στο εδάφιο 2.3.

Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται η ηλεκτροφόρηση των 1,2 % πηκτωμάτων αгарόζης από τη μερική πέψη και τις διαγνωστικές πέψεις ενώ στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζεται σχηματικά η περιοχή κλωνοποίησης κι έκφρασης στο φορέα, και για τις δυο κατασκευές.



α)

β)

Σχήμα 3.3: Ηλεκτροφόρηση 1,2 % πηκτώμα αгарόζης α) από μερική πέψη με *Xho*I, β) από διαγνωστικές πέψεις με *Hpa*I για τη *HrpADC8*.



Σχήμα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της περιοχής – έκφρασης στο φορέα pET26b(+) για *HrpADC8* και *HrpADC18*.

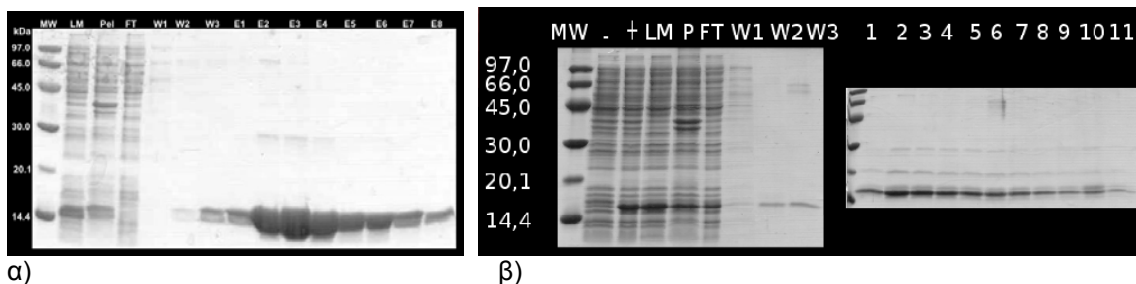
3.3 Χρωματογραφία

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης και για τα δυο μεταλλάγματα.

3.3.1 Χρωματογραφία συγγένειας Ni-NTA αгарόζης

Αρχικά έγινε καθαρισμός των μεταλλαγμάτων, με συγγένεια χρωματογραφίας, σε μικρή κλίμακα ώστε να υπάρχει η καλύτερη απόδοση πρωτεϊνικού προϊόντος.

Το τελικό πρωτόκολλο καθαρισμού μέσω χρωματογραφίας συγγένειας φαίνεται στο εδάφιο 2.4.1, ενώ στο Σχήμα 3.5 φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 12 % από τους δύο καθαρισμούς σε μεγάλη κλίμακα (4 l καλλιέργεια).



α)

β)

Σχήμα 3.5: Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12 %, α) για την πρωτεΐνη HrpADC8 και β) για τη HrpADC18. LM = loading material, FT = flow through, - IPTG = non-induced, + IPTG = induced, P or Pel = pellet, W1 = wash 1, W2 = wash 2, W3 = wash 3, 1-11=elution fractions.

3.3.1.1 Ταυτοποίηση προϊόντων καθαρισμού

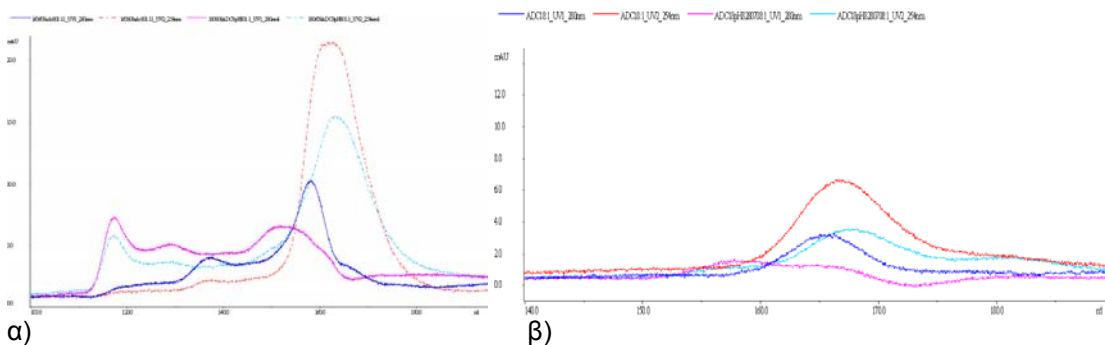
Το αναμενόμενο θεωρητικό μοριακό βάρος της HrpADC18 είναι περίπου 12 *KDa* ενώ σύμφωνα με το Σχήμα 3.5β στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12 % φαίνεται κοντά στα 14,4 *KDa*. Θέλοντας να γίνει επιβεβαίωση των ζωνών που είναι στα 20,1 και 30 *KDa* που εμφανίζονται στα εκλούσματα, έγινε ταυτοποίηση τους μέσω ανίχνευσης του ακροφυσίου των έξι ισθιδινών με Ni-NTA που προσδένεται πάνω σε αυτό και τα οποία είναι συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Το ένζυμο στη συνέχεια ανιχνεύεται με χρωστικές, οπότε έμμεσα, ανιχνεύεται το 6His-tag συνεπώς και η πρωτεΐνη που το φέρει (Σχήμα 3.6).

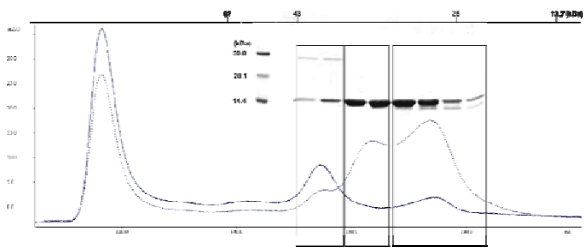


Σχήμα 3.6: Μembrάνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι ζώνες της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12 %, και στην οποία έχει γίνει ανίχνευση με Ni-NTA AP conjugate. MW πρωτεϊνικός δείκτης (*KDa*), 1 το Ni-NTA AP conjugate δεσμεύεται στη ζώνη της HrpADC18-μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, 2 το Ni-NTA AP conjugate δεσμεύεται στη ζώνη της HrpADC18-πρίν τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, 3 το Ni-NTA AP conjugate δεσμεύεται στη ζώνη της HrpADC18-μετά τη χρωματογραφία συγγένειας.

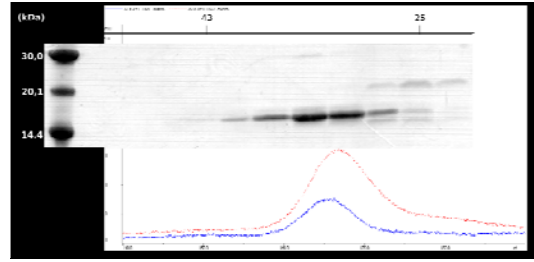
3.3.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Στο Σχήμα 3.7 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης (Sephacryl S-100) σε δυο διαφορετικά διαλύματα 20 *mM* οξικό νάτριο pH 5, 100 *mM* NaCl, και 20 *mM* Tris-HCl pH 8, 100 *mM* NaCl καθώς και τα τελικά χρωματογραφήματα για τα δυο μεταλλάγματα σε 20 *mM* οξικό νάτριο pH 5, 100 *mM* NaCl, με τις αντίστοιχες αναλύσεις SDS-PAGE.





γ)

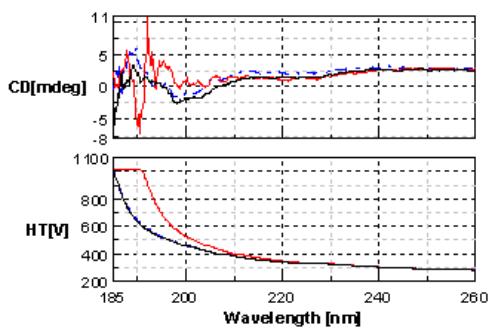


δ)

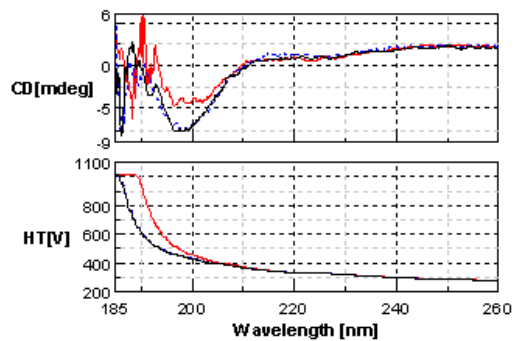
Σχήμα 3.7: Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης, α) σε διαφορετικά διαλύματα: μπλέ καμπύλη (280nm), κόκκινο καμπύλη (254 nm) 20 mM οξικό νάτριο pH 5,0, 100 mM NaCl και ρόζ καμπύλη (280nm), τirkουάζ καμπύλη (254 nm) 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl για τη HprADC8 και β) για τη HprADC18, γ) χρωματογραφήματα στήλης μοριακής διήθησης για τη HprADC8 στα 280 nm (συνεχής γραμμή) και στα 254 nm (διακεκομμένη γραμμή) και δ) για τη HprADC18, στα 280 nm (κόκκινη γραμμή) και στα 254 nm (μπλέ γραμμή), σε 20 mM οξικό νάτριο pH 5,0, 100 mM NaCl με τις αντίστοιχες SDS-PAGE αναλύσεις. Ο πάνω X άξονας δείχνει τα μοριακά βάρη των πρότυπων πρωτεϊνών.

3.4 ΚΥΚΛΙΚΟΣ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΣ

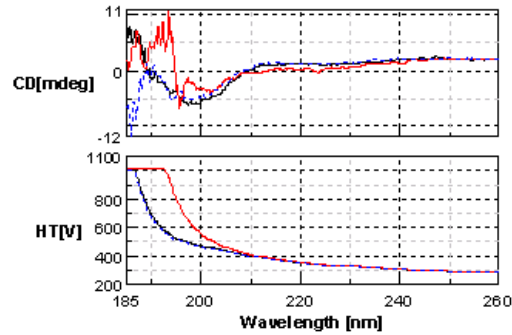
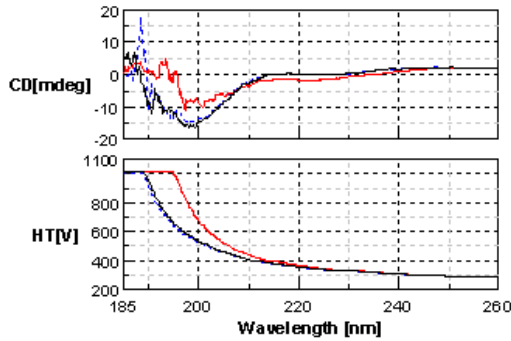
Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού συλλέχθηκαν σε φασματοπολαρίμετρο J815 [Jasco Corp.] του οικείου ιδρύματος (Τμήμα Βιολογίας, Π. Κ.). Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα πάχους 1 mm για την καταγραφή φάσματος κυκλικού διχρωϊσμού στο άπυρ υπεριώδες σε θερμοκρασίες 2° C, 4° C, 12° C, 60° C, 90° C, και 2° C, 4° C μετά τους 60° C, 90° C. Τα δείγματα των HprADC8, HprADC18 προέκυψαν με αραιώση με διάλυμα 20 mM Na₂HPO₄ pH 8,0 ή με 20 mM MES pH 5,5 και 100 mM Na₂SO₄. Έγιναν πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης των μεταλλαγμάτων καταγράφοντας το σήμα του κυκλικού διχρωϊσμού στα 200 nm, στο εύρος θερμοκρασιών 0-40 °C και στα 222 nm στο εύρος θερμοκρασιών 4-90 °C, με ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας 75° Ch⁻¹ κι απόκριση κάθε 1 s. Στο Παράρτημα Γ παρουσιάζονται τα ποσοστά της δευτεροταγούς δομής που εκτιμήθηκαν με τα προγράμματα SELCON3, CDSSTR και CONTIN/LL για διαφορετικές συγκεντρώσεις, θερμοκρασίες και διαλύματα. Τα φάσματα των HprADC8, HprADC18 παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.8, ενώ τα φάσματα από τα πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.9.



α)



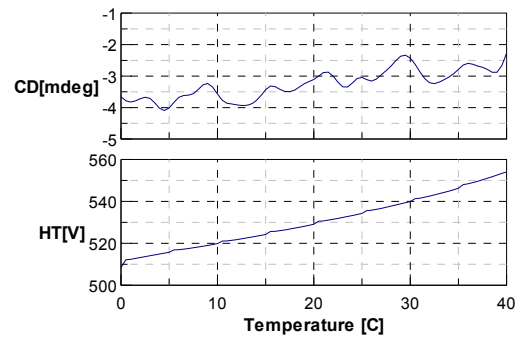
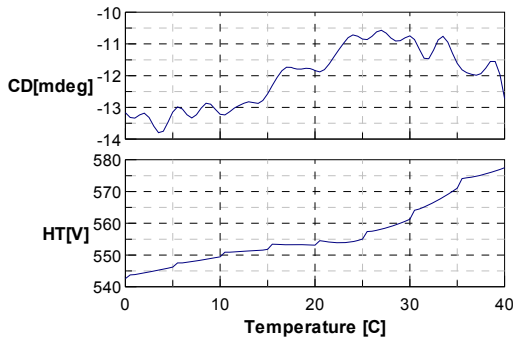
β)



γ)

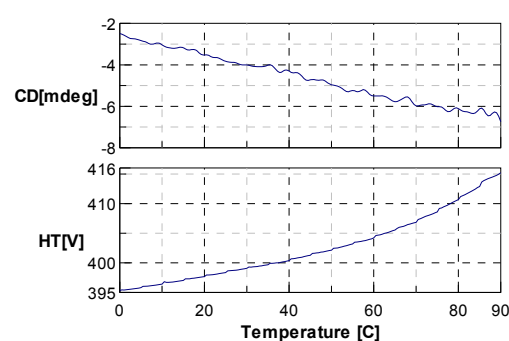
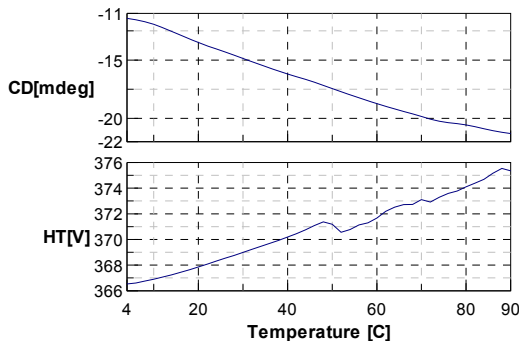
δ)

Σχήμα 3.8: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, α) της HrpADC8 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,0527 \text{ mgml}^{-1}$ και β) σε 20 mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 100 mM NaCl, $C = 0,079 \text{ mgml}^{-1}$. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού γ) της HrpADC18 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,394 \text{ mgml}^{-1}$ και δ) σε 20 mM Na_2HPO_4 pH 8,0, 100 mM NaCl, $C = 0,394 \text{ mgml}^{-1}$. Η συνεχόμενη κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στους 90° C, η μπλε διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στους αρχικούς 4° C, ενώ η συνεχόμενη μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στους 4° C, φάσμα που πάρθηκε σε αυτή τη θερμοκρασία μετά τους 90° C



α)

β)



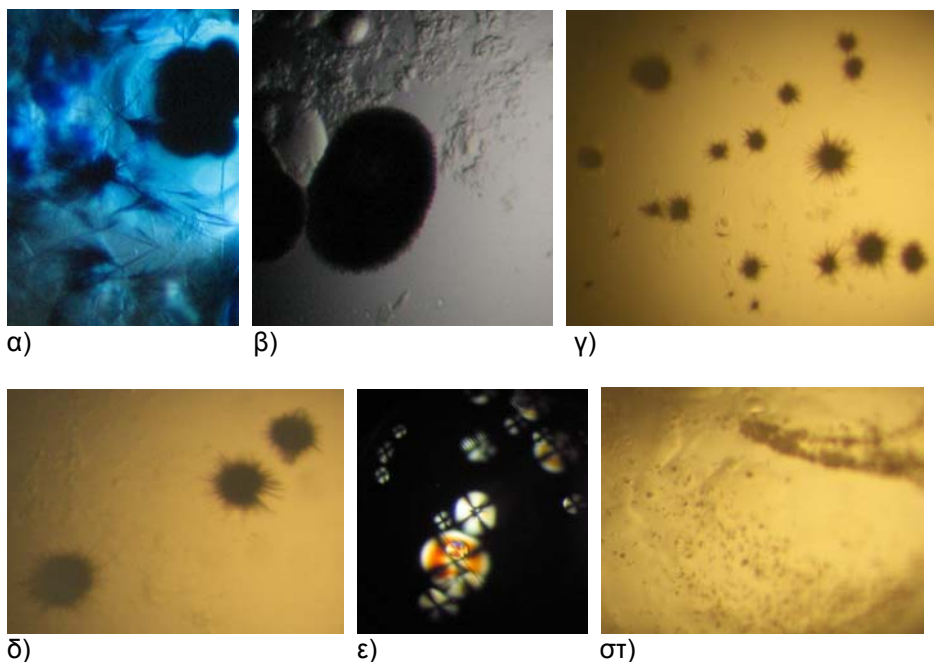
γ)

δ)

Σχήμα 3.9: Φάσματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης μέσω κυκλικού διχρωϊσμού, α) της HrpADC8 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,0527 \text{ mgml}^{-1}$, στα 200 nm στο εύρος θερμοκρασιών 0-40 °C, β) της HrpADC18 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,394 \text{ mgml}^{-1}$, στα 200 nm στο εύρος θερμοκρασιών 0-40 °C, γ) της HrpADC8 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,0527 \text{ mgml}^{-1}$, στα 222 nm στο εύρος θερμοκρασιών 4-90 °C, δ) της HrpADC18 σε 20 mM MES pH 5,5, 100 mM NaCl, $C = 0,394 \text{ mgml}^{-1}$, στα 222 nm στο εύρος θερμοκρασιών 4-90 °C.

3.5 ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΙΣ

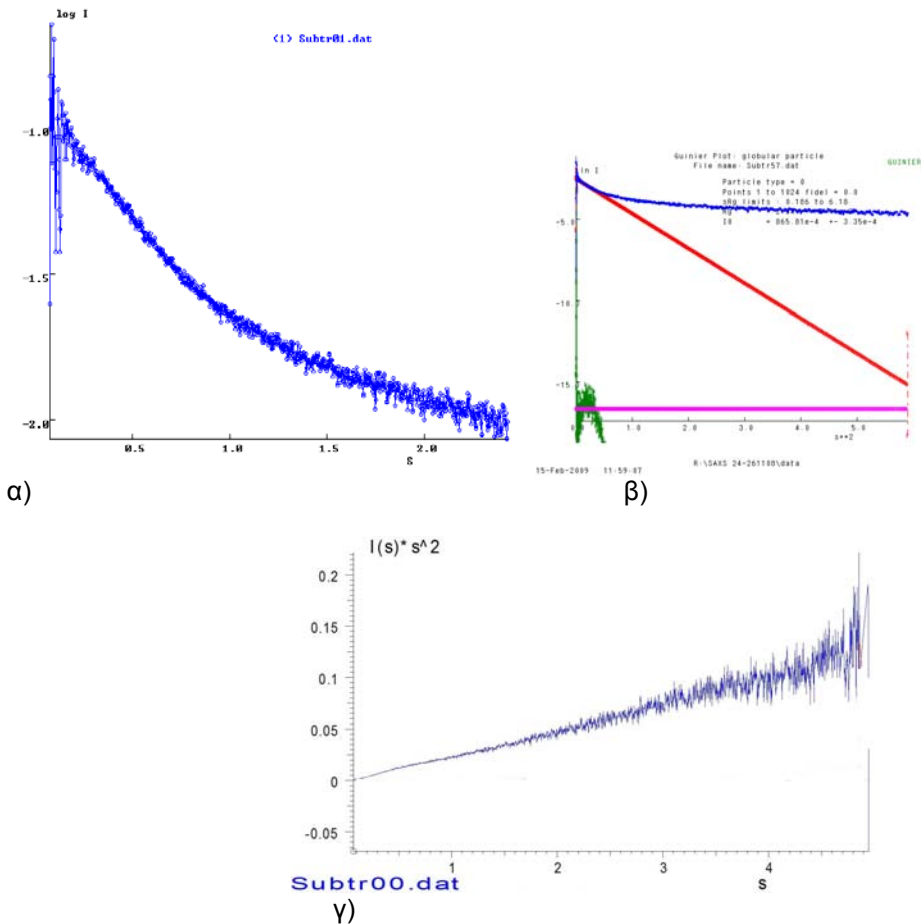
Η συνθήκη στην οποία παρατηρήθηκαν οι πρώτοι θύσανοι της HrpADC8 πρωτεΐνης ήταν 0,2 M CaCl₂, 20 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 4,6 (Hampton Crystal Screen I) στους 291 K. Δοκιμάστηκαν με Izit Crystal Dye™, που διαφοροποιεί τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους από τους κρυστάλλους αλάτων. Στο Παράρτημα Δ φαίνονται όλες οι συνθήκες βελτιστοποίησης για τη HrpADC8 πρωτεΐνη. Το Σχήμα 3.10 παρουσιάζει φωτογραφίες συνθηκών που πάρθηκαν από στερεοσκόπιο για τη HrpADC8. Η HrpADC18 πρωτεΐνη, έδινε καθαρές σταγόνες και διαχωρισμό φάσεων κατά τα πειράματα κρυσταλλώσεων.



Σχήμα 3.10: Φωτογραφίες από στερεοσκόπιο: α) αρχική συνθήκη 0,2 M CaCl₂, 20 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 4,6 (Hampton Crystal Screen I) στους 291 K με προσθήκη Izit Crystal Dye™, β) πρώτος θύσανος υπό 0,2 M CaCl₂, 20 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 4,6 στους 291 K, γ) και δ) βελτιστοποιημένοι θύσανοι υπό συνθήκες 0,06 M CaCl₂, 5 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,0, ε) χρήση διασταυρούμενων πολωμένων φακών για την παρατήρηση του φαινόμενου διάσπασης της προσπίπτουσας δέσμης σε δύο κατά τη διάθλαση τους από ύλη με περιοδική διάταξη (διπλοδιαθλαστικότητα), οι κρύσταλλοι με αυτόν τον τρόπο εμφανίζονται με διαφορετικό χρώμα από το περιβάλλον τους, στ) μικροί βελονοειδείς κρύσταλλοι της ίδιας πρωτεΐνης υπό 0,06 M CaCl₂, 5 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,0 και 500 μl 50 % παραφινέλαιο / 50 % σιλικονέλαιο.

3.6 ΣΚΕΔΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΣΕ ΜΙΚΡΕΣ ΓΩΝΙΕΣ

Η τελική καμπύλη σκέδασης της HrpADC8 πρωτεΐνης και το αντίστοιχο Guinier plot για συγκέντρωση 5 mgml⁻¹ υπό 20 mM οξικό νάτριο pH 5,5, 100 mM NaCl, παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.11. Η τελική καμπύλη προέρχεται από την καμπύλη σκέδασης του δείγματος από όπου αφαιρείται η καμπύλη σκέδασης του διαλύτη, δίνοντας την καθαρή σκέδαση που οφείλεται στο σωματίδιο. Πιο αναλυτικά το πρωτόκολλο συλλογής κι ανάλυσης των δεδομένων παρουσιάζεται στο εδάφιο 2.7.



Σχήμα 3.11: α) Η τελική καμπύλη σκέδασης της ακτίνων Χ της πρωτεΐνης ΗηρΑΔC8 από διάλυμα σε μικρές γωνίες. Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στο λογάριθμο των εντάσεων ενώ ο οριζόντιος στο άνωσμα σκέδασης $s = (4\pi \sin 2\theta) / \lambda$ [$1/\text{\AA}$], β) η περιοχή *Guinier* της τελικής καμπύλης δεν εμφανίζει γραμμικότητα, πράγμα που σημαίνει ότι δεν υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο δείγμα. Με πράσινο αναπαρίστανται οι υπολειμματικές τιμές της ευθείας προσέγγισης (residuals), γ) διάγραμμα *Kratky*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπομονάδα Hrp pilus γενικά έχει προβλεφθεί ότι είναι α-έλικα, με εξαίρεση όμως την αντίστοιχη υπομονάδα της *P. syringae* [82-83], όπου το αμινοτελικό άκρο της υπομονάδας προβλέπεται να είναι β-πτυχωτά φύλλα. Από τους Πίνακες 3.1 και 3.2, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η HrpA της *P. syringae* pv. *phaseolicola* έχει περίπου ίδια ποσοστά προβλεπόμενης α-έλικας και προβλεπόμενης επτάδας με τις MxiH (*S. flexneri*), BsaL (*B. pseudomallei*), PrgI (*S. typhimurium*), και EspA (*E. coli*), πρωτεΐνες των οποίων οι δομές αποτελούνται από α-έλικες, και πιο συγκεκριμένα σπειραμμένο σπείραμα, που παίζει ρόλο στον πολυμερισμό τους [28], [33-35], [84].

Το καρβοξυτελικό άκρο της HrpA DC3000 (ομόλογη της HrpA *P. syringae* pv. *phaseolicola*) έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνο για το πολυμερισμό της [39-40], [80], [85]. Λαμβάνοντας υπόψιν και τον προβλεπόμενο αμφιπαθητικό χαρακτήρα της καρβοξυτελικής έλικας (Σχήμα 3.2), θα μπορούσε να προταθεί ότι το συγκεκριμένο τμήμα της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για εξωτερικές κι εσωτερικές διαμορφώσεις σπειρωμένου σπειράματος. Προκειμένου να αποφευχθεί αυθόρμητος πολυμερισμός, ο οποίος θα εμπόδιζε την κρυστάλλωση της, δημιουργήθηκαν δυο γονιδιακές κατασκευές με 8 και 18 αμινοξικά κατάλοιπα λιγότερα στο καρβοξυτελικό άκρο της αγρίου τύπου HrpA.

Από τις δυο αυτές κατασκευές, τα αμινοξέα LEHHHHHH βρίσκονται τελικά στο καρβοξυτελικό άκρο της HrpA πρωτεΐνης. Η μεγάλη πρόκληση στις δυο γονιδιακές κατασκευές ήταν ότι το γονίδιο *hrpA* είχε ήδη μια εσωτερική περιοριστική χ hoI θέση, με αποτέλεσμα να γίνει μερική πέψη με το χ hoI, προκειμένου να μελετηθεί όσον το δυνατόν πιο κοντινή αλληλουχία στην αγρίου τύπου. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άλλα περιοριστικά ένζυμα αντί του χ hoI, αλλά στο καρβοξυτελικό άκρο εκτός από τις έξι ιστιδίνες (λόγω του φορέα) θα υπήρχαν επιπλέον τουλάχιστον πέντε αμινοξέα αντί δυο.

Τα δυο μεταλλάγματα βρέθηκαν διαλυτά στις συνθήκες καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας. Αρχίζουν να εκλύονται από τα 100 mM ιμιδαζολίου καθώς και στο βήμα του Wash 3 με 30 mM ιμιδαζολίου. Πείραμα με χρωματογραφία μοριακής διήθησης ακολουθήθηκε, αφού συλλέχθηκαν τα πρωτεϊνικά εκλούσματα κι υποβλήθηκαν σε διαπίδυση και συγκέντρωση. Αξίζει να σημειωθεί, ότι όταν και τα δυο μεταλλάγματα υποβλήθηκαν σε διαπίδυση σε διαφορετικά διαλύματα, παρατηρήθηκε υδρογέλη, εκτός με το διάλυμα 20 mM οξικό νάτριο pH 5,0, 100 mM NaCl. Αυτού του είδους υδρογέλη έχει μελετηθεί μόνο σε σφαιρικές πρωτεΐνες και εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης, τη συγκέντρωση της, την ιοντική ισχύς, τη θερμοκρασία και το pH [86]. Στην περίπτωση που η θερμοκρασία [87] και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης [88] είναι πολύ χαμηλά τότε δεν παρατηρείται τέτοιου είδους υδρογέλη. Στην περίπτωση όμως που αυτοί οι παράγοντες ξεπερνάνε τις κρίσιμες τιμές τους και πιο συγκεκριμένα αυξάνονται, παρατηρείται ελάττωση του χρόνου δημιουργίας υδρογέλης [77], [86], [89-90]. Η σημαντικότητα του pH του διαλύματος παρατηρήθηκε και στη HrpA DC3000 [80].

Σύμφωνα με την αλληλουχία της HrpA, δεν υπάρχει κανένα αρωματικό κατάλοιπο, και για αυτό το λόγο κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης γινόταν καταγραφή της απορρόφησης στα 254 nm, εκτός από τα 280 nm. Λόγω της μη ύπαρξης αρωματικών αμινοξέων στην αλληλουχία της υπήρχε πρόβλημα στη μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry (εκτός από τη μέθοδο Bradford) κι η μέθοδος σάρωσης κι επεξεργασίας SDS-PAGE με ένα οποιοδήποτε πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων. Επιπλέον, σε διάλυμα pH 5,0, φαίνεται και για τα δυο μεταλλάγματα, σε αυτό το στάδιο να υπάρχει μεγαλύτερη απόδοση πρωτεΐνης.

Το χρωματογράφημα της HrpADC8 δίνει τέσσερις κορυφές. Η πρώτη χαρακτηρίζει το νεκρό όγκο της κολόνας κι αντιπροσωπεύει μεγάλο μοριακού βάρους πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Το ενδιαφέρον είναι ότι υπάρχει πολύ μικρή ποσότητα της HrpADC8 σε αυτή την κορυφή (απορρόφηση στα 254 nm). Η δεύτερη, στα περίπου 43 kDa, αντιστοιχεί σε πολύ

μικρή ποσότητα της HgrADC8 και ταυτόχρονα στην παρουσία δεύτερης πρωτεΐνης, η οποία πρέπει να έχει αρωματικά κατάλοιπα, αφού η απορρόφηση στα 280 nm είναι μεγαλύτερης έντασης από ότι στα 254 nm. Η τρίτη κορυφή, περίπου στα 30 kDa, αντιστοιχεί στη HgrADC8. Η έκλυση αυτή του μεταλλάγματος δηλώνει ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε διμερή κατάσταση αφού το μοριακό βάρος του μονομερούς υπολογίζεται στα 12 kDa. Η πρωτεΐνη HgrADC8 εκτιμάται ως διμερές από τη στήλη μοριακής διήθησης εφόσον και μόνο εφόσον είναι σφαιρική (globular) καθώς η στήλη έχει βαθμονομηθεί με σφαιρικές πρωτεΐνες. Η τελευταία κορυφή αντιστοιχεί στη HgrADC8 και σε μπάντες μικρότερου μοριακού βάρους. Αυτές οι μπάντες, μπορεί να είναι πρωτεολυτικά προϊόντα της HgrADC8, αφού δεν παρατηρείται απορρόφηση αρωματικών αμινοξέων στη κορυφή αυτή.

Όσον αφορά το χρωματογράφημα της HgrADC18, υπάρχει μια κορυφή, στα 30 kDa περίπου, που αντιστοιχεί στη HgrADC18 λόγω της μεγάλης έντασης της απορρόφησης στα 254 nm, αλλά ταυτόχρονα υπάρχει και μια άλλη πρωτεΐνη λόγω της κορυφής στα 280 nm (φαίνεται και στο SDS-PAGE).

Σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των δυο μεταλλαγμάτων από πειράματα κυκλικού διχρωισμού, τα φάσματα δείχνουν χαρακτηριστική αρνητική κορυφή στα 200 nm υπό διαφορετικές συνθήκες. Σύμφωνα με την ανάλυση δεδομένων κυκλικού διχρωισμού, υπάρχει ένα πολύ μικρό προβλεπόμενο ποσοστό α-έλικας (10 %), ενώ τα προβλεπόμενα ποσοστά των β-πτυχωτών και τυχαίου σπειράματος είναι παρόμοια (20-30 %), ανεξάρτητα από τις διαφορετικές συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Τα πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης και για τα δυο μεταλλάγματα έγιναν στα 200 nm σε θερμοκρασιακό εύρος 4-90 °C, για να δούμε τη συμπεριφορά τους έστω και αν έχουν μικρό προβλεπόμενο ποσοστό α-έλικας. Συνήθως τα φάσματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης δείχνουν μια σιγμοειδή καμπύλη ως προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας, πράγμα που σημαίνει ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας η πρωτεΐνη από τη φυσική της κατάσταση πηγαίνει στην αποδιαταγμένη. Εδώ όμως παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Επίσης, τα πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης και για τα δυο μεταλλάγματα έγιναν στα 222 nm σε θερμοκρασιακό εύρος 0-40 °C, γιατί σε αυτό το μήκος κύματος παρουσιάζεται η χαρακτηριστική αρνητική κορυφή στα απλά φάσματα κυκλικού διχρωισμού. Η επιλογή του συγκεκριμένου θερμοκρασιακού εύρους έγινε σύμφωνα με το διάγραμμα HT [V] – wavelength [nm], που αντιπροσωπεύει το θόρυβο (για την ακρίβεια αυτό που παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο διάγραμμα είναι η μεταβολή της τάσης σε Volt που επηρεάζει την απορρόφηση του ανιχνευτή ως προς τη μεταβολή του μήκους κύματος σε nm). Αυτό που παρατηρείται εδώ είναι σχεδόν μια ευθεία γραμμή.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης, έρχονται σε αντίθεση με τη θεωρία της εύπλαστης σφαίρας για την πρωτεϊνική αναδίπλωση [91-93] και είναι δύσκολο να ερμηνευτούν προς το παρόν. Ωστόσο όμως, η θεωρία αυτή προήλθε κυρίως από μελέτη πρωτεϊνών που περιέχουν έλικες. Οι δεσμοί υδρογόνου στην α-έλικα δεν συμμετέχουν στις γειτονικές πεπτιδικές αλυσίδες. Γι' αυτό όταν η τεταρτοταγής δομή αρχίζει να αποδιατάσσεται, υπάρχει ακόμη α-έλικα. Από την άλλη μεριά στα β-πτυχωτά φύλλα, λόγω της φύσης των δεσμών υδρογόνου τους, η δευτεροταγής δομή τους πιθανόν εξαφανίζεται όταν η τεταρτοταγής δομή τους αρχίζει να αποδιατάσσεται [94].

Όσον αφορά τις κρυσταλλώσεις, έγιναν πάρα πολλές προσπάθειες βελτιστοποίησης με τη μέθοδο διάχυσης ατμών με διαφορετικές τεχνικές και σε διάφορες συνθήκες (Παράρτημα Δ) με καλύτερο αποτέλεσμα τους θύσανους του μεταλλάγματος HgrADC8 σε 0,06 M CaCl₂, 5 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,0 και τους μικρούς, λεπτούς βελονοειδείς κρυστάλλους του ίδιου μεταλλάγματος υπό συνθήκες 0,06 M CaCl₂, 5 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,5 και 500 μl από 50 %πραφινέλαιο / 50 % σιλικονέλαιο.

Οι μετρήσεις σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες για το μέταλλο HgrADC8 δεν ήταν επαρκείς (έγιναν μόνο δυο, 5 mgml⁻¹, 0,5 mgml⁻¹), γιατί όπως φαίνεται κι από τη τελική καμπύλη σκέδασης για τη μια μέτρηση (διότι η άλλη είχε πολύ ασθενές σήμα λόγω πολύ

χαμηλής συγκέντρωσης) υπάρχει πολύ μεγάλος θόρυβος λόγω επίσης χαμηλής συγκέντρωσης και πιθανόν λόγω κατακρήμνισης του μεταλλάγματος. Περαιτέρω ανάλυση ήταν αδύνατον. Επιπρόσθετα, η περιοχή *Guinier* της τελικής καμπύλης δεν εμφανίζει γραμμικότητα, πράγμα που δεν υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο δείγμα. Σκεδάσεις από κατακρεμνισμένες πρωτεΐνες επηρεάζουν την περαιτέρω ανάλυση [77]. Με πράσινο αναπαρίστανται οι τιμές των υπολοίπων (residuals) της προσέγγισης. Επιπλέον, η γωνία σκέδασης είναι πολύ μικρή, πράγμα που σημαίνει πολύ χαμηλή ανάλυση και τελικά μαζική κατακρήμνιση. Σύμφωνα με το διάγραμμα *Kratky* δεν εμφανίζεται καμία κορυφή που είναι χαρακτηριστικό διπλωμένης πρωτεΐνης αλλά μια ευθεία γραμμή, που σημαίνει ότι είναι πλήρως αποδιατεταγμένη. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν τα δυο δείγματα (aliquots) φτάσανε για μετρήσεις, δεν ήταν παγωμένα κι ένα από τα δυο είχε κατακρεμνιστεί. Δεν είχε δοκιμαστεί η συμπεριφορά του συγκεκριμένου μεταλλάγματος στο παρελθόν μετά από πάγωμα του με υγρό N₂. Οπωσδήποτε τα πειράματα σκέδασης θα πρέπει να επαναληφθούν στο μέλλον, και μάλιστα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και σε διαφορετικά διαλύματα.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, ένα ανοικτό ερώτημα όσον αφορά τη δομή της HgrA είναι, γιατί τα ποσοστά α-έλικας από κυκλικό διχρωισμό είναι πολύ χαμηλότερα από εκείνα του *PSIPRED*. Χαρακτηριστική αρνητική κορυφή στα 200 nm έχουν οι β-II τύπου όλων των β-πρωτεϊνών καθώς και πρωτεΐνες με τυχαίο σπείραμα. Οι β-I και β-II υποκατηγορίες βασίζονται απλώς στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού [95-96]. Οι β-I πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστικά φάσματα για β-πτυχωτά φύλλα. Δομές των β-II πρωτεϊνών περιέχουν β-πτυχωτά φύλλα με μικρό και ακανόνιστο μήκος ή φύλλα β-στροφής [97]. Γενικά η β-II διαμόρφωση μπορεί να διαχωριστεί από το τυχαίο σπείραμα με τη βοήθεια κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδους (250-300 nm), όπου συμβάλλουν κυρίως οι πλευρικές αρωματικές ομάδες, σύμφωνα με δυο βασικά κριτήρια: α) κατά τη θερμική αποδιάταξη να έχουν την κλασική σιγμοειδής καμπύλη και β) κατά τη θερμική αποδιάταξη με 6 M GuHCl και 2mM DTE να έχουν μια ευθεία γραμμή κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας στο εγγύς και άπω υπεριώδους [94]. Δυστυχώς όμως οι HgrADC8, HgrADC18 δεν έχουν αρωματικά κατάλοιπα καθώς και κατά τη θερμική αποδιάταξη δεν εμφανίζεται η κλασική σιγμοειδής καμπύλη. Επομένως δεν θα μπορούσαμε να εμπιστευτούμε την πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής μόνο από την ανάλυση δεδομένων κυκλικού διχρωισμού (αφού η πρόβλεψη για β-πτυχωτά φύλλα είναι ίδια με εκείνη για τυχαίο σπείραμα), κάτι που έχει γίνει και στο παρελθόν σύμφωνα με τους [97]. Εξάλλου, η πρόβλεψη μέσω *PSIPRED* συνηγορεί με τις δομές λυμένων βελονοειδών δομών από τα ζωοπαθογόνα βακτήρια.

Στην περίπτωση όμως που τα φάσματα για τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα αντιστοιχούν σε τυχαίο σπείραμα τίθεται και ένα άλλο ερώτημα όσον αφορά τα πειράματα κρυστάλλωσης σε συνδυασμό με το αρχικό ερώτημα. Εδώ θα μπορούσε να δωθεί σαν απάντηση ότι σε τόσο χαμηλή συγκέντρωση ίσως να υπάχρει κάτι ευέλικτο και να μην υπάρχει κάτι οργανωμένο όπως στην περίπτωση των πειραμάτων κρυστάλλωσης όπου η συγκέντρωση είναι πολύ μεγαλύτερη. Ίσως θα πρέπει η συγκέντρωση να είναι μεγάλη ώστε να υπάρχει καλύτερο και πιο οργανωμένο πακετάρισμα. Γι αυτό θα μπορούσε να γίνει μελέτη της κατάστασης των μεταλλαγμάτων με τεχνικές όπως θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry) [98], ή ThermoFluor assay (fluorescence-based shift) [99], οι οποίες δουλεύουν με μεγαλύτερη συγκέντρωση δείγματος (0,4-2 mg/ml με DSC, και 2-3,5mg/ml με ThermoFluor assay). Επιπλέον, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθούν και άλλες φασματοσκοπικές μέθοδοι όπως Fourier-transform infrared, Raman.

Η αποτυχία εύρεσης συνθηκών κρυστάλλωσης για την HgrADC8 είναι πιθανό να οφείλεται στον πεπερασμένο χαρακτήρα που έχει μια τέτοιου είδους διερεύνηση και επομένως στο ενδεχόμενο οι κατάλληλες συνθήκες να μην εξετάστηκαν. Είναι επίσης πιθανό να οφείλεται σε δομική ιδιαιτερότητα του μορίου όπως στην ύπαρξη ευέλικτων περιοχών που λόγω της κινητικότητας τους εμποδίζουν τη δημιουργία κρυσταλλικών επαφών.

Επειδή δοκιμάστηκαν, όπως προαναφέρθηκε πολλές συνθήκες κρυστάλλωσης με διαφορετικές τεχνικές θα ήταν σκόπιμο να γυρίσουμε πίσω στη γονιδιακή κατασκευή. Μια πρόταση είναι να κοπεί η ουρά ιστιδινών, με μια κατάλληλη πρωτεύαση, στα δυο αυτά

μεταλλάγματα. Τέτοιου είδους πρωτεάσες είναι η rTEV [100], Factor X [101], PreScission protease [102]. Επίσης, να κλωνοποιηθεί με τον ίδιο τρόπο το γονίδιο της αγρίου τύπου στον ίδιο φορέα των μεταλλαγμάτων ώστε να μελετηθεί κι αυτό χωρίς την ουρά ιστιδινών και να συγκριθεί με τις δυο άλλες γονιδιακές κατασκευές.

Επιπλέον θα μπορούσε να γίνει τοπική αναγωγή της επιφανειακής διαμορφωτικής εντροπίας (surface conformational entropy). Η καλή ποιότητα του κρυστάλλου εξαρτάται από την παρουσία ομογενών μπαλωμάτων (patches) στην επιφάνεια της πρωτεΐνης [103]. Αυτού του είδους τα μπαλώματα μπορούν να δημιουργηθούν εάν αμινοξέα με μεγάλη διαμορφωτική εντροπία αντικατασταθούν με αλανίνες [35]. Συνεπώς, πρωτεΐνες που περιέχουν μεγάλη επιφάνεια αμινοξέων με μεγάλες αμινοξικές αλυσίδες ενδέχεται να μη διαμορφώνουν καλούς κρυστάλλους [104-105]. Για παράδειγμα, η LcrV (needle tip protein) από τη *Yersinia pesti* κρυστάλλωσε μετά από τριπλή μετάλλαξη K40A/D41A/K42A και λύθηκε η δομή σε ανάλυση 2,2 Å [35].

Επιπρόσθετα, αναγωγική μεθυλίωση θα μπορούσε να είχε λάβει μέρος, κατά την οποία ελεύθερες πρωτοταγείς αμινομάδες αμινοξέων (λ. χ. λυσίνες) μετατρέπονται σε τεταρτοταγείς αμίνες, με αποτέλεσμα να μειώνονται οι βαθμοί ελευθέριας αυτών των αμινοξέων και να καθίσταται η πρωτεΐνη πιο σταθερή δίνοντας κρυστάλλους [106]. Για παράδειγμα, με αναγωγική μεθυλίωση, η ανάλυση της δομής της λυσοζύμης αυγού βελτιστοποιήθηκε από 2,4 σε 1,8 Å. Η HrpA έχει επτά λυσίνες στην αλληλουχία της και θα μπορούσε να γίνει κάτι τέτοιο ώστε από τους αχινούς που έχουμε πάρει μέχρι τώρα, να πάρουμε τους επιθυμητούς κρυστάλλους.

Ενδιαφέρον θα ήταν επιπλέον, η μελέτη της υδρογέλης (που παρατηρήθηκε) με ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσε μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας να μελετηθεί η υδρογέλη αρχικά με στόχο να παρατηρηθεί αν είναι προϊόν πολυμερισμού ή όχι. Στην περίπτωση που παρατηρείται δίκτυο από τυχαία διατεταγμένα μόρια δημιουργώντας μια επιφάνεια με ινίδια θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί ο αυτοπολυμερισμός της όπως έγινε με τον αυτοπολυμερισμό του ιού M13 [107] με στόχο τη δημιουργία καινούριων βιοϋλικών. Σε γενικές γραμμές χρησιμοποιείται η ιδιότητα της αυτοοργάνωσης των ιών με αποτέλεσμα τη δημιουργία οργάνωσης ανόργανων και οργανικών νανοδομών που προσδένονται πάνω στους ιούς δημιουργώντας κρυστάλλους [108-109]. Είναι μια καινούρια γενιά βιοϋλικών που μπορεί να βρεί εφαρμογή στη δημιουργία ημιαγωγικών και μαγνητικών καλωδίων [110-111], εναλλακτικών μπαταριών [112] ή ακόμη και για τη μεταφορά φαρμάκων [113]. Πειράματα θερμικής βαρυμετρικής ανάλυσης (Thermal gravimetric analysis, TGA) γίνονται με σκοπό τη μελέτη της κρίσιμης θερμοκρασίας κατά την οποία δημιουργούνται οι ανόργανοι/οργανικοί κρύσταλλοι πάνω στα ινίδια [111]. Κάτι παρόμοιο θα μπορούσε να γίνει και με την υδρογέλη της HrpA.

Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) θα μπορούσε να εφαρμοστεί, ώστε να μετρηθεί η δύναμη των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα ινίδια. Γενικά η συγκεκριμένη μικροσκοπία χρησιμοποιείται ευρύτερα για να μετρά picoNewton δυνάμεις μοριακών αλληλεπιδράσεων [114]. Επιπλέον, πειράματα ανάκτησης φθορισμού μετά από λεύκανση (Fluorescence Recovery after Photobleaching, FRAP) θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα ώστε να μελετηθεί και η διάχυση της υδρογέλης [115]. Παράλληλα, πειράματα FTIR θα μπορούσαν να γίνουν για πιο ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό της υδρογέλης [115] καθώς και φασματοσκοπικές μελέτες Raman [116].

Όλα αυτά δεν κατέστη δυνατόν να γίνουν στα μικρά χρονικά πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αλλά η ενασχόληση με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη θα συνεχιστεί στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα Α

Πίνακας Α1: Αποτελέσματα *PSI-BLAST* θέτοντας ως αλληλουχία έρευνας την αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpA (κωδικός πρόσβασης *NCBI* AAF99291) από την *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*.

1ος Κύκλος

Ορισμός	Όνομα	Πληροφορίες
YP_273531	Type III helper protein HrpA2 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola 1448A]	Βαθμολογία=211 bits (536), Τιμή-E=2e-53, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=108/108 (100%), Θετικά=108/108 (100%), Κενά=0/108 (0%)
BAD20823	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola]	Βαθμολογία=206 bits (525), Τιμή-E=2e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=106/108 (98%), Θετικά=108/108 (100%), Κενά=0/108 (0%)
BAD20827	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. glycinea]	Βαθμολογία=206 bits (525), Τιμή-E=2e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=106/108 (98%), Θετικά=108/108 (100%), Κενά=0/108 (0%)
ABO26227	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci]	Βαθμολογία=205 bits (522), Τιμή-E=6e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=105/108 (97%), Θετικά=107/108 (99%), Κενά=0/108 (0%)
AAQ92358	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i>]	Βαθμολογία=205 bits (522), Τιμή-E=6e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=105/108 (97%), Θετικά=108/108 (100%), Κενά=0/108 (0%)
Q52480	Hrp pili protein hrpA (TTSS pilin hrpA)	Βαθμολογία=205 bits (521), Τιμή-E=8e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=105/108 (97%), Θετικά=107/108 (99%), Κενά=0/108 (0%)
BAD20847	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i>]	Βαθμολογία=204 bits (520), Τιμή-E=9e-52, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=105/108 (97%), Θετικά=106/108 (98%), Κενά=0/108 (0%)
ABO26224	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. angulata]	Βαθμολογία=204 bits (518), Τιμή-E=2e-51, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=104/108 (96%), Θετικά=107/108 (99%), Κενά=0/108 (0%)
BAD20831	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci]	Βαθμολογία=203 bits (517), Τιμή-E=2e-51, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=104/108 (96%), Θετικά=106/108 (98%), Κενά=0/108 (0%)
YP_234284	Type III helper protein HrpA2 [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae B728a]	Βαθμολογία=195 bits (496), Τιμή-E=6e-49, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=100/108 (92%), Θετικά=102/108 (94%), Κενά=0/108 (0%)
BAD20919	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. pisi]	Βαθμολογία=193 bits (490), Τιμή-E=3e-48, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=99/108 (91%), Θετικά=101/108 (93%), Κενά=0/108 (0%)
AAT96160	HrpA [<i>Pseudomonas viridiflava</i>]	Βαθμολογία=162 bits (409), Τιμή-E=8e-39, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=85/108 (78%), Θετικά=91/108 (84%), Κενά=0/108 (0%)

BAD20863	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>sesami</i>]	Βαθμολογία=90.5 bits (223), Τιμή-E=3e-17, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=48/103 (46%), Θετικά=67/103 (65%), Κενά=0/103 (0%)
BAD20871	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>]	Βαθμολογία=90.1 bits (222), Τιμή-E=3e-17, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=47/103 (45%), Θετικά=66/103 (64%), Κενά=0/103 (0%)
BAD20859	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>]	Βαθμολογία=89.7 bits (221), Τιμή-E=5e-17, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=48/102 (47%), Θετικά=67/102 (65%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20855	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>]	Βαθμολογία=89.0 bits (219), Τιμή-E=8e-17, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=47/103 (45%), Θετικά=68/103 (66%), Κενά=0/103 (0%)
BAD20867	HrpA [<i>Pseudomonas ficuserectae</i>]	Βαθμολογία=87.8 bits (216), Τιμή-E=2e-16, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=47/102 (46%), Θετικά=66/102 (64%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20931	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>oryzae</i>]	Βαθμολογία=43.1 bits (100), Τιμή-E=0.005, Μέθοδος=Compositional matrix adjust, Ταυτοσημίες=34/104 (32%), Θετικά=56/104 (53%), Κενά=2/104 (1%)

2ος Κύκλος

Ορισμός	Όνομα	Πληροφορίες
BAD20923	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>]	Βαθμολογία=92.7 bits (229), Τιμή-E=6e-18, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=34/105 (32%), Θετικά=57/105 (54%), Κενά=2/105 (1%)
NP_791208	Type III protein HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str.DC3000]	Βαθμολογία=73.8 bits (180), Τιμή-E=3e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=31/102 (30%), Θετικά=51/102 (50%), Κενά=0/102 (0%)
AAQ20005	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>]	Βαθμολογία=73.0 bits (178), Τιμή-E=5e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=31/102 (30%), Θετικά=51/102 (50%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20895	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>]	Βαθμολογία=73.0 bits (178), Τιμή-E=5e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=32/102 (31%), Θετικά=51/102 (50%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20887	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>delphinii</i>]	Βαθμολογία=72.6 bits (177), Τιμή-E=6e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=32/102 (31%), Θετικά=51/102 (50%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20883	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i>]	Βαθμολογία=72.3 bits (176), Τιμή-E=8e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=31/102 (30%), Θετικά=50/102 (49%), Κενά=0/102 (0%)
BAD20891	HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>magnoliae</i>]	Βαθμολογία=72.3 bits (176), Τιμή-E=9e-12, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=32/103 (31%), Θετικά=52/103 (50%), Κενά=0/103 (0%)
ABB91661	Type III helper protein HrpA [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>]	Βαθμολογία=63.4 bits (153), Τιμή-E=4e-09, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=33/103 (32%), Θετικά=54/103 (52%), Κενά=0/103 (0%)

3ος Κύκλος

Ορισμός	Όνομα	Πληροφορίες
YP_001185538	Hypothetical protein Pmen_0031 [<i>Pseudomonas mendocina ymp</i>]	Βαθμολογία=44.1 bits (103), Τιμή-E=0.003, Μέθοδος=Composition-based stats, Ταυτοσημίες=17/91 (18%), Θετικά=41/91 (45%), Κενά=0/91 (0%)

Κύκλος: αν η αλληλουχία δεν έχει στατιστικά σημαντική ομοιότητα με κάποια άλλη αλληλουχία στη βάση δεδομένων, η σελίδα αποτελεσμάτων είναι πολύ σύντομη και μας ενημερώνει ότι δε βρέθηκε κάποια παρόμοια αλληλουχία.

Βαθμολογία: κατά τη στοίχιση αλληλουχιών στο ταίριασμα θέσεων ή χαρακτήρων αποδίδεται μια βαθμολογία. Οι βαθμολογίες για όλα τα δυνατά ζεύγη αμινοξικών καταλοίπων σε συνδυασμό με κάποιους κανόνες για τις ποινές εισαγωγής κενών αποτελούν ένα σύστημα βαθμονόμησης των στοίχισεων με βάση το οποίο προκύπτει μια τελική βαθμολογία για κάθε δυνατή στοίχιση.

E-value (expected value): είναι η τιμή - E ενός αναμενόμενου αποτελέσματος x που αντιπροσωπεύει τις φορές που θα περιμέναμε να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα x τυχαία. Όσο πλησιάζει η τιμή του E-value στο μηδέν, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα η εξεταζόμενη στοίχιση να μην προκύψει κατά τύχη [117].

Μέθοδος: είναι το σύστημα βαθμονόμησης με το οποίο αλλάζονται οι ρυθμίσεις για τα πρόστιμα που δίνει ο αλγόριθμος στη μη ταύτιση, καθώς και στην εισαγωγή και προέκταση κάποιου κενού. Ωστόσο, συνήθως χρησιμοποιούνται περισσότερα σύνθετα συστήματα βαθμονόμησης και η βαθμολογία για το ταίριασμα δυο χαρακτήρων δίνεται στους λεγόμενους πίνακες αντικατάστασης, τετραγωνικούς πίνακες με 20 σειρές και στήλες στην περίπτωση των αμινοξέων [118]

Ταυτοσημίες: είναι το ποσοστό ταύτισης και ομοιότητας ανάμεσα στα συγκεκριμένα κομμάτια των αλληλουχιών. Βάσει αυτών των ταυτίσεων και ομοιοτήτων υπολογίζεται η βαθμολογία της κάθε στοίχισης καθώς και το πόσο στατιστικά σημαντική είναι.

Θετικά: ο αλγόριθμος ψάχνει αρχικά για μια πολύ καλή στοίχιση σε μια σχετικά μικρή περιοχή και μετά προσπαθεί να επεκτείνει το μήκος της μερικής αυτής στοίχισης, ώστε να καλύψει το σύνολο της αλληλουχίας. Μόλις ο αλγόριθμος βρεί μια όμοια λέξη ή υποακολουθία, τότε αυτόματα επεκτείνει την ευθυγράμμιση και προς τις δυο κατευθύνσεις μέχρι το σκόρ ευθυγράμμισης να πέσει κάτω από ένα όριο που δίνει ο χρήστης. Η επιλογή του παραπάνω ορίου είναι πολύ σημαντική καθώς καθορίζει πόσο πιθανό είναι τα αποτελέσματα μιας ανάζητησης να είναι βιολογικά συγγενή (θετικά).

Κενά: τα κενά σε έναν αλγόριθμο στοίχισης συνήθως προστίθενται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιείται το ταίριασμα όμοιων ή παρόμοιων χαρακτήρων στα επόμενα ή προηγούμενα τμήματα της στοίχισης.

Παράρτημα Β

Σχήμα Β1: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία μέσω της *CLUSTAL W* [46].

```
HrpAPantoea      ---MSGLLTGLMGLGGPLSSATSFASKTLEGAM-SDSMAESAVAQAAMK-----ID 48
HrpAerwinia      ---MA-----GSSLTSASTSASKTLESAM-GQSLTESANAQASKMK-----MD 39
NopA              ---MSKIG---TLTSAVGAGAAAQQNVAAKGA-GAAAFQAQIAELAASV-----AE 44
HrpAXanth         MQIFPEVS---SWRSRVGQGMDCFTGGLSNGISGAAALSGANGQMSLLGD---MSASD 53
HrpAPseudomonas  MNIMSSLTNAGRGVVNTVVG-GAAQGINSVKSSADRNIALTKNTGSTDSIDATRSSISKGD 59
HrpY              ---MAGVP---KPNTTNTTSTTSTFQSFANGVDDAASRTGFQAQYQAIT-----AQ 45
                ::                :                :

HrpAPantoea      TQNSILDGKMDSATKEINS-----GHNAAKAIQF----- 77
HrpAerwinia      TQNSILDGKMDSASKSINS-----GHNAAKAIQF----- 68
NopA              ATARSML--LRTVTTELQT-----TKKAADERVQ----- 71
HrpAXanth         EAQKSMNNKITMLKNDLDFNVALNKFIFKAGDNAKQLVGG----- 93
HrpAPseudomonas  AKSAELDGTANEENGLLRETSMLAGFEDKKEALSNQIVASKIRNSVVQF 108
HrpY              GQQDMLD--AAKMQNALNRTOMLAKLMEAGPKAAKDLIS----- 82
                :                :
```

Σχήμα Β2: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία της οικογένειας *Hrc1* μέσω της *CLUSTAL W* [46].

```
HrpAPantoea      -----MSGLLTGLM--GLGGPLS---SATSFASKTLEGAMSDSMAESAVAQAAMK-KIDT 49
HrpAerwinia      -----MA-----GSSLT---SASTSASKTLESAMGQSLTESANAQASKM-KMDT 40
HrpAPseudomonas  MNIMSSLTNAGRGVVNTVVGAAQGINSVKSSADRNIALTKNTGSTDSIDATRSSISKGDA 60
                ::                * ..                * .. : * .. : : * .. : * .. : * .. :

HrpAPantoea      QNSILDGKMDSAT-----KEINSGHNAK-----AIQF 77
HrpAerwinia      QNSILDGKMDSAS-----KINSGHNAK-----AIQF 68
HrpAPseudomonas  KSAELDGTANEENGLLRETSMLAGFEDKKEALSNQIVASKIRNSVVQF 108
                : : * * * : : : : : * * * : : * * * : : * * * : : * * *
```

Σχήμα Β3: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία της οικογένειας *Hrc2* μέσω της *CLUSTAL W* [46].

```
HrpY              MAGVPKPN--TTNTTSTTSTFQSFANGVDDAASRTGFQAQYQAIT-----AQGQQDMLD 52
HrpAXanth         MQIFPEVSSWRSRVGVGQGMDCFTGGLSNGISGAAALSGANGQMSLLGDMSASDEAQKSMN 60
                * * * : : : : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : :

HrpY              --AAKMQNALNRTOMLAKLMEAGPKAAKDLIS- 82
HrpAXanth         NKITMLKNDLDFNVALNKFIFKAGDNAKQLVGG 93
                : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : : * * * : :
```

Σχήμα Β4: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία μέσω της *CLUSTAL W* [46].

```
AscF              -----MADYFT-----YTDKN 11
PscF              -----MAQIFN-----PNP-- 9
YscF              -----MSNFSG-----FTKGTD 12
YscFenter        -----MSNFSG-----FAKGTD 12
LscF              -----MPSKQQSQYLTTQQKETIMAQIFTSATT 27
VP1694           -----MS-FYD-----ATN 8
BPSS1548         -----MSNPPTP-----LLADYEW 14
BsaL              -----MSNPPTP-----LLADYEW 14
ErpI              -----MAD--W 4
PrgI              -----MATP-----WSG-- 7
MxiH              -----MSVT-----VPDK-- 8
SG0558           -----MSDLR-----AWNGN-- 10
SseB              ---MSSGNILWGSQNPVFKNSFGVSNADTGSQDDLQQNPFAEGYGVLLILLMVIQAI 57
SseBCT18         ---MSSGNILWGSQNPVFKNSFGVSNADTGSQDDLQQNPFAEGYGVLLILLMVIQAI 57
EseB              ---MTVNTDYHGGVNHVGN----GYDNNLDRMAGQGDSDIMSISVLYQFMTLFTDLA 52
CV2583           ---MSSINAQGGVQVPASITTDVIDNDHIEYLRARARNYSLLGQAIATMEEVMLLFTELS 56
EspA             MDTSNATSVVNVSASSSTIYDLGNMSKDEVVKLFEELGVFQAAILMFSYMYQAQSNLS 60
BscF              -----MAINLG-----GDAG 10

AscF              SNTLDQVANSLSGQ--ANDANTEVNAKAEAMK-----TNPDPNALLAELQH----- 55
PscF              GNTLDTVANALKEQ--ANAANKDVNDAIKALQG--T-DNADNPALLAELQH----- 55
YscF              IADLDAVAQTLKPK--ADDANKAVNDSIAALK-----DKPDNPALLADLQH----- 56
YscFenter        ITDLDAVAQTLKPK--ADDANKAVNDSIAALK-----DTPDNPALLADLQH----- 56
```

LscF VNTLDKVDQLKKQ--ADTANSVNDAITALK-----DGPDPNALLADLQH----- 71
 VP1694 SVNLDLVKTKLEQQ--AKDANKSVTDAIKNLE-----TNADDPKLAELQH----- 52
 BPSS1548 SGYLTGIGRAFDDG--VKDLNKQLQDAQANLT-----KNPSDPTALANYQM----- 58
 BsaL SGYLTGIGRAFDDG--VKDLNKQLQDAQANLT-----KNPSDPTALANYQM----- 58
 Erpl NGYIMDISKQFDQG--VDDLNQVVEKALEDLA-----TNPSDPKFLAEYQS----- 48
 Prgl --YLDVSAKFDTG--VDNLQTVTEALDKLA-----AKPSDPALLAAYQS----- 49
 MxiH DWTLSLSETFDDG--TQLQGQLTSALNALA-----ENPSNPQLLAEYQS----- 52
 SG0558 GWFIDDIKDFDTG--AQTMMEQLETARKALS-----DAPDNPSVLAEFQA----- 54
 SseB NNKFIEVQKNAERARNTQEKSNEMDEVIKAAKGAKEEVPEDVIKYMIRDNGI---- 112
 SseBCT18 NNKFIEVQKNAERARNTQEKSNEMDEVIKAAKGAKEEVPEDVIKYMIRDNGI---- 112
 EseB QGKYDQMKAKADRARNSSQVANQIDAIKFKKAG--DKGDLPEVLYKLRDHNINITY 109
 CV2583 NAKFAQMSKKMEVSRDAQEMANKVEAVLAGITDPK--DTKKLPQDVLVLYK----- 105
 EspA IAKFADMNEASKASTTAQKMANLVDAKIADVQSSTDKNAKAKLPQDVIDYIND----- 113
 BscF RVTMQSVNQAVNTR--LNAHERDLRSRLEALSARG--DGAVSTSDLLIVQQ----- 57

AscF -----KINKWSVIYNINS--TVTR-AMKDLMQGILQKI----- 85
 PscF -----KINKWSVIYNINS--TVTR-ALRDLMQGILQKI----- 85
 YscF -----SINKWSVIYNINS--TIVR-SMKDLMQGILQKFP----- 87
 YscFenter -----SINKWSVIYNMSS--TIVR-SMKDLMQGILQKFP----- 87
 LscF -----KINKWSVIYNINS--TVTR-SMKDLMQGILQKI----- 101
 VP1694 -----AINKWSVVYNINA--TTTR-AIKDVMQSILQKV----- 82
 BPSS1548 -----IMSEYNLYRNAQS--SAVK-SMKDIDSSIVSNFR----- 89
 BsaL -----IMSEYNLYRNAQS--SAVK-SMKDIDSSILEHHHHHH----- 92
 Erpl -----ALAEYTYLYRNAQS--NVVK-AYKDLDIAIQNFR----- 79
 Prgl -----KLSEYNLYRNAQS--NTVK-VFKDIDAAIQNFR----- 80
 MxiH -----KLSEYTYLYRNAQS--NTVK-VIKDVDAAIQNFR----- 83
 SG0558 -----KLSEYTLFRNAQS--STVK-TFKDIGAAIQNFR----- 85
 SseB ---LIDGMTIDDYMAKYGDHG--KLDKGGQLQAIAALDNDANRNTDLMSSQGQITIQKMS 166
 SseBCT18 ---LIDGMTIDDYMAKYGDHG--KLDKGGQLQAIAALDNDANRNTDLMSSQGQITIQKMS 166
 EseB QDDGKNATSDIDQYLKSIHPDQKGLDKGELDVIKGALETDSGRSSDFVTQAQLQIKTM 169
 CV2583 -----ANGISVDSVENLEGLDLSQADLTAVKSALESFSGRASDFVQSSQLKMQQLI 155
 EspA -----PRNDISVTGIRDLSGDLSAGDLQTVKAAISAKANNLTVVNNSQLEIQKMS 164
 BscF -----EMQSWVMIDLQS--TVVK-QVADSLKGVQKAS----- 88

AscF -----
 PscF -----
 YscF -----
 YscFenter -----
 LscF -----
 VP1694 -----
 BPSS1548 -----
 BsaL -----
 Erpl -----
 Prgl -----
 MxiH -----
 SG0558 -----
 SseB QELNAVLTQLTGLISKWGEISSMIAQKTYS 196
 SseBCT18 QELNAVLTQLTGLISKWGEISSMIAQKTYS 196
 EseB QSYNVCVSLINSMQTLLEAMNKSIQAIR- 198
 CV2583 QNFNTAVTMANSLQSMNAESTKSIQAIR- 184
 EspA NTLNLLTSARSDVQSLQYRTISAIKSLGK-- 192
 BscF -----

Σχήμα Β5: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκκριτικού συστήματος τρία της οικογένειας Ysc μέσω της CLUSTAL W [46].

LscF MPKSKQSQYLTQQKETIMAQIFTSATTVNTLDKVDQLKKQADTANSVNDAITALK--- 57
 YscF -----MSNFSG-----FTKGTDIADLDAVAQTLKPPADDANKAVNDSIAALK--- 42
 AscF -----MADYFT-----YTDK-NSNTLDQVASNLSGQANDANTEVKNKAIKAMK--- 41
 PscF -----MAQIFN-----PNPGNTLDTVANALKEQANAANKDVNDAIKALQGT- 41
 VP1694 -----MS-FYD-----ATNSVNLDDVKTLEQQAKDANKSVTDAIKNLE--- 38
 BscF -----MAINLG-----GDAGRVTMQSVNQAVNTRLNAHERDLRSRLEALSARG 43

LscF DGPDPNALLADLQHKINKWSVIYNINSTVTRSMKDLMQGILQKI- 101
 YscF DKPDPNALLADLQHSINKWSVIYNINSTIVRSMKDLMQGILQKFP 87
 AscF TNPDPNALLAELQHKINKWSVIYNINSTVTRAMKDLMQGILQKI- 85

```
PscF          DNADNPALLAELQHAIKNSVYININSTVTRALRDLMQGILQKI- 85
VP1694        TNADDP SKLAELQHAIKNSVYININATTTRAIKDVMQSILQKV- 82
BscF          DGVASTSDDLIVQEQEMQSVWMIDLQSTVVKQVADSLKGVIOKAS 88
               . . . . *   :*   : . . . *   *   : . . . . *   . :   : *   : . . . : *
```

Σχήμα Β6: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία της οικογένειας *Ssa-Esc* μέσω της CLUSTAL W [46].

```
SseB          MSSGNILWGSQNPVIFKNSFGVSNADTGSQDLSQQNPF AEGYGVLLILLMVIQAIANN- 59
SseBCT18      MSSGNILWGSQNPVIFKNSFGVSNADTGSQDLSQQNPF AEGYGVLLILLMVIQAIANN- 59
EseB          MTVNTDYHGGVN-HVGANGYDNNLDRMAGQGD-----IMSDGISVLVYQFMTLFTDLAQQ- 54
CV2583        -MSSINAQGGVQPASITTDDEVIDNDHIEYLRAARNYSL LGQAIATMEEVMLLFTELSNA- 58
EspA          MDTSNATSVVNV SASSTSTIYDLGNMSKDEVVKKLFEE LGVFQAAILMFSYMYQAQSNLS 60
               . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .

SseB          --KFIEVQKNAERARNTQEKSNE MDEVIAKAAKG-DAKTKEEVPEDEVIKYMRD--NGILI 114
SseBCT18      --KFIEVQKNAERARNTQEKSNE MDEVIAKAAKG-DAKTKEEVPEDEVIKYMRD--NGILI 114
EseB          --KYDQMKAKADRARNSQQVANQIDAI IAKFKK---AGDKGDLPEVLKYLRD--HNINI 107
CV2583        --KFAQMSKKMEVSRDAQEMANKVEAVLAGITD---PKDTKKLPQDVLVDYLKA--NGISV 111
EspA          IAKFADMNEASKASTTAQKMANLVDAKIADVQSSTDKNAKAKLPQDVVIDYINDPRNDISV 120
               * : . . . . . : * : * : * : . . . . * * : * : * : . : * :

SseB          DG-----MTIDDYMAKYG--DHGKLDKGG LQAIK AALDNDANRNTDLMSQGQITIQK 164
SseBCT18      DG-----MTIDDYMAKYG--DHGKLDKGG LQAIK AALDNDANRNTDLMSQGQITIQK 164
EseB          TVQDDGKNATSDIDQYLSIGHPDGKGLDKGELDVIKGALE TDSGRSSDFVTQAQLQIQK 167
CV2583        DS-----VEN-----LEGLSQADLTAVKSALESFSGRASDFVQSQSLKMQQ 153
EspA          TG-----IRD-----LSGDL SAGDLQTVKAAISA KANLTTVVNNSQLEIQQ 162
               : . . . . * * : * : * : . . . . : : . . : * : * : * :

SseB          MSQELNAVLTQLTGLISKWGEISSMIAQKTYS 196
SseBCT18      MSQELNAVLTQLTGLISKWGEISSMIAQKTYS 196
EseB          TMQSYNVCVSLINSMQTLLEAMNKSI AQNIR- 198
CV2583        LIQNFN TAVTMANS LQSMNAESTKSI AQAIR- 184
EspA          MSNTLNLLTSARSDVQSLQYRTISAI SLGK-- 192
               : * : . . . : . . . * :
```

Σχήμα Β7: Πολλαπλή στοίχιση των αντίστοιχων πρωτεϊνών της HrpA από ζωοπαθογόνα βακτήρια του εκκριτικού συστήματος τρία της οικογένειας *Inv-Mxi-Spa* μέσω της CLUSTAL W [46].

```
PrgI          MATP-----WSG----YLDDVSAKFD TGVDNLQTQVTEALDKLAAKPSDPALLAAY 47
MxiH          MSVT-----VPDKDW-TLSSLS ETFDDGTQTLQGLT SALNALAENPSNPQLLAEY 50
ErpI          MAD-----WNG----YIMDISKQFDQGVDDL NQQVEKALEDLATNP SDPKFLAEY 46
SG0558        MSDLRA-----WNGNGW-FIDDIAKDFDTGAQTMMEQLE TARKALSDAPDNPSVLAEF 52
BsaI          MSNPPTPL LADYEWG----YLTGIGRAFDDG VKDLNKQLQDAQANLTKNPSDPTALANY 56
YscFenter     MSNFSG-----FAKGTDI TDLDAVAQTLKKPADDANKAVNDSIAALKDTPDNPALLADL 54
               * : . . . : . . . . : . . . . . : : * * : * * **

PrgI          QSKLSEYNLYRNAQSNTVKVKFDIDAAI IQNFR--- 80
MxiH          QSKLSEYTLYRNAQSNTVKVIKD VDAAI IQNFR--- 83
ErpI          QSALAEYTLYRNAQSNVVKAYKDLDS AIIQNFR--- 79
SG0558        QAKLSEYTLFRNAQSSTVKTFKDIGA AIIQNFR--- 85
BsaI          QMIMSEYNLYRNAQSSAVKSMKDIDSS ILEHHHHHHH 92
YscFenter     QHSINKWSVIYNMSSIVRSMKDLMQG ILQKFP--- 87
               * : . . . . * * * * : ** : * : . . . .
```

Με κόκκινο χρώμα διακρίνονται τα μικρά υδρόφοβα αμινοξέα συμπεριλαμβανόμενου και του αρωματικού Υ, με μπλε τα όξινα, με πράσινο τα αμινοξέα που φέρουν υδροξυλομάδα ή αμιδίο καθώς και το βασικό Q, ενώ σε κίτρινο πλαίσιο τα βασικά. Με (:) συμβολίζεται η συντηρημένη περιοχή, με (.) συμβολίζεται η ημισυντηρημένη περιοχή και με (*) συμβολίζονται τα όμοια αμινοξέα.

Παράρτημα Γ

Πίνακας Γ1: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής όπως προκύπτουν από την ανάλυση των προγραμμάτων *SELCON3*, *CDSSTR* και *CONTIN/LL* για τη HrpAΔC8.

T(°C)	C(mg/ml)	pH	Method	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd	RMSD	NRMSD
2	0.08	5.5	<i>SELCON3</i>	0	0	0	0	0.4	0.63	0.25	0.17
			<i>CDSSTR</i>	0	0.02	0.24	0.12	0.23	0.36	0.16	0.11
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.06	0.24	0.12	0.21	0.36	0.1	0.07
			<i>SELCON3</i>	0.02	0.08	0.22	0.11	0.21	0.34	0.39	0.28

12	0.08	5.5	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.02	0.22	0.13	0.26	0.36	0.26	0.19
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.07	0.24	0.12	0.21	0.36	0.08	0.06
			<i>SELCON3</i>	0	0.04	0.28	0.14	0.21	0.33	0.05	0.36
60	0.08	5.5	<i>CDSSTR</i>								
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.04	0.28	0.14	0.21	0.33	0.05	0.36
			<i>SELCON3</i>	0.02	0.08	0.22	0.12	0.21	0.35	0.63	0.62
2	0.16	5.5	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.03	0.25	0.13	0.24	0.32	0.2	0.2
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.06	0.24	0.13	0.22	0.36	0.06	0.06
			<i>SELCON3</i>	0	0.05	0.25	0.13	0.22	0.35	0.06	0.06
12	0.16	5.5	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.02	0.21	0.12	0.23	0.4	0.15	0.16
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.25	0.13	0.22	0.35	0.06	0.06
			<i>SELCON3</i>	0	0.03	0.22	0.13	0.26	0.36	0.1	0.13
60	0.16	5.5	<i>CDSSTR</i>	0	0.03	0.22	0.13	0.26	0.36	0.1	0.13
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.25	0.13	0.22	0.35	0.06	0.08
			<i>SELCON3</i>	0	0.04	0.25	0.14	0.19	0.38	0.16	0.14
4	0.05	5.5	<i>CDSSTR</i>	0	0	0.31	0.16	0.21	0.33	0.29	0.25
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.04	0.25	0.14	0.19	0.38	0.16	0.14
			<i>SELCON3</i>	0	0	0.04	0.08	0.3	0.58	0.34	0.46
90	0.05	5.5	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.01	0.29	0.15	0.25	0.3	0.15	0.2
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.04	0.26	0.13	0.22	0.35	0.14	0.19
			<i>SELCON3</i>	0.01	0.07	0.15	0.09	0.23	0.4	0.62	0.41
4af	0.05	5.5	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.02	0.24	0.14	0.24	0.35	0.32	0.22
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.25	0.13	0.2	0.37	0.12	0.08
			<i>SELCON3</i>	0.01	0.01	0.23	0.11	0.22	0.4	0.18	0.15
12	0.16	8	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.01	0.23	0.11	0.22	0.4	0.18	0.15
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.25	0.13	0.21	0.35	0.07	0.05
			<i>SELCON3</i>	0.04	0.07	0.17	0.1	0.2	0.33	1.85	0.99
12	0.08	8	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.02	0.25	0.13	0.22	0.37	0.31	0.16
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.06	0.23	0.13	0.22	0.36	0.1	0.05
			<i>SELCON3</i>	0	0.05	0.28	0.14	0.21	0.33	0.56	0.42
60	0.08	8	<i>CDSSTR</i>	0	0.03	0.26	0.13	0.25	0.32	0.24	0.18
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.06	0.25	0.12	0.23	0.34	0.1	0.08
			<i>SELCON3</i>	0	0.05	0.21	0.13	0.25	0.34	1.18	0.58
12af	0.08	8	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.02	0.24	0.13	0.23	0.37	0.23	0.11
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.06	0.21	0.12	0.22	0.38	0.11	0.05

T(°C): Θερμοκρασία, C(mg/ml): Συγκέντρωση, H(r): Τακτική α-έλικα, H(d): Παραμορφωμένη α-έλικα, S(r): Τακτικός β-κλώνος, S(d): Παραμορφωμένος β-κλώνος, T: Στροφή, U: τυχαίο σπειράμα. RMSD: Μέση Τετραγωνική Ρίζα Απόκλισης του ανασυσταμένου φάσματος από το πειραματικό, 4af: αντιστοιχεί στο φάσμα των 4°C που πάρθηκε μετά τους 90°C, 12af: αντιστοιχεί στο φάσμα των 12°C που πάρθηκε μετά τους 60°C.

Πίνακας Γ2: Ποσοστά δευτεροταγούς δομής όπως προκύπτουν από την ανάλυση των προγραμμάτων *SELCON3*, *CDSSTR* και *CONTIN/LL* για τη HrpAΔC18.

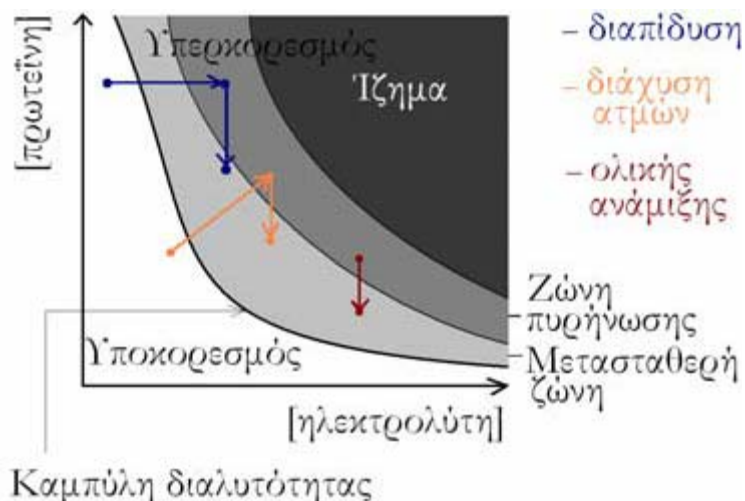
T(0C)	C(mg/ml)	pH	Method	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd	RMSD	NRMSD
			<i>SELCON3</i>	0.03	0.04	0.09	0.09	0.27	0.47	0.8	0.37
2	0.07	5.5	<i>CDSSTR</i>	0	0.02	0.21	0.13	0.25	0.38	0.25	0.11
			<i>CONTIN/LL</i>	0.01	0.06	0.17	0.11	0.23	0.43	0.22	0.1

			SELCON3	0.03	0.1	0.22	0.12	0.21	0.32	0.62	0.35
4	0.07	5.5	CDSSTR	0.01	0.03	0.24	0.13	0.22	0.36	0.31	0.18
			CONTIN/LL	0	0.06	0.22	0.13	0.22	0.37	0.17	0.1
			SELCON3	0.01	0.03	0.22	0.12	0.25	0.36	0.18	0.1
60	0.07	5.5	CDSSTR	0.01	0.03	0.22	0.12	0.25	0.36	0.18	0.1
			CONTIN/LL	0.01	0.07	0.21	0.12	0.27	0.32	0.12	0.07
			SELCON3	0.03	0.08	0.18	0.1	0.2	0.34	0.22	0.17
90	0.07	5.5	CDSSTR	0.02	0.03	0.25	0.13	0.25	0.31	0.14	0.11
			CONTIN/LL	0.01	0.07	0.21	0.12	0.27	0.34	0.16	0.12
			SELCON3	0.01	0.07	0.19	0.11	0.22	0.36	0.65	0.35
4af	0.07	5.5	CDSSTR	0.01	0.03	0.24	0.12	0.23	0.37	0.25	0.13
			CONTIN/LL	0	0.06	0.21	0.12	0.22	0.38	0.18	0.1
			SELCON3	0.01	0.03	0.23	0.12	0.24	0.38	0.31	0.15
2af	0.07	5.5	CDSSTR	0.01	0.03	0.23	0.12	0.24	0.38	0.31	0.15
			CONTIN/LL	0.02	0.07	0.2	0.12	0.22	0.38	0.22	0.1
<hr/>											
			SELCON3	0.01	0.06	0.25	0.15	0.28	0.26	0.85	0.49
2	0.07	8	CDSSTR	0.01	0.01	0.25	0.13	0.23	0.37	0.24	0.14
			CONTIN/LL	0	0.06	0.2	0.13	0.22	0.39	0.13	0.07
			SELCON3	0.01	0.01	0.09	0.12	0.28	0.47	0.48	0.29
4	0.07	8	CDSSTR	0.01	0.01	0.26	0.13	0.23	0.35	0.31	0.18
			CONTIN/LL	0	0.06	0.2	0.13	0.22	0.39	0.11	0.06
			SELCON3	0	0.06	0.24	0.12	0.21	0.33	0.46	0.36
60	0.07	8	CDSSTR	0.01	0.03	0.26	0.13	0.23	0.34	0.23	0.18
			CONTIN/LL	0	0.06	0.24	0.13	0.22	0.35	0.1	0.08
			SELCON3	0	0.08	0.23	0.12	0.21	0.35	0.4	0.3
90	0.07	8	CDSSTR	0	0.03	0.25	0.13	0.24	0.35	0.17	0.13
			CONTIN/LL	0	0.07	0.23	0.12	0.24	0.34	0.13	0.1
			SELCON3	0.05	0.08	0.17	0.12	0.19	0.35	0.19	0.1
4af	0.07	8	CDSSTR	0.01	0.01	0.24	0.13	0.23	0.38	0.29	0.15
			CONTIN/LL	0	0.06	0.2	0.13	0.22	0.39	0.12	0.06
			SELCON3	0.04	0.07	0.14	0.11	0.21	0.38	0.56	0.27
2af	0.07	8	CDSSTR	0.01	0.02	0.23	0.13	0.25	0.38	0.25	0.12
			CONTIN/LL	0	0.07	0.18	0.12	0.23	0.41	0.14	
<hr/>											
			SELCON3	0.02	0.01	0.06	0.07	0.29	0.53	0.5	0.27
2	0.13	5.5	CDSSTR	0.01	0.02	0.22	0.13	0.25	0.37	0.22	0.12
			CONTIN/LL	0	0.07	0.22	0.12	0.23	0.36	0.07	0.04
			SELCON3	0.06	0.1	0.18	0.12	0.24	0.3	1.03	0.55
4	0.13	5.5	CDSSTR	0.01	0.02	0.22	0.13	0.24	0.38	0.27	0.14
			CONTIN/LL	0	0.07	0.22	0.12	0.23	0.36	0.08	0.04
			SELCON3	0.05	0.12	0.15	0.1	0.22	0.34	0.26	0.18
60	0.13	5.5	CDSSTR	0	0.04	0.23	0.13	0.25	0.35	0.15	0.1
			CONTIN/LL	0	0.1	0.15	0.12	0.27	0.37	0.1	0.07
			SELCON3	0.01	0.04	0.2	0.12	0.25	0.37	0.15	0.11
90	0.13	5.5	CDSSTR	0.01	0.04	0.2	0.12	0.25	0.37	0.15	0.11
			CONTIN/LL	0.03	0.09	0.14	0.12	0.27	0.35	0.06	0.04
			SELCON3	0.04	0.07	0.19	0.11	0.22	0.34	1.86	1
4af	0.13	5.5	CDSSTR	0.01	0.03	0.23	0.12	0.23	0.39	0.21	0.11
			CONTIN/LL	0	0.07	0.2	0.12	0.24	0.37	0.08	0.04
			SELCON3	0.04	0.06	0.19	0.11	0.22	0.34	1.88	1
2af	0.13	5.5	CDSSTR	0.01	0.02	0.24	0.12	0.22	0.38	0.19	0.1
			CONTIN/LL	0	0.07	0.21	0.13	0.24	0.36	0.09	0.05
<hr/>											
			SELCON3	0	0.03	0.19	0.11	0.31	0.3	391	0.43
2	0.13	8	CDSSTR	0	0.03	0.19	0.11	0.31	0.3	391	0.43

			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.04	0.25	0.14	0.22	0.35	0.08	0.09
			<i>SELCON3</i>	0	0.02	0.23	0.13	0.28	0.3	0.15	0.16
4	0.13	8	<i>CDSSTR</i>	0	0.02	0.23	0.13	0.28	0.3	0.15	0.16
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.24	0.13	0.22	0.35	0.08	0.09
			<i>SELCON3</i>	0.01	0.02	0.29	0.16	0.19	0.34	0.41	0.54
60	0.13	8	<i>CDSSTR</i>	0	0.04	0.21	0.14	0.28	0.32	0.29	0.38
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.26	0.14	0.21	0.34	0.06	0.08
			<i>SELCON3</i>	0	0.03	0.23	0.13	0.27	0.33	0.16	0.22
90	0.13	8	<i>CDSSTR</i>	0	0.03	0.23	0.13	0.27	0.33	0.16	0.22
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.04	0.25	0.14	0.24	0.33	0.06	0.08
			<i>SELCON3</i>	0.02	0.07	0.29	0.14	0.2	0.26	0.21	0.21
4af	0.13	8	<i>CDSSTR</i>	0.02	0.07	0.29	0.14	0.2	0.26	0.21	0.21
			<i>CONTIN/LL</i>	0	0.05	0.25	0.14	0.22	0.34	0.08	0.08
			<i>SELCON3</i>	0.01	0.03	0.26	0.13	0.27	0.3	0.66	0.63
2af	0.13	8	<i>CDSSTR</i>	0.01	0.03	0.26	0.13	0.27	0.3	0.66	0.63
			<i>CONTIN/LL</i>	0.01	0.03	0.26	0.13	0.27	0.3	0.66	0.63

T(°C): Θερμοκρασία, C(mg/ml): Συγκέντρωση, H(r): Τακτική α-έλικα, H(d): Παραμορφωμένη α-έλικα, S(r): Τακτικός β-κλώνος, S(d): Παραμορφωμένος β-κλώνος, T: Στροφή, U: τυχαίο σπείραμα. RMSD: Μέση Τετραγωνική Ρίζα Απόκλισης του ανασυσταμένου φάσματος από το πειραματικό, 4af: αντιστοιχεί στο φάσμα των 4°C που πάρθηκε μετά τους 90°C, 2af: αντιστοιχεί στο φάσμα των 2°C που πάρθηκε μετά τους 90°C.

Παράρτημα Δ



Σχήμα Δ1: Διάγραμμα φάσης μιας πρωτεΐνης, με μεταβλητές την συγκέντρωση της στο διάλυμα και την συγκέντρωση ενός ηλεκτρολύτη (το σχεδιάγραμμα αναπαράχθηκε από την διδακτορική διατριβή του Γ. Παπανικολάου, 1995).

Στο Σχήμα Δ1 παρουσιάζεται το διάγραμμα φάσης μιας πρωτεΐνης, με μεταβλητές την συγκέντρωση της στο διάλυμα και την συγκέντρωση ενός ηλεκτρολύτη. Όλοι οι άλλοι παράγοντες παραμένουν σταθεροί. Η έντονη μαύρη καμπύλη αποτελεί την καμπύλη διαλυτότητας της πρωτεΐνης. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων κρυστάλλωσης βασίζεται στην εύρεση της ζώνης πυρήνωσης και εν συνεχεία στην μετακίνηση στην μετασταθερή ζώνη και την παραμονή σε αυτήν. Η παραμονή στην ζώνη πυρήνωσης είναι ασύμφορη γιατί δεν ευνοείται η δημιουργία μεγάλων κρυστάλλων καθώς το βιομόριο μοιράζεται σε έναν υψηλό αριθμό κρυστάλλων που καταλήγουν να είναι μικρότεροι σε όγκο. Ανάλογα την μέθοδο κρυστάλλωσης διαγράφονται διαφορετικές πορείες στο διάγραμμα φάσης. Σε ένα επιτυχές πείραμα διαπίδυσης (μπλε χρώμα) αυξάνεται η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη ώστε να επιτευχθεί ο υπερκορεσμός, αν ο υπερκορεσμός στο πείραμα συναντήσει την ζώνη πυρήνωσης τότε θα σχηματιστούν οι πρώτοι κρυσταλλικοί πυρήνες. Αν όμως ο υπερκορεσμός είναι αρκετά υψηλότερος τότε η πρωτεΐνη θα κατακρημνιστεί σε άμορφο ίζημα. Στην πρώτη περίπτωση η δημιουργία αρχικών πυρήνων κρυστάλλωσης θα μειώσουν την συγκέντρωση της διαλυτής πρωτεΐνης. Αν η μείωση είναι τέτοια ώστε η πρωτεΐνη να βρεθεί στην μετασταθερή ζώνη οι αρχικοί πυρήνες θα μεγαλώσουν και θα δώσουν κρυστάλλους ειδάλως αν η μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης είναι τόση ώστε να βρεθεί στην διαλυτή περιοχή (υποκορεσμός) οι αρχικοί πυρήνες θα διαλυθούν. Σε ένα πείραμα διάχυσης ατμών ή εξάτμισης (με πορτοκαλί χρώμα) συμβαίνουν τα ίδια πράγματα εκτός του ότι κατά την αρχική μετάβαση εκτός από την συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη θα αυξηθεί και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Σε ένα πείραμα ολικής ανάμιξης (κόκκινο χρώμα) η κατάσταση είναι απλούστερη. Η πρωτεΐνη θα πρέπει να βρεθεί εξ' αρχής στην ζώνη πυρήνωσης και με την μείωση της συγκέντρωσης της να πέσει στην μετασταθερή περιοχή. Σε δύσκολα «κρυσταλλώσιμες» πρωτεΐνες η ζώνη πυρήνωσης μπορεί να είναι μία εξαιρετικά μικρή ως και ανύπαρκτη περιοχή του πολυπαραμετρικού χώρου ώστε να μην μπορεί να προσεγγιστεί.

Η συνθήκη στην οποία παρατηρήθηκαν οι πρώτοι θύσανοι της HrpADC8 πρωτεΐνης ήταν 0,2 M CaCl₂, 20 % v/v ισοπροπανόλη, 0,1 M οξικό νάτριο pH 4,6 (Hampton Crystal Screen I) στους 291 K, με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας. Οι θύσανοι στο διάγραμμα φάσεων βρίσκονται μεταξύ της ζώνης πυρήνωσης και της ζώνης κατακρημνισής. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αρχική συνθήκη γίνεται ένα πρώτο πείραμα μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της ισοπροπανόλης και το pH (Πίνακας Δ1), ενώ παράλληλα γίνεται και δεύτερο πείραμα μεταβάλλοντας τη συγκέντρωση της ισοπροπανόλης και του CaCl₂ (Πίνακας Δ2) γύρω από την αρχική συνθήκη. Στόχος ήταν να δούμε αν γίνεται επανάληψη της αρχικής συνθήκης με εργαστηριακά διαλύματα καθώς και να ελέγξουμε μια μικρή περιοχή γύρω από την αρχική συνθήκη. Αξίζει να σημειωθεί ότι θα έπρεπε να πραγματοποιηθούν πειράματα κρυστάλλωσης σε μεγαλύτερο εύρος pH (3-9) και συγκέντρωσης ισοπροπανόλης ώστε να υπάρχει μια γενικότερη εικόνα γύρω από την αρχική συνθήκη. Η θερμοκρασία στην οποία γίνονται τα πειράματα κρυστάλλωσης είναι 291 K και όπου

αλλάζει αναγράφεται ανά πείραμα. Επίσης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προς κρυστάλλωση ήταν 6 mg/ml (έγιναν πειράματα και με μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης αλλά το αποτέλεσμα ήταν άμορφα ιζήματα).

Πίνακας Δ1: Μεταβολή του pH του $0,1 \text{ M}$ οξικού νατρίου με βήμα $0,2 \text{ pH units}$ (A-D) και της συγκέντρωσης της ισοπροπανόλης με βήμα $2\% \text{ v/v units}$ (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση CaCl_2 $0,2 \text{ M}$.

	16%	18%	20%	22%	24%	30%
4,40	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,60	B1	B2	B3	B4	B5	B6
4,80	C1	C2	C3	C4	C5	C6
5,00	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Πίνακας Δ2: Μεταβολή της συγκέντρωσης του CaCl_2 με βήμα $0,1 \text{ M}$ (A-D) και της ισοπροπανόλης με βήμα $2\% \text{ v/v units}$ (1-6) υπό σταθερό pH $4,6$ του $0,1 \text{ M}$ οξικού νατρίου.

	16%	18%	20%	22%	24%	30%
0,00	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,10	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0,20	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,30	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Οι συνθήκες B3 (Πίνακας Δ1) και C3 (Πίνακας Δ2) είναι επανάληψη της αρχικής συνθήκης, όπου παρατηρείται το ίδιο αποτέλεσμα. Θύσανοι παρατηρούνται επίσης και σε δυο νέες συνθήκες B3, B4 (Πίνακας Δ2) οπότε πραγματοποιούνται πειράματα κρυστάλλωσης βάσει αυτών των δύο συνθηκών. Υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης $22\% \text{ v/v}$ μεταβάλλεται η συγκέντρωση του CaCl_2 με εύρος $0,02\text{-}0,12 \text{ M}$ και το εύρος του pH $4,2\text{-}8,9$ με διαφορετικά διαθέσιμα ρυθμιστικά διαλύματα (Πίνακες Δ3, Δ4, Δ5). Αυτό που παρατηρείται είναι ότι μόνο σε χαμηλές τιμές pH εμφανίζονται θύσανοι και μάλιστα σε συγκέντρωση CaCl_2 $0,06\text{-}0,08 \text{ M}$ στις συνθήκες A3, A4, B3, C5 (Πίνακας Δ3) είναι ξεκάθαροι και καλοσχηματισμένοι θύσανοι. Η συνθήκη C5 είναι επανάληψη της B4 (Πίνακας Δ2).

Πίνακας Δ3: Μεταβολή του pH του $0,1 \text{ M}$ οξικού νατρίου με βήμα $0,2 \text{ pH units}$ (A-D) και της συγκέντρωσης του CaCl_2 με βήμα $0,02 \text{ M}$ (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση της ισοπροπανόλης $22\% \text{ v/v}$.

	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
4,20	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,40	B1	B2	B3	B4	B5	B6
4,60	C1	C2	C3	C4	C5	C6
4,80	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Πίνακας Δ4: Μεταβολή του pH $0,1 \text{ M}$ με διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα (A-D) και της συγκέντρωσης του CaCl_2 με βήμα $0,02 \text{ M}$ (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης $22\% \text{ v/v}$.

	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
N/Ac. 5,1	A1	A2	A3	A4	A5	A6
MES 5,8	B1	B2	B3	B4	B5	B6
BisTris6,4	C1	C2	C3	C4	C5	C6
MES 6,5	D1	D2	D3	D4	D5	D6

(N/Ac = NaAcetate)

Πίνακας Δ5: Μεταβολή του pH 0,1 M με διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα (A-D) και της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ με βήμα 0,02 M (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης 22% v/v.

	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
BisTris6,8	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Hepes7,5	B1	B2	B3	B4	B5	B6
BisTris8,3	C1	C2	C3	C4	C5	C6
BisTris8,9	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Παράλληλα ελέγχθηκε και η μεταβολή της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ σε μικρότερο εύρος 0,04-0,12 M (αφού παρατηρήθηκαν στον Πίνακα Δ2 θύσανοι σε συγκέντρωση 0,1 M, ενώ στον Πίνακα Δ3 παρατηρήθηκαν καλοσχηματισμένοι θύσανοι σε συγκέντρωση <0,1 M) ως προς τη μεταβολή συγκέντρωσης ισοπροπανόλης. Το αποτέλεσμα ήταν τα συσσωματώματα σε χαμηλή συγκέντρωση $CaCl_2$ και 22% v/v ισοπροπανόλης. Το επόμενο βήμα ήταν να μελετηθεί η μεταβολή της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ με το ίδιο εύρος ως προς τη μεταβολή του pH (Πίνακας Δ7). Στις περισσότερες συνθήκες παρατηρήθηκαν συσσωματώματα μικροκρυστάλλων με ίζημα πράγμα που σημαίνει ότι είμαστε πάλι στη περιοχή ανάμεσα στη ζώνη πυρήνωσης και κατακρήμνισης.

Πίνακας Δ6: Μεταβολή της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ με βήμα 0,02M (A-D) και της ισοπροπανόλης με βήμα 2% v/v units (1-6) υπό σταθερό pH 4,6 του 0,1 M οξικού νατρίου.

	18%	20%	22%	24%	26%	28%
0,04	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,06	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0,08	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,12	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Το επόμενο βήμα ήταν να επαναληφθούν τα πειράματα των Πινάκων Δ3, Δ6 αλλά σε χαμηλότερη θερμοκρασία για να δούμε πως η θερμοκρασία επηρεάζει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης (Πίνακες Δ7, Δ8). Συνήθως σε υψηλή ιοντική ισχύ οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές στην θερμοκρασία των 25°C παρά στην θερμοκρασία των 4°C. Σε αντίθεση σε χαμηλή ιοντική ισχύ η διαλυτότητα αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι η κινητική της κρυστάλλωσης είναι πιο αργή στους 4°C από ότι στους 18°C διότι δεν σχηματίστηκαν θύσανοι αλλά αρκετά συσσωματώματα μικροκρυστάλλων με πολύ ίζημα και σφαιρουλίτες. Θα έπρεπε να δοκιμαστούν και άλλες θερμοκρασίες κρυστάλλωσης αλλά δυστυχώς δεν υπήρχαν ειδικά διαμορφωμένοι χώροι υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία.

Πίνακας Δ7: Μεταβολή του pH του 0,1 M οξικού νατρίου με βήμα 0,2 pH units (A-D) και της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ με βήμα 0,02 M (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση της ισοπροπανόλης 22% v/v και 277 K.

	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
4,20	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,40	B1	B2	B3	B4	B5	B6
4,60	C1	C2	C3	C4	C5	C6
4,80	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Πίνακας Δ8: Μεταβολή της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ με βήμα 0,02M (A-D) και της ισοπροπανόλης με βήμα 2% v/v units (1-6) υπό σταθερό pH 4,6 του 0,1 M οξικού νατρίου και 277 K.

	18%	20%	22%	24%	26%	28%
0,04	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,06	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0,08	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,12	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πείραμα βάσει των Πινάκων Δ3, Δ6, μελετώντας τη μεταβολή της συγκέντρωσης ισοπροπανόλης σε χαμηλότερες τιμές ως προς τη μεταβολή του pH (Πίνακας Δ9). Παρατηρήθηκαν καλοσχηματισμένοι θύσανοι με καθαρό υπόβαθρο σε συγκέντρωση 6-8% v/v ισοπροπανόλης και σε pH 5,5 (συνθήκες D3, D4) ενώ σε ακόμη πιο χαμηλή συγκέντρωση ισοπροπανόλης παρατηρήθηκαν σφαιρουλίτες. Οπότε βάσει αυτού του πειράματος σχεδιάστηκε ένα άλλο στο οποίο μελετήθηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης του $CaCl_2$ σε μικρό εύρος ως προς την ίδια μεταβολή του pH , αλλά υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης 5% v/v (Πίνακας Δ10).

Πίνακας Δ9: Μεταβολή της συγκέντρωσης ισοπροπανόλης με βήμα 2% v/v units (1-6) και του pH 0,1 M οξικού νατρίου (A-D) με βήμα 0,5 pH units υπό σταθερή συγκέντρωση $CaCl_2$ 0,06M.

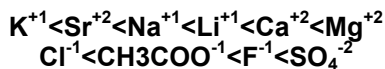
	2%	4%	6%	8%	10%	12%
4,00	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,50	B1	B2	B3	B4	B5	B6
5,00	C1	C2	C3	C4	C5	C6
5,50	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Σύμφωνα με τον Πίνακα Δ10, σε συγκέντρωση $CaCl_2$ 0,06-0,1 M εμφανίστηκαν συσσωματώματα κρυστάλλων και θύσανοι, ενώ όσον αφορά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (με εξαίρεση σε pH 5,0) εμφανίστηκαν σφαιρουλίτες. Επομένως, σχεδιάζεται νέο πείραμα με σταθερό pH 5,0, σταθερή τη συγκέντρωση ισοπροπανόλης 5% v/v , δοκιμάζοντας διαφορετικά αλάτια του Ca^{+2} και του Cl^{-1} καθώς και άλλα διαθέσιμα αλάτια στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης με τον Πίνακα Δ10 (Πίνακας Δ11, Δ12).

Πίνακας Δ10: Μεταβολή της συγκέντρωσης $CaCl_2$ με βήμα 0,02 M (1-6) και του pH 0,1 M οξικού νατρίου (A-D) με βήμα 0,5 pH units υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης 5% v/v .

	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
4,00	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,50	B1	B2	B3	B4	B5	B6
5,00	C1	C2	C3	C4	C5	C6
5,50	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Συγκρίνοντας τις συνθήκες του Πίνακα Δ10 με τις συνθήκες του Πίνακα Δ11 και Δ12 για το $CaCl_2$, παρατηρείται ότι υπάρχει επανάληψη. Επιπλέον, παρατηρούνται θύσανοι με ένα άλλο αλάτι, το $(CH_3COO)_2Ca$. Στα υπόλοιπα αλάτια παρατηρήθηκαν σφαιρουλίτες και σχηματισμός υμενίου. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί βάσει της ηλεκτραρνητικότητας των ιόντων η οποία σχετίζεται με την ικανότητα που έχουν τα αλάτια να κατακρημνίζουν την πρωτεΐνη.



Πίνακας Δ11: Μεταβολή της συγκέντρωσης αλατιού με βήμα 0,02 M (A-D) και είδος αλατιού (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης 5% v/v και σταθερό pH 5,0 0,1 M οξικού νατρίου.

	$CaCl_2$	$(CH_3COO)_2Ca$	$NaCl$	$MgCl_2$	$MnCl_2$	KCl
--	----------	-----------------	--------	----------	----------	-------

0,02	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,04	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0,06	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,08	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Πίνακας Δ12: Μεταβολή της συγκέντρωσης αλατιού με βήμα 0,02 M (A-D) και είδος αλατιού (1-6) υπό σταθερή συγκέντρωση ισοπροπανόλης 5% v/v και σταθερό pH 5,0 0,1 M οξικού νατρίου.

	CaCl ₂	SrCl ₂	LiCl	(CH ₃ COO) ₂ Mg	Na ₂ SO ₄	KF
0,02	A1	A2	A3	A4	A5	A6
0,04	B1	B2	B3	B4	B5	B6
0,06	C1	C2	C3	C4	C5	C6
0,08	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Στη συνέχεια, υπό σταθερή συγκέντρωση CaCl₂ 0,06 M, πραγματοποιείται πείραμα μεταβάλλοντας το pH ως προς το είδος οργανικού διαλύτη υπό σταθερή συγκέντρωση 5% v/v. Γενικά, τα μικτά διαλύματα ύδατος και οργανικών ουσιών παρουσιάζουν μικρότερη διηλεκτρική σταθερά σε σύγκριση με τα αμιγή υδατικά διαλύματα. Η μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς αυξάνει την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των αντίθετων φορτίων των πρωτεϊνικών μορίων και μειώνει την διαλυτότητα. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν επίσης να μειώσουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης μέσω εκτόπισης του δεσμευμένου νερού. Σε γενικές περιπτώσεις η διαλυτότητα της πρωτεΐνης μειώνεται με την μείωση της θερμοκρασίας παρουσία οργανικού διαλύτη [119]. Παρακάτω παρουσιάζεται η σειρά της διηλεκτρικής σταθεράς των χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών:

dioxane < tertbutanol < isopropanol < propanol < ethanol < methanol

Οι καλύτεροι θύσανοι παρατηρήθηκαν στη συνθήκη C1 με την ισοπροπανόλη η οποία βρίσκεται στη μέση της παραπάνω κατάταξης. Οι υπόλοιποι θύσανοι ήταν είτε συσσωματώματα θυσάνων είτε ίζημα.

Πίνακας Δ13: Μεταβολή του είδους πηκτικού διαλύματος υπό σταθερή συγκέντρωση 5% v/v (1-6) και του pH 0,1 M οξικού νατρίου (A-D) με βήμα 0,5 pH units (οριζόντια) υπό σταθερή συγκέντρωση CaCl₂ 0,06M.

	isoprop	methanol	ethanol	tertbutanol	dioxane	propanol
4,00	A1	A2	A3	A4	A5	A6
4,50	B1	B2	B3	B4	B5	B6
5,00	C1	C2	C3	C4	C5	C6
5,50	D1	D2	D3	D4	D5	D6

Το επόμενο βήμα ήταν να γίνει επανάληψη ορισμένων συνθηκών από προηγούμενα πειράματα κρυστάλλωσης που δώσανε θυσάνους με διαφορετική τεχνική. Η διαφορετική τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν η τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με λάδι. Η διαδικασία της πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης είναι πολλές φορές πολύ γρήγορη παράγοντας έτσι πολλούς μικρούς κρυστάλλους αντί για λίγους και μεγάλους. Επομένως χρησιμοποιώντας λάδια η διαδικασία πρωτεϊνικής κρυστάλλωσης επιβραδύνεται χωρίς να αλλάξουν οι συνθήκες κρυστάλλωσης. Στην ουσία αυτό το στρώμα λαδιού καθορίζει και το ρυθμό κρυστάλλωσης [120]. Στους Πίνακες Δ14-22 παρουσιάζονται τα συγκεκριμένα πειράματα. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι για πρώτη φορά εμφανίζονται πολλοί μικροί και λεπτοί βελονοειδείς κρύσταλλοι με καθαρό υπόβαθρο υπό την προσθήκη 500 μl μίγματος λαδιού (50%-50%) (Πίνακας 19, D1).

Πίνακας Δ14: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50% παραφινέλαιο-50% σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 µl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 µl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 µl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 µl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 20%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 6, B2)
 2: 22%isoprop, 0,04M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 6, A3)
 3: 20%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,2 (Πίνακας 3, A3)
 4: 20%isoprop, 0,08M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,2 (Πίνακας 3, A4)
 5: 20%isoprop, 0,02M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B1)
 6: 20%isoprop, 0,04M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B2)

Πίνακας Δ15: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 µl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 µl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 µl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 µl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 22%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B3)
 2: 22%isoprop, 0,08M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B4)
 3: 20%isoprop, 0,1M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B5)
 4: 20%isoprop, 0,12M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,4 (Πίνακας 3, B6)
 5: 22%isoprop, 0,02M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C1)
 6: 22%isoprop, 0,04M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C2)

Πίνακας Δ16: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 µl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 µl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 µl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 µl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 22%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C3)
 2: 22%isoprop, 0,08M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C4)
 3: 22%isoprop, 0,1M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C5)
 4: 22%isoprop, 0,12M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,6 (Πίνακας 3, C6)
 5: 22%isoprop, 0,1M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,2 (Πίνακας 3, A5)
 6: 22%isoprop, 0,12M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,2 (Πίνακας 3, A6)

Πίνακας Δ17: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 µl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 µl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 µl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 µl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 22%isoprop, 0,04M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,8 (Πίνακας 3, D2)
 2: 22%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,8 (Πίνακας 3, D3)
 3: 22%isoprop, 0,08M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,8 (Πίνακας 3, D4)
 4: 22%isoprop, 0,1M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,8 (Πίνακας 3, D5)
 5: 12%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 9, C6)
 6: 5%isoprop, 0,02M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 12, A1)

Πίνακας Δ18: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 μl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 μl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 5%ethanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B3)
 2: 5%4boutanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B4)
 3: 5%dioxane, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B5)
 4: 5%propanol 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B6)
 5: 5%4boutanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,0 (Πίνακας 13, A4)
 6: 5%dioxane, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,0 (Πίνακας 13, A5)

Πίνακας Δ19: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 μl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 μl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C1)
 2: 5%methanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C2)
 3: 5%ethanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C3)
 4: 5%tertbutanol 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C4)
 5: 5%dioxane, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C5)
 6: 5%propanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5 (Πίνακας 13, C6)

Πίνακας Δ20: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 50%παραφινέλαιο-50%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 μl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 μl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 5%ethanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, D3)
 2: 5%propanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, B1)
 3: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 9, D3)
 4: 5%isoprop ol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 9, D4)
 5: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 9, D5)
 6: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 9, D6)

Πίνακας Δ21: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 90%παραφινέλαιο-10%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 μl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 μl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 5%methanol, 0,06M CaCl₂, 0,1 M NaAc pH5,0 (Πίνακας 13, C2)
 2: 5%dioxane, 0,06M CaCl₂, 0,1 M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B5)
 3: 5%propanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, B1)
 4: 5%ethanol 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, C6)

5: 5%4boutanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, B4)

6: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, C1)

Πίνακας Δ22: Επανάληψη συνθηκών κρυστάλλωσης με την τεχνική κρεμαστής σταγόνας σε συνδυασμό με 60%παραφινέλαιο-40%σιλικονέλαιο. Σε κάθε σειρά (A-D) προστίθεται διαφορετική ποσότητα μίγματος λαδιού στο πηγάδι με το μητρικό διάλυμα.

Oil	1	2	3	4	5	6
50 μl	A1	A2	A3	A4	A5	A6
100 μl	B1	B2	B3	B4	B5	B6
200 μl	C1	C2	C3	C4	C5	C6
500 μl	D1	D2	D3	D4	D5	D6

1: 5%methanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,0 (Πίνακας 13, C2)

2: 5%dioxane, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH4,5 (Πίνακας 13, B5)

3: 5%propanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, B1)

4: 5%ethanol 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, C6)

5: 5%4boutanol, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, B4)

6: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5 (Πίνακας 13, C1)

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κρυστάλλωσης με τη βοήθεια της τεχνικής της ενπυρήνωσης (seeding) (Πίνακες Δ23-26). Όσον αφορά για το σχηματισμό πυρήνων απαιτείται υψηλός βαθμός υπερκορεσμού, για ομαλή αύξηση όμως απαιτούνται χαμηλά επίπεδα υπερκορεσμού που να εξασφαλίζουν χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης ώστε να αποφεύγεται η συγχώνευση στο πλέγμα ξένων ουσιών ή κενών. Για την αποφυγή αυτής της ασυμβατότητας έχει αναπτυχθεί η τεχνική της ενπυρήνωσης που αποσκοπεί στην αποσύνδεση της πυρήνωσης από την αύξηση των κρυστάλλων [121]. Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται μεγάλοι κρύσταλλοι ως πηγή μικροσκοπικών ή μακροσκοπικών πυρήνων σε καινούριες σταγόνες κρυστάλλωσης. Η συνθήκη χορεύει περιλαμβάνει προ-εξισορρόπηση του διαλύματος πρωτεΐνης καθιζητή σε συνθήκες χαμηλού υπερκορεσμού και στη συνέχεια προσθήκη μικροσκοπικών πυρήνων (microseeding) ή μεγάλων τμημάτων κρυστάλλου (macroseeding).

Για να γίνουν τα συγκεκριμένα πειράματα κρυστάλλωσης σαν αρχική συνθήκη ήταν η συνθήκη D4, Πίνακας 9, στην οποία παρατηρήθηκαν καλοσχηματισμένοι θύσανοι με καθαρό υπόβαθρο. Τοποθετούνται μερικοί θύσανοι σε ένα σωλήνα Erpendorf με μητρικό διάλυμα για να ομογενοποιηθούν μέσω χρήσης υπερήχων. Στη συνέχεια, 1 μl από το παραπάνω μίγμα προστίθεται σε 10 μl φρέσκου μητρικού διαλύματος (αραίωση 10⁻¹). Αυτό συνεχίζεται μέχρι αραίωση 10⁻³ (Πίνακες Δ23, Δ25). Από τα διαφορετικά αραιωμένα αποθέματα χρησιμοποιούνται 1μl για την κάθε σταγόνα σε συνθήκες με χαμηλότερη συγκέντρωση καθιζητή με χρόνο εξισορρόπησης 0 h και 6 h. Παράλληλα, γίνονται και πειράματα κρυστάλλωσης μέσω τεχνικής σποράς ίχνους (streak-seeding). Κατά την τεχνική αυτή κατάλληλη τρίχα χρησιμοποιείται (συνήθως από ουρά αλόγου) για να ακουμπήσει έναν ήδη ανεπτυγμένο κρύσταλλο. Προσαρτίζει έτσι στην επιφάνεια της άορατα με γυμνό οφθαλμό μικροσκοπικά κρυσταλλικά συσσωματώματα τα οποία στην συνέχεια μεταφέρονται σε νέα κρεμαστή σταγόνα. Με την απλή χάραξη της νέας σταγόνας με την τρίχα, τα κρυσταλλικά αυτά συσσωματώματα χρησιμοποιούνται ως σπόροι για την παραγωγή κρυστάλλων στην νέα σταγόνα. Με αυτό τον τρόπο είναι εύκολος ο διαχωρισμός της διαδικασίας πυρήνωσης από την διαδικασία ανάπτυξης της κρυστάλλωσης (Πίνακας Δ24, Δ26). Τα πειράματα έγιναν με χρόνο εξισορρόπησης 0 h και 6 h.

Πίνακας Δ23: Πείραμα κρυστάλλωσης με αρχική συνθήκη D4, Πίνακας 9, μέσω της τεχνικής της ενπυρήνωσης. Χρόνος εξισορρόπησης σταγόνας 0 h. Σε κάθε σειρά (A-D) γίνεται διαφορετική

αραίωση στην κάθε σταγόνα. Το μητρικό διάλυμα είναι 0,06 M CaCl₂, 3% v/v ισοπροπανόλη και 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,5.

Αραίωση	1	2	3	4	5	6
10 ⁰	A1	A2	A3	A4	A5	A6
10 ⁻¹	B1	B2	B3	B4	B5	B6
10 ⁻²	C1	C2	C3	C4	C5	C6
10 ⁻³	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 2%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 2: 3%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 3: 4%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 4: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 5: 6%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAcetate pH5,5
 6: 7%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

Πίνακας Δ24: Πείραμα κρυστάλλωσης με αρχική συνθήκη D4, Πίνακας 9, μέσω της τεχνικής σποράς ίχνους. Χρόνος εξισορρόπησης σταγόνας 0 h. Σε κάθε σειρά (A-D) γίνεται διαφορετική αραίωση στην κάθε σταγόνα. Το μητρικό διάλυμα είναι 0,06 M CaCl₂, 3% v/v ισοπροπανόλη και 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,5.

Αραίωση	1	2	3	4	5	6
10 ⁰	A1	A2	A3	A4	A5	A6
10 ⁻¹	B1	B2	B3	B4	B5	B6
10 ⁻²	C1	C2	C3	C4	C5	C6
10 ⁻³	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 2%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 2: 3%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 3: 4%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 4: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 5: 6%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 6: 7%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

Πίνακας Δ25: Πείραμα κρυστάλλωσης με αρχική συνθήκη D4, Πίνακας 9, μέσω της τεχνικής της ενπυρήνωσης. Χρόνος εξισορρόπησης σταγόνας 6 h. Σε κάθε σειρά (A-D) γίνεται διαφορετική αραίωση στην κάθε σταγόνα. Το μητρικό διάλυμα είναι 0,06 M CaCl₂, 3% v/v ισοπροπανόλη και 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,5.

Αραίωση	1	2	3	4	5	6
10 ⁰	A1	A2	A3	A4	A5	A6
10 ⁻¹	B1	B2	B3	B4	B5	B6
10 ⁻²	C1	C2	C3	C4	C5	C6
10 ⁻³	D1	D2	D3	D4	D5	D6

- 1: 2%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 2: 3%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 3: 4%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 4: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5
 5: 6%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAcetate pH5,5
 6: 7%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

Πίνακας Δ26: Πείραμα κρυστάλλωσης με αρχική συνθήκη D4, Πίνακας 9, μέσω της τεχνικής σποράς ίχνους. Χρόνος εξισορρόπησης σταγόνας 6 h. Σε κάθε σειρά (A-D) γίνεται διαφορετική

αραίωση στην κάθε σταγόνα. Το μητρικό διάλυμα είναι 0,06 M CaCl₂, 3% v/v ισοπροπανόλη και 0,1 M οξικό νάτριο pH 5,5.

Αραίωση	1	2	3	4	5	6
10 ⁰	A1	A2	A3	A4	A5	A6
10 ⁻¹	B1	B2	B3	B4	B5	B6
10 ⁻²	C1	C2	C3	C4	C5	C6
10 ⁻³	D1	D2	D3	D4	D5	D6

1: 2%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

2: 3%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

3: 4%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

4: 5%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

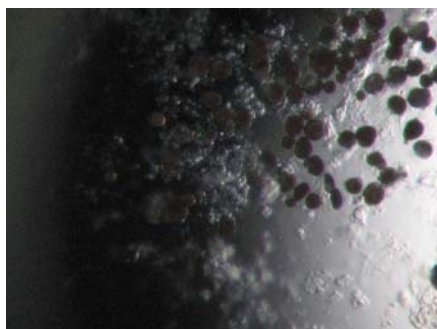
5: 6%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

6: 7%isoprop, 0,06M CaCl₂, 0,1M NaAc pH5,5

Αυτό που παρατηρείται από τους Πίνακες Δ23-Δ26 είναι ότι σε χρόνο εξισορρόπησης 0 h εμφανίζονται θύσανοι ενώ σε χρόνο εξισορρόπησης 6 h παρατηρούνται περισσότερο σφαιρουλίτες με την τεχνική ενπυρήνωσης και με την τεχνική σποράς ίχνους εξακολουθούν να εμφανίζονται θύσανοι. Αυτό που θα μπορούσε να γίνει είναι είτε να γίνουν πειράματα κρυστάλλωσης με μεγαλύτερο χρόνο εξισορρόπησης 12 h ή 24 h, είτε να γίνουν κρυσταλλώσεις με μεγαλύτερη αραίωση αφού στην 10⁻³ παρατηρούνται ήδη σφαιρουλίτες είτε να μειωθεί και άλλο η συγκέντρωση του καθιζητή. Παρακάτω παρουσιάζεται η αντιστοίχιση χρώματος με περιγραφή πειραμάτων κρυστάλλωσης καθώς και στο Σχήμα Δ2 ενδεικτικές φωτογραφίες από τα παραπάνω πειράματα.

clear drop
dirty
white percipitation
dark percipitation
skin
gelatinous percipitation
protein
phase separation
spherulites
transparent cluster
dark cluster
sea-urchin
needles
microcrystals/percipit

BETTER



α)



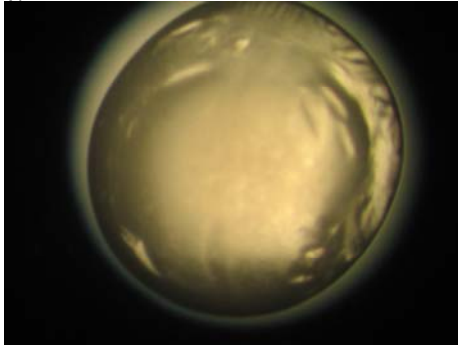
β)



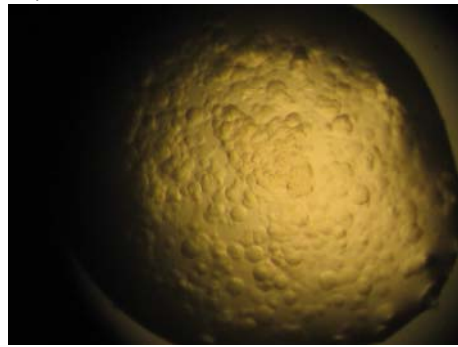
γ)



δ)



ε)



στ)

Σχήμα Δ2: Ενδεικτικές φωτογραφίες από τα πειράματα κρυστάλλωσης που πραγματοποιήθηκαν. α) σκούρα συσσωματώματα (dark clusters), β) λευκό ίζημα (white precipitation), γ) μικροκρύσταλλοι με ελαφρύ ίζημα (microcrystals with light precipitation), δ) σκούρο ίζημα με υμένιο (dark precipitation with skin), ε) υμένιο (skin), στ) σφαιρουλήτες (spherulites).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pugsley, A.P., (1993) *Microbiol Rev.* 1, 50-108.
2. Hueck, C.J., (1998) *Microbiol Mol Biol Rev.* 2, 379-433.
3. Economou, A., (1999) *Trends Microbiol.* 8, 315-20.
4. Michiels, T., *et al.*, (1991) *J Bacteriol.* 16, 4994-5009.
5. Alfano, J.R., & Collmer, A., (1997) *J Bacteriol.* 18, 5655-62.
6. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., & Dinesh-Kumar, S.P., (1997) *Science.* 276, 726-33.
7. He, S.Y., (1997) *Trends Microbiol.* 12, 489-95.
8. Cornelis, G.R., & Van Gijsegem, F., (2000) *Annu Rev Microbiol.* 54, 735-74.
9. Büttner, D., & Bonas, U., (2002) *EMBO J.* 20, 5313-22.

10. Cornelis, G.R., (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 742-52.
11. Lindgren, P.B., Peet, R.C., & Panopoulos, N.J., (1986) *J Bacteriol.* 2, 512-22.
12. Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J., & He, S.Y., (2003) *Microbes Infect.* 4, 301-10.
13. Tampakaki, A.P., *et al.*, (2004) *Cell Microbiol.* 9, 805-16.
14. Rosqvist, R., Magnusson, K.E., & Wolf-Watz, H., (1994) *EMBO J.* 4, 964-72.
15. van Dijk, K., *et al.*, (1999) *J Bacteriol.* 16, 4790-7.
16. Mindrinos, M.N., *et al.*, (1990) *Am. Soc. of Microbiology*, Washington, D.C.74-81.
17. Mudgett, M.B., *et al.*, (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24, 13324-9.
18. Aldridge, P., & Hughes, K.T., (2001) *Trends Microbiol.* 5, 209-14.
19. Hienonen, E., Roine, E., Romantschuk, M., & Taira, S., (2002) *Mol Genet Genomics.* 6, 973-8.
20. Sugase, K., Dyson, H., & Wright, P.E., (2007) *Nature.* 447, 1021-5.
21. Blocker, A.J., *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18, 6507-13.
22. Yip, C.K., & Strynadka, N.C., (2006) *Trends Biochem Sci.* 4, 223-30.
23. Kubori, T., *et al.*, (1998) *Science.* 280, 602-5.
24. Tamano, K., *et al.*, (2000) *EMBO J.* 15, 3876-87.
25. Kimbrough, T.G., & Miller, S.I., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20, 11008-13.
26. Blocker, A., Komoriya, K., & Aizawa, S., (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6, 3027-30.
27. Thomas, D.R., Francis, N.R., Xu, C., & DeRosier, D.J., (2006) *J Bacteriol.* 20, 7039-48.
28. Deane, J.E., *et al.*, (2006) *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 3, 302-5.
29. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I., & Galán, J.E., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18, 10225-30.
30. Büttner, D., & Bonas, U., (2006) *Curr Opin Microbiol.* 2, 193-200.
31. Zhang, L., Wang, Y., Picking, W.L., Picking, W.D., & De Guzman, R.N., (2006) *J Mol Biol.* 2, 322-30.
32. Wang, Y., *et al.*, (2007) *J Mol Biol.* 5, 1304-14.
33. Yip, C.K., *et al.*, (2005) *Nature.* 435, 702-7.
34. Sun, P., Tropea, J.E., Austin, B.P., Cherry, S., & Waugh, D.S., (2008) *J Mol Biol.* 3, 819-30.
35. Derewenda, U., *et al.*, (2004) *Structure.* 2, 301-6.
36. Johnson, S., *et al.*, (2007) *J Biol Chem.* 6, 4035-44.
37. Roine, E., *et al.*, (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7, 3459-64.
38. Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N., & Romantschuk, M., (1997) *FEBS Lett.* 2, 168-72.
39. Li, C.M., *et al.*, (2002) *EMBO J.* 8, 1909-15.
40. Hienonen, E., Romantschuk, M., Fenel, F., & Taira, S., (2007) *J Biotechnol.* 2, 258-67.
41. Altschul, S.F., *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 17, 3389-402.
42. Altschul, S.F., & Koonin, E.V., (1998) *Trends Biochem Sci.* 11, 444-7.
43. Jones, D.T., (1999) *J Mol Biol.* 2, 195-202.
44. Pruitt, K.D., Tatusova, T., & Maglott, D.R., (2007) *Nucleic Acids Res.*
45. Jones, D.T., Taylor, W.R., & Thornton, J.M., (1992) *Nature.* 358, 86-9.
46. Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson, T.J., (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80.
47. Prilusky, J., *et al.*, (2005) *Bioinformatics.* 16, 3435-8.
48. Uversky, V.N., (2002) *Protein Sci.* 4, 739-56.
49. Gasteiger, E., *et al.*, (2005) a: *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
50. Gasteiger, E., *et al.*, (2005) b: *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
51. Fischetti, V.A., Landau, G.M., Schmidt, J.P., & Sellers, P., (1993) *Inf.Proc.Let.* 45,11-18.
52. Turcotte, M., (2000) *Marcel Turcotte -- Helical Wheel Java Applet*.
53. Sathasivan, K., (2001) *The University CoOp Custom Publishing*. Austin, TX.
54. Kingsbury, N., & Masters, C.J., (1970) *Anal Biochem.* 1, 144-58.
55. Laemmli, U.K., (1970) *Nature.* 227, 680-5.
56. Scopes, R.K., (1984) *Anal Biochem.* 2, 525-9.
57. Bradford, M.M., (1976) *Anal Biochem.* 72, 248-54.
58. Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., & Ram, S.J., (2004) *Bioph Intern.* 7, 36-42.
59. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., (1951) *J Biol Chem.* 1, 265-75.

60. Sreerama, N., & Woody, R.W., (2004) *Methods Enzymol.* 383, 318-51.
61. Provencher, S.W., & Glockner, J., (1981) *Protein* 1, 33–37.
62. Sreerama, N., & Woody, R.W., (2000) *Anal Biochem.* 2, 252-60.
63. Johnson, W.C., (1999) *Proteins.* 3, 307-12.
64. Sreerama, N., & Woody, R.W., (2004) *Protein Sci.* 1, 100-12.
65. Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., & Woody, R.W., (2001) *Anal Biochem.* 2, 271-4.
66. Venyaminov, S.Yu., & Vassilenko, K.S., (1994) *Anal Biochem.* 1, 176-84.
67. Debye, P., & Hückel, E., (1923) *Physikalische Zeitschrift.* 24, 185–206.
68. Hofmeister, F., (1888) *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 24, 247–260.
69. Neagu, A., Neagu, M., & Dér, A., (2001) *Biophys J.* 3, 1285–1294.
70. Blundell, T.L., & Johnson, L.N., (1976) *Protein Crystallography.* Academic Press, London.
71. Chernov, A.A., (2003) *J. Structural Biology.* 142, 1-21.
72. Feher, G., & Kam, Z., (1985) *Methods Enzymol.* 114, 77-112
73. Durbin, S.D., & Feher, G., (1996) *Annu Rev Phys Chem.* 47, 171-204.
74. Svergun, D.I., & Koch, M.H., (2002) *Curr Opin Struct Biol.* 5, 654-60.
75. Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., & Tainer, J.A., (2007) *Q Rev Biophys.* 3, 191-285.
76. Kratky O., & Porod G., (1949) *J Colloid Sci.* 1, 35-70.
77. Kirste, R. G., & Oberthur, R. C., (1982) London: Academic Press. 387–431.
78. Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J. & Svergun, D.I. (2003) *J. Appl. Cryst.* 36, 1277-1282.
79. Altschul, S.F., (1997) *Nucleic Acids Res.* 17, 3389-402.
80. Taira, S., *et al.*, (1999) *Mol Microbiol.* 4, 737-44.
81. Jones, D.T., Tress, M., Bryson, K., & Hadley, C., (1999) *Proteins. Suppl* 3, 104-11.
82. He, S.Y., & Jin, Q., (2003) *Curr Opin Microbiol.* 1, 15-9.
83. Koebnik, R., (2001) *Trends Microbiol.* 12, 586-90.
84. Yip, C.K., Finlay, B.B., & Strynadka, N.C., (2005) *Nat Struct Mol Biol.* 1, 75-81.
85. Lee, Y.H., Kolade, O.O., Nomura, K., Arvidson, D.N., & He, S.Y., (2005) *J Biol Chem.* 22, 21409-17.
86. Mulvihill, D.M., & Kinsella, J.E., (1987) *Food Technology.* 41, 102-111.
87. Dunkerley, J.A., & Hayes, J.F., (1980) *New Zealand J. of Dairy Sc. & Tech.* 15, 191-196.
88. Ross-Murphy, S.B., (1991) *Eds. D.DeRossi, K. Kajiwara, Y. Osada and A. Yamauchi. New York; Plenum Press.* 21-40.
89. Schmidt, R.H., Illingworth, B.L., Ahmed, E.M., & Richter, R.L., (1978) *J. Food Proc. Preserv.* 2, 111.
90. Dunkerley, J.A., and Zadow, J.G., (1984) *Australian J. Dairy Technol.* 3, 44.
91. Dolgikh, D.A., *et al.*, (1981) *FEBS Lett.* 2, 311-5.
92. Ohgushi, M., & Wada, A., (1983) *FEBS Lett.* 1, 21-4.
93. Dolgikh, D.A., Kolomiets, A.P., Bolotina, I.A., & Ptitsyn, O.B., (1984) *FEBS Lett.* 1, 88-92.
94. Wu, J., Yang, J.T, & Wu C.S., (1992) *Anal. Biochem.* 200, 359-364.
95. Manavalan, P., & Johnson, W.C., (1983) *Anal Biochem.* 1, 76-85.
96. Sreerama, N., & Woody, R.W., (2003) *Protein Sci.* 2, 384-8.
97. Bar, M., Scherf, T., & Fass, D., (2008) *Protein Eng Des Sel.* 2, 107-14.
98. Spink, C.H., (2008) *Methods Cell Biol.* 84,115-41.
99. Cummings, M.D., Farnum, M.A., & Nelen, M.I., (2006) *J Biomol Screen.* 7, 854-63.
100. Phan, J., *et al.*, (2002) *J Biol Chem.* 52, 50564-72.
101. Døskeland, A.P., Martinez, A., Knappskog, P.M., & Flatmark, T., (1996) *Biochem J.* 313, 409-14.
102. Alexandrov, A., Dutta, K., & Pascal, S.M., (2001) *Biotechniques.* 6, 1194-8.
103. Kwong, P.D., *et al.*, (1999) *J Biol Chem.* 7, 4115-23.
104. Vekilov, P.G., Feeling-Taylor, A.R., Yau, S.T., & Petsev, D., (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 1, 1611-6.
105. Vekilov, P.G., (2003) *Methods Enzymol.* 368, 84-105.
106. Walter, T.S., *et al.*, (2006) *Structure.* 11, 1617-22.
107. Yoo, P.J., *et al.*, (2006) *Nat Mater.* 3, 234-40.
108. Norville, J.E., Kelly, D.F., Knight, T.F., Belcher, A.M., & Walz, T., (2007) *J Struct Biol.* 3, 313-23.
109. Bhaviripudi, S., Qi, J., Hu, E.L., & Belcher, A.M., (2007) *Nano Lett.* 11, 3512-7.

110. Mao, C., *et al.*, (2004) *Science*. 303, 213-7.
111. Mao, C., *et al.*, (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12, 6946-51.
112. Nam, K.T., *et al.*, (2006) *Science*. 312, 885-8.
113. Seeman, N.C., & Belcher, A.M., (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2, 6451-5.
114. Sanghvi, A.B., Miller, K.P., Belcher, A.M., & Schmidt, C.E., (2005) *Nat Mater*. 6, 496-502.
115. Yoo, P.J., *et al.*, (2008) *ACS Nano*. 3, 561-71.
116. Baratova, L.A., *et al.*, (2004) *Eur J Biochem*. 15, 3136-45.
117. Karlin, S., & Altschul, S.F., (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6, 2264-8.
118. Liò, P., & Goldman, N., (1998) *Genome Res*. 12, 1233-44.
119. Blundell, T.L., & Johnson, L.N., (1976) Academic Press Inc. London LTD. 60-68.
120. Chayen, N.E., (1998) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 54, 8-15.
121. Bergfors, T., (2003) *J Struct Biol*. 1, 66-76.