

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΥΛΙΚΩΝ

ΔΟΜΙΚΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΣ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΗΡΡΑ ΤΟΥ
ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
PHASEOLICOLA ΤΟΥ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΥΠΟΥ III

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ :

ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΚΟΤΖΑΜΠΙΑΣΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2011

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Βιοϋλικών

Μεταπτυχιακή διατριβή

« Δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης HrpA του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* του εκκριτικού συστήματος τύπου III ».

Μαριάννα Ι. Κοτζαμπασάκη

Ηράκλειο, 2011

Επιβλέποντες : Καθ. Μ. Κοκκινίδης, Αν. Καθ. Α. Μητράκη
Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Καθ. Μ. Κοκκινίδης, Αν. Καθ. Α. Μητράκη, Επ.
Καθ. Κ. Βελώνια

Master thesis

«Structural and physicochemical characterization of the type III secretion system protein HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola».

Marianna I. Kotzampasaki

Heraklion, 2011

Supervisors: Prof. M. Kokkinidis, Associate Prof. A. Mitraki
Three-member Examination Committee: Prof. M. Kokkinidis, Associate Prof. A. Mitraki, Assistant Prof. K. Velonia

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ανατέθηκε από το Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μιχαήλ Κοκκινίδη και της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Άννα Μητράκη. Οι μοριακές εργασίες κλωνοποίησης των γονιδίων σε κατάλληλο φορέα ετερόλογης έκφρασης καθώς και τα πειράματα απομόνωσης του T3SS έγιναν στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογία Φυτών, τα πειράματα SAXS έλαβαν χώρα 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), ενώ η βιοχημική ανάλυση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, τα πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης και τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας. Τα πειράματα HRTEM πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ηλεκτρονική Μικροσκοπίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, ενώ τα πειράματα FTIR και Raman πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Χημικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η προετοιμασία των δειγμάτων για τα πειράματα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και Raman πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϋλικών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Στο σημείο αυτό, Θα ήθελα να δώσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή μου Μιχαήλ Κοκκινίδη για την υποστήριξη του όλο αυτό το διάστημα και για τις γνώσεις που μου έδωσε. Ακόμα τον ευχαριστώ για την ουσιαστική συνεργασία που είχαμε, για όλες τις συμβουλές του, τις ευχάριστες ατελείωτες συζητήσεις μας για να λύσουμε όλους τους προβληματισμούς μας όσον αφορά αυτό το project, για τα Σαββατοκύριακα που περάσαμε με υποδείξεις για τα πειράματα μου, και για την πίστη του σε εμένα έτσι ώστε να ολοκληρώσουμε αυτήν την ερευνητική μελέτη. Πάντα θα ακούω στα αυτιά μου το « Μαριάννα ΌΟΟΟΟλα λάθος, ξανακοίτα από την αρχή ».

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω, ...

... την Καθηγήτρια μου Άννα Μητράκη για την συνεργασία που είχαμε από την αρχή που ακόμα έκανα την Πρακτική μου άσκηση στο Εργαστήριο Βιοϋλικών, μέχρι και τη συνέχεια της συνεργασίας μας και στο Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών. Την ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές της, για την εποπτεία των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοϋλικών, για τις γνώσεις που μου έδωσε και για τις ερευνητικές συζητήσεις που είχαμε.

... τον Καθηγητή Νικόλαο Πανόπουλο για όλες μας τις συζητήσεις όσον αφορά τα μυστήρια που κρύβονται πίσω από το εκκριτικό σύστημα τύπου III, για όλη του την φιλική διάθεση να με βοηθήσει και να μου λύσει όλες μου τις απορίες.

... την κ. Αλεξάνδρα Σιάκουλη και τον υποψήφιο διδάκτορα Μανώλη Κασωτάκη για την μεγάλη βοήθειά τους στο εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και για όλες τις ευχάριστες ώρες συνεργασίας που πέρασα μαζί τους καθώς και τη Δρ Ραλούκα για την συμβολή της στις τεχνικές φασματοσκοπίας.

... τους συνεργάτες μου και ιδιαίτερα τη Δρ Σπυριδούλα Χαρόβα, τη Δρ Αναστασία Δ. Γαζή, τη Δρ Βασιλική Φαδούλογλου για το ότι με εμπιστεύτηκαν, με υποστήριξαν σε όλα μου τα βήματα, δείχνοντας μου κατανόηση μα και κυρίως αγάπη και μαθαίνοντάς μου όλα τα κρυφά μονοπάτια της έκκρισης των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τάνυα για την μεγάλη της συνεργασία ακόμα και από τότε που έφυγε από το εργαστήριο και για τις φιλικές ώρες που περάσαμε μαζί στο Ηράκλειο, καθώς επίσης και την Spy για την συνεργασία μας σε πολλά πειράματα, για τα ξενύχτια μας στο εργαστήριο για να απομονώσουμε τον πολλά υποσχόμενο πύλο του T3SS και για τις ώρες που έχουμε περάσει και εκτός εργαστηρίου. Τις αγαπώ πολύ και τους οφείλω την διεύρυνση των στόχων, ονείρων και ελπίδων μου.

... Το εργαστηριακό προσωπικό, Ντίνα Κοτσιφάκη και Μαίρη Προβιδάκη για την βοήθεια τους στα πειράματα Χρωματογραφίας, Κρυσταλλογραφίας και Μοριακών τεχνικών, καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Μαρία Αμπράζη, Κάλλια Κουγιανού για την συμβολή τους στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού και τις συμμαθήτριες μου, Ελένη Μακράκη, Μαρία Καπανίδου, Κατερίνα Τσουρούλα, Κατερίνα Κεφάλα για την παρέα και ευχάριστη διάθεση μέσα και έξω από το εργαστήριο.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την απέραντη αγάπη μου στους γονείς μου, Ελένη και Γιάννη και να τους ευχαριστήσω που όλα αυτά τα χρόνια πιστεύουν σε μένα και με στηρίζουν στις αποφάσεις μου. Ακόμα εκφράζω την αγάπη μου στην καλύτερή μου φίλη Στέλλα Κούρτη, στον αξιολάτρευτο κολλητό μου φίλο και παλαιότερα εργαστηριακό μου συνεργάτη Μανόλη Σημαντηράκη και στον αξιαγάπητο Γιάννη Ξενικάκη που είναι δίπλα μου και με στηρίζουν σε ότι χρειαστώ.

"Έχεις τα πινέλα, έχεις και τα χρώματα, ζωγράφισε τον παράδεισο και μπες μέσα. "
Ν.Καζαντζάκης

Με αγάπη Roz Marie

Περίληψη

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS, Type three secretion system), είναι ένας εξειδικευμένος μοριακός μηχανισμός, ο οποίος καθιστά ικανά πολλά Gram-αρνητικά βακτήρια να εκκρίνουν και να διοχετεύουν τοξικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού ξενιστή τους. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το μονοπάτι έκκρισης κωδικοποιείται από τα γονίδια *hrp* (HR και pathogenicity) και *hrc* (HR και conserved).

Η παρούσα εργασία ασχολείται με τη δομική μελέτη τη πρωτεΐνης HrpA, η οποία είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη του T3SS της *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Η HrpA είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του αγωγού (pilus) του T3SS, του οποίου η δομή μοιάζει με τις γνωστές βελονοειδείς δομές (needle) των ζωοπαθογόνων βακτηρίων, ενώ η διάμετρος του υπολογίζεται περίπου στα 6 έως 8 nm και το μήκος μέχρι 2 μm. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HrpA αγρίου τύπου, υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική και δομική μελέτη της πρωτεΐνης, μεταβάλλοντας διάφορες παραμέτρους (pH, συγκέντρωση, χρόνο ανάπτυξης, θερμοκρασία) με μεθόδους κυκλικού διχρωισμού (CD), φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), φασματοσκοπίας Raman (Raman spectroscopy), και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (high resolution TEM).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός του μεταλλάγματος HrpAΔC8 σε διάφορες συνθήκες με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, CD, σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS) και high resolution TEM

Τέλος, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του αγωγού του T3SS (pilus) από την *P. syringae* pv. *phaseolicola*, με σκοπό να μελετηθούν οι δομικές του ιδιότητες με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και να συγκριθούν με τις πολυμερικές ιδιότητες που έχει η ανασυνδυασμένη HrpA να σχηματίζει ινώδεις δομές με χαρακτηριστικές διαστάσεις που κυμαίνονται από την μακρο- στην μικρο- κλίμακα. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υψηλής διακριτικής ικανότητας, η πρωτεΐνη αυτό-οργανώνεται *in vitro*, σχηματίζοντας ινίδια με διαστάσεις που μοιάζουν σημαντικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του αγωγού του T3SS της *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

Συμπερασματικά, ενώ η HrpA προβλέπεται σαν α-ελικοειδής πρωτεΐνη, το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της, παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά α-έλικας ενώ μοιάζει πολύ με το φάσμα των αποδιπλωμένων πρωτεϊνών. Τα πειράματα φασματοσκοπίας RAMAN, FTIR και SAXS που πραγματοποιήθηκαν, επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις από το CD.

Abstract

Type III secretion systems (T3SSs) are needle-like structures used by Gram negative bacteria to translocate bacterial proteins (effectors) into eukaryotic cells. The T3SS pathway of plant pathogens is encoded by *hrp* (HR and pathogenicity) and *hrc* (HR and conserved) genes.

The structural study of the HrpA protein, a small hydrophilic protein of the T3SS of *P. syringae* pv. *phaseolicola* will be presented. HrpA is the major component of T3SS pilus, a needle-like structure, whose diameter is about 6-8 nm and its length up to 2 μm. Recombinant wild type HrpA was overexpressed and purified by affinity chromatography. Moreover, physicochemical and structural study of HrpA protein was performed under different parameters (pH, concentration, shelf-life and temperature) with CD, FTIR, Raman spectroscopy and high resolution TEM.

In addition, physicochemical and structural characterization of deletion mutant (HrpAΔC8) also took place under various conditions with affinity chromatography, CD, SAXS and high resolution TEM.

Finally, the pilus of *P. syringae* pv. *phaseolicola* was purified in order to study its structural properties with HRTEM and to compare them with those of polymerized recombinant HrpA which forms fibre-like structures with nano- to micron scale features. According to the HRTEM observations, the *in vitro* formed fibers strongly resemble the structural parameters of T3SS pilus. Whereas HrpA is predicted to be a highly α-helical protein, its CD spectra indicate very low α-helical content and strongly resemble those of disordered proteins. Raman spectroscopy, FTIR and SAXS also support the CD observations.

Λέξεις κλειδιά(keywords): HrpA, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, T3SS, HRTEM, Hrp pilus

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	11
1.1 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα παθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια	11
1.2 Υποστρώματα έκκρισης	14
1.3 Η Αρχιτεκτονική της εκκριτικής μηχανής τύπου III	16
1.4 Εξωκυττάρια συστατικά	18
1.5 Οι πρωτεΐνες	20
1.5.1 Η δομή του σπειρωμένου σπειράματος	20
1.5.2 Εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες	21
1.6 Σκοπός Εργασίας	22
1.7 Βιβλιογραφία	23
Κεφάλαιο 2. Υλικά και Μέθοδοι	25
2.1 <i>In silico</i> επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών	25
2.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών	26
2.2.1 Έκφρασης πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα	27
2.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	27
2.3 Επαγωγή του T3SS της <i>P. Syringae</i> pv. <i>Phaseolicola</i> και απομόνωση του Hrp/Hrc πύλου	29
2.3.1 Επαγωγή καλλιεργειών <i>P.syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> παρουσία 10% φυτικού εκχυλίσματος <i>P. Vulgaris</i>	29
2.3.2 Χρώση ηλεκτροφορημάτων με άργυρο (Silver Staining)	30
2.4 Μέθοδοι χρωματογραφίας για την απομόνωση ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών	30
2.4.1 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	31
2.4.2 Απομόνωση πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας	32
2.5 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	33
2.6 Κυκλικός διχρωσμός (CD)	34
2.6.1 Επεξεργασία δεδομένων κυκλικού διχρωσμού	36
2.7 Φασματοσκοπία Raman	37

2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων	38
2.8 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)	39
2.8.1 Προετοιμασία δειγμάτων	40
2.9 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες	40
2.9.1 Η προσέγγιση Guinier κι η εξίσωση Debye	41
2.9.2 Διάγραμμα Kratky	41
2.9.3 <i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος	42
2.9.4 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες	42
2.10 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) - Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (High Resolution Transmission Electron Microscopy, HRTEM)	43
2.10.1 Τεχνικές προετοιμασίας βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο TEM	46
2.10.1.1 Αρνητική χρώση (Negative staining)	46
2.10.1.2 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων για παρατήρηση με TEM	46
2.10.1.3 Προετοιμασία χρωστικών ουσιών	47
2.10.1.4 Προετοιμασία των grids για το TEM	47
2.10.1.5 Παραγωγή formvar	47
2.11 Βιβλιογραφία	48
Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα:	
Δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8.	49
3.1 Βιοϋπολογιστικές μέθοδοι	49
3.1.1 Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8	49
3.1.2 PSIPRED	50
3.1.3 FOLDINDEX	50
3.1.4 MATCHER	51
3.2 Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8 <i>in vitro</i>	51
3.2.1 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	51

3.3	Επαγωγή του εκκριτικού συστήματος τύπου III και απομόνωση του Hgr/Hgc πύλου	52
3.4	Απομόνωση των <i>in vitro</i> πρωτεϊνών HgrA και HgrAΔC8	53
3.5	Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης της HgrAΔC8	54
3.6	Μελέτη της HgrAΔC8 με Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες	55
3.6.1	<i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος της HgrAΔC8	56
3.7	Μελέτη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών HgrA και HgrAΔC8 με κυκλικό διχρωισμό	58
3.7.1	Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης HgrA στο άπω υπεριώδες	58
3.8	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης HgrA με Raman Analysis	60
3.9	Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης HgrA με FTIR	61
3.10	Δομική μελέτη των πρωτεϊνών HgrA και HgrAΔC8 με HRTEM	62
3.10.1	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης για την HgrA	62
3.10.1.1	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 5	62
3.10.1.2	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 7.8	64
3.10.1.3	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 3.5	65
3.10.1.4	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 4.5	66
3.10.1.5	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 6.5	66
3.10.1.6	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 8.5	67
3.10.1.7	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrA σε pH 9.5	67
3.10.2	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης για την HgrAΔC8	68
3.10.2.1	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 5	68
3.10.2.2	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 7.6	68
3.10.2.3	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 3.5	69
3.10.2.4	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 4.5	69
3.10.2.5	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 6.5	70
3.10.2.6	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 8.5	70
3.10.2.7	Μελέτη της πρωτεΐνης HgrAΔC8 σε pH 9.5	71

3.11	Δομική μελέτη του Hgr/Hgc πύλου με HRTEM	71
3.12	Βιβλιογραφία	73
Κεφάλαιο 4. Συμπεράσματα		74
4.1	Συζήτηση	74
4.2	Βιβλιογραφία	76

Εισαγωγή

Τα βακτήρια, συνάπτουν ένα μεγάλο εύρος βιοτικών σχέσεων, με πολλούς ξενιστές που κυμαίνονται από βιοφίλμ έως συμβιωτικές ή παθογόνες σχέσεις. Η πρωτεϊνική έκκριση, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση όλων αυτών των αλληλεπιδράσεων. Εξαιτίας της γρήγορης συσσώρευσης των βακτηριακών αλληλουχιών, οι γνώσεις πάνω στα βακτηριακά πρωτεϊνικά εκκριτικά συστήματα έχουν διευρυνθεί (Tseng *et al.*, 2009). Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπου η έκκριση έχει να κάνει με μεταφορά κατά μήκος της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης, υπάρχουν πλέον έξι γνωστές γενικές κατηγορίες των πρωτεϊνικών εκκριτικών συστημάτων καθεμία από τις οποίες παρουσιάζει αξιόλογη ποικιλομορφία (Tseng *et al.*, 2009). Πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από παθογόνα και άλλους συμβιωτές, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται μέσα στον κύτταρο-ξενιστή, να επηρεάζουν την φυσιολογία του και να προάγουν τον αποικισμό (τοξίνες και πρωτεΐνες-τελεστές). Όσον αφορά το πεδίο της μεταφοράς πρωτεϊνών, ο όρος «μεταφορά» γενικά αναφέρεται στην κίνηση μιας πρωτεΐνης κατά μήκος μιας λιπιδιακής στοιβάδας (Desvaux *et al.*, 2009). Σε αντίθεση, η «πρωτεϊνική έκκριση» αναφέρεται συγκεκριμένα στην ενεργό μεταφορά μιας πρωτεΐνης από ένα εσωτερικό τμήμα του κυττάρου στον εξωκυττάριο χώρο (Desvaux *et al.*, 2009). Συνέπεια αυτής της ενεργού διαδικασίας είναι ότι, η εκκρινόμενη πρωτεΐνη εντοπίζεται ολοκληρωτικά έξω από την εξωτερική λιπιδιακή στοιβάδα και μπορεί να είναι διαλυτή, προσκολλημένη στην επιφάνεια ή τμήμα υποομάδας μιας επιφανειακής απόφυσης (Desvaux *et al.*, 2006a). Για να επιτευχθεί η έκκριση των πρωτεϊνικών στόχων, το σύμπλεγμα μετατόπισης Sec επιστρατεύει την βοήθεια επιπλέον πρωτεϊνικών συστημάτων, όπως το T2SS ή και το T5SS ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής στοιβάδας (Desvaux *et al.*, 2004b). Ενώ η «πρωτεϊνική έκκριση» αναφέρεται συγκεκριμένα στην ενεργό μεταφορά μιας πρωτεΐνης υποστρώματος στον εξωκυττάριο χώρο, η «πρωτεϊνική εξαγωγή» αναφέρεται συγκεκριμένα στην ενεργό μεταφορά της πρωτεΐνης στο περιπλασμικό χώρο (Desvaux *et al.*, 2009).

1.1 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα παθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια

Απαρτιζόμενο από περισσότερες από 20 πρωτεΐνες, μερικές από τις οποίες είναι συντηρημένες, το τύπου III σύστημα μοιάζει να είναι ένα από τα πιο περίπλοκα εκκριτικά συστήματα στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III χρησιμοποιείται για να μεταφέρει μια σειρά δραστικών πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή με μια συνεχή πορεία χωρίς διακριτό περιπλασμικό ενδιάμεσο. Αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή. Το εκκριτικό σύστημα υπάρχει σε βακτήρια που είναι παθογόνα για ζώα και φυτά και αυτό προϋποθέτει εξαιρετική εξειδίκευση στις πρωτεΐνες που μεταφέρονται.

Στα φυτικά παθογόνα ο μηχανισμός και τα σχετιζόμενα με αυτόν 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 (Hypersensitive Response, HR), (Lindgren *et al.*, 1986; Jin *et al.*, 2003). Η HR χαρακτηρίζεται από τη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή που έρχονται σε άμεση επαφή με το παθογόνο. Η

νέκρωση αυτή έχει χαρακτηριστικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) και συνοδεύεται από την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών και πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Η εκδήλωση HR (ασύμβατη σχέση ξενιστή-παθογόνου) ή η εμφάνιση ασθένειας (συμβατή σχέση ξενιστή-παθογόνου) εξαρτάται από την ύπαρξη ή απουσία αντίστοιχα ενός συμπληρωματικού ζεύγους γονιδίων: του γονιδίου ανθεκτικότητας στο ξενιστή (R) και το ονομαζόμενο γονιδίου 'αμολυσματικότητας' (*avr*, *avirulence*) στο παθογόνο (Baker *et al.*, 1997). Το γονίδιο R κωδικοποιεί έναν υποδοχέα της πρωτεΐνης *Avr* και η αλληλεπίδραση των δυο παραγόντων πυροδοτεί σειρά αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση της HR. Στην περίπτωση που η *Avr* εισέλθει σε κύτταρο που δεν εκφράζει την αντίστοιχη πρωτεΐνη υποδοχέα ακολουθεί η εκδήλωση ασθένειας. Εκτός από τις *Avr* πρωτεΐνες που εισέρχονται στο φυτικό κύτταρο, το *Hrp* σύστημα χρησιμοποιείται και για την έκκριση μικρών, θερμοσταθερών πρωτεϊνών με υψηλό ποσοστό γλυκινών και αδιευκρίνιστο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται *Harpins* και φαίνεται ότι δρουν εξωκυττάρια είτε συμμετέχοντας στη δημιουργία του συμπλόκου διάνοιξης/μεταφοράς είτε καταστρέφοντας τη μεμβράνη του ξενιστή με σκοπό την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών στο θρεπτικά φτωχό αποπλάστη όπου πολλαπλασιάζονται τα φυτοπαθογόνα βακτήρια. Ποιες δομές ή ποιες διεργασίες γίνονται στόχοι των τοξικών παραγόντων και με ποιο τρόπο δρουν για να προκαλέσουν ασθένεια δεν έχει διευκρινιστεί. Μια υπόθεση είναι ότι ο παράγοντας 'αμολυσματικότητας' καταστέλλει την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την εκδήλωση μηχανισμών άμυνας που σχετίζονται με την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών ή την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος (Hauck *et al.*, 2003).

Στην συνέχεια παρατηρήθηκε ότι ορισμένα από τα *hrp* γονίδια παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με γονίδια που συμμετέχουν στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου και επιβεβαιώθηκε ο υψηλός βαθμός συντήρησης τους σε όλα τα παθογόνα βακτήρια 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 (Alfano & Collmer, 1997).

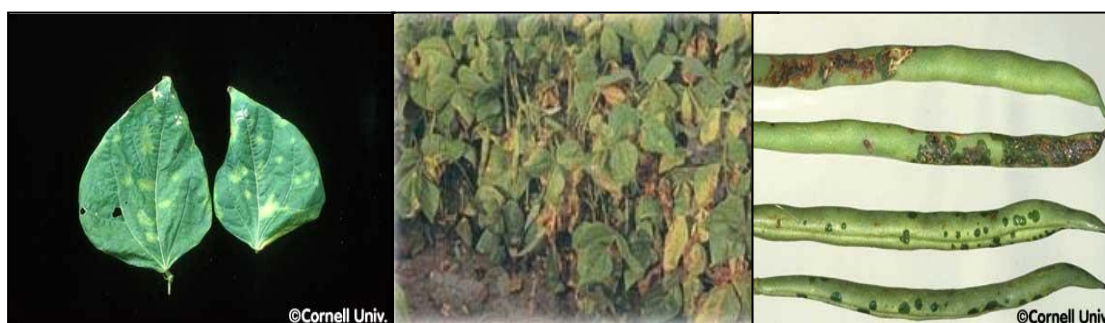
Τα εκκριτικά συστήματα τύπου III παρουσιάζουν τρία χαρακτηριστικά: i) οι προς εξαγωγή πρωτεΐνες δεν διαθέτουν αποκοπτόμενο σινάλο ii) απαιτούνται προσαρμοσμένες βοηθητικές πρωτεΐνες (σαπερόνες) για πολλές από τις προς εξαγωγή πρωτεΐνες – υποστρώματα έκκρισης και iii) απαιτείται επαφή με το κύτταρο ξενιστή για πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού έκκρισης – μεταφοράς (Thomas & Finlay, 2003).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III δεν είναι συνεχώς παρόν και ενεργό στα παθογόνα βακτήρια αλλά υπόκειται σε ρύθμιση σε μεταγραφικό και μεταμεταγραφικό επίπεδο. Η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων γίνεται μέσω ειδικών μεταγραφικών παραγόντων που ενεργοποιούνται αποκρινόμενοι σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες που έχουν σχέση με την εξειδίκευση του βακτηρίου και την φυσιολογία του ξενιστή (Wei *et al.*, 1995). Αυτές οι συνθήκες μπορεί να είναι η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών, δισθενή κατιόντα (όπως Ca^{2+}), το pH και η φάση ανάπτυξης που βρίσκονται τα βακτήρια. Η μεταγραφική ρύθμιση της διαδικασίας είναι λιγότερο μελετημένη. Φαίνεται ότι η επαφή του βακτηρίου με τον ξενιστή επάγει την έκκριση. Τέτοιες περιπτώσεις απαντώνται στα εντεροπαθογόνα *Salmonella*, *Yersinia* και *Shigella flexneri* που έχει δείχθει ότι ο τύπου III ελεγχόμενος μηχανισμός έκκρισης ενεργοποιείται μέσω φυσικής επαφής με την επιφάνεια του κυττάρου στόχου (Hueck, 1998). 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 (Hueck, 1998; Cornelis & Gijsegem, 2000; Cornelis, 2002; Jin *et al.*, 2003).

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, όπως και τα περισσότερα μέλη της ομάδας, προκαλεί μία από τις εξής δύο αντιδράσεις σε φυτά: (i) είτε ασθένεια με χαρακτηριστικά συμπτώματα κηλίδωσης, σε όσα φυτά αποτελούν ξενιστές της (λ. χ. *Phaseolus vulgaris*, φασολιά) ή (ii) 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 i) υδατωδών λιπαρών κηλίδων (πρωτογενή συμπτώματα) κι εξαρτώνται από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου (Mindrinos *et al.*, 1990) ii) 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 (Εικόνα 1.1).

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* επάγει την τοπική νεκρωτική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά μη ξενιστές (incompatible 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.

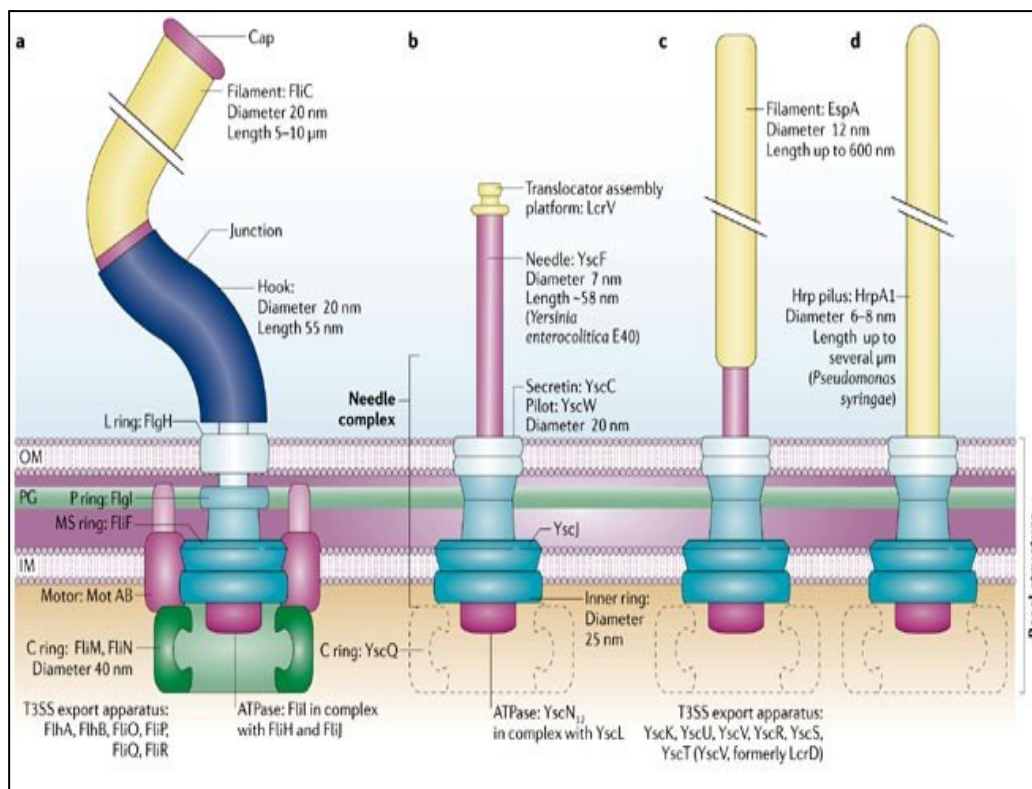


Εικόνα 1.1: Μόλυνση φασολιάς από το βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* (http://pseudomonas-syringae.org/psp_ab_1448A.html).

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 τριών τουλάχιστον παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της έκκρισης. Οι παράγοντες αυτοί είναι: (i) η αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, (ii) η πρόσδεση στην εκκρινόμενη πρωτεΐνη ενός ειδικού βοηθητικού παράγοντα και (iii) η δομή του 5' άκρου του mRNA της εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Τα υποστρώματα έκκρισης φέρουν σινιάλα για την παράδοση τους στο εκκριτικό σύστημα τύπου III και τον περαιτέρω χειρισμό τους. Το κύριο σινιάλο έκκρισης από το τύπου III σύστημα φαίνεται να εδράζει στα 15 με 20 αμινοτελικά αμινοξέα των υποστρωμάτων έκκρισης και παρόλο που δεν γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη ενός εμφανούς μοτίβου, το κύριο αυτό σινιάλο είναι κοινό μεταξύ των εκκριτικών συστημάτων τύπου III, μαστιγιακών και μη, (Lee & Galan, 2004). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο παραπάνω συστημάτων υπεισέρχεται στη χρήση ενός δεύτερου σινιάλου που χρησιμοποιούν τα μη μαστιγιακά εκκριτικά συστήματα τύπου III. Το δεύτερο αυτό σινιάλο απαιτεί την συνεργασία μίας βοηθητικής πρωτεΐνης (σαπερόνη τάξης I) που δεσμεύεται στα κατάλοιπα 30 – 80 της δραστικής πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, δεν έχουν βρεθεί σαπερόνες που εξυπηρετούν όλο το εύρος των δραστικών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι σαπερόνες τάξης I φαίνεται να παραδίδουν τα υποστρώματα στην ATPάση του εκκριτικού συστήματος (Gauthier & Finlay, 2003). Ειδικότερα πιστεύεται ότι οι σαπερόνες αυτές κρατούν το αμινοτελικό άκρο των δραστικών πρωτεϊνών σε μία εκτεταμένη διαμόρφωση χρησιμεύοντας πιθανώς σαν εκκινητές (primers) της διαδικασίας αποδίπλωσης της δραστικής πρωτεΐνης για την ενεργητική της μεταφορά μέσω του στενού διαύλου/αγωγού του εκκριτικού συστήματος τύπου III (εσωτερική διάμετρος $\approx 20 \text{ \AA}$).

Η χρήση πολλών σινιάλων από το εκκριτικό σύστημα τύπου III ίσως παρέχει την μοριακή βάση για ιεραρχία στην έκκριση των πρωτεϊνών, ενώ έχει δειχτεί ότι η χρήση του δεύτερου σινιάλου εξυπηρετεί την στόχευση για έκκριση από το μη μαστιγιακό εκκριτικό σύστημα τύπου III (Lee & Galan, 2004).

Για έκκριση μέσω αυτού του συστήματος απαιτείται ένας πρωτεϊνικός δακτύλιος στην εσωτερική μεμβράνη που δρα ως αγκυροβόλιο των υποστρωμάτων έκκρισης. Πάνω από τον εσωτερικό δακτύλιο βρίσκεται ένα κανάλι που διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη, τον περιπλαστικό χώρο και την εξωτερική μεμβράνη. Στην εξωτερική επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου βρίσκεται είτε μια βελονοειδής δομή ή το νήμα του μαστιγίου. Η εκκριτική συσκευή που είναι υπεύθυνη για την καθοδήγηση της έκκρισης συνδέεται με την κυτταροπλασματική επιφάνεια του εσωτερικού δακτυλίου (Εικόνα 1.2) (Cornelis, 2000; Cornelis 2006).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση του βακτηριακού μαστιγίου (a) και των TTSS της *Yersinia* (b), της *E. coli* (c) και της *Pseudomonas syringae* (d). Το βασικό σώμα του μαστιγίου αποτελείται από πρωτεΐνες που σχηματίζουν τους δακτυλίους C, MS, P και L. OM: εξωτερική μεμβράνη, PG: στρώμα πεπτιδογλυκάνης, IM: εσωτερική μεμβράνη (Cornelis, 2006).

1.2 Υποστρώματα έκκρισης

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει μια πλειάδα πρωτεϊνών που μπορούν να διακριθούν σε δομικές, εκκρινόμενες και βοηθητικές.

Οι δομικές σχηματίζουν: (i) Το βασικό σώμα της εκκριτικής μηχανής που είναι μια υπερμοριακή δομή που διαπερνά τις δυο μεμβράνες και το περίπλασμα του βακτηρίου και συνδέει το κυτταρόπλασμα με τον εξωκυττάριο χώρο. (ii) Μια εξωκυττάρια προέκταση του βασικού σώματος, που είναι μια επιμήκης, κυλινδρική δομή και πιθανότατα λειτουργεί ως αγωγός μέσω του οποίου μεταφέρονται οι μολυσματικοί παράγοντες στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Στην *P. syringae* ο αγωγός (pilus) αποτελείται κατά κύριο λόγο από την δομική πρωτεΐνη HrpA, η οποία είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpA*, το οποίο βρίσκεται αμέσως πριν από το γονίδιο *hrpZ*, στο ίδιο οπερόνιο. Η επιμήκυνση του αγωγού Hrp, ο οποίος έχει διάμετρο 6-8 nm και μήκος > 2 μm γίνεται με την προσθήκη νέων υπομονάδων HrpA στο πιο απόμακρο άκρο του από την επιφάνεια του κυττάρου με ένα μηχανισμό αυτός είναι παρόμοιο με αυτόν της επιμήκυνσης του

βακτηριακού μαστιγίου (Roine *et al.*, 1997). Η πρωτεΐνη HrpA δεν 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 (Hienonen *et al.*, 2006). Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συσχετίζεται άμεσα είτε με την υψηλή απαίτηση του βακτηρίου για την κύρια υπομονάδα που δομεί τον πύλο, είτε με την λειτουργία του mRNA ως εκκριτικού σιναλού. Η τελευταία θεώρηση συναντά αρκετούς υποστηρικτές (Aldridge & Hughes, 2001), ενώ η σύζευξη του μηχανισμού μετάφρασης και σύγχρονης έκκρισης θα δικαιολογούσε την απουσία σαπερονών τάξης III από την νησίδα παθογένειας του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος. Η πρωτεΐνη PscF της *P. aeruginosa* αποτελεί το κύριο συστατικό δόμησης της εξωκυττάριας βελονοειδούς δομής (needle) του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Όταν η πρωτεΐνη απομονώθηκε έπειτα από ετερόλογη υπερέκφραση της σε *E. coli* βρέθηκε να πολυμερίζεται παράγοντας ίνες πλάτους 80 Å και μήκους μεγαλύτερου του 1 μm, (Quinaud *et al.*, 2005).

Στις δομικές εξωκυττάριας πρωτεΐνες ανήκουν και οι πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής (needle-tip proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέουν την βελονοειδή δομή με τις πρωτεΐνες διάνοιξης-μεταφοράς της μεμβράνης του ξενιστή εξασφαλίζοντας την 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 και ολιγομερισμό των πρωτεϊνών διάνοιξης-μεταφοράς κατά την δόμηση του πόρου. Στην περίπτωση του Ysc εκκριτικού συστήματος (*Yersinia*) η πρωτεΐνη LcrV παρουσιάζει τις παραπάνω ιδιότητες. Η πρωτεΐνη έχει την επιπλέον ικανότητα να ανοίγει πόρους σε μεμβράνες (Derewenda *et al.*, 2004). Η δομή της πρωτεΐνης έχει προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X ενώ κρυσταλλικές δομές διατίθενται και για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από την *S. flexneri* IpaD και την BipD της *Burkholderia pseudomallei* (Johnson *et al.*, 2006). Και οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν μία κεντρική περιοχή σπειρωμένου σπειράματος (coiled coil) που αποτελείται από δύο α-έλικες μήκους περίπου 50 καταλοίπων.

Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διακρίνονται: (i) Στους παράγοντες παθογένειας (effectors) που δρουν στο εσωτερικό του ξενιστή και (ii) Στις πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς (translocators) που θεωρούνται υπεύθυνες για τη διάνοιξη πόρου στην μεμβράνη του ξενιστή.

Οι δραστικές πρωτεΐνες (effectors) δεν παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία ανάμεσα στα διάφορα τύπου III εκκριτικά συστήματα αλλά εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και σε πολλές περιπτώσεις τους αποδίδεται ενζυμική ενεργότητα φωσφατάσης, κινάσης, τρανσφεράσης, κυκλάσης ή λιπάσης (Hueck, 1998). Οι κύριοι στόχοι αυτών των πρωτεϊνών φαίνεται να είναι ο κυτταροσκελετός του ξενιστή και τα κυτταρικά σήματα με τελικό αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της άμυνας του. Για ορισμένους από αυτούς τους παράγοντες έχει δείχτει ότι φτάνουν μέχρι τον πυρήνα του ξενιστή όπου πιθανόν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του (Bonnas *et al.*, 2003). Τα φυτοπαθογόνα σε σχέση με τα ζωοπαθογόνα βακτήρια διαθέτουν ένα αρκετά μεγάλο οπλοστάσιο δραστικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η *P. syringae* pv *phaseolicola* διαθέτει 19 γνωστές δραστικές πρωτεΐνες, ενώ η *P. syringae* pv *tomato* DC3000 φθάνει τον αριθμό των 29 δραστικών πρωτεϊνών (Chang *et al.*, 2005) σε αντίθεση με τις 6 της *Yersinia*. Εκτός από τις δραστικές πρωτεΐνες που δρουν εντός του κυτταροπλάσματος του ξενιστή, ορισμένες δρουν εξωκυττάρια ή ενσωματώνονται στην μεμβράνη του. Για παράδειγμα στην *P. syringae* pv. *phaseolicola*, η πρωτεΐνη HrpZ, που κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζει εσωτερικά της νησίδα παθογένειας του εκκριτικού συστήματος τύπου III, μπορεί να προκαλέσει αντίδραση υπερευαισθησίας αν προστεθεί εξωγενώς. Η HrpZ φαίνεται να δημιουργεί οπές σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες *in vitro* (Lee *et al.*, 2001).

Ως πρωτεΐνες διάνοιξης – μεταφοράς(translocators) χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να δομούν τον πόρο στην μεμβράνη του ξενιστή και στη συνέχεια να δεσμεύονται με το υπόλοιπο εξωκυττάρια τμήμα της εκκριτικής συσκευής, οδηγώντας έτσι απευθείας τις δραστικές πρωτεΐνες στο εσωτερικό του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες διάνοιξης – μεταφοράς στα ζωοπαθογόνα έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς και φαίνεται ότι διεισδύουν πλήρως στην μεμβράνη του ξενιστή. Συνήθως κάθε εκκριτικό σύστημα τύπου III των

ζωοπαθογόνων φέρει δύο τέτοιες πρωτεΐνες (λ.χ. YopD και YopB στην *Yersinia*) οι οποίες συνιστούν τον πόρο στην μεμβράνη του ξενιστή. Αυτές οι πρωτεΐνες τοποθετούνται στην ευκαρυωτική μεμβράνη συνήθως με την βοήθεια της πρωτεΐνης του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής (LcrV στην περίπτωση της *Yersinia*). Στα φυτοπαθογόνα η HrpF της *Xanthomonas* είναι η μόνη υποψήφια πρωτεΐνη-translocator (Bonas *et al.*, 2002). Στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, πριν την έκκριση τους, οι πρωτεΐνες διάνοιξης-μεταφοράς βρίσκονται δεσμευμένες στις αντίστοιχες σαπερόνες τάξης II. Η δέσμευση αυτή πιθανόν αποτρέπει την πρόωρη αλληλεπίδραση τους που θα προκαλούσε κυτταροτοξικότητα στο βακτήριο (Neyt & Cornelis, 1999).

Τέλος, υπάρχει μια ομάδα βοηθητικών πρωτεϊνών (chaperons, σαπερόνες) που είναι απαραίτητες για την έκκριση ορισμένων παραγόντων. Οι πρωτεΐνες αυτές πιστεύεται ότι μεταξύ άλλων εμπλέκονται στην ιεραρχική έκκριση ορισμένων παραγόντων του εκκριτικού συστήματος και παράλληλα διασφαλίζουν την ακεραιότητα τους στο κυτταρόπλασμα του παθογόνου.

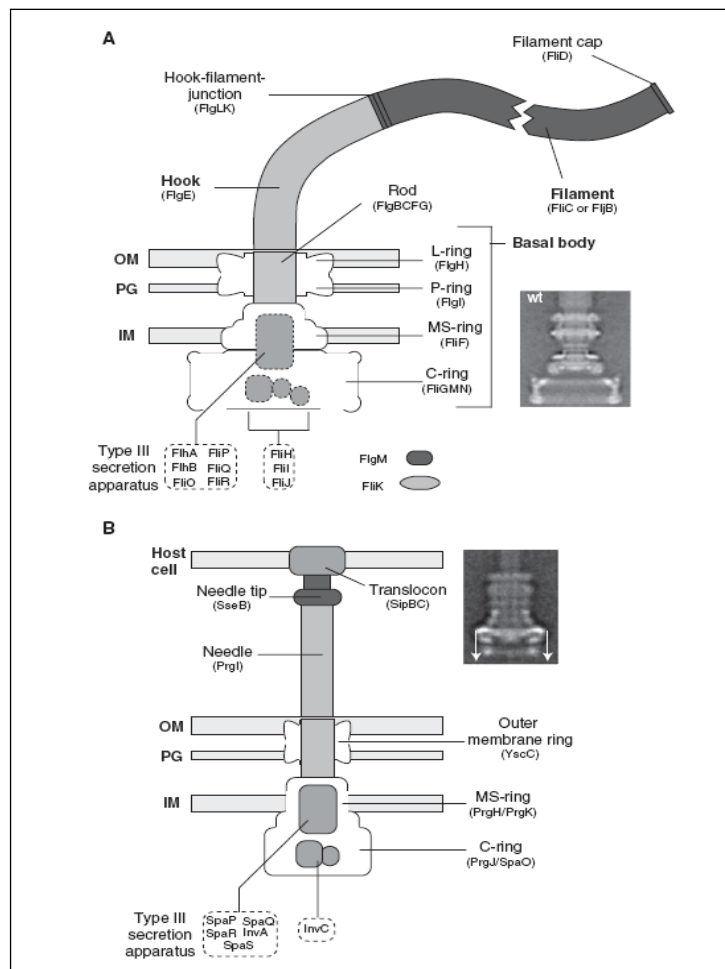
1.3 Η Αρχιτεκτονική της εκκριτικής μηχανής τύπου III

Η εκκριτική μηχανή αποτελείται από το βασικό σωματίο (basal body) και μια κυλινδρική δομή που εκτείνεται πέρα από την επιφάνεια του βακτηρίου.

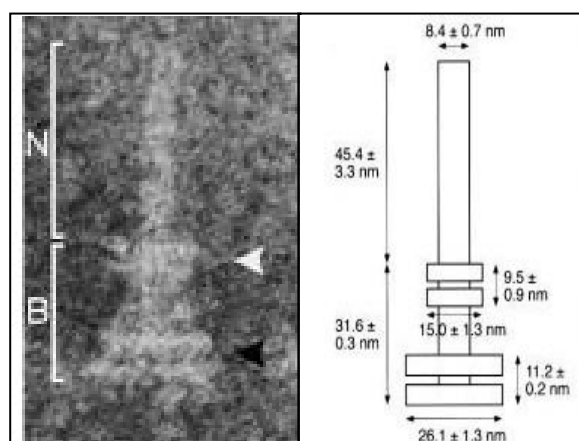
Το βασικό σωματίο του T3SS δομείται ως ένα διπλό ζεύγος ομόκεντρων δακτυλίων βυθισμένων στη διπλή μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου. Το ένα ζεύγος εντοπίζεται στην περιοχή της εξωκυττάριας μεμβράνης και το άλλο στην περιοχή της εσωτερικής. Ο εσωτερικός δακτύλιος εμφανίζει μεγαλύτερη διάμετρο σε σχέση με τον εξωτερικό. Η μορφολογία του βασικού σώματος της εκκριτικής μηχανής του μαστιγίου, όπως και των ζωοπαθογόνων *Salmonella* και *Shigella* έχει μελετηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία και παρατηρείται σημαντική ομοιότητα μεταξύ τους (Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000; Blocker *et al.*, 2003).

Ο βασικός πυρήνας του T3SS, χαρακτηριζόμενος και ως σύμπλοκο βελόνας (NC, needle complex), το οποίο στη *S. typhimurium* αποτελείται από τις πρωτεΐνες PrgH, PrgK και InvG, αγκυροβολείται επί του βασικού σωματίου. Από αυτές, οι δυο πρώτες σχηματίζουν τον εσωτερικό δακτύλιο του βασικού σώματος (inner ring), ο οποίος είναι ενσωματωμένος στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, ενώ η InvG σχηματίζει τον εξωτερικό δακτύλιο (outer ring) που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου και ανήκει στην οικογένεια των σεκρετινών YscC (secretins) (**Εικόνα 1.3B**) (Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000; Blocker *et al.*, 2001; Erhardt *et al.*, 2010). Στη *Shigella* ο εσωτερικός δακτύλιος σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες MxiJ και MxiG (**Εικόνα 1.4**) (Ghosh 2004; Tamano *et al.*, 2000).

Στην περίπτωση του μαστιγιακού συστήματος τύπου III το βασικό σωματίο αποτελείται από τον MS-δακτύλιο, τη ράβδο (rod) και τους δακτύλιους L και P, τα οποία αποτελούν τα μη κινητά τμήματα του μαστιγίου. Στα μη κινητά τμήματα ανήκουν και το άγκιστρο (hook), οι ζώνες σύνδεσης του άγκιστρου με το νημάτιο και το νημάτιο (filament) με το κάλυμμά του (cap). Ο κινητήρας (motor) αποτελείται από το περιστροφικό διακόπτη γνωστός ως C-δακτύλιος (C-ring) που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του MS-δακτυλίου, τα στοιχεία του στάτορα (stator) ή τα σύμπλοκα Mot που είναι ενσωματωμένα στην εσωτερική μεμβράνη, είναι υπεύθυνα για την πρωτογενή παραγωγή ροπής και περικλείουν τους δακτύλιους C και MS και τέλος τη μαστιγιακή μηχανή έκκρισης τύπου III που αποτελείται από μεμβρανικά στοιχεία στο κέντρο του δακτυλίου MS- και από διαλυτά ή περιφερειακά της μεμβράνης στοιχεία όπως η ATPάση που καθοδηγούν τη διαδικασία έκκρισης (**Εικόνα 1.3A**) (Erhardt *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.3: Σχηματική σύγκριση του μαστιγίου και του εκκριτικού συστήματος τύπου III της *Salmonella*. **(A)** Αριστερά, η απεικόνιση του μαστιγίου της *Salmonella*. Η δομή του μαστιγίου αποτελείται από 3 τμήματα: 1) το βασικό σώματιο (basal body). Οι τρεις δακτύλιοι του βασικού σώματος: MS, L, P 2) το άγκυστρο (hook) και 3) το νημάτιο (filament). OM: εξωτερική μεμβράνη. IM: εσωτερική μεμβράνη. PG, πεπτιδογλυκάνη. Δεξιά: η εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνει ένα απομονωμένο σύμπλοκο basal body-hook του μαστιακού συστήματος της *Salmonella*. **(B)** Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση του εκκριτικού συστήματος τύπου III της *Salmonella*. Η εκκριτική μηχανή τύπου III αποτελείται από 3 τμήματα: 1) το βασικό σώματιο (basal body) που αποτελείται από δύο ζεύγη δακτυλίων 2) τη βελονοειδή δομή (needle) και 3) τον πόρο διάνοιξης/μεταφοράς (translocon). Δεξιά: η εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνει την εκκριτική συσκευή τύπου III της *Salmonella enterica* (Erhardt *et. al*, 2010).



Εικόνα 1.4: Αριστερά: εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της τύπου III εκκριτικής μηχανής του βακτηρίου *Shigella*. Το “N” αναφέρεται στο “Needle”, ενώ το “B” στο “Basal Body” της εκκριτικής μηχανής. Το άσπρο βέλος δείχνει το ζεύγος των δακτυλίων της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ το μαύρο βέλος τη θέση του ζεύγους δακτυλίων στην εσωτερική μεμβράνη. Δεξιά: σχηματικό μοντέλο της εκκριτικής μηχανής της *Shigella* και προτεινόμενα μεγέθη για τις υποδομές που συνθέτουν την μηχανή (Tamano *et al.*, 2000).

Η προέκταση του βασικού σώματος της εκκριτικής συσκευής στον εξωκυττάριο χώρο είναι μια επιμήκης, κυλινδρική δομή που ανάλογα με το παθογόνο στο οποίο παρατηρείται αναφέρεται ως needle (στα ζωοπαθογόνα) ή ως pilus (στα φυτοπαθογόνα) (Kubori *et al.*, 2000). Η δομή αυτή θεωρείται ανάλογη του μαστιγίου και συνιστάται από τη συμμετρική επανάληψη μιας ή περισσότερων μικρών, υδρόφιλων πρωτεϊνών. Το ινίδιο είναι λεπτότερης διαμέτρου και εξαιρετικά μακρύτερο από την 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 την διατήρηση και διέλευση διαμέσου ενός σημαντικού επιπρόσθετου εμποδίου: του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (πάχους >100 nm) (Buttner & Bonas, 2006). Οι δομικές διαφορές που υπάρχουν στα εξωκυττάρια τμήματα των εκκριτικών συστημάτων τύπου III μεταξύ των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων αντανακλά την διαφορετική κυτταρική οργάνωση των ζωικών και φυτικών οργανισμών στους οποίους παρασιτούν.

Η εξακρίβωση του ρόλου του needle/pilus σαν το ουσιαστικό εξάρτημα της εκκριτικής συσκευής το οποίο προσκολλάται στην επιφάνεια του ξενιστή αποτέλεσε για χρόνια αντικείμενο έρευνας. Συγκεκριμένα, έχει δειχτεί ότι αυτές οι εξωκυττάρια δομές είναι απαραίτητες για την εκδήλωση παθογένειας και ότι η τύπου III-ελεγχόμενη έκκριση γίνεται μόνο από ορισμένα σημεία του βακτηρίου που συμπίπτουν με την παρουσία τους στην επιφάνεια του βακτηρίου (Jin *et al.* , 2003).

Ακόμα έχει δειχθεί ότι ο πύλος (pilus) λειτουργεί ως αγωγός μεταφοράς των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και όχι ως απλός μηχανισμός ιχνηλάτισης του δρόμου προς τον ξενιστή (Jin *et al.* , 2001). Επιπλέον η έκκριση φαίνεται να γίνεται μόνο από το απομακρυσμένο από τη βακτηριακή επιφάνεια άκρο του πύλου που είναι και το σημείο από το οποίο επιμηκύνεται με την διαδοχική προσθήκη υπομονάδων (Li *et. al.*, 2002).

1.4 Εξωκυττάρια συστατικά

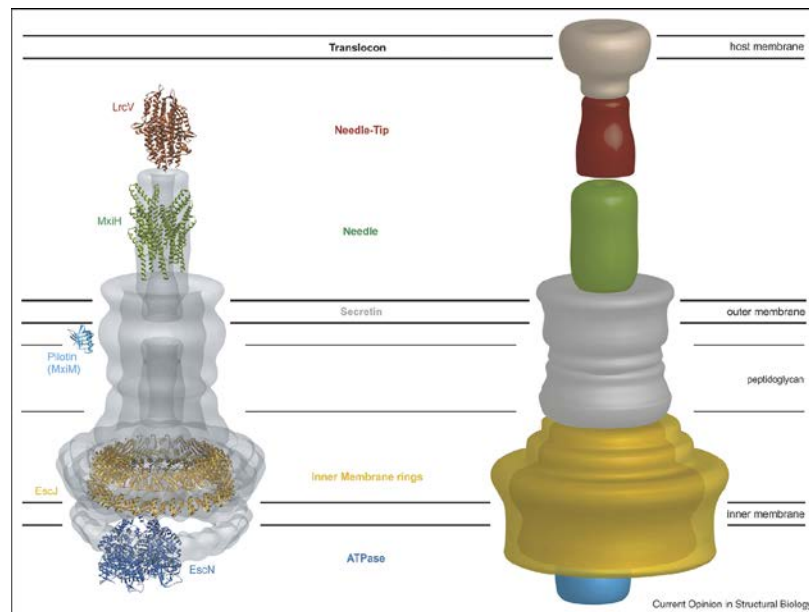
Τα εξωκυττάρια συστατικά του T3SS αποτελούν τις δομές της βελόνας για τα ζωοπαθογόνα (ή του Hcp/Hrc πύλου για τα φυτοπαθογόνα), το σύμπλοκο καλύμματος της βελόνας (needle tip complex) που σχηματίζει ένα κωδωνοειδές κάλυμμα (ή νημάτιο στην EPEC) και το σύμπλοκο του πόρου μεταφοράς (translocon, translocation pore) το οποίο αποτελείται από δυο μεμβρανικές πρωτεΐνες της οικογένειας των YopB/YopD, οι οποίες ολιγομερίζονται για το σχηματισμό ενός πόρου στη μεμβράνη του ξενιστή ευκαρυώτη (Yip & Strynadka 2006).

Η δομή βελόνας (needle) του T3SS είναι ένα ελικοειδές πολυμερές αποτελούμενο από μερικές εκατοντάδες υπομονάδων της οικογένειας YscF της *Yersinia* (**Εικόνα 1.5**). Το μήκος της βελόνας είναι 50 nm στη *Salmonella*, 45.4±3.3 nm στη *Shigella* και 58±10nm στη *Yersinia*, μεγέθη πολύ μικρότερα σε σχέση με το μήκος του βακτηριακού μαστιγίου (10-15 μm) ενώ η εσωτερική διάμετρος του καναλιού είναι 25Å σε όλες τις περιπτώσεις. Οι πρόσφατα καθορισμένες δομές των μονομερών βελόνας, MxiH (*S. flexneri*) (Deane *et al.*, 2006), BsaL (*B. pseudomallei*) (Zhang *et al.*, 2006), PrgI (*S. typhimurium*) (Wang *et al.*, 2007) (**Εικόνα 1.6A,B,Γ**) ανέδειξαν μια κοινή δομή δεματιού δύο ελίκων σπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil). Έξω από την κεντρική περιοχή σπειρωμένου σπειράματος παρατηρείται το αμινοτελικό άκρο να είναι δραστήριο, ενώ το καρβοξυτελικό να είναι αδύπλωτο.

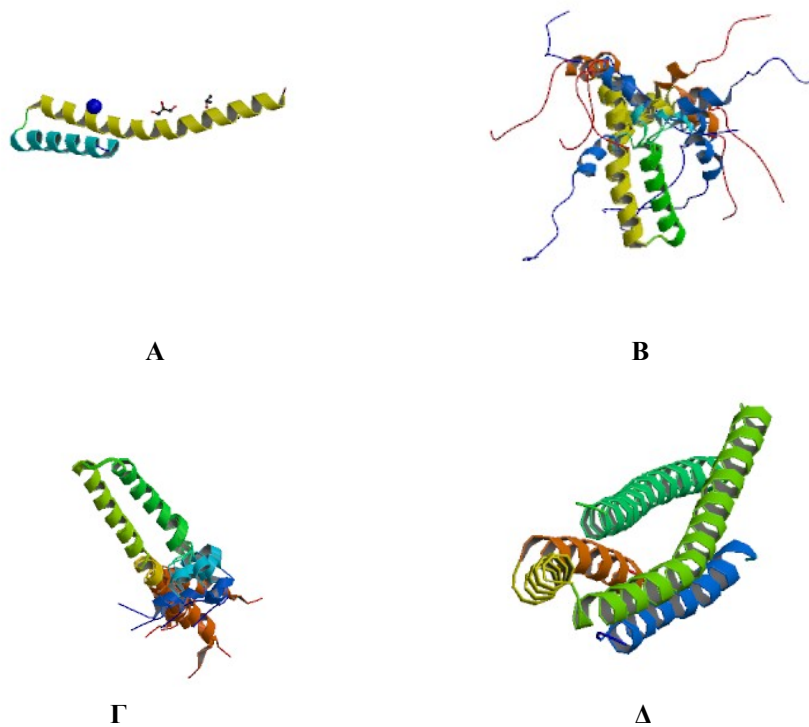
Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια αντί βελόνας διαθέτουν τον αγωγό Hcp/Hrc ή πύλο, ο οποίος έχει εξωτερική διάμετρο 8 nm όπως και οι βελόνες των ζωοπαθογόνων αλλά το μήκος του μπορεί να φτάσει και τα 2 μm, υπερβαίνοντας κατά πολύ το μήκος της αγρίου τύπου βελόνας.

Οι πρωτεΐνες καλύμματος της βελόνας πιστεύεται ότι ρυθμίζουν τη σωστή ένθεση του πόρου μεταφοράς συνδέοντας τη βελόνα με τη μεμβράνη του ξενιστή. Η EspA της *E. coli* (**Εικόνα 1.6 Δ**) (Yip *et. al.*, 2005) κι η YscF της *Yersinia pestis* (Sun *et. al.*, 2008) λύθηκαν μαζί με τις σαπερόνες τους CesA 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*) (Johnson *et. al.*, 2007;

Derewenda *et. al.*, 2004). Και οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν μία κεντρική περιοχή σπειρωμένου σπειράματος (coiled coil) που αποτελείται από δύο α-έλικες μήκους περίπου 50 καταλοίπων.



Εικόνα 1.5: Αρχιτεκτονική του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Κρυσταλλικές δομές γνωστών μεμονωμένων πρωτεϊνικών συστατικών του συστήματος [(κωδικοί πρόσβασης: LcrV(1r6f), MxiH (2v6l), MixM (1y9l), EscJ (1yj7) and EscN (2obl)] μπόρεσαν να τοποθετηθούν συνολικά σε ένα χάρτη πυκνότητας κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του συμπλόκου βελόνας από την *S. typhimurium* (3D-EM βάση δεδομένων, Κωδικός πρόσβασης: emd1100) παράλληλα με ένα μοντέλο που αναπαριστά τη μορφολογία του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Trevor *et. al.*, 2008).



Εικόνα 1.6: Κατατεθειμένες δομές στη PDB: (A) MxiH (*S. flexneri*) (PDB ID: 2ca5) (Deane *et al.*, 2006), (B) BsaL (*B. pseudomallei*) (PDB ID: 2gou) (Zhang *et al.*, 2006), (Γ) PrgI (*S. typhimurium*) (PDB ID: 2jow) (Wang *et al.*, 2007) (Δ) EspA (*E. coli*) (PDB ID: 1xou) (Yip *et. al.*, 2005).

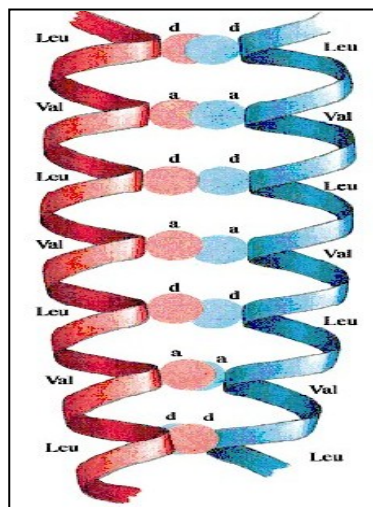
1.5 Οι πρωτεΐνες

1.5.1 Η δομή του σπειρωμένου σπειράματος

Το σπειρωμένο σπείραμα είναι ένα δομικό μοτίβο που περιέχεται κυρίως σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες (Gazi *et al.*, 2009). Ένα σπειρωμένο σπείραμα αποτελείται από δυο έως επτά α-έλικες τυλιγμένες η μια γύρω από την άλλη οι οποίες σχηματίζουν μια υπερελίκωση και όπου οι πλευρικές αλυσίδες πακετάρονται στον υδρόφοβο πυρήνα σύμφωνα με το μοντέλο «εσοχών – εξοχών». Ενώ οι κανονικές έλικες χρειάζονται 3.6 κατάλοιπα για μια πλήρη στροφή έλικας, η διαταραχή που επιβάλλεται σε κάθε μια έλικα μέσα σε ένα αριστερόστροφο σπειρωμένο σπείραμα (που είναι και το πιο σύνηθες), μειώνει την τιμή αυτή σε 3.5 κατάλοιπα ανά στροφή. Έτσι, ανά δυο στροφές έλικας σχηματίζεται μια επανάληψη επτάδας (Lupas 1996). Μια πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει από δυο έως 200 τέτοιες επαναλήψεις επτάδας. Η επτάδα συνήθως αναγράφεται ως a-b-c-d-e-f-g για τη μια έλικα και a'-b'-c'-d'-e'-f'-g' για την άλλη.

Η υπόθεση «Peptide Velcro» (Arndt *et al.*, 2002) διακρίνει τρία σημαντικά δομικά στοιχεία για το σχηματισμό ενός ειδικού σπειρωμένου σπειράματος. Αρχικά, τα κατάλοιπα στις θέσεις a και d θα πρέπει να είναι υδρόφοβα (πχ λευκίνη, βαλίνη ή ισολευκίνη) ώστε να σταθεροποιείται το διμερές έλικας μέσω υδρόφοβων δυνάμεων και δυνάμεων van der Waals. Δεύτερον, τα κατάλοιπα στις θέσεις e και g θα πρέπει να είναι φορτισμένα (λ.χ γλουταμικό ή λυσίνη) ώστε να παράγονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο ελίκων που παράγουν και την ειδικευση της αλληλεπίδρασης. Τρίτον, οι εναπομείνουσες θέσεις b,c και f πρέπει όλες να καταλαμβάνονται από υδρόφιλα κατάλοιπα καθώς αυτά θα δομήσουν τις επιφάνειες που θα είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη (**Εικόνα 1.11**).

Μια πρωτεΐνη αναδιπλώνεται για να μεγιστοποιήσει το ποσό του μη πολικού υλικού που είναι θαμμένο μέσα στον πυρήνα της αναδίπλωσης (Dill 1990). Καθώς μια απομονωμένη α-έλικα είναι οριακά σταθερή σε διάλυμα, η ελικοειδής σύνδεση υπογραμμίζει την μετάβαση από την μονομερή αποδιπλωμένη κατάσταση πχ. του τυχαίου σπειράματος στη δομή του σπειρωμένου σπειράματος (Cohen & Parry 1990, Delahay & Frankel 2002). Τα σπειρωμένα σπειράματα διακρίνονται από μια περιοδικότητα μη πολικότητας/πολικότητας και η αμφιπαθική φύση τους αυτή οδηγεί δυο ή περισσότερα να συνδέονται μεταξύ τους μέσω των υδρόφοβων επιφανειών τους. Το τοπικό κυτταρικό περιβάλλον μπορεί να τροποποιήσει την ικανότητα αναδίπλωσης και πρόσδεσης πρωτεϊνών σπειρωμένων σπειραμάτων και αλλαγές ιδίως του pH μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την αναδίπλωση και τις ελικοειδείς αλληλεπιδράσεις τους (Dutta *et al.*, 2001; Delahay & Frankel 2002).



Εικόνα 1.11: Σχηματικό διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται το πακετάρισμα των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων μεταξύ δύο α-ελίκων σε μια δομή υπερέλικας. Κάθε έβδομο κατάλοιπο και στις δύο α-έλικες είναι μια λευκίνη που ονομάζεται «d». Εξαιτίας της επανάληψης της επτάδας, τα d-

κατάλοιπα πακετάρονται το ένα απέναντι στο άλλο κατά μήκος της υπερέλικας. Τα κατάλοιπα με την ονομασία «a» είναι επίσης συνήθως υδρόφοβα και συμμετέχουν στο σχηματισμό του υδρόφοβου πυρήνα κατά μήκος της υπερέλικας (Branden, C. and Tooze, J., Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών).

Έχει υποστηριχθεί ότι υπάρχουν αλληλουχίες μέσα σε ένα σπειρωμένο σπειράμα οι οποίες είναι υπεύθυνες για την έναρξη του σχηματισμού του. Για παράδειγμα εντός της μυοσίνης, της κινεσίνης και της τροπομυοσίνης έχουν βρεθεί αλληλουχίες δεκατριών καταλοίπων που απαιτούνται για την έναρξη της συναρμολόγησης του σπειρωμένου σπειράματος (Kammerer *et al.*, 1998). Βάση αυτής της παρατήρησης είχε γίνει η υπόθεση ότι η αλληλουχία αυτή αποτελεί μια αυτόνομη ελικοειδή μονάδα αναδίπλωσης που διαμεσολαβεί στο σχηματισμό του σπειρωμένου σπειράματος. Ωστόσο, γνωστές τέτοιες αλληλουχίες έχει φανεί ότι διαθέτουν χαμηλά ποσοστά ελικοειδούς περιεχομένου και δεν μπορούν να αναγνωριστούν μόνο βάσει αυτού (Frank *et al.*, 2000). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα υπολογιστικά προγράμματα για την αναγνώριση δομών σπειρωμένου σπειράματος (COILS, MULTICOIL κλπ), τα οποία προβλέπουν τις περιοχές των δομών, την πιθανότητα σχηματισμού σπειρωμένου σπειράματος από έλικες και την ολιγομερική τους κατάσταση.

Στην επιστήμη υλικών και νανοτεχνολογίας οι ραβδόμορφες δομές και οι διακριτές μεταπτώσεις αποδιπλωμένης-αναδιπλωμένης κατάστασης έχουν εμπνεύσει ποικίλες εφαρμογές. Αλλάζοντας τα πρότυπα υδρόφοβων/πολικών καταλοίπων μιας επανάληψης επτάδας μπορεί να παραχθεί μια πλειάδα νέων δομών.

Τα σπειρωμένα σπειράματα μπορούν να δράσουν ως διακόπτες διαμόρφωσης σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Έχουν σχεδιαστεί δομές που σχηματίζουν ίνες, αμυλοειδείς ή μη αμυλοειδείς με την εφαρμογή εξωτερικού ερεθίσματος pH ή θερμοκρασίας ή μετά από απλή ανάδευση. Άλλες εφαρμογές αφορούν τη χρήση σπειρωμένων σπειραμάτων για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση μιας λειτουργίας. Τα παραδείγματα αυτά είναι μερικά μόνο από τα διαθέσιμα στη βιβλιογραφία και απεικονίζουν τη δυνατότητα χρήσης των δομών αυτών σε βιοϊατρικές εφαρμογές όπως επίσης και σε εφαρμογές υλικών.

1.5.2 Εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες

Μέχρι σήμερα όλο και περισσότερα στοιχεία αποδεικνύουν την ύπαρξη χιλιάδων εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικούς κυρίως οργανισμούς. Αναφέρεται ότι ποσοστό μεγαλύτερο του 30% είναι είτε μερικώς είτε πλήρως αποδιπλωμένες (Fink, 2005). Ένας πιθανός λόγος για τα αυξημένα ποσοστά στους ευκαρυώτες είναι η αυξημένη ανάγκη για πρωτεϊνική σηματοδότηση, ρύθμιση και έλεγχο (Dunker *et al.*, 2001). Οι εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες συνήθως υστερούν σε κατάλοιπα που προωθούν την αναδίπλωση όπως είναι τα W, C, F, Y, V, L, N και είναι πλούσιες σε κατάλοιπα που προωθούν την αποδίπλωση A, R, G, Q, S, P, E, K (Fink, 2005). Η προστασία της αδίπλωτης πρωτεΐνης μέσω μοριακής σύνδεσης καθιστά εμφανή την παρουσία της όταν με την απομάκρυνση του αλληλεπιδρώντος μορίου η πρωτεΐνη καθίσταται ευαίσθητη σε δράση πρωτεασών και μειώνεται η βιωσιμότητά της μέσα στο κύτταρο. Παρουσία των αλληλεπιδρώντων μορίων τους, το ενεργειακό τοπίο για τις αδίπλωτες πρωτεΐνες δύναται να μεταβληθεί, οδηγώντας τις σε αναδίπλωση κατά την πρόσδεση. Ο μοριακός συνωστισμός πολλές φορές μπορεί να οδηγήσει την ισορροπία μιας αδίπλωτης περιοχής προς την διπλωμένη κατάσταση. Αντίθετα, απουσία του μορίου πρόσδεσης, η αδίπλωτη πρωτεΐνη μπορεί να μην λάβει μια καθορισμένη τεταρτοταγή δομή αλλά να αποκτά παροδικά πολλούς προσανατολισμούς σε σχέση με το κύριο σώμα του μορίου.

Οι διάφορες μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα από εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες είναι η πρόσδεση σε άλλες πρωτεΐνες πχ κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες, αναστολείς της μετάφρασης, ή σε μόρια νουκλεϊκών οξέων, πχ rRNA, mRNA, tRNA και DNA. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι συχνά αδίπλωτες στο διάλυμα μέχρι να ενσωματωθούν στη μεμβράνη οπότε και αποκτούν ελικοειδή μορφή. Ακόμα διάφορες

ευκίνητες περιοχές ενζύμων αποκτούν δομή κατά την πρόσδεση του υποστρώματός τους ή της προσθετικής ομάδας.

Έχει διατυπωθεί το μοντέλο της πρωτεϊνικής τετράδας, βάση του οποίου μια πρωτεΐνη μπορεί να υπάρξει σε τέσσερις καταστάσεις: την πλήρως διπλωμένη, τη μορφή εύπλαστης σφαίρας, τη μορφή προ-εύπλαστης σφαίρας και την πλήρως αποδιπλωμένη μορφή ή τυχαίο σπείραμα. Το είδος της φυσικής διαμόρφωσης που θα λάβει μια πρωτεΐνη μέσα στο κύτταρο εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η πρωτοταγής αλληλουχία της, η παρουσία ή απουσία χημικής τροποποίησης, η παρουσία ή απουσία αλληλεπιδρώντων μορίων και οι συνθήκες του περιβάλλοντος μέσου. Αυτοί οι παράγοντες είναι σε δυναμική κατάσταση μέσα στο κύτταρο και έτσι οι φυσιολογικές πρωτεΐνες μπορεί να μεταπίπτουν από τη μια μορφή στην άλλη. Η λειτουργία μπορεί να είναι συνδεδεμένη με οποιαδήποτε από τις μορφές αυτές (Dunker *et al.*, 2002).

Σημαντικά παραδείγματα εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών αποτελούν τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών HgrO/FliJ/YscO. Οι αμινοξικές αλληλουχίες αυτών των μικρών υδρόφιλων πρωτεϊνών παρουσιάζουν τάση για εγγενή αποδίπλωση και σχηματισμό σπειρωμένου σπειράματος. Ενδείξεις από την HgrO και άλλα ανάλογα πρωτεϊνικά μόρια από άλλες οικογένειες T3SS υποδεικνύουν ότι η τεράστια ευκαμψία αυτών των μικρών εγγενώς αδίπλωτων μορίων να αλλάζουν δομή όταν συνδεθούν στους συγγενής διπλωμένους πρωτεϊνικούς στόχους τους, σε συνδυασμό με την παρουσία των σπειρωμένων σπειραμάτων ίσως είναι σημαντικά στοιχεία για την εγκαθίδρυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα πλαίσια της λειτουργίας του T3SS (Gazi *et al.*, 2008).

1.6 Σκοπός Εργασίας

Ο στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πρωτεΐνης HgrA, μια μικρής υδροφολικής πρωτεΐνης του T3SS της *P. syringae* pv. *phaseolicola*, καθώς και του μεταλλάγματός της, HgrAΔC8. Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη ότι το καρβοξυτελικό άκρο της HgrA από την *P. syringae* pv. *phaseolicola* θεωρείται υπεύθυνο για τον πολυμερισμό της, καθώς και ότι η καρβοξυτελική προβλεπόμενη α-έλικας της πρωτεΐνης έχει αμφιπαθητικό χαρακτήρα, σχεδιάστηκε μία γονιδιακή κατασκευή με 8 υπολειπόμενα αμινοξικά κατάλοιπα (HgrAΔC8) προκειμένου θεωρητικά να αποφευχθεί ο αυθόρμητος πολυμερισμός της, και έτσι να συγκριθούν οι δομικές και φυσικοχημικές ιδιότητες της ολόκληρης πρωτεΐνης και του μεταλλάγματος.

Η HgrA είναι η κύρια δομική πρωτεΐνη του αγωγού Hgr, του οποίου η διάμετρος από δομικές μελέτες σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως *P. syringae* pv. *Tomato*, *Erwinia amylovora* και *Ralstonia solanacearum* υπολογίζεται περίπου 6-8 nm και το μήκος μέχρι 2 μm. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HgrA αγρίου τύπου υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυσικοχημική και δομική μελέτη της πρωτεΐνης σε διάφορες συνθήκες pH, χρόνου, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης με μεθόδους κυκλικού διχρωισμού (CD), φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), φασματοσκοπίας Raman (Raman spectroscopy), και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός του μεταλλάγματος HgrAΔC8 σε διάφορες συνθήκες με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, CD, SAXS και HRTEM.

Τέλος, ακολουθήθηκε πρωτόκολλο απομόνωσης του Hgr/Hgc πύλου από την *P. syringae* pv. *phaseolicola*, με σκοπό να πραγματοποιηθεί ο δομικός χαρακτηρισμός του με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και να συγκριθούν οι πολυμερικές του ιδιότητες με τις ιδιότητες πολυμερισμού της ανασυνδυασμένης HgrA.

1.7 Βιβλιογραφία

- Arndt K.M., Pelletier J.N., Muller K.M., Pluckthun A. & Alber T. 2002. Comparison of *in vivo* selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure*, 10, 1235-1248.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., & Dinesh-Kumar, S.P., 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science*. May 2; 276(5313):726-33.
- Blocker A., Jouihri N., Larquet E., Gounon P., Ebel F., Parsot C., Sansonetti P. & Allaoui A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretin. *Mol Microbiol*, 39(3), 652-663.
- Blocker A., Komoriya K. & Aizawa S.-I. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *PNAs*, 100(6), 3027-3030.
- Bonas U. & Buttner D. 2002. Port of entry — the type III secretion translocon. *Trends Microbiol*, 10, 186-192.
- Bonas U. & Buttner D. 2003. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 312-319.
- Buttner D. & Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol*, 9, 193-200.
- Chang J.H., Urbach J.M., Law T.F., Arnold L.W., Hu A., Gombar S., Grant S.R., Ausubel F.M., & Dangl J.L., 2005. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 102, 2549.
- Cohen C., & Parry, D.A.D. 1990. α -helical coiled-coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Proteins* 7, 1–15.
- Cornelis, G.R., & Van Gijsegem, F., 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol.* 54:735-74.
- Cornelis, G.R., 2002. The Yersinia Ysc-Yop ‘type III’ weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Oct;3(10):742-52.
- Cornelis G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature*, 4, 811-825.
- Cornelis GR., 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol*, 4(11):811-825.
- Deane J.E., Roversi P., Cordes F.S., Johnson S., Kenjale R., Daniell S., et al. 2006. Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *PNAs*, 103, 12529–12533.
- Delahay M.R. & Frankel G. 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol. Microbiol.* 45(4), 905-916.
- Derewenda U., Mateja A., Devedjiev Y., Routzahn K.M., Evdokimov A.G., Derewenda Z.S. & Waugh D.S. 2004. The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure*, 12, 301–306.
- Desvaux M., Parham N.J., Scott-Tucker A., Henderson I.R., 2004b. The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol.* 12(7), 306–309
- Desvaux M., Hébraud M., Henderson I.R., Pallen M.J., 2006a. Type III secretion: what’s in a name? *Trends Microbiol.* 14(4), 157–160.
- Desvaux M, Hébraud M, Talon R, Henderson I.R., 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends Microbiol.*, 17(4):139-145.
- Dill K.A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133-7155.
- Dunker A.K. & Obradovic Z. 2001. The protein trinity-linking function and disorder. *Nat. Biotechnol*, 19(9), 805-806.
- Dunker A.K., Brown C.J., Lawson J.D., Iakoucheva L.M. & Obradovic Z. 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, 41(21), 6573-6582.
- Dutta K., Alexandrov A., Huang H., & Pascal S.M. 2001. pH-induced folding of an apoptotic coiled-coil. *Protein Sci* 10, 2531–2540.
- Marc Erhardt1, Keichi Namba2, and Kelly T. Hughes, 2010. Bacterial Nanomachines: The Flagellum and Type III Injectisome. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Filloux A., Hachani A., Bleves S., 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154(Pt 6):1570-1583.
- Frank S., Lustig A., Schulthess T., Engel J. & Kammerer R.A. 2000. A distinct seven-residue trigger sequence is indispensable for proper coiled-coil formation of the human macrophage scavenger receptor oligomerization domain. *J Biol Chem.* 275, 11672-11677.
- Gauthier A. & Finlay B.B., 2003. Translocated Intimin Receptor and Its Chaperone Interact with ATPase of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185,6747.
- Gazi A.D., Bastaki M., Charova S.N., Gkougkoulia E.A., Kapelios E.A., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2008. Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *JBC*, 283(49), 34062-34068.
- Gazi A.D., Charova S.N., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2009. Coiled-coils in type III secretion systems: structural flexibility, disorder and biological implications. *Cellular Microbiology*, 11(5), 719-729.
- Ghosh P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(4), 771-795.
- Johnson S., Roversi P., Espina M., Olive A., Deane J.E., Birket S., Field T., Picking W.D. et al., 2006. Self-chaperoning of the Type III Secretion System needle tip proteins IpaD and BipD. *J.Biol.Chem.* , 282, 4035–4044.

- Hauck, P., Thilmony, R. & He S.-Y., 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 8577-8582.
- Herczenik E., Gebbink M., 2008. Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease, The Faseb Journal Review.
- Hienonen E., Romantschuk M. & Taira S., 2006. Stabilization of heterologous transcripts with hrpA, mRNA of a type III secretion system component. Microbial Cell Factories 2006, 5(Suppl 1), P72. Poster Presentation.
- Hueck C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Mol. Biol. Rev. 62, 379.
- Jin, Q. & He S.-Y. 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. Science 294, 2556-2558.
- Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. & He, S.-Y., 2003. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*, Microbes Infect. 5, 301-310.
- Kammerer R.A., Schulthess T., Landwehr R., Lustig A., Engel J., Aebi U. & Steinmetz M.O. 1998. An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. PNAS, 95(23), 13419-13424.
- Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E. & Aizawa S.I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science, 280(5363), 602-605.
- Kubori T., Sukhan A., Aizawa S.I. & Galan J. E., 2000. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, Proc Natl. Acad Sci U S A. 97, 10225-10230.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A.P., Panopoulos N.J., et al., 2001. HrpZPsp from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. Proc Natl. Acad Sci U S A. 98, 289.
- Lee S.H. & Galan J.E., 2004. *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. Mol Microbiol. 51, 483.
- Lindgren P.B., Peet R.C. & Panopoulos N.J., 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. J. Bacteriol. 168, 512.
- Lupas A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. Trends Biochem Sci. 21(10), 375-382.
- Mindrinos, M.N., Rahme L.G., Fredrick, R.D., Hatziloukas, E., Grimm, C., and Panopoulos, N, J., 1990. Structure, function, regulation, and evolution of genes involved in pathogenicity, the hypersensitive response, and phaseolotoxin immunity in the bean halo blight pathogen. Am. Soc. of Microbiology, Washington, D.C. 74-81.
- Neyt C. & Cornelis G.R., 1999. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. Mol Microbiol 31, 143.
- Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiaho-Lassila E. L., Kalkkinen E. L., Romantschuk M., & He S. Y. 1997. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. PNAS, 94, 3459-3464.
- Sun, P., Tropea, J.E., Austin, B.P., Cherry, S., Waugh, D.S., 2008. Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG. J. Mol. Biol., 377:819-830.
- Tamano K., Aizawa S., Katayama E., Nonaka T., Imajoh-Ohmi S., Kuwae A., Nagai S. & Sasakawa C. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. EMBO J, 19(15), 3876-3887.
- Thomas N.A. & Finlay B.B., 2003. Establishing order for type III secretion substrates – a hierarchical process. TRENDS Microbiol. 11, 398.
- Thomasson W.A. Unraveling the Mystery of Protein Folding. BREAKTHROUGHS IN BIOSCIENCE.
- Trevor F Moraes I, Thomas Spreter I and Natalie CJ Strynadka, 2008. Piecing together the Type III injectisome of bacterial pathogens. Current Opinion in Structural Biology, 18:258-266.
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC, 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. BMC Microbiology, 9 (Suppl 1):S2.
- Quinaud M., Chabert J., Faudry E., Neumann E., Lemaire D., Pastor A., et al., 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 280, 36293.
- Wang Y., Ouellette A.N., Egan C.W., Rathinavelan T., Im W. & De Guzman R.N. 2007. Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL and MxiH. J Mol Biol 371(5), 1304-1314.
- Wei Z.-M. & Beer S. V., 1995. hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. J. Bacteriol. 175, 6201.
- Yip C.K., Finlay B.B. & Strynadka N.C. 2005. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. Nat Struct Mol Biol, 12, 75-81.
- Yip C.K. & Strynadka N.C. 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. Trends Biochem Sci, 31, 223-230.
- Zhang L., Wang Y., Picking W.L., Picking W.D. & De Guzman R.N. 2006. Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. J Mol Biol 359, 322-330.

BIBΛIA

Branden C., Tooze J., Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών, Έκδοση 2^η, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Garland.

Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν τεχνικές καθαρισμού πρωτεϊνών, χρωματογραφίας συγγένειας, χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, κυκλικού διχρωισμού(CD), σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες, φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR), φασματοσκοπίας Raman (Raman spectroscopy), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM), κρυστάλλωσης καθώς και βιοπληροφορικές μελέτες. 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 Κεφάλαιο 3 όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

2.1 In silico επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών

Η αμινοξική αλληλουχία εμπεριέχει πληροφορία για την τρισδιάστατη διεύθυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο και την σταθερότητα της.

Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της υπό μελέτη πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος **PSIPRED** (Jones, 1999) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Η μέθοδος χρησιμοποιεί 4 ξεχωριστά νευρωνικά δίκτυα, τα οποία εκπαιδεύονται από τα μοτίβα αλληλουχιών που προκύπτουν από την **PSI-BLAST** (Position Specific Iterated - BLAST). Η μέθοδος PSI-BLAST παράγει μια πολύ ευαίσθητη στοίχιση αλληλουχιών και ανιχνεύει ακόμα και μακρινές ομόλογες αλληλουχίες συγκρινόμενες με την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Έτσι, το προφίλ αλληλουχιών που έχει προκύψει ως αποτέλεσμα των υπολογισμών του PSI-BLAST, χρησιμοποιείται ως αρχείο έναρξης για το πρόγραμμα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής PSIPRED. Για τη μείωση των ψευδο-θετικών αποτελεσμάτων των μεθόδων αναγνώρισης αναδίπλωσης, ειδικά όσον αφορά μεγάλες αλληλουχίες, είναι σημαντικός ο αποκλεισμός προκατειλημμένων περιοχών επί της αλληλουχίας ενδιαφέροντος πριν γίνει η πρόβλεψη (Jones 1999). Ο διακομιστής του PSIPRED χρησιμοποιεί το πρόγραμμα PFILT το οποίο φιλτράρει και καλύπτει περιοχές χαμηλής περιπλοκότητας όπως διαμεμβρανικά τμήματα ή περιοχές σπειροειδών σπειραμάτων.

Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν ακόμα με το πρόγραμμα **FoldIndex** (Prilusky *et al.*, 2005) (<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>) για το κατά πόσον μπορούν να δομήσουν σφαιρικές πρωτεΐνες έχοντας ικανό ποσοστό υδρόφοβων αμινοξέων σε σχέση με τα φορτισμένα τους κατάλοιπα. Ο αλγόριθμος στηρίζεται στα αποτελέσματα του Uversky *et al.* (2000) για τη διάκριση μεταξύ διπλωμένων κι εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα η μέθοδος βασίζεται στη μέση υδροφοβικότητα των αμινοξέων της πρωτεΐνης και στην απόλυτη τιμή του καθαρού τους φορτίου. Οι Uversky *et al.* (2000) όρισαν i) την απόλυτη τιμή του καθαρού φορτίου $|\langle R \rangle|$, ως την απόλυτη τιμή της διαφοράς μεταξύ των αριθμών των θετικά από τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα σε τιμή pH 7.0, διαιρεμένης με τον συνολικό αριθμό καταλοίπων, και ii) την απόλυτη τιμή της υδροφοβικότητας $\langle H \rangle$, ως το άθροισμα της υδροφοβικότητας όλων των καταλοίπων, διαιρεμένου με το συνολικό αριθμό καταλοίπων. Η εξίσωση των ορίων μεταξύ διπλωμένων και εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών όπως είχε πρωτοδιατυπωθεί από την ίδια ομάδα:

$$|\langle R \rangle| = 2.785 \langle H \rangle - 1.151$$

αναδιαμορφώθηκε στον αλγόριθμο FoldIndex:

Δείκτης αναδίπλωσης (Fold index) $I_F = 2.785\langle H \rangle - |\langle R \rangle| - 1.151$.

Βάσει αυτού, όλες οι θετικές τιμές αναπαριστούν πρωτεΐνες ή επικράτειες επί πρωτεϊνών που πιθανόν είναι αναδιπλωμένες, ενώ οι αρνητικές τιμές αναπαριστούν εκείνες που πιθανόν είναι εγγενώς αδίπλωτες.

Το πρόγραμμα **Matcher** (Fischetti *et al.*, 1993) χρησιμοποιήθηκε για τον 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.

2.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μικροοργανισμών στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι ποικίλα. Οι γρήγοροι ρυθμοί ανάπτυξης τους, η εύκολη διαχείριση του γενετικού υλικού τους, η πληθώρα διαφορετικών στελεχών, η εύκολη απόδοση στην παραγωγή του προϊόντος στο τεχνικό περιβάλλον που δεν επηρεάζεται από εποχικούς παράγοντες και οι μικρές απαιτήσεις τους, τα καθιστούν εξαιρετικά εργαλεία για την παραγωγή ετερόλογων προϊόντων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η σημαντικότερη αιτία για την επιλογή ενός βακτηρίου ως μικροοργανισμού έκφρασης είναι το γεγονός ότι οι υπό εξέταση πρωτεΐνες εκφράζονται φυσιολογικά στην *P. syringae*, ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο. Διασφαλίζεται έτσι η ορθή μετάφραση του γονιδίου καθώς και η ορθή αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εντός του συγγενικού κυτταροπλασματικού περιβάλλοντος. Έχει δειχθεί μάλιστα ότι δραστικές πρωτεΐνες από φυτοπαθογόνα βακτήρια όταν εκφραστούν ετερόλογα σε ζωοπαθογόνα αναγνωρίζονται και εκκρίνονται. Για την παραγωγή των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για τους παραπάνω λόγους το Gram αρνητικό βακτήριο *E. coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος

BL21.

Ειδικότερα οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην έκφραση πρέπει να είναι απενεργοποιημένες ως προς την παρουσία των πιο επιζήμιων φυσικών πρωτεασών, να διατηρούν σταθερά το πλασμίδιο έκφρασης και να φέρουν τα γενετικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για το σύστημα έκφρασης (λχ φαγικό θραύσμα DE3). Τέτοιο στέλεχος βακτηρίων *E. coli* είναι το BL21, το οποίο έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικό σε συστηματικές εφαρμογές ανασυνδυασμένης έκφρασης. Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται γρήγορα σε ελάχιστο θρεπτικό και είναι μη παθογόνα για τον άνθρωπο. Επίσης είναι παροπλισμένα για τις πρωτεάσες Lon & OmpT που δύνανται να διαταράξουν την απομόνωση άθικτης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί πολλά παράγωγα των κυττάρων BL21 που φέρουν διαφοροποιημένο γενετικό υπόβαθρο για την βελτίωση της έκφρασης του γονιδίου-στόχος.

Η έκφραση στο φορέα pET-26b(+) (*Novagen*) ελέγχεται από το σύστημα του T7 εκκινητή 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 προαναφερόμενες DE3. Η έκφραση της T7 πολυμεράσης από το κύτταρο ξεκινά με την προσθήκη του σακχάρου ισοπροπυλ-θειογαλακτοπυρανοσίνη (IPTG), καθώς το γονίδιο υπόκειται σε έλεγχο από το lac εκκινητή και το lac ρυθμιστή ο οποίος αναστέλλεται από το LacI αναστολέα. Ο ίδιος ρυθμιστής βρίσκεται και downstream του T7 εκκινητή στον πλασμιδιακό φορέα. Επομένως υπάρχει διπλός έλεγχος για να μην ξεκινήσει η υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πριν την επαγωγή με IPTG με συνέπειες στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

2.2.1 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 1:40 υγρό θρεπτικό μέσο LB, εφοδιασμένο με 40 μgml^{-1} καναμυκίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37° C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η OD₆₀₀ της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0.5 και 0.7.

Στη συνέχεια αφαιρέθηκε 1 ml κυτταρικού αιωρήματος για να χρησιμοποιηθεί ως μη επαγμένο δείγμα-μάρτυρας, προστέθηκε ο επαγωγικός παράγοντας (IPTG) σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM. και οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα ανάδευσης ρυθμισμένο στους 22 °C για την επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης για 4 ώρες. Μετά το πέρας της επαγωγής μετρήθηκε εκ νέου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, αφαιρέθηκε 1 ml κυττάρων ως επαγμένο δείγμα, ο υπόλοιπος όγκος καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε 2737 g για 25 min στους 4 °C και οι κυτταρικές πάστες φυλάχθηκαν στους -20 °C (όταν η λύση των κυττάρων επρόκειτο να γίνει μέσα σε λιγότερο από 24 ώρες) ή στους -80 °C για πιο μακρόχρονη αποθήκευση.

2.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης που βασίζεται στη δυνατότητα μετακίνησης φορτισμένων μορίων μέσα σε ηλεκτρικά πεδία, προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο για να διαχωριστούν πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως DNA και RNA. Η ταχύτητα μετακίνησης (v) της πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και το συντελεστή τριβής (f).

$$v = Ez / f$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη Ez που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετα φορτισμένο ηλεκτρόδιο είναι αντίθετη της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου που μετακινείται και του μέσου μετακίνησης. Η σταθερά τριβής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου.

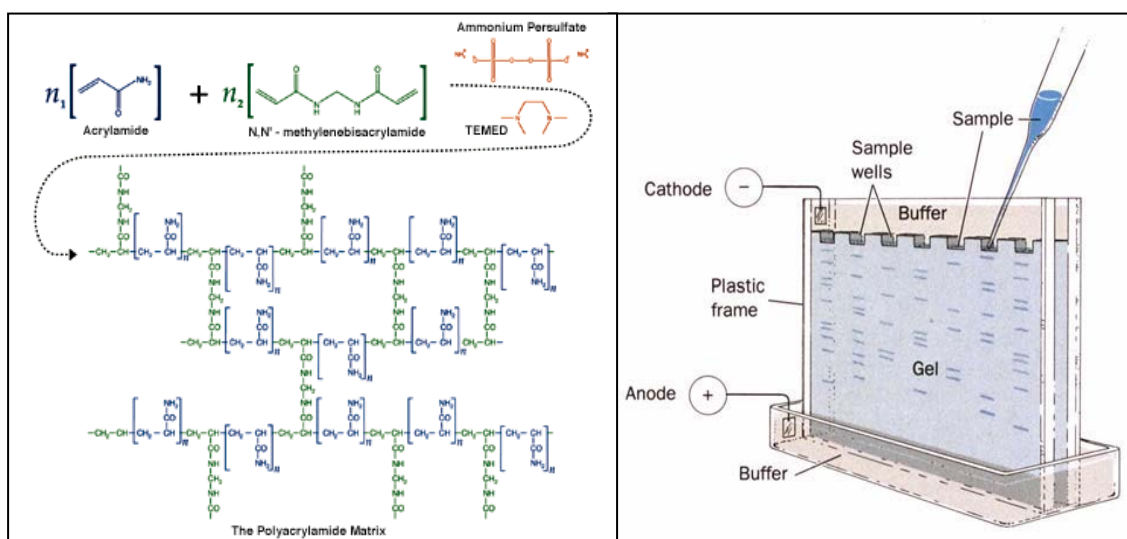
Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα και όχι σε διάλυμα, επειδή το πήκτωμα λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων κι επιπλέον καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις της θερμοκρασίας, προϋπόθεση απαραίτητη για σωστό διαχωρισμό μορίων. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δι-ακρυλαμίδης (MBA) (**Εικόνα 2.1, αριστερά**). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Μόρια ενδιαμέσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS (Kingsbury & Masters, 1970). Έτσι σχηματίζεται ένα πλέγμα, με μέγεθος πόρων που κυμαίνεται αφενός ανάλογα με την ολική συγκέντρωση ακρυλαμίδης (%T) και MBA (%C, crosslinker) και, αφετέρου, ανάλογα με τη σχετική συγκέντρωση της MBA ως προς την ακρυλαμίδη. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Σε μία τυπική ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μάζα τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι

αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης (**Εικόνα 2.1, δεξιά**). Η απόσταση μετακίνησης των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες σε ομοιογενή πηκτώματα (Rf) είναι αντιστρόφως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Αυτή η εμπειρική σχέση δεν ακολουθείται σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. σε πρωτεΐνες πλούσιες σε υδατάνθρακες. Το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης καθίσταται πλέον αμελητέο καθώς το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο σε μία ευρεία κλίμακα pH. Έτσι, τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται με κατεύθυνση από την κάθοδο προς την άνοδο (**Εικόνα 2.1, δεξιά**).



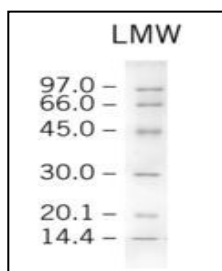
Εικόνα 2.1 Αριστερά: Σχηματισμός πηκτώματος ακρυλαμίδης. **Δεξιά:** πηκτώμα επίπεδης ηλεκτροφόρησης. Διακρίνεται ο τρόπος «φόρτωσης» των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής καθώς και η συνδεσμολογία της συσκευής.

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 (Laemmli, 1970).

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται 1:4 με το διάλυμα φόρτωσης 5x sample buffer (1x sample buffer: 750 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 % SDS, 52 % γλυκερίνη, bromophenol-blue, 4M 2-μερκαπτοαιθανόλη). 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 (**Εικόνα 2.1, δεξιά**). Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού (10 % μείγματος ακρυλαμίδης (29 % ακρυλαμίδη, 1 % N,N'-μεθυλενοδιακρυλαμίδη), 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 (running buffer) 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.

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. Ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών ήταν ο LMW (Low Molecular Weight) από την εταιρεία Amersham GE Healthcare (**Εικόνα 2.2**).



Εικόνα 2.2: Η ηλεκτροφορητική εικόνα του πρωτεϊνικού μοριακού μάρτυρα μεγεθών LMW. 97 kDa: β-φωσφορυλάση, 66 kDa: αλβουμίνη, 45 kDa: οβαλβουμίνη, 30 kDa: καρβονική ανυδράση, 20.1 kDa: αναστολέας της τρυψίνης, 14.4 kDa: α-λακταλβουμίνη (GE Healthcare product information).

2.3 Επαγωγή του T3SS της *P. Syringae* pv. *Phaseolicola* και απομόνωση του Hrp/Hrc πύλου

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αγρίου τύπου *P.syringae* pv. *phaseolicola* (race1, Psp1448a). Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB. Για την επαγωγή του T3SS οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο επαγωγής hrp, το οποίο περιείχε 50mM KHPO₄ pH 5.8, 7,6mM NH₄SO₄, 1.7mM MgCl₂ και 1,7mM NaCl στο οποίο προστέθηκαν 10mM φρουκτόζης προμηθευμένης από την εταιρία Scharlau. Το φυτικό εκχύλισμα που χρησιμοποιήθηκε σαν βοηθητικό μέσο στην επαγωγή του T3SS προήρθε από το φυτό *P. Vulgaris* και συγκεκριμένα από την ποικιλία Tender Green την οποία προμηθευτήκαμε από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Βιολογικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την επαναδιάλυση των κυτταρικών παστών ήταν το PBS (phosphate buffer saline) pH 7.4 το οποίο περιείχε 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄ • 2 H₂O και 1.76 mM KH₂PO₄. Τα χημικά της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) των πρωτεϊνικών δειγμάτων προήλθαν από την εταιρία Merck.

2.3.1 Επαγωγή καλλιεργειών *P.syringae* pv. *phaseolicola* παρουσία 10% φυτικού εκχυλίσματος *P. Vulgaris*

Παγωμένο στους -80°C γλυκερολικό απόθεμα κυττάρων *P.syringae* pv. *phaseolicola* χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό φρέσκου θρεπτικού μέσου LB. Η καλλιέργεια επωάστηκε στους 28°C για 48 ώρες μέχρις κορεσμού. Στη συνέχεια αυτή η καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 50ml φρέσκου θρεπτικού μέσου σε αραιώση 1:1000 και επωάστηκε στους 28°C μέχρις ότου η οπτική πυκνότητα των κυττάρων σε μήκος κύματος 600nm (OD600) φτάσει την τιμή 0.3. Στο σημείο αυτό τα κύτταρα παρελήφθησαν με ήπια φυγοκέντρηση (10', 3000rpm, 4°C), οι κυτταρικές πάστες ξεπλύθηκαν δυο φορές με ελάχιστο

θρεπτικό μέσο επαγωγής hgr και τελικά τα κύτταρα αραιώθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο επαγωγής hgr εφοδιασμένο με φρουκτόζη μέχρι την τιμή OD600=0.21. Από την αρχική αυτή καλλιέργεια προέκυψαν δυο υποκαλλιέργειες, στην μία εκ των οποίων προστέθηκε 10 % v.v φυτικό εκχύλισμα *P. Vulgaris*, ενώ στην άλλη δεν προστέθηκε καθόλου εκχύλισμα. Οι δυο υποκαλλιέργειες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στους 18°C για επώαση και επαγωγή του T3SS. Στις 6, 12 και 24 ώρες μετρήθηκε η OD600 των 2 καλλιεργειών και ακολούθησε κοινό πρωτόκολλο απομόνωσης του Hgr/Hrc πύλου για κάθε δειγματοληψία. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο στις 6, 12 και 24 ώρες έγιναν τα εξής: Τα κύτταρα παρελήφθησαν με ήπια φυγοκέντρηση (7', 3000rpm, 18°C), οι κυτταρικές πάστες επαναδιαλύθηκαν σε PBS και στη συνέχεια οι πύλοι από τα κύτταρα καταθρουματίστηκαν με συνεχές πιπετάρισμα με τη χρήση βελόνας διαμέτρου 21 gauge. Στη συνέχεια με φυγοκέντρηση (5', 3000rpm, 18°C) παρελήφθησαν οι πύλοι στο υπερκείμενο, ενώ στην κυτταρική πάστα παρέμειναν τα κύτταρα. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν 8 μl από αυτό το υπερκείμενο για προετοιμασία δείγματος παρατήρησης με ηλεκτρονική μικροσκοπία, ενώ το υπόλοιπο δείγμα αποθηκεύτηκε στους 4°C για μελλοντική χρήση.

2.3.2 Χρώση ηλεκτροφορημάτων με άργυρο (Silver Staining)

Η χρώση αργύρου πραγματοποιείται όταν οι ποσότητες των πρωτεϊνών στα διάφορα κλάσματα είναι πολύ μικρές (Chevallet *et al.*, 2006). Η ευαισθησία ανίχνευσης πρωτεϊνών αυξάνει κατά 5 περίπου φορές σε σχέση με την κλασσική μέθοδο χρώσης με Coomassie Brilliant Blue. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το παρακάτω:

1. Επώαση του gel με μονιμοποιητή(40% αιθανόλης, 10% οξικό οξύ και 50% H₂O) για 1h.
2. Πλύση gel σε H₂O για τουλάχιστον 30 min. Πλύση για 16h με πολλές αλλαγές του H₂O θα αφαιρέσει όλο το οξικό οξύ και θα μειώσει τον θόρυβο της χρώσης και θα αυξήσει την ευαισθησία.
3. Προετοιμασία gel για εμφάνιση σε 0,02% θειοθειικό νάτριο Na₂S₂O₃ (0,04 Na₂S₂O₃ σε 200ml H₂O) για 1 min μόνο. Περισσότερος χρόνος μειώνει την ανάκτηση πρωτεϊνών από το gel.
4. 3 πλύσεις του gel σε H₂O για 20sec/ πλύση.
5. Επώαση gel για 20min στους 4° C σε διάλυμα 0,1% νιτρικού αργύρου(0,2 g AgNO₃, 200ml H₂O, 0,002% φορμαλδεΰδης (προσθήκη 40μl φορμαλδεΰδης 35% προ της χρήσης). Η χρώση ενισχύεται από το κρύο AgNO₃.
6. 3 πλύσεις του gel σε H₂O για 20sec/ πλύση.
7. Τοποθέτηση του gel σε νέο δίσκο χρώσης. Υπολείμματα AgNO₃ στην επιφάνεια του gel και στο δίσκο χρώσης ίσως αυξήσουν το θόρυβο κατά την εμφάνιση.
8. 3 πλύσεις του gel σε H₂O για 20sec/ πλύση.
9. Εμφάνιση στο gel σε 3% ανθρακικό νάτριο (7,5 g Na₂CO₃ σε 250 ml H₂O), 0,05% φορμαλδεΰδης (προσθήκη 125μl φορμαλδεΰδης 35% προ της χρήσης). Αλλαγή του διαλύματος εμφάνισης αμέσως μόλις έγινε κίτρινο. Τελειώσαμε την διαδικασία όταν η χρώση ήταν επαρκής.
10. 1 πλύση του gel σε H₂O για 20sec.
11. Η χρώση ολοκληρώθηκε με επώαση σε 5% οξύ για 5 min.
12. Αποθήκευση του gel στους 4° C σε 1% οξικό οξύ CH₃COOH.

2.4 Μέθοδοι χρωματογραφίας για την απομόνωση ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών

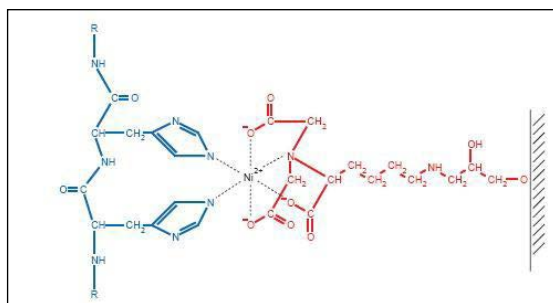
Ιστορικά η χρωματογραφία περιλάμβανε την επιβράδυνση των διαλυτών ουσιών συγκριτικά με το μέτωπο του διαλύτη που προχωρά μέσα σε στερεό μέσο. Το όνομα χρησιμοποιήθηκε

αρχικά για να περιγράψει τον διαχωρισμό των φυσικών χρωστικών σε χαρτί διηθήσεως λόγω της διαφορικής επιβράδυνσης αυτών.

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

2.4.1 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένου μετάλλου χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό πρωτεϊνών πρώτη φορά στα 1975 με τη χρήση του χηλικού παράγοντα ιμινοδιοξικό οξύ (iminodiacetic acid, IDA), ο οποίος ήταν φορτισμένος με ιόντα μετάλλου όπως Zn^{2+} , Cu^{2+} , or Ni^{2+} . Σήμερα σε αρκετές περιπτώσεις απομόνωσης πρωτεϊνών φερουσών ετικέτες ιστιδίνης χρησιμοποιείται ο παράγοντας NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) φορτισμένος με ιόντα νικελίου (Qiagen). Ο παράγοντας αυτός είναι ένας προσροφητής τεσσάρων ιόντων και καταλαμβάνει τις τέσσερις από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στη σφαίρα συντεταγμένων του ιόντος νικελίου, αφήνοντας ελεύθερες τις υπόλοιπες δυο να αλληλεπιδράσουν με την ετικέτα ιστιδίνης (**Εικόνα 2.3**). Το υλικό Ni-NTA σε μια από τις εμπορεύσιμες μορφές του απαντάται προσδεμένο σε σφαιρίδια Sepharose CL-6B (Ni-NTA Agarose, Qiagen) και χρησιμοποιείται ευρέως για τους σκοπούς απομόνωσης συντηγμένων με ετικέτες ιστιδινών πρωτεΐνες (The Qiaexpressionist, 2003).



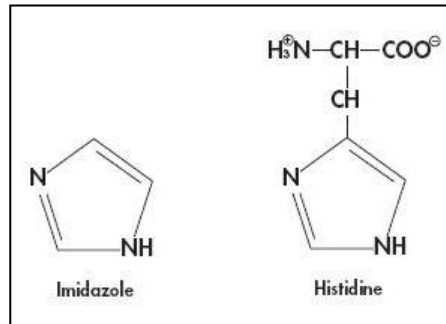
Εικόνα 2.3. Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών καταλοίπων της ετικέτας ιστιδινών και της μήτρας Ni-NTA (The Qiaexpressionist, 2003).

Η απομόνωση συντηγμάτων His-πρωτεϊνών από στήλη συγγένειας νικελίου μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές (native) ή αποδιατακτικές (denaturing) συνθήκες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παρατηρείται συχνά η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών του κυτταρικού συστήματος έκφρασης μαζί με την πρωτεΐνη-στόχο. Για το λόγο αυτό συνήθως στα διαλύματα λύσης και πλύσης προστίθεται χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Ο δακτύλιος του μορίου του ιμιδαζολίου είναι μέρος της δομής του μορίου της ιστιδίνης. Τα κατάλοιπα ιστιδίνης αλληλεπιδρούν με το δακτύλιό τους με τα ιόντα νικελίου. Το ίδιο κάνει και το ιμιδαζόλιο με το δικό του δακτύλιο, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν συναγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στην πρόσδεσή τους αλλά μπορεί και εκτοπίζει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τα ιόντα νικελίου (**Εικόνα 2.4**). Έκλυση των προσδεμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε υψηλά επίπεδα (100-250mM), οπότε οι His-πρωτεΐνες αδυνατούν πια να ανταγωνιστούν το ιμιδαζόλιο για τις θέσεις πρόσδεσης του υλικού χρωματογραφίας και εκλύονται από τη στήλη (The Qiaexpressionist, 2003).

Δεν υπάρχει κάποιο γενικό και αποτελεσματικό σε κάθε περίπτωση πρωτόκολλο για την απομόνωση His-πρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή τους κατά περίπτωση, η οποία δομή μπορεί να παρεμβληθεί στη διαδικασία πρόσδεσης. Γενικά, τα σημεία προσοχής είναι τα παρακάτω:

- Τα κύτταρα πρέπει να λύνονται ήπια με υπερήχους, ομογενοποίηση ή λυσοζύμη και για την αποφυγή φαινομένων αποδόμησης τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται πάντα στους 0–4 °C και να εμπλουτίζονται σε αναστολείς πρωτεασών.

- Μη ειδική πρόσδεση άσχετων πρωτεϊνών στο υλικό χρωματογραφίας μπορεί να συμβαίνει επειδή α) οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν γειτονικά κατάλοιπα ιστιδίνης που μπορεί να μιμούνται την ετικέτα ιστιδινών της πρωτεΐνης-στόχος (περίπτωση σπάνια σε βακτηριακές πρωτεΐνες), β) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-στόχος (με ιοντικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή δισουλφιδικούς δεσμούς) και συγκρατούνται μαζί της επί της στήλης. Τέτοια φαινόμενα καταπολεμώνται με την προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου στα διαλύματα λύσης και πλύσης, με την διατήρηση της ιοντικής ισχύος σε υψηλά επίπεδα όταν αυτό δεν έρχεται σε σύγκρουση με τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης-στόχου, με την προσθήκη αναγωγικού μέσου πχ β-μερκαπτοαιθανόλης για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ή με την προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων απορρυπαντικού.



Εικόνα 2.4: Χημικές δομές του καταλοίπου της ιστιδίνης και του μορίου του ιμιδαζολίου (The Qiaexpressionist, 2003).

2.4.2 Απομόνωση πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας

Η κυτταρική πάστα που έχει προκύψει από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (2l LB) επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα λύσης 40 όγκους κολώνας (Lysis buffer: 20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο, 5% γλυκερίνη). Στο διάλυμα προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (τελικοί όγκοι: benzamidine 150mgml⁻¹, PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) 1mM από τη Sigma και, leupeptin 20μgml⁻¹ από τη Roche). Στη συνέχεια τα κύτταρα διαρρήγνυνται με υπερήχους για 15x30 sec με 1.30 min διάλυμα την κάθε φορά (5x50 μεγάλο probe). Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται (18513 g, Jouan MR-23, rotorAM100.13, 1h, 6°C) για το διαχωρισμό των μη διαλυτών και διαλυτών σωματίων. Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη που περιέχει Ni-NTA αραρόζη το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 30 όγκους κολώνας Lysis buffer. Ο όγκος κολώνας (cv) είναι 5ml. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις της κολώνας με wash buffers που περιέχουν 20mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl κι αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, με μέγιστη τα 30mM. Οι εκπλύσεις της His-tagged πρωτεΐνης (elution buffers) πραγματοποιούνται σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου κατά περίπτωση, κι είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγγένεια που παρουσιάζει η κάθε His-πρωτεΐνη εγγενώς για το Ni²⁺ (**Πίνακας 2.1**). Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται τη διαδικασία της διαπίδυσης έναντι 2l διαλύματος 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5.8 ή 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.6 ή 20mM κιτρικό νάτριο pH

5, 100mM NaCl ή 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 5.8, 20mM KF ή 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 7.6, 20mM KF ή 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5 ή 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5 ή 20mM Mes-NaOH pH 6.5 ή 20mM Tris-HCl pH 8.5 ή 20mM glycine-NaOH pH 9.5. 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 2l. 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 2.1: Πρωτόκολλο καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας

	Tris-HCl pH8(mM)	NaCl (mM)	Imidazole(mM)	c.v.
Wash1	20	100	10	10
Wash2	20	100	20	10
Wash3	20	100	30	5
Elution1	20	100	60	1
Elution2	20	100	80	1
Elution3	20	100	100	1
Elution4	20	100	100	1
Elution5	20	100	200	1
Elution6	20	100	200	1
Elution7	20	100	300	1
Elution8	20	100	300	1
Elution9	20	100	500	1
Elution10	20	100	500	1

2.5 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 έκλουση των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά, οι μεγάλοι μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκκλύονται πρώτες από τη στήλη και 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 Sephacryl S-100 (Amersham) το οποίο έχει διαχωριστικό εύρος 1 - 100 kD. Το Sephacryl παράγεται από ενδομοριακή σύνδεση αλλυλικής δεξτράνης και N,N-δισακρυλαμιδίου του μεθυλενίου. Είναι χημικά σταθερό σε όλα τα συχνά χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ λειτουργεί σε εύρος pH 2-11. Το μέγεθος των πόρων ελέγχεται επιμελώς από τις κατασκευάστριες εταιρίες. Το υλικό πακεταρίστηκε σε στήλη XK 16/100 (Pharmacia) με την βοήθεια του συστήματος ÄKTA purifier (Amersham) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας. Κάνοντας χρήση διάταξης προσαρμογής (adaptor) στο ένα άκρο της στήλης ο συνολικός όγκος στρώματος ήταν 323 cm³. Η βέλτιστη ανάλυση για μία στήλη όγκου 100 cm³ παρουσιάζεται σε όγκο έκλουσης 60 ml (Scopes, 1984). Στη δεδομένη περίπτωση η στήλη είναι γύρω στα 323 cm³ κι εκτιμάται ότι έχει βέλτιστη ανάλυση γύρω στα 193 ml όγκου έκλουσης. Από τη βαθμονόμηση της στήλης η βέλτιστη ανάλυση είναι για βιομόρια μεγέθους πλησίον των 13 kDa. Η στήλη ελέγχθηκε με δείγμα ακετόνης και ο νεκρός της όγκος προσδιορίστηκε με δείγμα Μπλε Δεξτράνης και βρέθηκε ίσος με 118 cm³. Ακολούθως η στήλη βαθμονομήθηκε με τη βοήθεια των πρωτεϊνών αναφοράς: Ριβονουκλεάσης A (MW = 13.7 kD, R_h = 16.4 Å), Χυμοθρυψινογόνου A (25 kD, 20.9 Å), Οβαλβουμίνης (43 kD, 30.5 Å) και Αλβουμίνης του ορού των βοοειδών (BSA, Bovine Serum Albumin, 67 kD, 35.5 Å). Η ανάλυση μέσω μοριακής διήθησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 20°C. Η ροή ήταν 1.0mlmin⁻¹

και 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 διαπίδωσης) στήλη με λούπα των 2ml.

2.6 Κυκλικός διχρωσμός (CD)

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. Κατά την 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 ελλειπσοειδώς και ονομάζεται ελλειπτικά πολωμένο φως (Sreerama & Woody, 2004). Επίσης κατά την διέλευση ενός επίπεδα πολωμένου φωτός από μέσο που έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης για το δεξιά από ότι για το αριστερά πολωμένο φως τότε το αρχικό επίπεδα πολωμένο φως στρέφει την γωνία του επιπέδου ταλάντωσης του και το φαινόμενο ονομάζεται κυκλική διπλοδιαθλαστικότητα (ORD, Optical Rotatory Dispersion). Και τα δύο φαινόμενα δημιουργούνται από την ασύμμετρη μοριακή δομή της ύλης και σχετίζονται μεταξύ τους μέσω του μετασχηματισμού Kronig-Kramer. 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 διχρωσμός ορίζεται ως:

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

όπου $\epsilon_L(\lambda)$ και $\epsilon_R(\lambda)$ 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 [$1/M \cdot \text{cm}$], όπου M η γραμμομοριακή συγκέντρωση.

Ο κυκλικός διχρωσμός μετατρέπεται σε γραμμομοριακή ελλειπτικότητα, $[\theta]$, μέσω της σχέσης:

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

Η γραμμομοριακή ελλειπτικότητα είναι επίσης μία μέτρηση του φαινομένου του κυκλικού διχρωσμού και εκφράζεται ως:

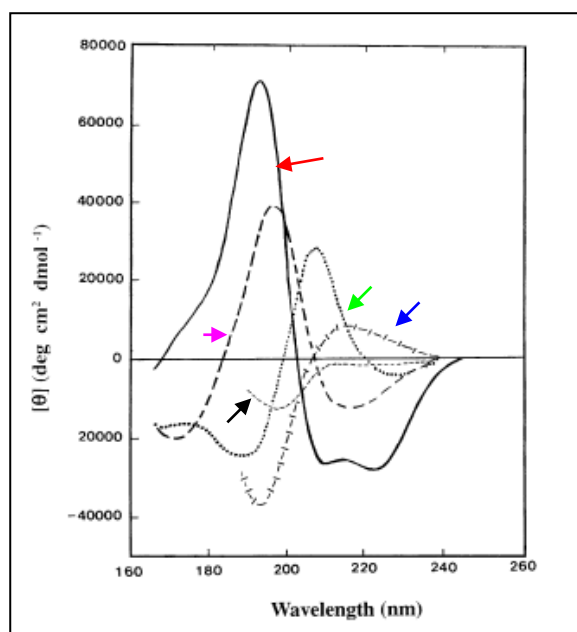
$$[\theta] = 100 \cdot \theta / C \cdot l$$

όπου C και l είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση και το μήκος διαδρομής (cm) του κύματος εντός του μέσου. Εκφράζεται σε μονάδες [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmole}^{-1}$] ή σε μονάδες [$\text{deg} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

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 διχρωσμού στις πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε τρία εύρη μηκών κύματος: i) Στην περιοχή του άπω – υπεριώδους (κάτω των 250 nm) όπου κυριαρχεί η συνεισφορά των πεπτιδικών δεσμών, ii) στην περιοχή του εγγύς- υπεριώδους (250 – 300 nm) όπου συμβάλλουν κυρίως οι πλευρικές αρωματικές ομάδες και iii) η ορατή περιοχή (300 – 700 nm) όπου συνεισφέρουν τα χρωμοφόρα που δυνητικά φέρουν μερικές πρωτεΐνες.

Για τον υπολογισμό των στοιχείων δευτεροταγούς δομής συλλέγονται φάσματα απορρόφησης στο άπω υπεριώδες, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει τα μήκη κύματος από 260 nm μέχρι το χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να φτάσει ο κάθε διαλύτης, με τα 185 nm να αποτελούν σύνηθες καλό κατώτατο όριο. Παρότι οι πλευρικές αλυσίδες των αρωματικών καταλοίπων απορροφούν ισχυρά στην περιοχή του άπω υπεριώδους, τη μεγαλύτερη συνεισφορά έχει ο πεπτιδικός δεσμός (Martin & Schilstra 2008). Διαφορετικά δομικά στοιχεία παρουσιάζουν διαφορετικά φάσματα κυκλικού διχρωσμού. Για παράδειγμα, οι α-ελικοειδείς πρωτεΐνες έχουν αρνητικά μέγιστα στα 222 nm και 208 nm και ένα θετικό στα 193 nm. Οι εντάσεις των σημάτων αυτών αντικατοπτρίζουν το βαθμό περιεχομένου σε α-έλικα. Πρωτεΐνες με καλά καθορισμένα αντιπαράλληλα β-φύλλα παρουσιάζουν αρνητικά

μέγιστα στα 218 nm και θετικά στα 195 nm ενώ διαταραγμένες ή αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν πολύ χαμηλή ελλειπτικότητα κάτω από τα 210 nm και αρνητικές τιμές κοντά στα 195 nm (Kelly, 2005) (**Εικόνα 2.5**). Πρωτεΐνες μικτού περιεχομένου σε α -έλικες και β -κλώνους παράγουν φάσματα που κυριαρχούνται από το α -ελικοειδές περιεχόμενό τους και άρα εμφανίζουν τα σήματα των α -ελίκων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρείται ένα ενιαίο ευρύ ελάχιστο μεταξύ των 210-220 nm λόγω της αλληλοεπικάλυψης των συνεισφορών των α -ελίκων και των β -φύλλων. Οι οικογένειες των κολλαγόνων είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση πρωτεϊνών καθώς περιέχουν τρεις αλυσίδες που τυλίγονται η μια γύρω από την άλλη σε μια τριπλή έλικα. Κάθε αλυσίδα έχει τη διαμόρφωση που λαμβάνει η πολυ-L-προλίνη σε μια επιμήκη ελικοειδή διαμόρφωση όπου όλοι οι δεσμοί είναι σε *trans* διαμόρφωση μεταξύ τους (πολυ-L-προλίνη II). Τα φορτισμένα πολυπεπίδια όπως το πολυ-L-γλουταμικό ή η πολυ-L-λυσίνη σε ουδέτερο pH εμφανίζουν μια παρόμοια της πολυ-L-προλίνης II διαμόρφωση (Greenfield 2006c). Πέραν των α -ελίκων, β -φύλλων και στροφών τα προγράμματα επεξεργασίας υπολογίζουν και την υπόλοιπη δομή που χαρακτηρίζεται ως 'ανώμαλη', 'εγγενώς διαταραγμένη' ή 'φυσιολογικά διαταραγμένη' δομή (Whitmore L. & Wallace 2007). Καθώς τα φάσματα των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τη διαμόρφωσή τους, ο κυκλικός διχρωσμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής αγνώστων πρωτεϊνών, όπως επίσης για την παρακολούθηση των αλλαγών διαμόρφωσης λόγω αλλαγών θερμοκρασίας, pH, μεταλλαγών, παρουσίας αποδιατακτικών ή της πρόσδεσης άλλων πρωτεϊνών στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος (Greenfield 2006c).



Εικόνα 2.5: Φάσματα κυκλικού διχρωσμού πεπτιδίων μοντέλων στις διαμορφώσεις : α -έλικας (κόκκινο βελάκι), αντιπαράλληλου β -φύλλου (φούξια βελάκι), β -στροφής (πράσινο βελάκι), πολυ-προλίνης τύπου II (P2) (μπλέ βελάκι) και αποδιατεταγμένης δομής (μαύρο βελάκι) (Kelly, 2005).

2.6.1 Επεξεργασία δεδομένων κυκλικού διχρωισμού

Όλες οι μέθοδοι ανάλυσης των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες στηρίζονται στην υπόθεση ότι το φάσμα μίας πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί από έναν γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων των δευτεροταγών δομών που την αποτελούν, συμπεριλαμβάνοντας έναν όρο σφάλματος που αντιστοιχεί στην 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 διχρωισμού της πρωτεΐνης, $B_{k\lambda}$ 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 διχρωισμού διαθέτουμε N γραμμικές εξισώσεις με κοινά στοιχεία τα φάσματα των στοιχειωδών δευτεροταγών δομών, $B_{k\lambda}$. Ελαχιστοποιώντας την διαφορά με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος κυκλικού διχρωισμού 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 (Provencher & Glockner, 1981). 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 διχρωισμού 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: i) το άθροισμα των κλασμάτων να είναι μεταξύ 0.95 και 1.05, ii) κάθε κλάσμα να είναι μεγαλύτερο του -0.025, iii) η τιμή RMSD μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος να είναι μικρότερη της 0.25 Δε και iv) το κλάσμα σε α -έλικα εκτιμάται από το πλήρες σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς και καθορίζεται η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή αποδοχής ως το τέταρτο κριτήριο για την 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:

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

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 (Sreerama & Woody, 1993). Σε αυτή τη μέθοδο το υπό ανάλυση πειραματικό φάσμα περιλαμβάνεται σε έναν πίνακα φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, 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 ιδιαζουσών τιμών. Η ανάλυση ιδιαζουσών 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 πληρεί τα προαναφερθέντα 4 κριτήρια που ισχύουν και στην περίπτωση του προγράμματος CONTIN/LL. Στη μέθοδο που εμπεριέχεται στο πρόγραμμα CDSSTR (Johnson, 1999) 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 ιδιαζουσών 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 (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>) (Sreerama & Woody, 2000).

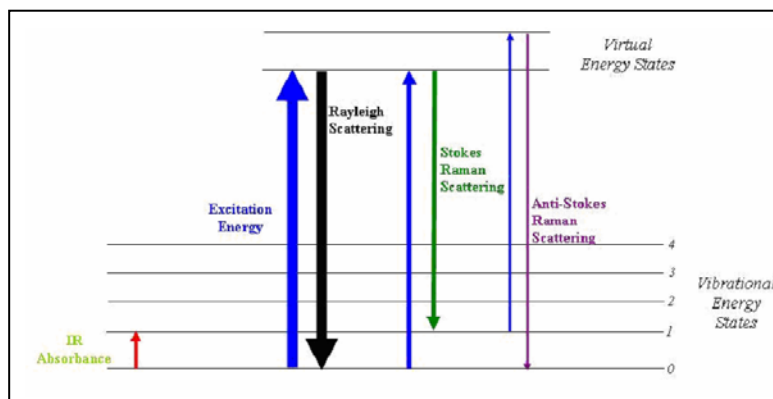
2.7 Φασματοσκοπία Raman

Ο C.V Raman έκανε την παρατήρηση ότι όταν μονοχρωματικό φως προσπίπτει σε ένα δείγμα, σκεδάζεται όχι μόνο στην αρχική συχνότητα αλλά και σε συχνότητες μικρότερες ή μεγαλύτερες. Αυτές οι μετατοπίσεις Raman (εκφρασμένες σαν μετατοπίσεις συχνότητας (κυματάριθμου) $\Delta\nu \text{ cm}^{-1}$, από την διεγείρουσα συχνότητα) αντιστοιχούν στα ενεργειακά επίπεδα ταλάντωσης των μορίων του δείγματος.

Τα φάσματα Laser-Raman δίνουν πληροφορίες για μοριακές ταλαντώσεις. Οι αρχές της φασματοσκοπίας Raman είναι απλές: Όταν μονοχρωματικό φως πέσει σε ένα δείγμα ή περάσει μέσα από ένα δείγμα, εκτός από το φως που σκεδάζεται στην ίδια συχνότητα με την αρχική (σκέδαση Rayleigh), ένα μέρος του μπορεί να σκεδαστεί σε συχνότητες μετατοπισμένες (σκέδαση Raman, μη ελαστική σκέδαση). Αυτές οι μετατοπίσεις συχνότητας (θετικές ή αρνητικές) είναι ίσες με τις συχνότητες των μοριακών ταλαντώσεων του δείγματος (**Εικόνα 2.6**).

Στη φασματοσκοπία Raman, εκπομπή από μιας Raman ταινίας, προέρχεται από αλλαγή της πολωσιμότητας (επαγόμενης διπολικής ροπής) του μορίου, σαν αποτέλεσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα, πράγμα που αποτελεί και τον γενικό κανόνα επιλογής.

Συνήθως σε ένα φάσμα Raman καταγράφεται η θέση (μετατόπιση από την Rayleigh σε cm^{-1}) και η ένταση των ταινιών Stokes. Χρησιμοποιείται laser σαν διεγείρουσα ακτινοβολία γιατί δίνει μονοχρωματικό, σύμφωνο και ισχυρό φως, ώστε να είναι δυνατόν να ανιχνευθούν οι γραμμές Stokes(ή anti-Stokes).



Εικόνα 2.6: Όταν μονοχρωματικό φως πέσει σε ένα δείγμα ή περάσει μέσα από ένα δείγμα, εκτός από το φως που σκεδάζεται στην ίδια συχνότητα με την αρχική (σκέδαση Rayleigh), ένα μέρος του μπορεί να σκεδαστεί σε συχνότητες μετατοπισμένες (σκέδαση Raman, μη ελαστική σκέδαση). Αυτές οι μετατοπίσεις συχνότητας (θετικές ή αρνητικές) είναι ίσες με τις συχνότητες των μοριακών ταλαντώσεων του δείγματος (www.aua.gr).

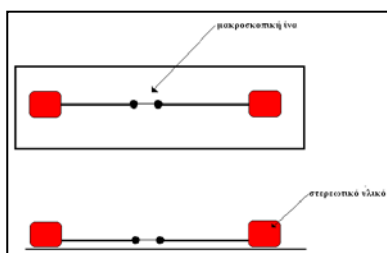
Οι αμιδικές ταινίες I (band) που οφείλονται κυρίως στην έκταση του δεσμού C=O και οι αμιδικές ταινίες III που οφείλονται στην κάμψη του δεσμού N-H και στην έκταση του δεσμού C-N, χρησιμοποιούνται κυρίως για την διάγνωση δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το που εμφανίζονται. Στον **Πίνακα 2.2** φαίνονται οι ενδεικτικές κορυφές για συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές (Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Χαμόδρακας 1993).

Πίνακας 2.2: Παρουσιάζονται οι ενδεικτικές κορυφές για συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές (Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Χαμόδρακας, 1993).

Χαρακτηριστικές ταινίες για:				
Φύση της ταινίας	α-έλικα	β-πτυχωτές επιφάνειες	β-στροφές	Μη κανονική δομή
Αμιδική I	1650-1660	1665-1680	1665, 1690	1660-1667
Αμιδική II	1516, 1545	1535, 1560	(I) 1550-1555	
			1567	
			(II) 1545, 1555	
			1560	
Αμιδική III	1260-1290	1230-1240	1290-1330	

2.7.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των υπό μελέτη πρωτεϊνικών δειγμάτων περιλαμβάνει την κρυστάλλωσή τους με ευθυγράμμιση ινών (Fiber Alignment). Συγκεκριμένα μια μεγάλη σταγόνα (5 έως 20μl) από το πυκνό διάλυμα με τα ινίδια, τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ευθυγραμμισμένες γυάλινες ράβδους που απέχουν μεταξύ τους 1 έως 2 mm (**Εικόνα 2.7**) και αφήνεται να στεγνώσει μέχρι να σχηματιστεί μια γέφυρα των ινών της πρωτεΐνης ανάμεσα στις κεφαλές των γυάλινων ράβδων.



Εικόνα 2.7: Ο σχηματισμός της γέφυρας των ινών της πρωτεΐνης ανάμεσα στις κεφαλές των γυάλινων ράβδων.

Για να κάνουμε τα πειράματα Raman χρησιμοποιήσαμε το φασματόμετρο Nicolet Almega XP Raman Spectrometer στο τμήμα του Χημικού του Πανεπιστημίου Κρήτης. Στα υπό μελέτη πρωτεϊνικά δείγματα εφαρμόστηκε χημική ανάλυση με τη μέθοδο φασματοσκοπίας Raman, με διεγείρουσα ακτινοβολία laser στα 473nm. Τα φάσματα καταγράφηκαν και επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού OMNIC (ver.7.3). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του κάθε φάσματος παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.3**.

Πίνακας 2.3: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του κάθε φάσματος.

Πρωτεϊνικό δείγμα	HrpAwild_type
Exposure time	3,5 sec
Number of Exposures	10
Number of background exposures	2
Grating	672 lines/mm
Spectograph aperture	100 μm pinhole

2.8 Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

Τα φάσματα υπερύθρου οφείλονται σε μεταπτώσεις ανάμεσα σε δύο δονητικά επίπεδα της θεμελιώδους ηλεκτρονιακής κατάστασης του μορίου και συνήθως παρατηρούνται σαν φάσματα απορρόφησης IR σε μόρια που έχουν μόνιμη διπολική ροπή. Αντίθετα, τα φάσματα Raman συνδέονται με τη σκέδαση φωτός από τα μόρια. Το φως έχει συνήθως συχνότητα στην περιοχή του ορατού ή του υπεριώδους.

Από τις ζώνες απορρόφησης που χαρακτηρίζουν τα φάσματα υπερύθρου των πρωτεϊνών υπάρχει μία που ονομάζεται Αμίδιο I (Amide I) και έχει βρεθεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δομικές μελέτες (Pelton & McLean, 2000). Η Αμίδιο I ζώνη προέρχεται κυρίως από τη δόνηση 'έκτασης' του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού και η ακριβής συχνότητα εμφάνισής της συσχετίζεται άμεσα με το περιβάλλον του καρβονυλίου όπως διαμορφώνεται από τη δευτεροταγή δομή. Στην πραγματικότητα η Αμίδιο I συνίσταται από την αλληλεπικάλυψη περισσότερων ζωνών απορρόφησης που καθεμιά προέρχεται από διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Η χρήση του FT-IR τα τελευταία χρόνια έκανε δυνατή την καταγραφή φασμάτων απορρόφησης στο υπέρυθρο σε υψηλότερη διακριτικότητα και με αύξηση της αναλογίας σήματος προς θόρυβο σε σχέση με τα κλασσικά φάσματα απορρόφησης. Έτσι διευκολύνθηκε η ανάλυση της Αμίδιο I ζώνης στα συστατικά της στοιχεία με τη χρήση των τεχνικών της δεύτερης παραγωγής και της Fourier αποσυνέλιξης. Επίσης, οι αμιδικές ταινίες II που οφείλονται στην κάμψη του δεσμού N-H και στην έκταση του δεσμού C-N, χρησιμοποιούνται κυρίως για την διάγνωση δευτεροταγούς δομής ανάλογα με το που εμφανίζονται. Στον **Πίνακα 2.4** φαίνονται οι ενδεικτικές κορυφές για συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές (Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Χαμόδρακας 1993).

Πίνακας 2.4: Παρουσιάζονται οι ενδεικτικές κορυφές για συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές (Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Χαμόδρακας, 1993).

Χαρακτηριστικές ταινίες για:				
Φύση της ταινίας	α-έλικα	β-πτυχωτές επιφάνειες	β-στροφές	Μη κανονική δομή
Αμιδική I	1645 - 1660	1620 - 1640	1662 - 1695	1645-1655
Αμιδική II	1546	1520, 1530		

2.8.1 Προετοιμασία δειγμάτων

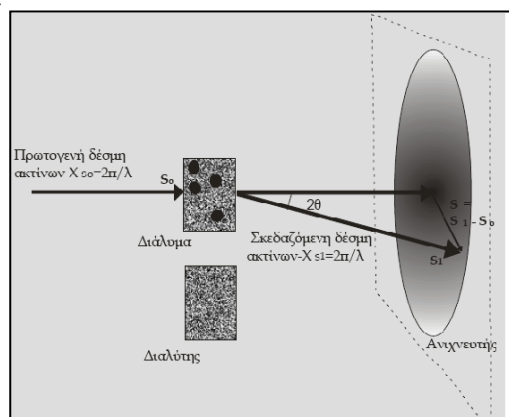
Το κυριότερο όμως πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η εύκολη προετοιμασία των προς μελέτη δειγμάτων. Συγκεκριμένα 80μl από τα υπό μελέτη πυκνά πρωτεϊνικά δείγματα ινιδίων εναποτέθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και τοποθετήθηκαν μέσα σε απαγωγό για αρκετές ώρες έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης με ήπια εξάτμιση και να σχηματιστεί ένα λεπτό στρώμα πρωτεΐνης. Στη συνέχεια αυτά τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια διαμαντιού του ειδικού δειγματολήπτη του φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific) και τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων αυτών ελήφθησαν στην περιοχή μέσου υπερύθρου $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Το εν λόγω φασματοφωτόμετρο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεϊκής τριγλυκίνης (DTGS) και διαχωριστή δέσμης από KBr. Τα φάσματα καταγράφηκαν και επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού FT-IR Omnic (ver.7.3) με διακριτικό όριο 4 cm^{-1} και 128 σαρώσεις ανά δείγμα.

2.9 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες

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 αραιώσης όμως ο παράγοντας δομής τείνει στη μονάδα κι η ένταση της σκέδασης είναι ανάλογη του παράγοντα σχήματος.



Εικόνα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα (Svergun & Koch, 2003).

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 ($\Delta\rho(\mathbf{r})$) στο πλάτος σκέδασης από ένα σωματίδιο ($\rho(\mathbf{r})$) σε σύγκριση με την σκέδαση από ισοδύναμο όγκο διαλύτη, καθορίζεται από τον μετασχηματισμό Fourier του επιπρόσθετου μήκους σκέδασης:

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_s$$

$$F(s) = \int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) \exp(is\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

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 (**Εικόνα 2.10**) (Svergun & Koch, 2003). Όπου $F^*(s)$ είναι ο συζυγής μιγαδικός του $F(s)$.

2.9.1 Η προσέγγιση Guinier κι η εξίσωση Debye

Στα ισοτροπικά (radically symmetric) συστήματα που σκεδάζουν σε διάλυμα ισχύει η προσέγγιση Guinier για τιμές του s πλησίον του 0 (Guinier & Fournet, 1955):

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

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 (Putman *et al.*, 2007). 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:

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

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.

2.9.2 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 (Kratky & Porod, 1949), 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, (Kirste & Oberthur, 1982).

2.9.3 Ab initio καθορισμός του σχήματος

Η πληροφορία για το σχήμα όμοιων σωματιδίων τυχαία προσανατολισμένων στο διάλυμα σε χαμηλή διακριτικότητα και της εσωτερικής δομής τους είναι δυνατόν να καθοριστεί από την σκέδαση ακτίνων-X στις μικρές γωνίες. Η μοντελοποίηση μέσω Ψευδών Ατόμων (Agarwal & Isaacs, 1977) στηρίζεται στην διευθέτηση ψευδών ατόμων ακτίνας r_0 σε μια σφαίρα διαμέτρου $D_{max} \gg r_0$. Η διάμετρος D_{max} αποτελεί την μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου όπως αυτή εκτιμάται από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου $M \gg (D_{max}/r_0)^3$ είναι πολύ μεγάλος για τις συμβατικές μεθόδους ελαχιστοποίησης. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις τύπου Monte Carlo όπως η προσομοίωση ανόπτησης. Η μέθοδος Monte Carlo είναι μία ομάδα υπολογιστικών αλγορίθμων για την προσομοίωση ποικίλων φυσικών και μαθηματικών συστημάτων. Διαχωρίζονται από άλλες μεθόδους καθώς είναι στοχαστικές, δηλαδή μη-ντετερμινιστικές κάνοντας χρήση τυχαίων αριθμών (ή συχνότερα ψευδο-τυχαίων αριθμών) σε αντίθεση με τους ντετερμινιστικούς αλγόριθμους. Η προσομοίωση ανόπτησης (simulated annealing, SA) είναι ένας γενικής χρήσεως πιθανοκρατικός μετά-αλγόριθμος για την αντιμετώπιση του προβλήματος της καθολικής βελτιστοποίησης (global optimization). Εντοπίζει μία καλή προσέγγιση του καθολικού βέλτιστου μίας δεδομένης συναρτήσεως εντός μεγάλου χώρου έρευνας. (Chacon *et al.*, 1998, Svergun *et al.*, 1999). Το πρόγραμμα DAMMIN (Svergun *et al.*, 1999) με τη χρήση προσομοίωσης ανόπτησης επιλέγει τη διαμόρφωση πακεταρισμένων ψευδών ατόμων X που προσεγγίζουν τα πειραματικά δεδομένα ελαχιστοποιώντας την συνάρτηση:

$$f(X) = x^2 + \alpha P(X)$$

όπου x είναι η ασυμφωνία μεταξύ της πειραματικής και της υπολογιζόμενης καμπύλης, $P(X)$ είναι η ποινή για την εξασφάλιση του συμπαγούς και συνεχούς μοντέλου και $\alpha > 0$ η βαρύτητα της τιμής $P(X)$.

Πρακτικά το πρόγραμμα ξεκινάει από μία τυχαία διαμόρφωση x σε «υψηλή» θερμοκρασία T . Κάνει ένα μικρό βήμα (τυχαία τροποποίηση της διαμόρφωσης: x') και υπολογίζει την διαφορά:

$$\Delta = f(x') - f(x)$$

Αν $\Delta < 0$ αποδέχεται το βήμα αν $\Delta > 0$ το αποδέχεται με μια συγκεκριμένη πιθανότητα $e^{-\Delta/T}$. Κάνει ακόμα ένα βήμα από την διαμόρφωση x αν η x' έχει απορριφθεί ή από την x' αν έχει γίνει αποδεκτή. Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές. Ακολουθώντας μειώνεται η θερμοκρασία σε $T' = cT$, $c < 1$. Το σύστημα συνεχίζει να ψύχεται ωστόσο δεν παρατηρείται βελτίωση στο $f(x)$, (Svergun, 1999). Κατά την ανάκτηση του σχήματος του σωματιδίου από τα δεδομένα σκέδασης σε διάλυμα η επιλογή του εναντιόμορφου γίνεται αυθαίρετα και δεν λαμβάνεται υπόψη παρά μόνο κατά την σύγκριση δύο διαφορετικά παραγόμενων μοντέλων του ίδιου σωματιδίου μεταξύ τους.

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

Δείγματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε τρεις τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν στην γραμμή ακτινοβόλησης X33 του γερμανικού συγχροτρονίου (DESY) του

Αμβούργου σε συνεργασία με τον εκεί εξωτερικό σταθμό του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL-Hamburg Outstation). Στα δείγματα προστέθηκε 2mM DDT και φυγοκεντρήθηκαν σε στροφές 18000g για 1min και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θερμοελεγχόμενη κυψελίδα mica. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 10° C. Η έκθεση στις ακτίνες X ήταν συνεχής με εναλλαγή δείγματος /διαλύτη και είχε διάρκεια 3min. Τα δείγματα εναλλασσόταν με το ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου η ένταση σκέδασης καταγραφόταν για 3min. Ο ανιχνευτής ήταν δίσκος ειδώλου MAR345 (Mar Research). Τα πρότυπα σκέδασης καταγραφόταν για μια απόσταση 3-4 μέτρων, καλύπτοντας το εύρος του ανύσματος σκέδασης $0.15 < s < 5.5 \text{ nm}^{-1}$ ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$, όπου 2θ η γωνία σκέδασης και $\lambda=1.5 \text{ \AA}$ το μήκος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Η ένταση της σκέδασης που καταγραφόταν στο δίσκο ειδώλου μετατρεπόταν σε μονοδιάστατα δεδομένα μέσω του πακέτου προγραμμάτων PRIMUS-MAR (ATSAS 2.3 software).

Η επεξεργασία των δεδομένων άρχισε με το πρόγραμμα PRIMUS από το οποίο υπολογίστηκε μέσω της προσέγγισης Guinier , η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου R_g καθώς και η αρχική ένταση $I(0)$. Ακόμα από το ίδιο πρόγραμμα υπολογίζεται η σταθερά Porod, K , καθώς και ο όγκος Porod, V_p , του σωματιδίου.

Στην συνέχεια ο υπολογισμός της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, γίνεται με αλληλεπίδραση του PRIMUS με το πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier GNOM .

Ο καθορισμός του γενικού σχήματος της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε μέσω ψευδών ατόμων με το πρόγραμμα DAMMIN. Οι διαφορετικές τυχαίες αρχικές κατανομές των ψευδών ατόμων στο χώρο έρευνας καταλήγουν σε διαφορετικές λύσεις. Γι αυτό τα 15 μοντέλα κάθε μελέτης υπερτίθενται ανά ζεύγη με τα εκτελέσιμα αρχεία Damsel/ Supcomb/ Damaver. Το μοντέλο αναφοράς επιλέγεται κατάλληλα από το πρόγραμμα έτσι ώστε να απέχει λιγότερο από το μέσο όρο. Το Damsup παρατάσσει τα μοντέλα σύμφωνα με το μοντέλο αναφοράς. Εν συνεχεία το Damaver υπολογίζει ένα χάρτη πιθανοτήτων από τα παρατεταγμένα μοντέλα και τέλος το Damfilt φιλτράρει αυτό το χάρτη παράγοντας το πιο πιθανό μοντέλο. Στα 15 αυτά μοντέλα υπολογίζονται οι τιμές Κανονικοποιημένης Χωρικής Ασυμφωνίας NSD (τιμές $NSD > 0.7$ υποδεικνύουν την αστάθεια του παραγόμενου μοντέλου). Για την βελτιστοποίηση του μέσου μοντέλου το εκτελέσιμο Damstart παράγει από αυτό έναν σταθερό πυρήνα ψευδών ατόμων ο οποίος εισάγεται εκ νέου στο DAMMIN .

Για την επιπλέον επεξεργασία των μοντέλων χαμηλής διακριτικότητας που παρήχθησαν από τα πειράματα σκέδασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000). Το πρόγραμμα υπολογίζει τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά και την γυροσκοπική ακτίνα από την λεπτομερή ατομική δομή χρησιμοποιώντας μεθοδολογίες μοντελοποίησης μέσω σφαιριδίων (Carrasco & Garcia de la Torre, 1999). Όλα τα άτομα εκτός των υδρογόνων αντικαθίστανται από σφαιρίδια συγκεκριμένης ακτίνας. Το σωματίδιο που παράγεται με αυτόν τον τρόπο αποτελείται από αλληλεπικαλυπτόμενες σφαίρες. Το πρόγραμμα μπορεί επίσης να επεξεργαστεί μοντέλα ψευδών ατόμων ή ψευδών καταλοίπων.

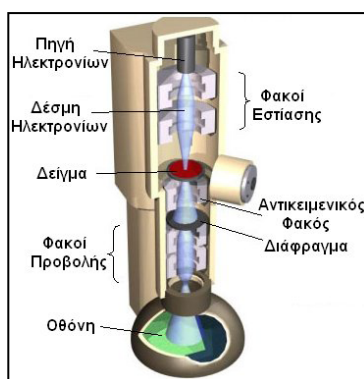
Η υδροδυναμική ανάλυση των πιο πιθανών μοντέλων και οι περαιτέρω απεικονίσεις τους έγιναν με χρήση του προγράμματος PYMOL.

2.10 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) - Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (High Resolution Transmission Electron Microscopy, HRTEM)

Σε ένα συμβατικό Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM = Transmission Electron Microscopy), ένα λεπτό δείγμα ακτινοβολείται από μία δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος. Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από μία κάθοδο, είτε με θερμιονική εκπομπή, είτε με εκπομπή τύπου Schottky, είτε με εκπομπή πεδίου. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών, ελέγχεται η περιοχή που φωτίζεται καθώς και η εστίαση της δέσμης. Μετά το δείγμα, τα ηλεκτρόνια οδηγούνται, με τη βοήθεια συγκεντρωτικών φακών (επίσης μαγνητικού τύπου), σε μια φθορίζουσα οθόνη. Επειδή τα

ηλεκτρόνια υφίστανται ισχυρή ελαστική και μη ελαστική σκέδαση από τα άτομα του δείγματος, γι' αυτό και το δείγμα πρέπει να είναι αρκούντως λεπτό, ανάλογα, βέβαια, και με την πυκνότητα και τη στοιχειακή σύνθεσή του. Στο επάνω μέρος μιας στήλης κενού, υπάρχει η πηγή ηλεκτρονίων, η οποία είναι είτε ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου (περίπτωση θερμοηλεκτρονικής εκπομπής), είτε μια λεπτή μεταλλική ακίδα παρουσία ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (περίπτωση εκπομπής πεδίου). Για την αποφυγή ασταθειών στην εκπομπή ηλεκτρονίων, η πρώτη αυτή βαθμίδα βρίσκεται σε υπερυψηλό κενό. Η εκπεμπόμενη δέσμη ηλεκτρονίων επιταχύνεται με τη βοήθεια ηλεκτροδίων που βρίσκονται σε υψηλή τάση (kV-MV). Ακολουθούν, συνήθως δύο, συγκεντρωτικοί φακοί μαγνητικού τύπου, με τη βοήθεια των οποίων εστιάζεται η δέσμη ηλεκτρονίων. Οι μαγνητικοί φακοί είναι ηλεκτρομαγνητικά πηνία τοποθετημένα έτσι ώστε η δέσμη των ηλεκτρονίων να περνά κατά μήκος του άξονά τους. Στην περιοχή των μαγνητικών φακών το κενό είναι της τάξης 10⁻⁷ έως 10⁻⁴ mbar, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται οι συγκρούσεις των ηλεκτρονίων με τα μόρια του αέρα. Οι συγκεντρωτικοί φακοί προκαλούν εστίαση της δέσμης ηλεκτρονίων, σε μια περιοχή διαστάσεων λίγων τετραγωνικών μικρομέτρων (μm²), στο επίπεδο που βρίσκεται το αντικείμενο.

Το αντικείμενο έχει τη μορφή λεπτού δισκίου, το πάχος του οποίου είναι μερικά νανόμετρα. Το δείγμα εισάγεται στο θάλαμο του μικροσκοπίου μέσω ειδικής θυρίδας που εξασφαλίζει τη διατήρηση του κενού, και τοποθετείται σε διάταξη μικρομετρικών μετατοπίσεων. Τα ηλεκτρόνια που διέρχονται από το δείγμα περιθλώνται, σύμφωνα με το νόμο του Bragg, σε διαφορετικές γωνίες, ανάλογα με τα κρυσταλλικά χαρακτηριστικά της κάθε περιοχής του. Ο αντικειμενικός φακός, ο οποίος βρίσκεται αμέσως μετά το δείγμα, σχηματίζει στο εστιακό του επίπεδο την περίθλαση μακρινού πεδίου του δείγματος (περίθλαση Fraunhofer), η οποία αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (σε αντίστροφο χώρο) των κρυσταλλικών χαρακτηριστικών του δείγματος. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια διέρχονται από έναν ενδιάμεσο φακό, με τη βοήθεια του οποίου σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο είδωλο, το οποίο (ως αντίστροφος μετασχηματισμός του Fourier του προηγούμενου) αποτελεί μεγεθυμένη απεικόνιση (σε ευθύ χώρο) του αντικειμένου. Το ενδιάμεσο αυτό είδωλο, μέσω ενός τελευταίου φακού (φακός προβολής), προβάλλεται, μετά από μία τελευταία μεγέθυνση, σε φθορίζουσα οθόνη, για παρατήρηση ή φωτογράφιση (**Εικόνα 2.11**) (Transmission Electron Microscopy I, Williams & Carter, 1996; Αρχές και εφαρμογές της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Πολυχρονίδης, 2000).



Εικόνα 2.11: Σχηματική απεικόνιση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (TEM).

Ειδικότερα η εικόνα σχηματίζεται πάνω σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού αυτά διαπεράσουν το παρασκεύασμα. Τα σημεία του παρασκευάσματος που δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια, μας δίνουν σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονιακά πυκνές, electron dense) ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή, electron lucent) μας δίνουν φωτεινές περιοχές. Αυτή η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται με την εκλεκτική «χρώση» του παρασκευάσματος.

Φυσικά αυτές τις εικόνες εκτός του ότι μπορούμε να τις παρατηρήσουμε απ' ευθείας στην οθόνη του μικροσκοπίου, μπορούμε και να τις απεικονίσουμε με τις ειδικές φωτογραφικές

μηχανές που είναι πάντα ενσωματωμένες στα μικροσκόπια. Τα πιο σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα και μικροϋπολογιστή και έτσι μπορεί να γίνει απευθείας ψηφιοποίηση και αποθήκευση της εικόνας. Οι εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gatan Digital Micrograph (ver. 3.4).

Επειδή τα ηλεκτρόνια δε μπορούν να ταξιδέψουν στον αέρα, το όλο σύστημα, πηγή ηλεκτρονίων, φακοί, παρασκευάσμα, οθόνη και σύστημα φωτογράφισης πρέπει να βρίσκονται σε υψηλό κενό της τάξης των 10^{-4} Torr τουλάχιστον.

Ο τρόπος που λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μας θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να παρατηρήσουμε. Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να παρατηρηθεί με το κλασικό TEM και με τις κλασικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες: (i) να αντέχει σε υψηλό κενό, (ii) να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, (iii) να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια, και (iv) να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.

Αυτές οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα παρασκευάσμα, μας περιορίζουν στο να μπορούμε να εξετάσουμε μόνο μονιμοποιημένα δείγματα (νεκρά), αφυδατωμένα, κομμένα σε πολύ λεπτές τομές (πάχος 50-100 nm) και «χρωματισμένα» με «χρωστικές» που περιέχουν βαριά μέταλλα, όπως για παράδειγμα είναι ο μόλυβδος και το ουράνιο.

Η διακριτική ικανότητα του TEM δίνεται από τη σχέση:

$$r = 1.21\lambda^{3/4} C_s^{1/4}$$

,όπου λ το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων της δέσμης και C_s η σφαιρική εκτροπή του αντικειμενικού φακού. Τα σύγχρονα TEM έχουν διακριτική ικανότητα 0.15-0.35 nm.

Εάν με το διάφραγμα του αντικειμενικού φακού επιτρέψουμε την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων που έχουν σχεδιαστεί κατά Bragg σε διαφορετικά κρυσταλλικά επίπεδα είναι δυνατό να πάρουμε εικόνες στις οποίες το κόντραστ οφείλεται στη διαφορετική φάση των ηλεκτρονίων και ονομάζονται εικόνες υψηλής ευκρίνειας (High Resolution Transmission Electron Microscopy).

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRTEM) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές χαρακτηρισμού των υλικών στη νανοκλίμακα. Η ευρεία εφαρμογή της έγκειται, μεταξύ των άλλων, στην απ' ευθείας απεικόνιση της δομής και μορφολογίας με μεγάλη διακριτική ικανότητα (καλύτερη από 0.1 nm με τα σύγχρονα μικροσκόπια). Επιπλέον, λόγω της σύνθετης αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων με την ύλη, είναι δυνατή η ολοκληρωμένη μελέτη του υλικού με διαφορετικές τεχνικές ταυτόχρονα. Έτσι, εκτός από τον δομικό χαρακτηρισμό των υλικών με τις 'παραδοσιακές' μεθόδους TEM (περίθλαση ηλεκτρονίων, HRTEM), είναι δυνατή η ανάλυση της χημικής σύστασης και της ηλεκτρονικής δομής των στερεών σε περιοχές μικρότερες του 1 nm^2 με φασματοσκοπικές μεθόδους. Εάν σε όλα αυτά προστεθούν και οι μέθοδοι λεπτομερούς επεξεργασίας των εικόνων TEM και HRTEM με ειδικευμένα υπολογιστικά προγράμματα, γίνεται κατανοητό ότι η ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία για τον ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των υλικών.

Για τα εργαστηριακά πειράματα χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διελεύσεως JEM-2100 της εταιρείας JEOL το οποίο είναι εφοδιασμένο με σύστημα υψηλής διακριτικής ικανότητας (high resolution, HR). Έχει διακριτικό όριο σημείου 0.23 nm και πλέγματος ίση με 0.14 nm. Υπάρχει δυνατότητα λειτουργίας του σε δυναμικό επιτάχυνσης 80, 100, 120, 160 και 200 kV. Εκτός από το σχηματισμό της εικόνας του ειδώλου σε μεγέθυνση μέχρι 1.500.000 φορές, είναι δυνατή και η απεικόνιση του προτύπου περίθλασης (diffraction pattern) του παρατηρούμενου κρυσταλλικού υλικού. Τέλος, διαθέτει ειδική υποδοχή δείγματος που επιτρέπει την παρατήρησή του ενώ στρίβει σε δύο άξονες.

2.10.1 Τεχνικές προετοιμασίας βιολογικών δειγμάτων για παρατήρηση στο TEM

2.10.1.1 Αρνητική χρώση (Negative staining)

Ορισμένες κατηγορίες κυττάρων, μικροοργανισμών ή μεγαλομορίων των οποίων δε μας ενδιαφέρει άμεσα η εσωτερική τους δομή (βακτήρια, ιοί, πρωτεϊνικά μόρια, νουκλεϊκά οξέα κλπ.) μπορούν να παρατηρηθούν με το TEM με αρνητική χρώση. Με αυτή τη μέθοδο συνήθως το παρασκεύασμα δε χρειάζεται να μονιμοποιηθεί, παρά μόνο να τοποθετηθεί και απλωθεί πάνω στα πλέγματα (grids) που είναι καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη, από πλαστικό ή άνθρακα. Στη συνέχεια γίνεται η χρώση με ένα διάλυμα που περιέχει ένα βαρύ μέταλλο, όπως για παράδειγμα το φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA), το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οξικό ουρανύλιο, η βολφραμική μεθυλαμίνη, το μυρμηκικό ουρανύλιο ή συνδυασμούς τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και γρήγορη και ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση ιώσεων φυτών και ζώων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλες ιστοχημικές ή ανοσοβιολογικές μεθόδους.

2.10.1.2 Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων για παρατήρηση με TEM

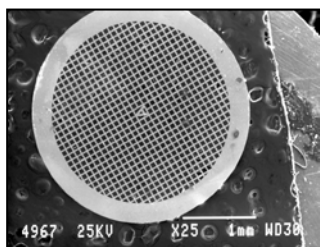
Το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε για να παρατηρήσουμε τα δείγματά μας στο TEM έχει ως εξής :

Αρχικά οι πρωτεΐνες που προήλθαν από την κολώνα Ni υπέστησαν διαπίδυση σε διαλύματα χαμηλά σε περιεκτικότητα αλάτων (Βλέπε Κεφάλαιο3 των αποτελεσμάτων αναλυτικά) τα οποία θεωρούνται κατάλληλα για παρατήρηση των δειγμάτων αυτών με TEM. Στη συνέχεια πήραμε 8μl από αυτό το χαμηλής περιεκτικότητας αλάτων πρωτεϊνικό δείγμα και το τοποθετήσαμε πάνω σε πλέγματα (grids).

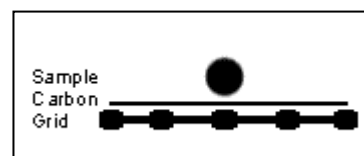
Τα grids είναι πλέγματα, στα οποία τοποθετείται το υλικό και παρατηρείται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Τα grids συνήθως έχουν 150, 200 ή 300 θέσεις (150,200,300 mesh). Υπάρχουν διάφοροι τύποι grids: Από διαμάντι, μόλυβδο, τιτάνιο, βολφράμιο, νάιλον, νικέλιο ή χαλκό. Τα grids που χρησιμοποιήθηκαν στα εργαστηριακά πειράματα ήταν χάλκινα (copper grids).

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 2 ειδών 300 mesh–copper grids: (i) grids τα οποία παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Βιοϋλικών και είναι επικαλυμμένα με ένα 0.7% πολυμερικό στρώμα (βλέπε Εδάφια 2.10.1.4, 2.10.1.5 προετοιμασία grids για ηλεκτρονική μικροσκοπία - προετοιμασία formvar) (**Εικόνα 2.12**) και (ii) εργοστασιακά grids τα οποία είναι επικαλυμμένα με formvar και άνθρακα (300 mesh - formvar/carbon coated copper grids, Agar company) (**Εικόνα 2.13**).

Μετά από 2 λεπτά αφαιρέθηκε το υπόλοιπο του διαλύματος που προεξείχε πάνω στο grid με ένα απορροφητικό χαρτάκι (Whatman). Τελικά τα δείγματα βάφτηκαν με αρνητική χρώση χρησιμοποιώντας 8μl οξικό ουρανύλιο (UA) 1% , ή Phosphotungstic acid (PTA) 1% για 2 λεπτά (Βλέπε 2.11.1.4 προετοιμασία χρωστικών ουσιών).



Εικόνα 2.12 (Ευγενική προσφορά Dr. Emmanouil Kasswtaki)



Εικόνα 2.13

2.10.1.3 Προετοιμασία χρωστικών ουσιών

Οι χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αρνητική χρώση των δειγμάτων παρασκευάστηκαν ως εξής:

(i) Οξικό Ουρανύλιο, Uranyl acetate [$\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$], UA (1 %):

Αυτή η χρωστική, όπως προανέφερα, χρησιμοποιείται για pH4 και H_2O . Επειδή, το νερό έχει pH γύρω στο 5 με 6, διαλύουμε το οξικό ουρανύλιο σε νερό.

(ii) Φωσφοροβόλφραμικό οξύ, Phosphotungstic acid ($\text{H}_3\text{P W}_{12}\text{O}_{40}$), PTA (1 %):

Αυτή η χρωστική, όπως προανέφερα, χρησιμοποιείται για pH7.

2.10.1.4 Προετοιμασία των grids για το TEM

Αρχικά, καλύπτεται το grid με formvar. Το formvar λειτουργεί σαν ημιπερατή μεμβράνη και σαν « στήριγμα » για την εναπόθεση του υλικού, αφού καλύπτει τις κενές θέσεις του grid (κυψελίδες).

2.10.1.5 Παραγωγή formvar

Συγκέντρωση formvar σε 0,7 % και διάλυση της στο διαλύτη 1,2-Dichloroethane.

Δε χρησιμοποιούμε το νερό ως διαλύτη, γιατί είναι πολικός διαλύτης και δε μπορεί να διαλυθεί σε αυτόν η σκόνη. Ενώ, χρησιμοποιώντας τον μη πολικό διαλύτη 1,2-Dichloroethane, αποφεύγουμε τη δημιουργία συσσωματωμάτων, καθώς ο διαλύτης εξατμίζεται, δημιουργώντας αυτή την μεμβράνη. Η ιδανική συγκέντρωση της σκόνης formvar είναι 0.7 %, διότι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, η μεμβράνη δεν είναι σταθερή και δεν την διαπερνούν εύκολα τα ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να δυσκολεύει την παρατήρηση του δείγματος και την εστίαση του οργάνου.

2.11 Βιβλιογραφία

- Agarwal R.C. & Isaacs N.W., 1977. Method for obtaining a high resolution protein map starting from a low resolution map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 2835.
- Chacón, P., F. Morán, J. F. Díaz, E. Pantos, and J. M. Andreu. 1998. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.* 74, 2760.
- Chevallet M., Luche S., and Rabilloud T., 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.*; 1(4): 1852–1858.
- Fischetti, V. A., Landau, G. M., Schmidt, J. P., and Sellers, P., 1993. Identifying periodic occurrences of a template with applications to protein structure, *Information Process. Lett.* 45, 11–18.
- García de la Torre J., Huertas M. L., & Carrasco B., 2000. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophys J* 78,719-730.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. From: *The Proteomics Protocols Handbook*, 52, 571-608, edited by: J. M. Walker © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Guinier A., Fournet G., 1955. Ed: C. B. Walker, and K. L. Yudowitch, *Small-Angle Scattering of X-Rays* (Wiley, New York), p. 17.
- Greenfield N.J. 2006c. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Prot.* 1(6), 2876-2890.
- Jones D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195.
- Jones D.T. 1999. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202.
- Kelly M., Thomas J. Jess, Nicholas C. Price, 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751: 119 – 139
- Kingsbury, N., & Masters, C.J., 1970. *Anal Biochem.* Jul;36(1):144-58.
- Kirste R.G. & Oberthur R.C., 1982. In: Glatter O, Kratky O (eds) *Small-angle X-ray scattering*. Academic Press, New York, p 402.
- Prilusky J., Felder C.E., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg E.H., Man O., Beckmann J.S., Silman I. and Sussman J.L. 2005. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinf. Appl. Note* 21(16), 3435-3438.
- Provencher, S.W. & Glockner J., 1981. Estimation of globular protein secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155.
- Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., & Tainer, J.A., 2007. *Q Rev Biophys.* Aug;40(3):191-285.
- Scopes R., 1984. *Protein purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag. New York.
- Siegel L.M., & Monte K.J., 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 112, 346.
- Sreerama N. and Woody R.W., 1993. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32.
- Sreerama N. and Woody R.W. 2000. Estimation of protein secondary structure form circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287, 252-260.
- Svergun D.I., 1999. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing *Biophys J.* 76, 2879.
- The Qiaexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2003. Qiagen.
- Uversky V.N., Gillespie J.R. & Fink A.L. 2000. Why are “natively unfolded” proteins instructed under physiologic conditions? *Prot: Str Funct Genet* 41, 415-427.
- Whitmore L. and Wallace B.A. 2007. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392-400.

BIBΛΙΑ

- Χαμόδρακας Σταύρος, *Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής*, Αθήνα 1993, Εκδόσεις Συμμετρία.
- Transmission Electron Microscopy I*, Williams & Carter, 1996.
- Αρχές και εφαρμογές της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Πολυχρονίδης, 2000.

Αποτελέσματα:

Δομικός και φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8.

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη βιοϋπολογιστική μελέτη της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της αγρίου τύπου HrpA *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola καθώς και της αλληλουχίας του μεταλλάγματος της, HrpAΔC8 από το οποίο έχουν αφαιρεθεί τα τελευταία οκτώ αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της ολόκληρης πρωτεΐνης. Επιπλέον, παρατίθενται τα πρωτόκολλα υπερέκφρασης και καθαρισμού καθώς κι η ανάλυση δεδομένων μέσω κυκλικού διχρωισμού, ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης τόσο για το μετάλλαγμα όσο και για την ολόκληρη πρωτεΐνη. Στη συνέχεια αναφέρεται το πρωτόκολλο επαγωγής του T3SS και απομόνωσης του Hrp/Hrc πύλου, καθώς και ο δομικός χαρακτηρισμός του, μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης σε αντιπαράθεση με την *in vitro* HrpA. Ακόμα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις τεχνικές φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier και φασματοσκοπίας Raman για την HrpA καθώς και η ανάλυση του μεταλλάγματος HrpAΔC8 μέσω σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες.

3.1 Βιοϋπολογιστικές μεθόδους

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών HrpA (κωδικός πρόσβασης Entrez: AAF99291) και HrpAΔC8 (μετάλλαγμα της πρωτεΐνης HrpA από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα τελευταία οκτώ αμινοξέα του καρβοξυτελικού της άκρου) υποβλήθηκαν σε προβλέψεις δευτεροταγούς δομής, σφαιρικότητας και επανάληψης της επτάδας σύμφωνα με την μεθοδολογία που παρουσιάζεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο2 (Εδάφιο 2.1).

3.1.1 Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8

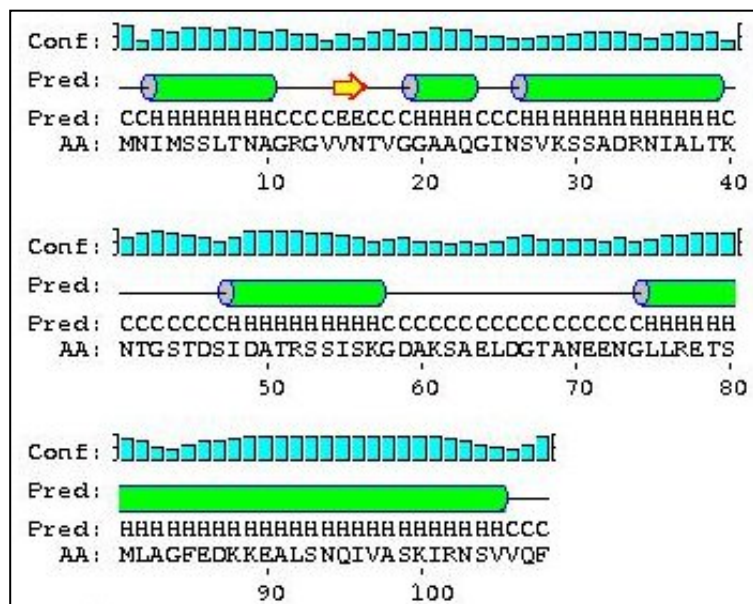
Εδώ αναφέρονται οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες (i) της αγρίου τύπου HrpA *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola μαζί με την αμινοξική ταμπέλα του φορέα έκφρασης pet16b, η οποία προσθέτει 21 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας (με μπλέ σημειώνονται τα 18 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου που είναι υπεύθυνα για τον πολυμερισμό της πρωτεΐνης και (ii) της αλληλουχίας του μεταλλάγματος HrpAΔC8 της αγρίου τύπου HrpA από την οποία έχουν αφαιρεθεί τα τελευταία οκτώ αμινοξέα του καρβοξυτελικού της άκρου μαζί με την αμινοξική ταμπέλα του φορέα έκφρασης pet26b, η οποία προσθέτει οκτώ αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας. Έτσι :

(i)MGHHHHHHHHHHSSGHIEGRHMNIMSSLTNAGRGVVNTVGGAAQGINSVKSSAD
RNIALTKNTGSTDSIDATRSSISKGDAKSAELDGTAN
EENGLLRETSMLAGFEDKKEALSNQIVASKIRNSVVQF

(ii)MNIMSSLTNAGRGVVNTVGGAAQGINSVKSSADRNIALTKNTGSTDSIDATRSSIS
KGDAKSAELDGTANEENGLLRETSMLAGFEDKKEALSNQIVASKLEHHHHHHH

3.1.2 PSIPRED

Η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της αγρίου τύπου HrpA *P. syringae* pv. *phaseolicola* έλαβε χώρα μέσω του προγράμματος PSIPRED (ver. 2.1) στην οποία υποδεικνύονται έξι προβλεπόμενες α-έλικες (Εικόνα 3.2).

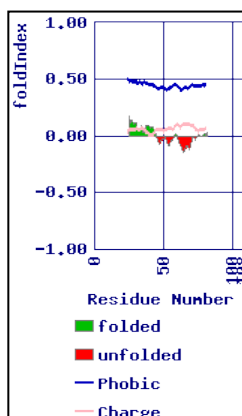


Εικόνα 3.2: Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της αγρίου τύπου HrpA *P. syringae* pv. *phaseolicola* μέσω PSIPRED (H=helix, E=strand, C=coil). Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης.

3.1.3 FOLDINDEX

Με το FoldIndex πραγματοποιήθηκε πρόβλεψη του κατά πόσον η αγρίου τύπου πρωτεΐνη HrpA έχει καθορισμένη δομή ή είναι εγγενώς αδίπλωτη (<http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>). Η πρωτεΐνη HrpA προβλέπεται να είναι μην είναι όλη αναδιπλωμένη. Συγκεκριμένα προβλέπεται να έχει 2 εγγενώς αδίπλωτες περιοχές από το αμινοξύ 46-58 την πρώτη και την δεύτερη από το αμινοξύ 61-74. Έτσι:

1 MNIMSSLTNA GRGVVNTVGG AAQGINSVKS SADRNIALTK NTGSTDSIDA
 51 TRSSISKGDA KSAELDGTAN EENGLLRETS MLAGFEDKKE ALSNQIVASK
 101 IRNSVVQF(Predicted disordered segment)



Εικόνα 3.3: Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές. Η HrpA προβλέπεται να έχει και επικράτειες που δεν είναι αναδιπλωμένες.

3.1.4 MATCHER

Ο αλγόριθμος **Matcher** (<http://cis.poly.edu/~jps/matcher.html>) χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη επαναλήψεων επτάδας για την HrpA. Έτσι λοιπόν για την αγρίου τύπου HrpA της *P. syringae* pv. phaseolicola προβλέπεται ποσοστό επαναλήψεων επτάδας που ανέρχεται στο 45%. Στην **Εικόνα 3.4** παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του αλγορίθμου Matcher.

Seq_name	Score	Seq	Path	Ratio
=====	=====	====	====	=====
HrpA PspH	108	108	49	45%
a b c d e f g				
1		Met Asn Ile Met Ser Ser Leu Thr Asn Ala		
11		Gly Arg Gly Val Val Asn Thr Val Gly Gly		
21		Ala Ala Gln Gly Ile Asn Ser Val Lys Ser		
31		Ser Ala Asp Arg Asn Ile Ala Leu Thr Lys		
41		Asn Thr Gly Ser Thr Asp Ser		
48	Ile Asp Ala Thr Arg Ser Ser			
55	Ile Ser Lys Gly Asp Ala Lys			
62	Ser Ala Glu Leu Asp Gly Thr			
69	Ala Asn Glu Glu Asn Gly Leu			
76	Leu Arg Glu Thr Ser Met			
82	Leu Ala Gly Phe Glu Asp Lys			
89	Lys Glu Ala Leu Ser Asn Gln			
96	Ile			
97		Val Ala Ser Lys Ile Arg Asn Ser Val Val		
107		Gln Phe		

Εικόνα 3.4: Ο αλγόριθμος Matcher όπως πραγματοποιήθηκε για την αγρίου τύπου HrpA της *P. syringae* pv. phaseolicola.

3.2 Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών HrpA και HrpAΔC8 in vitro

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HrpAΔC8 παρήχθησε από τα αντίστοιχο πλασμίδιο σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράψαμε στο Εδάφιο 2.2.1. Η πρωτεΐνη HrpA αγρίου τύπου παρήχθησε ως εξής:

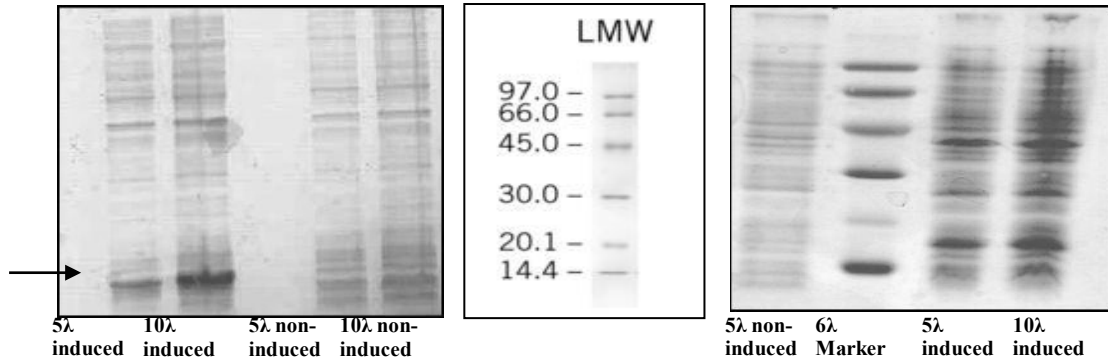
Από ολονύχτια καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3) pLysS, τα οποία περιέχουν το φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, εμβολιάζεται σε αναλογία 1/40 θρεπτικό μέσο LB, το οποίο εμπεριέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και 20μg/ml χλωραμφενικόλη. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 C° με γρήγορη ανάδευση μέχρι η ιοντική ισχύ OD₆₀₀ της καλλιέργειας να φτάσει μεταξύ 0,5 και 0,7. Στην συνέχεια ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,3mM. Η καλλιέργεια έπειτα επωάζεται στους 23 C° για 4 ώρες. Τέλος τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 2737g για 25 λεπτά στους 4 C° και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80 C°.

Στη συνέχεια ακολούθησε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Βλέπε Εδάφιο 3.2.1) των παραγόμενων πρωτεϊνών για να ελεγχθεί η έκφραση και η διαλυτότητά τους. Έτσι λοιπόν οι πρωτεΐνες φάνηκαν να τρέχουν λίγο πιο πάνω από την μπάντα της α-λακταλβουμίνης δηλαδή πάνω από τα 14.4kDa (**Εικόνα 3.5**).

3.2.1 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιήθηκε τυπικά σε πηκτώματα πυκνότητας 15% βάσει των πρωτοκόλλων και των συνταγών που περιγράφονται στο Εδάφιο 2.2.2. Το αποδιατακτικό

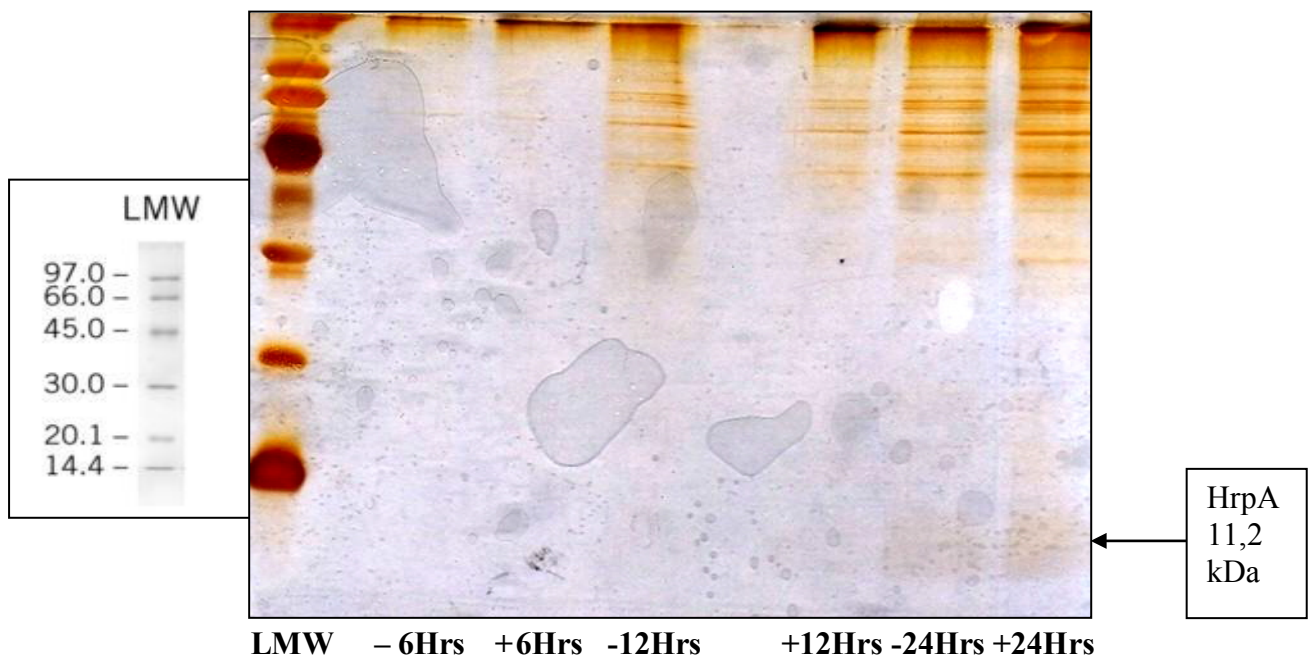
διάλυμα φόρτωσης (5x) αναμίχθηκε σε αναλογία 1:4 με τα δείγματα, ακολούθησε βρασμός τους για 5' και φόρτωσή τους στα πηκτώματα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 200V. Όταν το μέτωπο της χρωστικής έφτασε στο κάτω άκρο του πηκτώματος η ηλεκτροφόρηση διακόπηκε και τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χρώσης με ανάδευση για 10' για να αποχρωματισθούν στη συνέχεια σε διάλυμα αποχρωματισμού ολονύκτια.



Εικόνα 3.5. Αριστερά: 15% SDS-PAGE της HrpAΔC8, Δεξιά: 15% SDS-PAGE της αγρίου τύπου HrpA. Το βελάκι αντιστοιχεί στην HrpAΔC8, η οποία τρέχει λίγο πιο πάνω από την μπάντα της λακταλβουμίνης δηλαδή πάνω από τα 14.4kDa.

3.3 Επαγωγή του εκκριτικού συστήματος τύπου III και απομόνωση του Hrp/Hrc πύλου

Η επαγωγή του T3SS, η απομόνωση του Hrp/Hrc πύλου και στη συνέχεια η χρώση αργύρου πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα αναλυτικά πρωτόκολλα που παρουσιάστηκαν στα Εδάφια 2.3.1 & 2.3.2. Στην **Εικόνα 3.6** φαίνεται η μπάντα που αντιστοιχεί στο μονομερές της *in vivo* HrpA στα 11.2 kDa.



Εικόνα 3.6: Χρώση αργύρου των απομονωμένων πύλων κατά τη δειγματοληψία 6, 12 και 24 ωρών:
 -: without plant extract
 +: with 10% (v/v) plant extract

3.4 Απομόνωση των *in vitro* πρωτεϊνών HgrA και HgrAΔC8

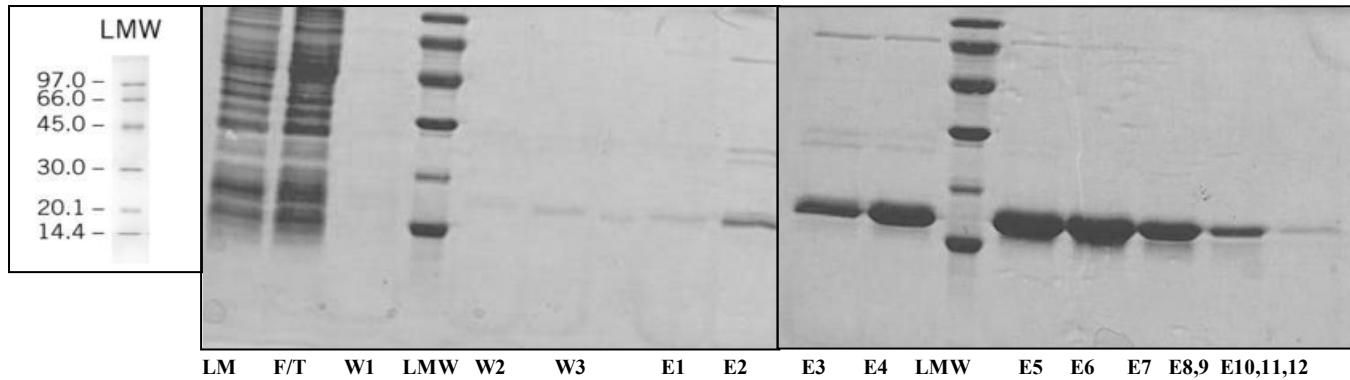
Το πρωτόκολλο καθαρισμού του μεταλλάγματος HgrAΔC8 φαίνεται στο Εδάφιο 2.4.2, ενώ για την αγρίου τύπου HgrA ακολουθήθηκε το παρακάτω σχήμα καθαρισμού:

Η κυτταρική πάστα που έχει προκύψει από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (2l LB) επαναδιαλυτοποιείται σε διάλυμα λύσης 40 όγκους κολώνας (Lysis Buffer: 20 mM Tris pH8, 100mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερίνη και 0,1% Triton X-100). Στο διάλυμα προστίθενται πρωτεϊνικοί αναστολείς (τελική συγκέντρωση: benzamidine 150 μgml^{-1} , PMSF 1mM από τη Sigma και Leupeptin 20 μgml^{-1} από τη Roche). Επίσης στο διάλυμα προστίθεται και DNaseI με τελική συγκέντρωση 0,5 u/ml. Στη συνέχεια τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπερήχους για 16x30 sec με 2 min διάλυμα την κάθε φορά (5x50 μεγάλο probe). Έπειτα το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται (12000 rpm, 50 min, 4 C°). Ακολούθως το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη η οποία περιέχει Ni-NTA αραρόζη και έχει εξισορροπηθεί με 30 όγκους κολώνας lysis buffer και η όλη διαδικασία που θα ακολουθήσει πραγματοποιείται στους 4C°. Ο όγκος κολώνας είναι 5ml(c.v.). Στη συνέχεια πραγματοποιούνται πλύσεις της κολώνας με wash buffers τα οποία περιέχουν 20 mM Tris pH8, 100mM NaCl και αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου με μέγιστη τα 40mM. Οι εκπλύσεις της His-tagged πρωτεΐνης (elution buffers) πραγματοποιούνται σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου κατά περίπτωση, κι είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγγένεια που παρουσιάζει η κάθε His-πρωτεΐνη εγγενώς για το Ni⁺² (Πίνακας 3.1).

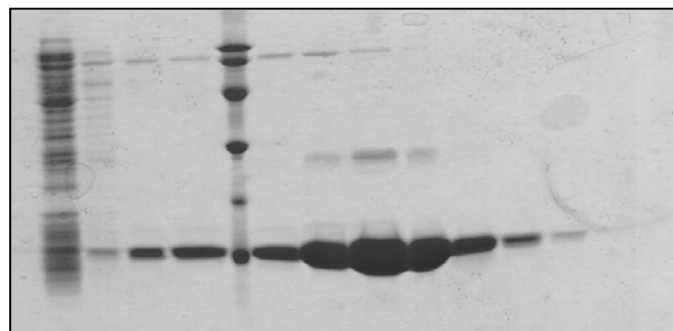
Στην **Εικόνα 3.7** φαίνονται οι ηλεκτροφορήσεις σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 15 % από τους καθαρισμούς της HgrA και HgrAΔC8 σε μεγάλη κλίμακα (2l καλλιέργεια). Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά διαλύματα υφίστανται τη διαδικασία της διαπίδυσης έναντι 2l διαλύματος 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5.8 ή 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.6 ή 20mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100mM NaCl ή 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 5.8, 20mM KF ή 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 7.6, 20mM KF ή 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5 ή 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5 ή 20mM Mes-NaOH pH 6.5 ή 20mM Tris-HCl pH 8.5 ή 20mM glycine-NaOH pH 9.5 για την ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου κι αλλαγής pH αντίστοιχα. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα συγκεντρώνεται σε τελικό όγκο που εξαρτάται από τη μετέπειτα χρήση της πρωτεΐνης (Βλέπε Εδάφιο 3.5).

Πίνακας 3.1: Πρωτόκολλο καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας

	Tris-HCl pH8(mM)	NaCl (mM)	Imidazole(mM)	c.v.
Wash1	20	100	20	30
Wash2	20	100	30	10
Wash3	20	100	40	10
Elution1	20	100	80	1
Elution2	20	100	100	1
Elution3	20	100	150	1
Elution4	20	100	200	1
Elution5	20	100	250	1
Elution6	20	100	300	1
Elution7	20	100	350	1
Elution8	20	100	400	1
Elution9	20	100	450	1
Elution10	20	100	500	1
Elution11	20	100	550	1
Elution12	20	100	600	1



α)



β)

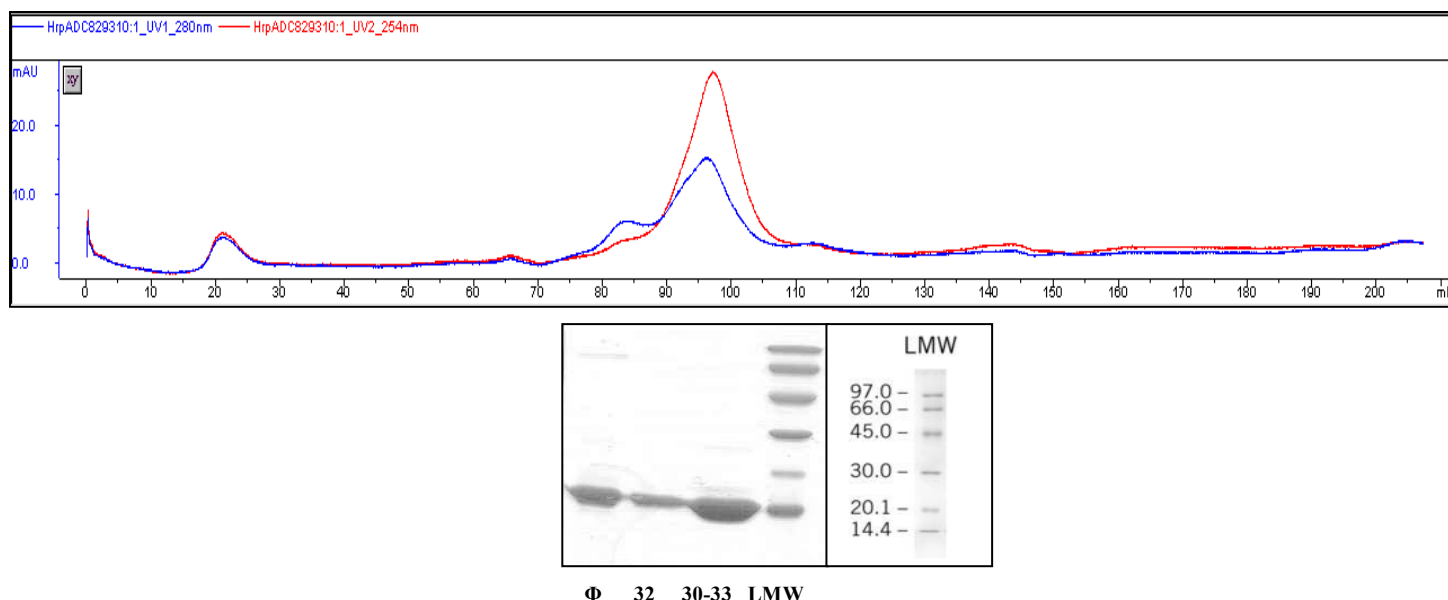
Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15 %, **α)** για την πρωτεΐνη HrpA και **β)** για τη HrpAΔC8. LMW = πρωτεϊνικός μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW, LM = loading material, FT = flow through, W1 = wash 1, W2 = wash 2, W3 = wash 3, 1-12=elution fractions.

3.5 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης της HrpAΔC8

Εκλούσεις της απομονωμένης από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης HrpAΔC8 (Βλέπε Εδάφιο 2.4.2) σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM οξικό νάτριο pH 5 και 100 mM NaCl συγκεντρώθηκαν μέχρι τα 3 ml και φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100 εξισορροπημένης με 20 mM οξικό νάτριο pH 5 και 100 mM. Μετά το πέρας της ανάλυσης έγινε η μελέτη της απεικόνισης του χρωματογραφήματος σε συνδυασμό με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) των κλασμάτων κάθε εμφανιζόμενης κορυφής και η ανάλυση των τιμών των εκλούσιμων όγκων των δειγμάτων σε σχέση με το πρότυπο διάγραμμα των πρωτεϊνών μαρτύρων. Από την εφαρμογή των αντίστοιχων εξισώσεων προέκυψε το φαινομενικό μοριακό βάρος των αναλυμένων κορυφών, όπως επίσης και η υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του μονομερούς της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 11.3 kDa.

Το χρωματογράφημα της HrpAΔC8 δίνει περισσότερες από μία κορυφές, πράγμα που δηλώνει ότι το δείγμα δεν είναι μονοδιάσπαρτο. Ειδικότερα, κατά την υποβολή του μεταλλάγματος σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τη στήλη παρουσιάζοντας μία κύρια κορυφή, η οποία αντιστοιχεί σε σωματίδιο φαινομενικού μοριακού βάρους 38 kDa και σε υδροδυναμική ακτίνα 27.74 Å (**Εικόνα 3.8**). Η έκλυση αυτή του μεταλλάγματος υποδηλώνει είτε την παρουσία της πρωτεΐνης ως τριμερές στο διάλυμα εφόσον και μόνο εφόσον η πρωτεΐνη είναι σφαιρική είτε ως ένα μονομερές εκτεταμένο σωματίδιο. Δεδομένου ότι τα πειράματα SAXS στη συνέχεια (Εδάφιο 3.6) μας καταδεικνύουν την ύπαρξη ενός μη σφαιροειδούς σωματιδίου στο διάλυμα η στήλη μοριακής

διήθησης καταδεικνύει την εκτεταμένη διαμόρφωση της HrpADC8. Ο υδροδυναμικός όγκος του μεταλλάγματος εκτιμάται βάση της υδροδυναμικής της ακτίνας στα 89369 \AA^3 . Σύμφωνα με τις εξισώσεις του Uversky (2002) για την εκτίμηση των διαφορετικών σταδίων διπλώσης μίας πρωτεΐνης η HrpADC8 κατατάσσεται στις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες, παράδειγμα των οποίων αποτελούν τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών HrpO/FliJ/YscO (Natively unfolded proteins, Βλέπε Εδάφιο 1.5.2).



Εικόνα 3.8: Χρωματογραφήματα στήλης μοριακής διήθησης για τη HrpADC8 στα 280 nm (μπλέ γραμμή) και στα 254 nm (κόκκινη γραμμή) σε 20 mM οξικό νάτριο pH 5.0, 100 mM NaCl με την αντίστοιχη SDS-PAGE ανάλυση. Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης.

3.6 Μελέτη της HrpADC8 με Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες

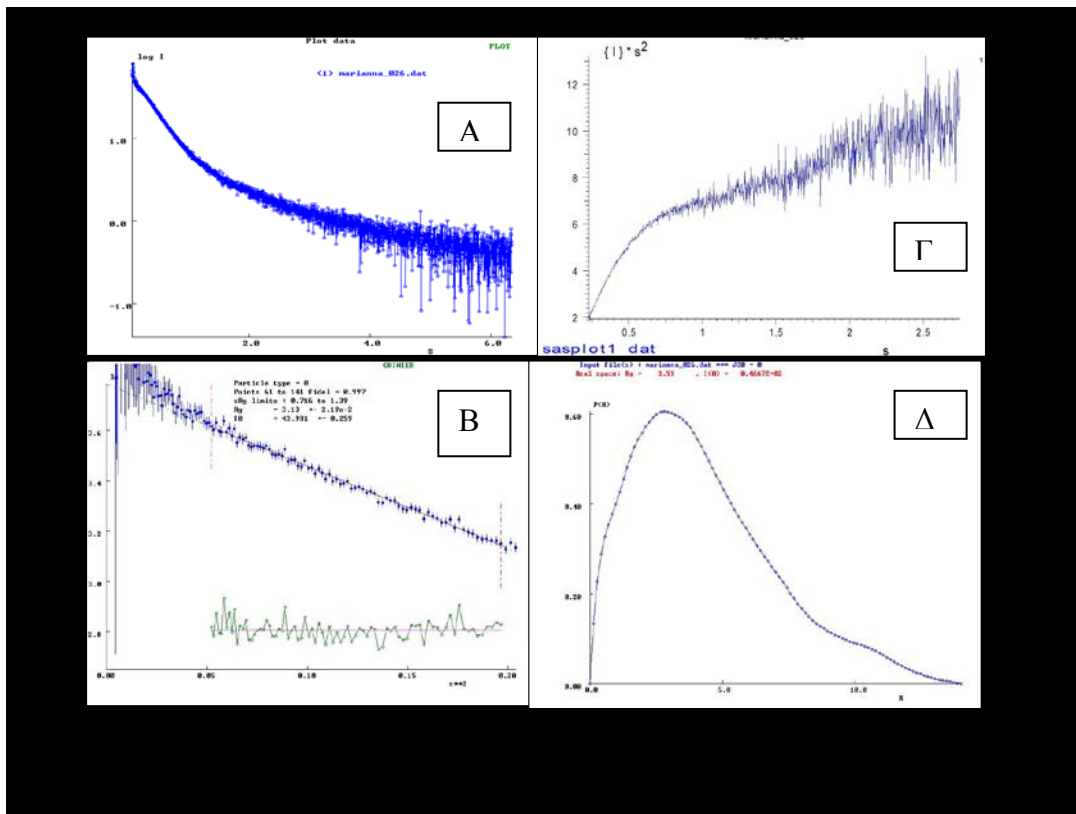
Δείγμα της υπό μελέτη πρωτεΐνης HrpADC8, συγκέντρωσης 2 mg/ml, υπό 20mM οξικό νάτριο pH 5; 100 mM NaCl, υποβλήθηκε σε SAXS και η ανάλυση των δεδομένων παρουσιάζεται παρακάτω.

Έτσι στην **Εικόνα 3.9^A** παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης του πρωτεϊνικού δείγματος της HrpADC8, συγκέντρωσης 2mg/ml, υπό 20 mM οξικό νάτριο pH 5; 100 mM NaCl, από διάλυμα. 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. Συγκεκριμένα ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στο λογάριθμο των εντάσεων ενώ ο οριζόντιος στο άνυσμα σκέδασης $s = (4\pi \sin 2\theta) / \lambda$.

Στην **Εικόνα 3.9^B** απεικονίζεται το διάγραμμα της προσέγγισης Guinier: $\ln I(s)$ συναρτήσει του s^2 . Οι τιμές της έντασης στη μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα R_g όπως φαίνεται στον πίνακα 1 υπολογίζονται αντίστοιχα στα 43.98 και 31.3 \AA . Η μοριακή μάζα της HrpADC8 εκτιμάται από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα BSA σε 41,86 kDa. Η περιοχή Guinier της τελικής καμπύλης δεν εμφανίζει γραμμικότητα πράγμα που σημαίνει ότι δεν υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο δείγμα. Με πράσινο απεικονίζονται οι υπολειμματικές τιμές της ευθείας προσέγγισης (residuals).

Στην **Εικόνα 3.9^F** απεικονίζεται το διάγραμμα Kratky, από το οποίο σχεδιάζοντας τη συνάρτηση $I(s)s^2$ έναντι του s , μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες σχετικά με την σφαιρικότητα του σωματιδίου. Στο διάγραμμα Kratky για τα δεδομένα σκέδασης της HrpADC8, η καμπύλη φτάνει σε ένα πλατό, αλλά η περιοχή των μεγάλων γωνιών καταλαμβάνεται από μια μονοτονικά αυξανόμενη καμπύλη χαρακτηριστική της σκέδασης από σωματίδιο σχήματος ράβδου (αλυσίδα τύπου Kratky-Porod).

Στην **Εικόνα 3.9^A** απεικονίζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $p(r)$ όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου υπολογίζεται στα 130 Å. Η μέγιστη τιμή της $p(r)$ υπολογίζεται στα 35.9 Å και αντιπροσωπεύει την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου. Από την ασύμμετρη μορφή της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων (μέγιστο μετατοπισμένο στις μικρές αποστάσεις) προέκυψε ότι πρόκειται για επιμηκυμένο μόριο.



Εικόνα 3.9: **A.** Η τελική καμπύλη σκέδασης του πρωτεϊνικού δείγματος της HprAΔC8, συγκέντρωσης 2mg/ml, υπό 20 mM οξικό νάτριο pH 5; 100 mM NaCl, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. **B.** Η προσέγγιση Guinier στις μικρές γωνίες της καμπύλης A. Η κλίση της ευθείας δίνει τη γυροσκοπική ακτίνα R_g του σωματιδίου, 3.13nm, ενώ το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα του $\log I$ δίνει την τιμή της $I_{(0)} = 43.98$. **Γ.** Το διάγραμμα Kratky $I(s) \cdot s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με πλατό στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει εκτεταμένο σκεδάζον σωματίδιο. **Δ.** Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για $D_{max}=13$ nm. Η κατανομή είναι ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εντοπίζεται στις μικρές αποστάσεις r , πράγμα που υποδηλώνει την επιμήκη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.

3.6.1 Ab initio καθορισμός του σχήματος της HprAΔC8

Ο καθορισμός του σχήματος της HprAΔC8 πραγματοποιήθηκε μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (simulation annealing) με την μέθοδο των ψευδών ατόμων (πρόγραμμα DAMMIN), χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας. Εκτελέστηκαν ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας διαμέτρου 130 Å. Τα μοντέλα που παρήχθησαν από το πρόγραμμα DAMMIN, υπερτέθηκαν ανά ζεύγη με τα εκτελέσιμα damsels/damaver/supcomb και παρουσίασαν υψηλή τιμή μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας ($MNSD > 0.7$), μαρτυρώντας μεγάλες περιοχές εξάπλωσης που υποδεικνύουν την αστάθεια των μοντέλων (**Εικόνα 3.10**).



Εικόνα 3.10: Το πιθανότερο μοντέλο υπολογίστηκε για το πρωτεϊνικό δείγμα της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 2mg/ml, υπό 20 mM οξικό νάτριο pH 5; 100 mM NaCl, από αρκετές ανακατασκευές του προγράμματος DAMMIN, τα μοντέλα συγκρίθηκαν στο SUPCOMB, παρήχθηκε ο συνολικός όγκος κάλυψης από το DAMAVER και έγινε φιλτράρισμα για την εύρεση του πιο πιθανού μοντέλου από το DAMFILT. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε $D_{max} = 13\text{nm}$ ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δεν δόθηκε καμία συμμετρία (P1) και ανισομετρία. Τιμή ασυμφωνίας των υπολογιζόμενων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi = 0.85$. Στην συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση του πιο πιθανού μοντέλου με το πρόγραμμα HYDROPRO, όπου η επεξεργασία με τη μεθοδολογία μοντελοποίησης μέσω σφαιριδίων. **A**, Το HYDROPRO αυθόρμητα παρήγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**, Άποψη βάσης. Η απεικόνιση έγινε μέσω του προγράμματος γραφικών PyMOL (DeLano Sc.) για χωροπληρωτικό μοντέλο.

Τα παραπάνω μοντέλα που παρήχθησαν με την μέθοδο προσομοίωσης απόπτησης (simulation annealing) εξετάστηκαν επίσης με το πρόγραμμα HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) για να εκτιμηθούν από αυτά οι τιμές της υδροδυναμικής και γυροσκοπικής τους ακτίνας, ο όγκος που καταλαμβάνουν και η μέγιστη διάμετρος τους. Στον **Πίνακα 3.2** οι τιμές αυτές παρουσιάζονται συνολικά μαζί με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές είτε από τα δεδομένα της σκέδασης σε μικρές γωνίες είτε από τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης στη στήλη μοριακής διήθησης.

Πίνακας 3.2: Υδροδυναμικοί Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα καθώς και υπολογιζόμενα από τα μοντέλα του DAMMIN για το πρωτεϊνικό δείγμα της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 2mg/ml, υπό 20 mM οξικό νάτριο pH 5; 100 mM NaCl.

Παράμετροι	Πειραματικές Τιμές	DAMMIN από DAMSTART
R_g (Å) Guinier*	31.4	
R_g (Å)**	35.9	34.1
D_{max} (Å)**	130	123
R_h (Å)	27.74	29.3
V (Å ³)	89369	98830

*Η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.

** Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $p(r)$ μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier.

R_h είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διήθησης.

Οι τιμές των R_g , R_h , D_{max} και V από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).

Συμπερασματικά λοιπόν οι μετρήσεις σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες έδειξαν ότι το μεταλλάγμα HgrADC8 σε διάλυμα 20mM οξικό νάτριο pH 5, 100 mM NaCl στους 10 C°, βρίσκεται υπό την μορφή εκτεταμένου σωματιδίου, το οποίο δεν φαίνεται να διαθέτει έναν καλά καθορισμένο υδρόφοβο πυρήνα. Επίσης το μοριακό βάρος του μεταλλάγματος της HgrADC8 από τα SAXS (~ 41KDa) φαίνεται ότι συμπίπτει με το φαινομενικό μοριακό βάρος από τη στήλη μοριακής διήθησης (~ 38KDa), ενισχύοντας έτσι τη θεώρηση ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στο διάλυμα υπό μορφή μονομερούς εκτεταμένου σωματιδίου. Τέλος από τις τιμές της υδροσκοπικής ακτίνας που προκύπτουν από το HYDROPRO οι οποίες συμπίπτουν με την τιμή της υδροσκοπικής ακτίνας της gel filtration συμπεραίνουμε ότι τα δείγματα (aliquots) που φτάσανε για μετρήσεις δεν είχαν ξεπαγώσει.

3.7 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HgrA με κυκλικό διχρωισμό

Τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο τύπου Jasco (J815). Για τις μετρήσεις στο άπω υπεριώδες (185-260 nm) στους 10 C° χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες πάχους 1 mm. Τα δείγματα της πρωτεΐνης HgrA που υποβλήθηκαν σε πειράματα κυκλικού διχρωισμού προέκυψαν από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθως διαπίδυση έναντι «διαφανούς» διαλύματος α) 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 5.8, 20mM KF και β) 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 7.6, 20mM KF. Τα παραπάνω πρωτεϊνικά δείγματα της HgrA στον κατάλληλο διαλύτη χρησιμοποιήθηκαν για μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής των μορίων. Στο άπω υπεριώδες πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τόσο των αρχικών διαλυμάτων των πρωτεϊνών όσο και αραιώσεών τους με τα αντίστοιχα α-ε προαναφερθέντα διαλύματα. Σε όλες τις μετρήσεις, τιμές θορύβου (τάσης HT) πάνω από 600 απορρίπτονταν.

Πριν από την υποβολή των δεδομένων στους υπολογισμούς δευτεροταγούς δομής έγινε η χρήση του μενού του προγράμματος Spectra Manager (Jasco Inc.) όπου πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του σήματος του διαλύτη από την καμπύλη ελλειπτικότητας του δείγματος, η κανονικοποίηση της καμπύλης βάσει του αριθμού καταλοίπων και της συγκέντρωσης του δείγματος και η παραγωγή έτσι της καμπύλης της μοριακής ελλειπτικότητας του δείγματος.

Για τον υπολογισμό των ποσοστών δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα της σουίτας CDPPro, SELCON3, CONTINLL και CDSSTR (βλέπε Εδάφιο 2.6.1) από όπου προέκυψαν τα ποσοστά εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών δομών στο υπό εξέταση πρωτεϊνικό μόριο μετά από σύγκριση με το σετ αναφοράς SMP56 (Sreerama & Woody, 2004). Και από τα τρία προγράμματα προκύπτει η παράμετρος καλής προσαρμογής (goodness of fit) NRMSD η οποία αποτελεί μέτρο του πόσο καλά ταιριάζει (fit) η υπολογισμένη δευτεροταγής δομή με τα πειραματικά δεδομένα. Η παράμετρος λαμβάνει τιμές από 0 (κανένα fit) έως 1 (τέλειο fit).

3.7.1 Φάσματα κυκλικού διχρωισμού πρωτεΐνης HgrA στο άπω υπεριώδες

Η πρωτεΐνη HgrA υπεβλήθη σε πειράματα κυκλικού διχρωισμού σε διάφορες συγκεντρώσεις και pH στο άπω υπεριώδες και τα ενδεικτικά ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της έτσι όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL, CDSSTR στις δυο τιμές pH 5.8 & 7.6 ακολουθούν παρακάτω στον Πίνακα 3.3. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε και για τα δυο pH ήταν το SMP56 (εύρος φάσματος: 190-260 nm, περιέχει 43 διαλυτές και 13 μεμβρανικές πρωτεΐνες και περιλαμβάνει τα στοιχεία: κανονική α-έλικα H(r), διαταραγμένη α-έλικα H(d), κανονικός β- κλώνος S(r), διαταραγμένος β-κλώνος S(d), στροφή T, αδόμενη περιοχή U, Sreerama & Woody 2004). Η πρωτεΐνη και στις δυο τιμές pH επιδεικνύει χαρακτηριστική αρνητική κορυφή στα 200 nm που έχουν οι β-II πρωτεΐνες καθώς και οι πρωτεΐνες με τυχαίο σπείραμα. Δομές των β-II πρωτεϊνών περιέχουν β-πτυχωτά φύλλα με μικρό ακανόνιστο μήκος ή φύλλα β-στροφής (αρνητική κορυφή στα 200 nm και θετική κορυφή στα 190, 210 nm ; Sreerama & Woody

2004) (Εικόνα 3.11, 3.12). Και στα 2 pH παρατηρούνται ελάχιστα ποσοστά α-έλικας, ενώ τα CD φάσματα είναι παραπλήσια με φάσματα εγγενώς αδίπλων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα μοιάζουν πολύ με το φάσμα του αποδιατεταγμένου κολλαγόνου (denaturated collagen).

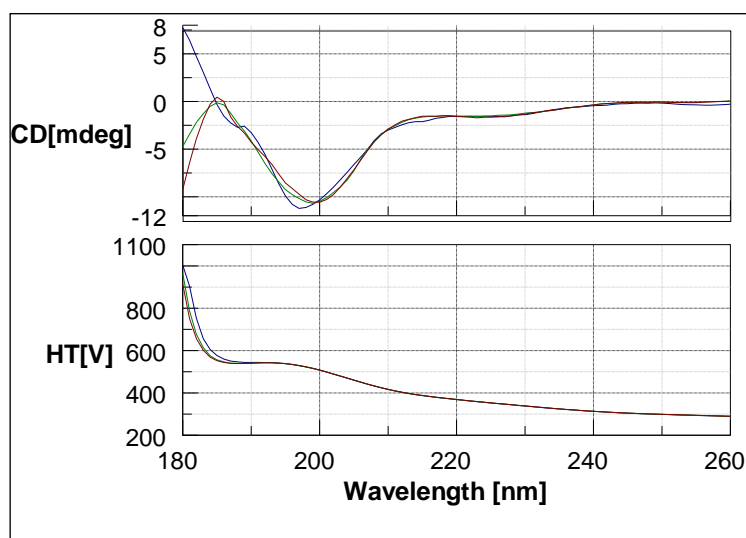
Πίνακας 3.3: Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη HgrA (A) συγκέντρωσης 0.016 mg/ml, δείγμα δέκα ημερών σε pH 5.8 και (B) συγκέντρωσης 0.013 mg/ml, δείγμα δέκα ημερών σε pH 7.6 από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL και CDSSTR. Σε pH 5.8 τα ποσοστά α-έλικας είναι χαμηλά, ενώ υψηλότερα είναι τα ποσοστά β-κλώνου, στροφής και τυχαίου σπειράματος. Σε pH 7.6 είναι λίγο υψηλότερα τα ποσοστά α-έλικας, ενώ αυξάνονται αρκετά και τα ποσοστά β-κλώνου. Επίσης υψηλό ποσοστό παρουσιάζει και η στροφή, ενώ τα ποσοστά τυχαίου σπειράματος παρουσιάζουν μείωση. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SMP56. 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.

	α-έλικες	β-πτυχές	στροφή	Τυχαίο σπείραμα	RMSD
SELCON3	14.2 %	33.1 %	21.6 %	33.6 %	2.934
CDSSTR	-	-	-	-	-
CONTILL	15.9 %	14.7 %	23.4 %	46 %	0.355

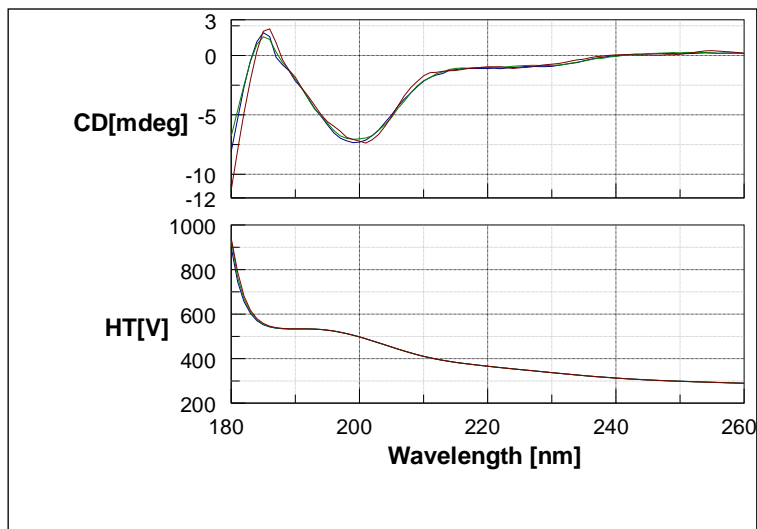
(A)

	α-έλικες	β-πτυχές	στροφή	Τυχαίο σπείραμα	RMSD
SELCON3	18 %	39.1 %	21.7 %	21.7 %	3.260
CDSSTR	44 %	26.2 %	16.8 %	12.6 %	0.343
CONTILL	0.2 %	54.9 %	35.9 %	9 %	1.802

(B)



Εικόνα 3.11: Το παραπάνω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (CD) απεικονίζει την πρωτεΐνη HgrA σε 10mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ pH 5.8, 20mM KF, 0.016 mg/ml, δείγμα δέκα ημερών (overlay 3 μετρήσεων: run6-run7-run8). Η μπλε γραμμή αντιστοιχεί στο γρήγορο scanning speed 100 nm/min γι' αυτό δεν συμπίπτει με την πράσινη και κόκκινη γραμμή. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε το χαρακτηριστικό ελάχιστο στα 200 nm.

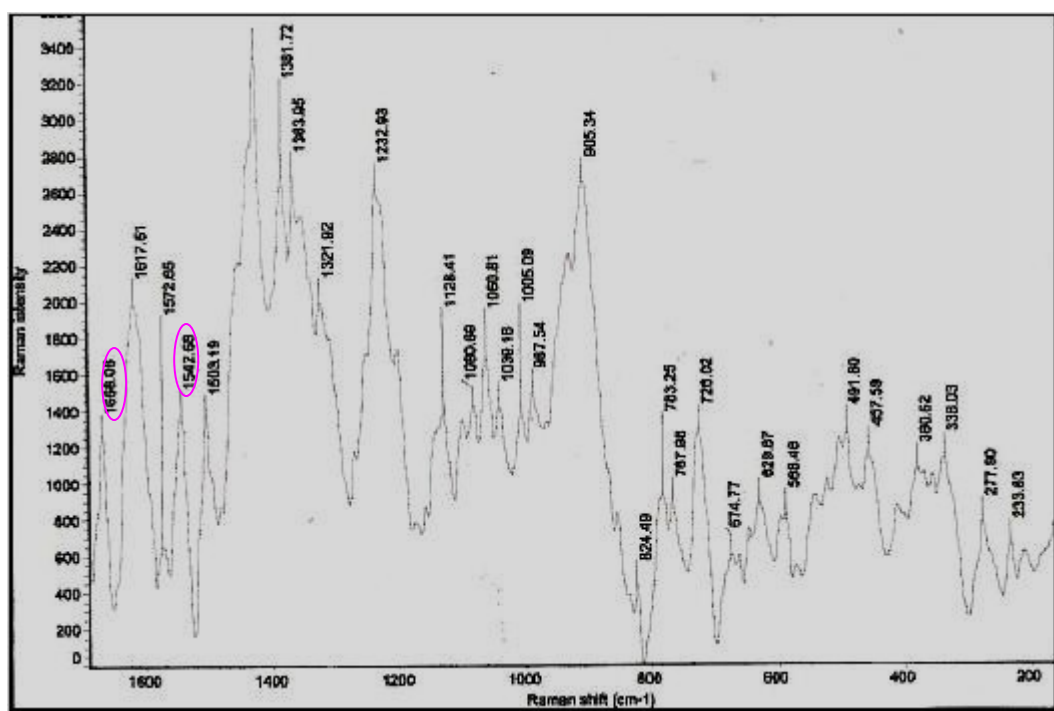


Εικόνα 3.17: Το παραπάνω φάσμα κυκλικού διχρωισμού (CD) απεικονίζει την πρωτεΐνη HrpA σε 10mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pH 7.6, 20mM KF, 0.013 mg/ml, δείγμα δέκα ημερών (overlay 3 μετρήσεων: run14-run15-run16). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούμε το χαρακτηριστικό ελάχιστο στα 200 nm.

3.8 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης HrpA με Raman Analysis

Το πρωτεϊνικό δείγμα της HrpA που υποβλήθηκε σε πειράματα φασματοσκοπίας Raman προέκυψε από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, ακολούθως διαπίδυση έναντι διαλύματος 10mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pH 5.8, 20mM KF και τέλος συμπύκνωση μέχρι τα 3.5 mL. Η περαιτέρω προετοιμασία του υπό μελέτη πρωτεϊνικού δείγματος και η διαδικασία καταγραφής του Raman φάσματός του (**Εικόνα 3.13**) περιγράφεται αναλυτικά στο Εδάφιο 2.7.1. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του φάσματος Raman παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4**. Οι αντιστοιχίσεις της κάθε κορυφής στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής έγινε με βάση τις αντιστοιχίσεις που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία: (Hamodrakas *et al.*, 2003; Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής, Χαμόδρακας, 1993).

Έτσι πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:



Εικόνα 3.13: Το φάσμα Raman της πρωτεΐνης HrpA, συγκέντρωσης 0.06 mg/ml, σε 20mM $NaH_2P_0_4/K_2HP_0_4$ pH 5.8, δείγμα δέκα ημερών. Σε αυτό το φάσμα μπορούμε να αναγνωρίσουμε δύο χαρακτηριστικές κορυφές $1668,06\text{cm}^{-1}$ (Αμιδική I) και $1232,93\text{cm}^{-1}$ (Αμιδική III) οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της δομής των β πτυχωτών φύλλων.

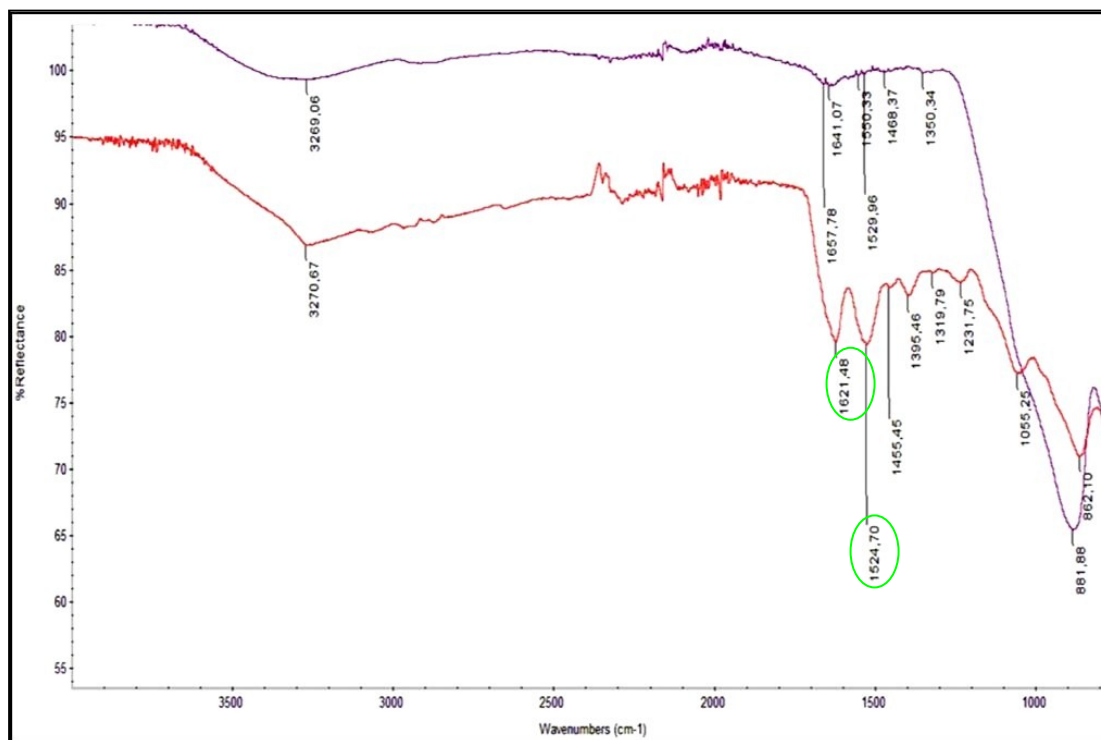
Πίνακας 3.4: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του παραπάνω φάσματος:

Πρωτεϊνικό δείγμα	HrpA pH 5.8, 10 ημερών
Exposure time	3,5 sec
Number of Exposures	10
Number of background exposures	2
Grating	672 lines/mm
Spectrograph aperture	100 μm pinhole

3.9 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός της πρωτεΐνης Hrpa με FTIR

Το πρωτεϊνικό δείγμα της Hrpa που υποβλήθηκε σε πειράματα φασματοσκοπίας υπερύθρου προέκυψε από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, ακολούθως διαπίδυση έναντι 20mM $\text{NaH}_2\text{P04}/\text{K}_2\text{HP04}$ pH 5.8 και τέλος συμπύκνωση μέχρι τα 9 ml. Η περαιτέρω προετοιμασία του υπό μελέτη πρωτεϊνικού δείγματος και η διαδικασία καταγραφής του IR φάσματός του (**Εικόνα 3.14**) περιγράφεται αναλυτικά στο Εδάφιο 2.8.1. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του IR φάσματος παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.5**. Οι αντιστοιχίσεις της κάθε κορυφής στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής έγινε με βάση τις αντιστοιχίσεις που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία: (Mclean & Pelton, 2000; Kong & Yu, 2007).

Έτσι πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:



Εικόνα 3.14: Το φάσμα υπερύθρου της συμπυκνωμένης πρωτεΐνης Hrpa, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml, σε 20mM $\text{NaH}_2\text{P04}/\text{K}_2\text{HP04}$ pH 5.8, δείγμα 10 ημερών. Σε αυτό το φάσμα μπορούμε να αναγνωρίσουμε δύο χαρακτηριστικές κορυφές $1621,5 \text{ cm}^{-1}$ (Αμιδική I) και $1524,7 \text{ cm}^{-1}$ (Αμιδική II) οι οποίες είναι χαρακτηριστικές της δομής των αντι-παράλληλων β πτυχωτών φύλλων. Με κόκκινη γραμμή αναπαρίσταται το φάσμα Raman της Hrpa, ενώ με μωβ γραμμή αναπαρίσταται το φάσμα Raman μόνο του buffer 20mM $\text{NaH}_2\text{P04}/\text{K}_2\text{HP04}$ pH 5.8.

Πίνακας 3.5: Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του παραπάνω φάσματος:

Πρωτεϊνικό δείγμα	HrpA pH 5.8, 10 ημερών
Number of sample scans	128
Collection length	152,64 sec
Resolution	4
Levels of zero filling	0
Number of scan points	8480
Number of FFT points	8192
Laser frequency	15798,3 cm ⁻¹
Interferogram peak position	4096
Apodization	Happ-Genzel
Phase correction	Mertz
Number of background scans	128
Sample gain	8

3.10 Δομική μελέτη των πρωτεϊνών Hrpa και HrpaΔC8 με HRTEM

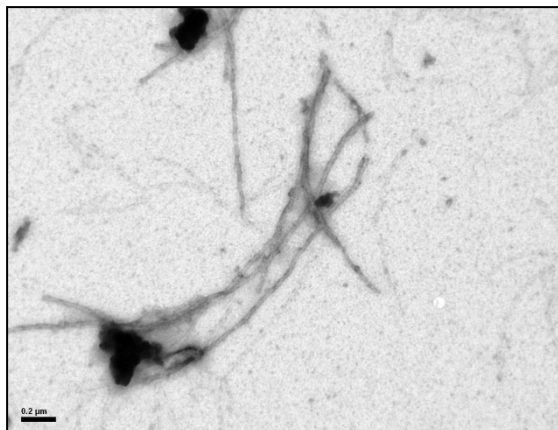
3.10.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης για την Hrpa

Τα δείγματα της πρωτεΐνης Hrpa που υποβλήθηκαν σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υψηλής ανάλυσης προέκυψαν από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθως διαπίδυση έναντι 21 διαλύματος διαφόρων τιμών pH: α) 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5, β) 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8, γ) 20mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7.6, 150mM NaCl, δ) 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5, ε) 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5, ζ) 20mM Mes-NaOH pH 6.5, η) 20mM Tris-HCl pH 8.5 και θ) 20mM glycine-NaOH pH 9.5. Στη συνέχεια τα παραπάνω μη συμπυκνωμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για αρνητική χρώση και τοποθέτηση τους πάνω σε grids με τον τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στο Εδάφιο 2.10.1. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση των εναποθεθειμένων επάνω στα grids πρωτεϊνικών υλικών με HRTEM, η οποία έδειξε ότι η πρωτεΐνη Hrpa σχηματίζει μακριά και λεπτά ινίδια στα pH 4.5-9.5. Σαν “negative control” χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα διαλύματα διαπίδυσης χωρίς καθόλου πρωτεϊνικό υλικό, τα οποία αναμενόμενα έδειξαν τον παρουσία μόνο άμορφου υλικού. Έπειτα τα ίδια πειράματα επαναλήφθηκαν, παραλαμβάνοντας δείγματα από την πρωτεΐνη σε διαφορετικούς χρόνους ανάπτυξης της, με σκοπό να ελεγχθεί η διαδικασία αυτό-οργάνωσης της πρωτεΐνης με την πάροδο του χρόνου. Οι εικόνες των αποτελεσμάτων από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gatan Digital Micrograph και περιγράφονται ακολούθως.

3.10.1.1 Μελέτη της πρωτεΐνης Hrpa σε pH 5

Η πρωτεΐνη Hrpa απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυση της έναντι 21 διαλύματος 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 2 και στις 20 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μακριών και λεπτών ινιδίων, με μέσο όρο διαμέτρου από 8 έως 10 nm για τα πιο μικρά ινίδια και από 16-30 nm για τα πιο μεγάλα ινίδια

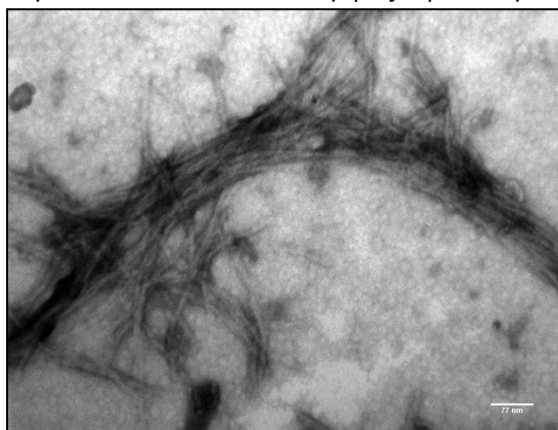
και μήκος από 0.5 - 2μm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.15 έως 3.17**, με την επεξήγηση των **Πινάκων 3.6, 3.7**.



Εικόνα 3.15: Εικόνα HRTEM της HgrA, μη συμπυκνωμένου δείγματος σε 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5, δείγμα 2 ημερών, χρώση με UA 1%. Τα ινίδια που σχηματίζονται έχουν διάμετρο που κυμαίνεται από 16-28 nm και μήκος περίπου 2 μm.

Πίνακας 3:6: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HgrA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.15.

Όνομα Πεπτιδίου	HgrA
Buffer	pH 5
Συγκέντρωση	Μη συμπυκνωμένο
Μέρες Ανάπτυξης	2 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.15
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	200 nm

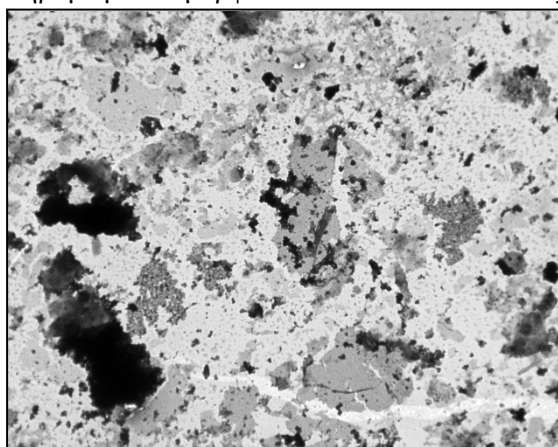


Εικόνα 3.16: Εικόνα HRTEM της HgrA, μη συμπυκνωμένου δείγματος σε 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5, δείγμα 20 ημερών, χρώση με UA 1%. Τα ινίδια που σχηματίζονται έχουν διάμετρο που κυμαίνεται από 8-10 nm.

Πίνακας 3:7: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HgrA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.16.

Όνομα Πεπτιδίου	HgrA
Buffer	pH 5
Συγκέντρωση	Μη συμπυκνωμένο
Μέρες Ανάπτυξης	20 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.16
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	77 nm

Σαν αρνητικό control χρησιμοποιήσαμε το buffer 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5 και πήραμε μόνο άμορφο υλικό το οποίο απεικονίζεται στην **Εικόνα 3.17**.



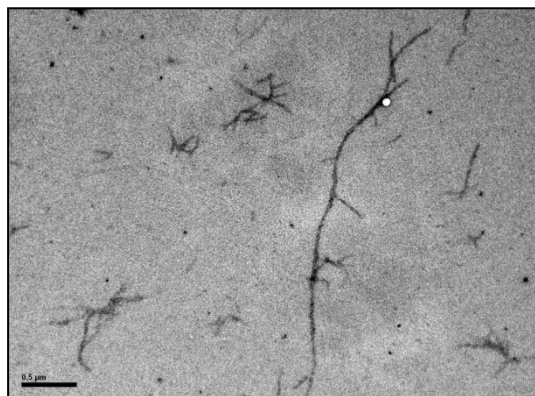
Εικόνα 3.17: Εικόνα HRTEM στην οποία απεικονίζεται το buffer 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 5 το οποίο δεν σχηματίζει ινίδια. Κλίμακα = 200nm.

Παρατηρήσεις/ Συμπεράσματα

Η πρωτεΐνη HrpA σε pH 5, στις δυο και στις είκοσι μέρες επώασής της παρατηρήθηκε ότι σχηματίζει μακριά και λεπτά ινίδια, με μέσο όρο διαμέτρου από 8 έως 10 nm για τα πιο μικρά ινίδια και από 16-30nm για τα πιο μεγάλα ινίδια και μήκος από 0.5 - 2μm. Στις είκοσι μέρες παρατηρούμε ότι ευνοείται η οργάνωση της πρωτεΐνης σε περισσότερα, λεπτότερα και καλύτερα πακεταρισμένα μεταξύ τους ινίδια. Επίσης χρησιμοποιώντας για negative control μόνο το διάλυμα διαπίδυσης επιβεβαιώσαμε ότι οι ινώδεις σχηματισμοί οφείλονται στο πρωτεϊνικό μας δείγμα και δεν είναι κάποιες μορφολογικές παρεμβολές από το buffer.

3.10.1.2 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 7.8

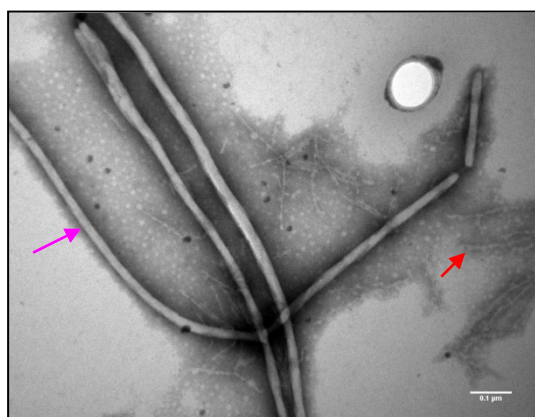
Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 2 και στις 20 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός δύο τύπων ινιδίων, με διάμετρο από 5-8 nm για τα πιο μικρά ινίδια και περίπου 40 nm για τα πιο μεγάλα ινίδια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις **Εικόνες 3.18 έως 3.20**, με την επεξήγηση των **Πινάκων 3.8, 3.9**.



Πίνακας 3:8: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.18

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 7.8
Συγκέντρωση	Μη συμπυκνωμένο
Μέρες Ανάπτυξης	2 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.18
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	500 nm

Εικόνα 3.18: Εικόνα HRTEM της HrpA, μη συμπυκνωμένου δείγματος σε 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8, δείγμα 2 ημερών, χρώση με PTA 1%. Τα ινίδια που σχηματίζονται έχουν διάμετρο περίπου 5 nm.

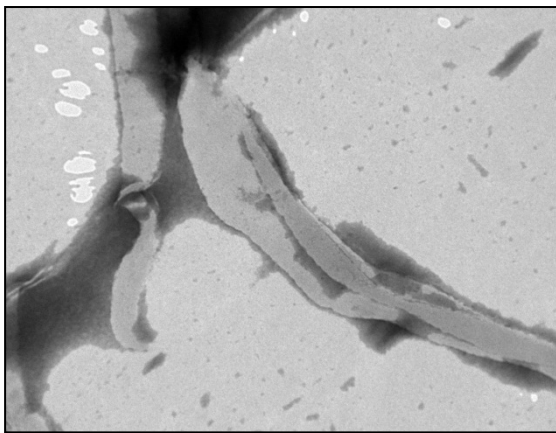


Πίνακας 3:23: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.19.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 7.8
Συγκέντρωση	Μη συμπυκνωμένο
Μέρες Ανάπτυξης	20 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.19
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	100 nm

Εικόνα 3.19: Εικόνα HRTEM της HrpA, μη συμπυκνωμένου δείγματος σε 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8, δείγμα 20 ημερών, χρώση με PTA 1%. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μακριών και λεπτών ινιδίων, με μέσο όρο διαμέτρου από 8 nm για τα πιο μικρά ινίδια (κόκκινο βελάκι) και 40nm για τα πιο μεγάλα ινίδια (φούξια βελάκι).

Σαν αρνητικό control χρησιμοποιήσαμε το buffer 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8 και δεν παρατηρήσαμε κανένα ινώδη σχηματισμό (**Εικόνα 3.20**).



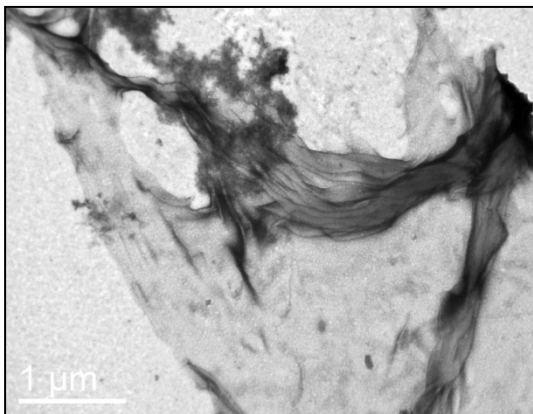
Εικόνα 3.20: Εικόνα HRTEM στην οποία απεικονίζεται το buffer 20mM NaH₂PO₄ / K₂HPO₄ pH 7.8 το οποίο δεν σχηματίζει ινίδια. Κλίμακα = 200nm.

Παρατηρήσεις/ Συμπεράσματα

Η πρωτεΐνη HrpA σε pH 7.8, στις δυο μέρες επώασής της παρατηρήθηκε ότι σχηματίζει μακριά και λεπτά ινίδια, διαμέτρου από 5 έως 8 nm, ενώ στις είκοσι μέρες ανάπτυξής της φάνηκε να συνυπάρχουν αυτά τα λεπτά ινίδια με ινίδια μεγαλύτερης διαμέτρου, περίπου 40 nm. Έτσι στις είκοσι μέρες παρατηρούμε ότι ευνοείται η οργάνωση αυτής της πρωτεΐνης σε περισσότερα και καλύτερα πακεταρισμένα μεταξύ τους ινίδια. Επίσης χρησιμοποιώντας για negative control το διάλυμα διαπίδυσης επιβεβαιώσαμε ότι οι ινώδεις σχηματισμοί οφείλονται στο πρωτεϊνικό μας δείγμα και δεν είναι κάποιες μορφολογικές παρεμβολές από το buffer. Αξίζει να αναφερθεί ότι δοκιμάσαμε το ίδιο πείραμα στις 20 ημέρες με συμπυκνωμένο δείγμα πρωτεΐνης (0.06 mg/ml) αλλά δεν παρατηρήσαμε διαφορά ως προς την οργάνωση του μη συμπυκνωμένου δείγματος στις 20 ημέρες. Στη συνέχεια ελέγξαμε αν μια ποικιλία pH από 3.5 έως 9.5 στην πάροδο του χρόνου, επηρεάζει ευνοϊκότερα ή όχι τους ινώδεις σχηματισμούς που παρατηρήσαμε στο pH 5 και 7.8.

3.10.1.3 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 3.5

Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υδρογέλης και όχι καλοσχηματισμένων ινιδίων, που παρατηρήθηκαν στα pH 5 και 7.8. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.21** με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.10**.



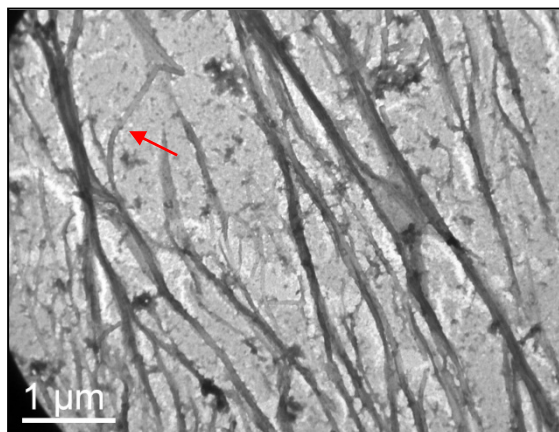
Πίνακας 3:10: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.10.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 3.5
Συγκέντρωση	0.03 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.10
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

Εικόνα 3.21: Εικόνα HRTEM της HrpA, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με UA1%. Παρατηρείται σχηματισμός υδρογέλης.

3.10.1.4 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 4.5

Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολύ ανεπτυγμένων ινιδίων διαμέτρου 50 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.21**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.11**.



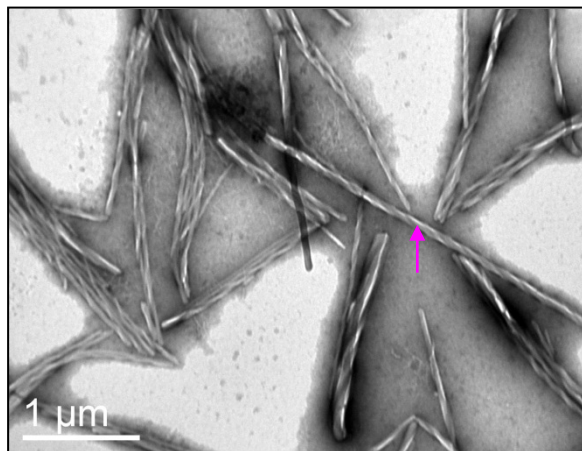
Πίνακας 3:11: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.21.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 4.5
Συγκέντρωση	0.03 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.21
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

Εικόνα 3.21: Εικόνα HRTEM της HrpA, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με UA1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός ανεπτυγμένων ινιδίων διαμέτρου 50 nm (κόκκινο βελάκι).

3.10.1.5 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 6.5

Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM Mes-NaOH pH 6.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός υπερελικωμένων ινιδίων διαμέτρου 70nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.23**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.12**.



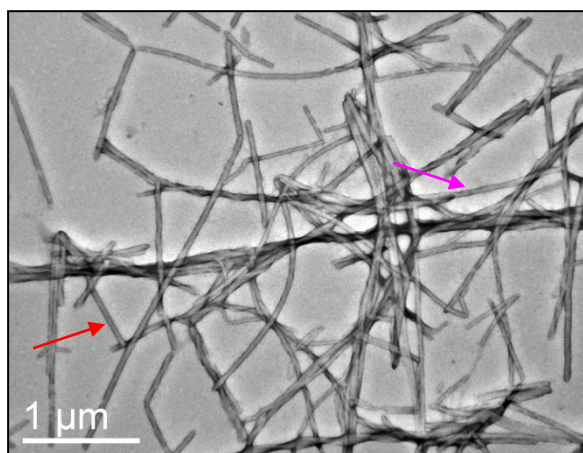
Πίνακας 3:12: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στις Εικόνες 3.23.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 6.5
Συγκέντρωση	0.03 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.23
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

Εικόνα 3.23: Εικόνα HRTEM της HrpA, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 6.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA 1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός υπερελικωμένων ινιδίων διαμέτρου περίπου 70 nm (φούξια βέλος).

3.10.1.6 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 8.5

Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM Tris-HCl pH 8.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρείται ο σχηματισμός μακριών ινιδίων διαμέτρου 44 nm και υπερελικωμένων ινιδίων 71 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.24**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.13**.



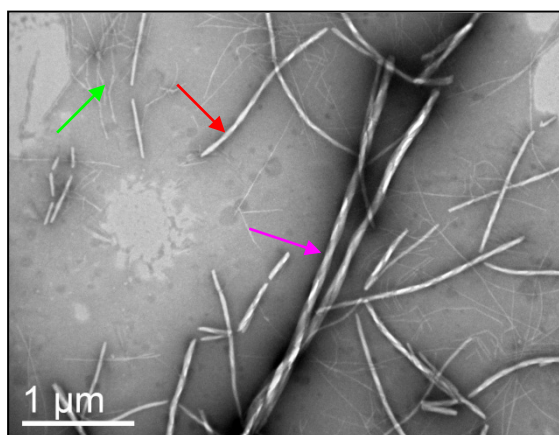
Εικόνα 3.24: Εικόνα HRTEM της HrpA, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml σε 20mM Tris-HCl pH 8.5 Tris-HCl pH 8.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA 1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός μακριών ινιδίων διαμέτρου (44 nm, κόκκινο βελάκι) και υπερελικωμένων ινιδίων (71 nm, φούξια βελάκι).

Πίνακας 3:13: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.24

Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 8.5
Συγκέντρωση	0.03 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.67, 3.68
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

3.10.1.7 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpA σε pH 9.5

Η πρωτεΐνη HrpA απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM glycine-NaOH pH 9.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μακριών και υπερελικωμένων ινιδίων διαμέτρου 80 nm καθώς και λεπτότερων ινιδίων διαμέτρου από 14 - 40 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.25**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.14**.



Εικόνα 3.25: Εικόνα HRTEM της HrpA, συγκέντρωσης 0.03 mg/ml σε 20mM glycine-NaOH pH 9.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA 1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός λεπτών ινιδίων διαμέτρου 14 nm (πράσινο βελάκι), μεγαλύτερων ινιδίων 40 nm (κόκκινο βελάκι) καθώς και υπερελικωμένων μακριών ινιδίων 80 nm (φούξια βελάκι).

Πίνακας 3:28: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpA που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.25.

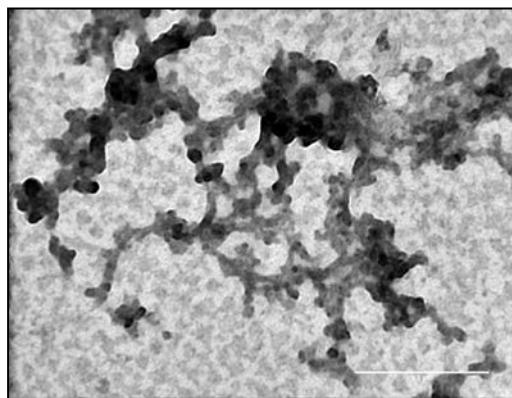
Όνομα Πεπτιδίου	HrpA
Buffer	pH 9.5
Συγκέντρωση	0.03 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.25
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

3.10.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης υψηλής ανάλυσης για την HrpAΔC8

Τα δείγματα της πρωτεΐνης HrpA που υποβλήθηκαν σε πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υψηλής ανάλυσης προέκυψαν από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθως διαπίδυση έναντι 2l διαλύματος διαφόρων τιμών pH: α) 20mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100mM NaCl, β) 20mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7.6, 30mM NaCl, γ) 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5, δ) 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5, ε) 20mM Mes-NaOH pH 6.5, ζ) 20mM Tris-HCl pH 8.5 και η) 20mM glycine-NaOH pH 9.5. Στη συνέχεια κάποια από αυτά τα δείγματα συγκεντρώθηκαν μέχρι τα 3 ml και χρησιμοποιήθηκαν για αρνητική χρώση και τοποθέτηση τους πάνω σε grids με τον τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στο Εδάφιο 2.10.1. Για συγκριτικά πειράματα μη συμπυκνωμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την ίδια διαδικασία. Τέλος ακολούθησε παρατήρηση των εναποτεθειμένων επάνω στα grids πρωτεϊνικών υλικών με HRTEM, η οποία έδειξε ότι η πρωτεΐνη HrpAΔC8 σχηματίζει μακριά και λεπτά ινίδια σε όλα τα pH με την πάροδο του χρόνου. Οι εικόνες των αποτελεσμάτων από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gatan Digital Micrograph και περιγράφονται ακολούθως.

3.10.2.1 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και μοριακής διήθησης και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100mM NaCl. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, συμπυκνώθηκε στα 200 μl και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 10 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πυκνών συσσωματωμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.26**, με την επεξήγηση των **Πίνακα 3.15**.



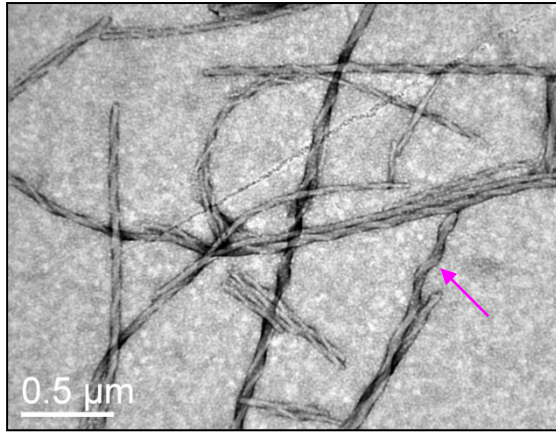
Πίνακας 3:15: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.26.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 5
Συγκέντρωση	1 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	10 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.26
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	400 nm

Εικόνα 3.26: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 1 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100mM NaCl., δείγμα 10 ημερών, χρώση με UA 1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός πυκνών άμορφων συσσωματωμάτων.

3.10.2.2 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 7.6

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ pH 7.6. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, συμπυκνώθηκε στα 3 ml και στη συνέχεια στο 1 ml και χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 30 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πάρα πολύ ανεπτυγμένων ινιδίων με διάμετρο 70 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.27**, με την επεξήγηση των **Πίνακα 3.16**.



Πίνακας 3:16: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.27.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 5
Συγκέντρωση	0.06 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	30 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.27
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	500 nm

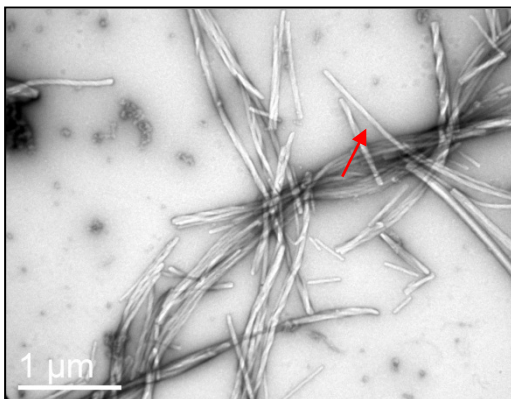
Εικόνα 3.27: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.06 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 5, 100mM NaCl., δείγμα 30 ημερών, χρώση με PTA 1%. Παρατηρείται ο σχηματισμός πολύ ανεπτυγμένων ινιδίων 70 nm (φούξια βελάκι).

Παρατηρήσεις/ Συμπεράσματα

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 σε pH 7.8 στις 30 ημέρες επώασής της παρατηρήθηκε ότι σχηματίζει πολύ ανεπτυγμένα ινίδια τα οποία φτάνουν τα 70 nm. Στις 30 ημέρες λοιπόν παρατηρούμε ότι ενονοείται η οργάνωση της πρωτεΐνης, η οποία στις δέκα ημέρες επώασής της στο pH 5 σχημάτιζε άμορφα συσσωματώματα. Στη συνέχεια ελέγξαμε αν μια ποικιλία pH από 3.5 έως 9.5 στην πάροδο του χρόνου, επηρεάζει ενοϊκότερα ή όχι τους ινώδεις σχηματισμούς που παρατηρήσαμε στο pH 7.8.

3.10.2.3 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 3.5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός καλοσχηματισμένων ινιδίων διαμέτρου 70 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.28**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.17**.



Πίνακας 3:31: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.28.

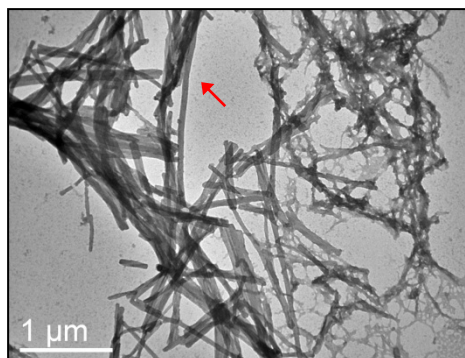
Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 3.5
Συγκέντρωση	0.02 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.28
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

Εικόνα 3.28: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.02 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 3.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με UA1%. Παρατηρούνται καλοσχηματισμένα ινίδια διαμέτρου 50nm (κόκκινο βελάκι).

3.10.2.4 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 4.5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης.

Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολύ στενά πακεταρισμένων ινιδίων διαμέτρου περίπου 50 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.29**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.18**.



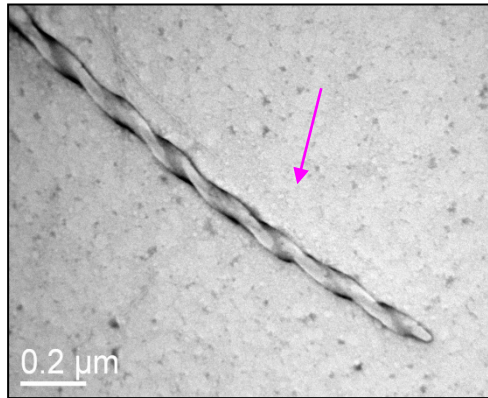
Πίνακας 3:18: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.29

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 4.5
Συγκέντρωση	0.02 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.29
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	1000 nm

Εικόνα 3.29: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.02 mg/ml σε 20mM κιτρικό νάτριο pH 4.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με UA1%. Παρατηρούνται στενά πακεταρισμένα ινίδια διαμέτρου 50 nm (κόκκινο βελάκι).

3.10.2.5 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 6.5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM Mes-NaOH pH 6.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολύ μακριών και υπερελικωμένων ινιδίων, με διάμετρο 60 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.30**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.19**.



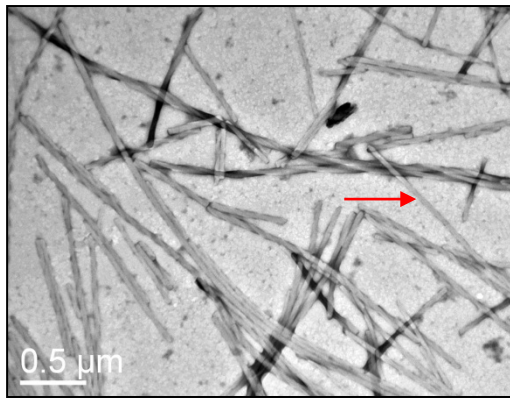
Πίνακας 3:19: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 330.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 6.5
Συγκέντρωση	0.02 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.30
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	200 nm

Εικόνα 3.30: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.02 mg/ml σε 20mM Mes-NaOH pH 6.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA1%. Παρατηρούνται υπερελικωμένα ινίδια διαμέτρου 60 nm (φούξια βελάκι).

3.10.2.6 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 8.5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2l διαλύματος 20mM Tris-HCl pH 8.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολύ ανεπτυγμένων και στενά πακεταρισμένων ινιδίων, με διάμετρο 40 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.31**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.20**.



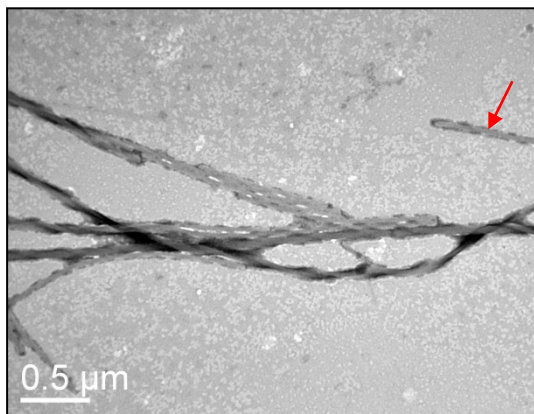
Πίνακας 3:20: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.20.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 8.5
Συγκέντρωση	0.02 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	320
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	500 nm

Εικόνα 3.31: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.02 mg/ml σε 20mM Tris-HCl pH 8.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA1%. Παρατηρούνται πολύ ανεπτυγμένα και στενά πακεταρισμένα ινίδια διαμέτρου 40 nm (κόκκινο βελάκι).

3.10.2.7 Μελέτη της πρωτεΐνης HrpAΔC8 σε pH 9.5

Η πρωτεΐνη HrpAΔC8 απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθησε διαπίδυσή της έναντι 2I διαλύματος 20mM glycine-NaOH pH 9.5. Στη συνέχεια αυτό το πρωτεϊνικό διάλυμα, χωρίς να συμπυκνωθεί χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή δείγματος ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η δειγματοληψία έγινε στις 40 ημέρες επώασης της πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μακριών και υπερελικωμένων ινιδίων διαμέτρου 40 nm. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.32**, με την επεξήγηση του **Πίνακα 3.21**.



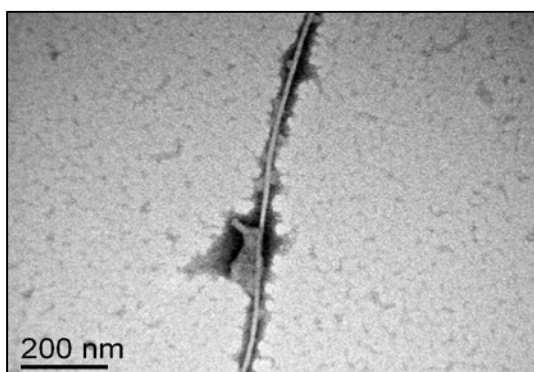
Πίνακας 3:21: Οι συνθήκες ανάπτυξης της HrpAΔC8 που απεικονίζεται στην Εικόνα 3.32.

Όνομα Πεπτιδίου	HrpAΔC8
Buffer	pH 9.5
Συγκέντρωση	0.02 mg/ml
Μέρες Ανάπτυξης	40 ημέρες
Αριθμός Εικόνας	3.32
Μεγέθυνση	-
Κλίμακα	500 nm

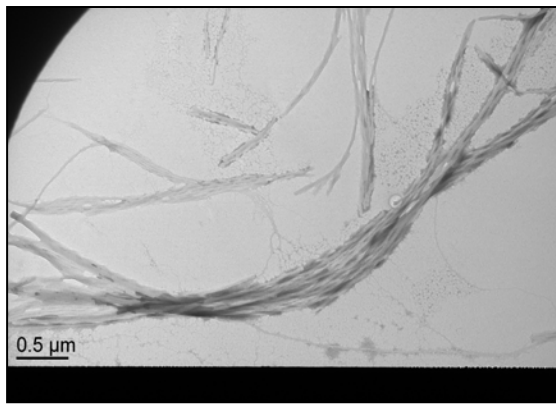
Εικόνα 3.32: Εικόνα HRTEM της HrpAΔC8, συγκέντρωσης 0.02 mg/ml σε 20mM glycine-NaOH pH 9.5, δείγμα 40 ημερών, χρώση με PTA1%. Παρατηρούνται υπερελικωμένα ινίδια διαμέτρου 40 nm (κόκκινο βελάκι).

3.11 Δομική μελέτη του Hrp.Hrc πύλου με HRTEM

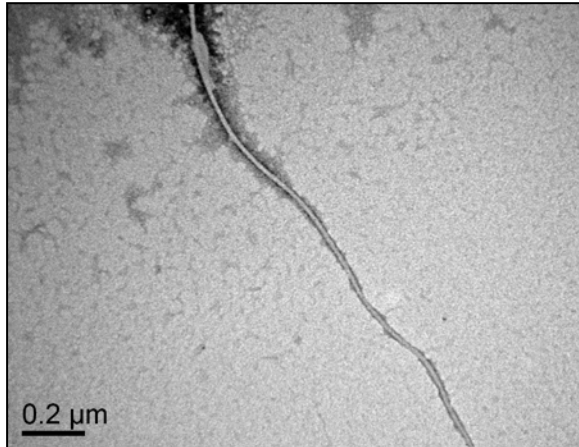
Η επαγωγή του T3SS της *P. Syringae* pv. phaseolicola και η απομόνωση του Hrp/Hrc πύλου της πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο Εδάφιο 2.3.1. Στη συνέχεια τα δείγματα που παρελήφθησαν για ηλεκτρονική μικροσκοπία στις 6,12, και 24 ώρες παρατηρήθηκε ότι σχηματίζουν ινίδια τα οποία μοιάζουν τόσο μορφολογικά όσο και σε διαστάσεις με τα 10 nm διαμέτρου και περίπου 2μm μήκους ινίδια που σχηματίζει η HrpA *in vitro*. Τα αποτελέσματα αυτά περιγράφονται στις **Εικόνες 3.33 έως 3.36**.



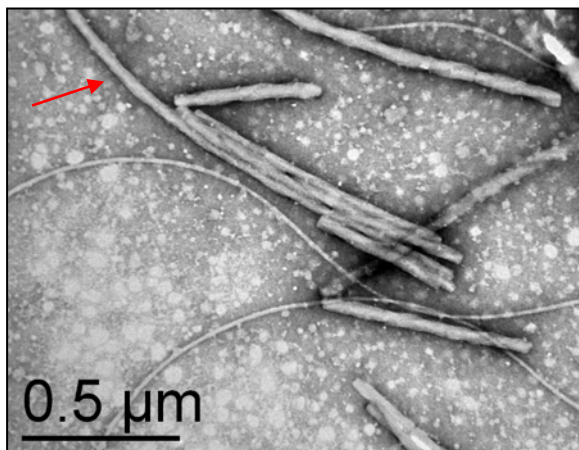
Εικόνα 3.33: Εικόνα HRTEM του 6 ωρών δείγματος με 10% φυτικό εκχύλισμα απομονωμένου πύλου της *P. Syringae* pv. phaseolicola σε pH 7.4 που φαίνεται να οργανώνεται σε μια ινώδη διαμόρφωση διαμέτρου 10 nm παρόμοια με τα ινίδια της *in vitro* HrpA. Η χρώση έγινε με PTA1%.



Εικόνα 3.34: Εικόνα HRTEM του 6 ωρών δείγματος με 10% φυτικό εκχύλισμα απομονωμένου πύλου της *P. Syringae* pv. *phaseolicola* σε pH 7.4 που φαίνεται να οργανώνεται σε μια ινώδη διαμόρφωση παρόμοια με τα ινίδια της *in vitro* HrpA. Η χρώση έγινε με PTA1%.



Εικόνα 3.35: Εικόνα HRTEM του 12 ωρών δείγματος με 10% φυτικό εκχύλισμα απομονωμένου πύλου της *P. Syringae* pv. *phaseolicola* σε pH 7.4 που φαίνεται να οργανώνεται σε μια ινώδη διαμόρφωση διαμέτρου 16 nm παρόμοια με τα ινίδια της *in vitro* HrpA. Η χρώση έγινε με PTA1%.



Εικόνα 3.36: Εικόνα HRTEM του 24 ωρών δείγματος με 10% φυτικό εκχύλισμα απομονωμένου πύλου της *P. Syringae* pv. *phaseolicola* σε pH 7.4 που φαίνεται να οργανώνεται σε μια ινώδη διαμόρφωση διαμέτρου 40 nm (κόκκινο βελάκι) παρόμοια με τα μεγαλύτερα ινίδια που σχηματίζει η *in vitro* HrpA. Η χρώση έγινε με PTA1%.

3.12 Βιβλιογραφία

- Hamodrakas, S.J., Iconomidou, V.A., Chryssikos, G.D., Gionis, V., Hoenger, A., 2003. FT-Raman spectroscopy as diagnostic tool of Congo red binding to amyloids. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72, 185-192.
- Jose´ Garcı´a de la Torre, Mari´a L. Huertas, and Beatriz Carrasco, 2000. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. *Biophysical Journal* Volume 78, 719–730
- Kong J., Yu S., 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biophysica Sinica*, 39 (8): 549-559.
- Murakami, K.S., Davydova, E.K., Rothman-Denes, L.B., 2008. X-ray crystal structure of the polymerase domain of the bacteriophage N4 virion RNA polymerase. *Journal: Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 15: 5046-5051.
- Sreerama N. & Woody R.W., 2004. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods Enzymol.* 383, 318-51.
- Uversky V.N., Gillespie J.R. & Fink A.L. 2000. Why are “natively unfolded” proteins instructed under physiologic conditions? *Prot: Str Funct Genet* 41, 415-427.
- Uversky V.N., 2002. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269, 2.

BIBΛΙΑ

Χαμόδρακας Σταύρος ,Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής ,Αθήνα 1993, Εκδόσεις Συμμετρία.

Συμπεράσματα

4.1 Συζήτηση

Το καρβοξυτελικό άκρο της HrpA DC3000 (ομόλογη της HrpA *P. syringae* pv. phaseolicola) έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνο για το πολυμερισμό της (Dunkerley *et al.*, 1984; Jones, 1999; Taïga, 1999; Hienonen *et al.*, 2007;). Λαμβάνοντας υπόψη και τον προβλεπόμενο αμφιπαθητικό χαρακτήρα της καρβοξυτελικής έλικας, θα μπορούσε να προταθεί ότι το συγκεκριμένο τμήμα της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνο για εξωτερικές κι εσωτερικές διαμορφώσεις σπειρωμένου σπειράματος. Προκειμένου να αποφευχθεί ο αυθόρμητος πολυμερισμός, δημιουργήθηκε μία γονιδιακή κατασκευή με 8 αμινοξικά κατάλοιπα λιγότερα στο καρβοξυτελικό άκρο της αγρίου τύπου HrpA, με σκοπό την σύγκριση των δομικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων του μεταλλάγματος και της ολόκληρης HrpA.

Ειδικότερα από τη χρωματογραφία συγγένειας καταφέραμε να πάρουμε διαλυτές την HrpA και την HrpAΔC8, με την έκλουσή τους από την κολώνα νικελίου να αρχίζει στα 100 mM ιμιδαζολίου, ενώ να σταματάνε να εκλύονται στα 400mM. Το χρωματογράφημα της HrpAΔC8 σε διάλυμα 20mM οξικό νάτριο pH 5, 100 mM NaCl δίνει περισσότερες από μία κορυφές, πράγμα που δηλώνει ότι το δείγμα δεν είναι μονοδιάσπαρτο. Ειδικότερα, κατά την υποβολή του μεταλλάγματος σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τη στήλη παρουσιάζοντας μία κύρια κορυφή, η οποία αντιστοιχεί σε σωματίδιο φαινομενικού μοριακού βάρους 38 kDa και σε υδροδυναμική ακτίνα 27.74 Å. Η έκλυση αυτή του μεταλλάγματος υποδηλώνει είτε την παρουσία της πρωτεΐνης ως τριμερές στο διάλυμα εφόσον και μόνο εφόσον η πρωτεΐνη είναι σφαιρική είτε ως ένα μονομερές εκτεταμένο σωματίδιο. Δεδομένου ότι τα πειράματα SAXS στη συνέχεια μας καταδεικνύουν την ύπαρξη ενός μη σφαιροειδούς σωματιδίου στο διάλυμα η στήλη μοριακής διήθησης καταδεικνύει την εκτεταμένη διαμόρφωση της HrpAΔC8.

Αναλυτικότερα, τα πειράματα SAXS για το μέταλλαγμα HrpAΔC8 σε διάλυμα 20mM οξικό νάτριο pH 5, 100 mM NaCl στους 10 C°, έδειξαν ότι βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση, χωρίς να έχει καλά καθορισμένο υδρόφοβο πυρήνα και έτσι να μην μπορεί να υιοθετήσει τριτοταγή δομή.

Ο δομικός χαρακτηρισμός συνεχίστηκε για την ολόκληρη πρωτεΐνη με πειράματα κυκλικού διχρωισμού. Η πρωτεΐνη HrpA και σε pH 5.8 και 7.6 επιδεικνύει χαρακτηριστική αρνητική κορυφή στα 200 nm, που έχουν οι β-II πρωτεΐνες καθώς και οι πρωτεΐνες με τυχαίο σπείραμα. Δομές των β-II πρωτεϊνών περιέχουν β-πτυχωτά φύλλα με μικρό ακανόνιστο μήκος ή φύλλα β-στροφής (αρνητική κορυφή στα 200 nm και θετική κορυφή στα 190, 210 nm ; Sreerama & Woody 2004). Και στα 2 pH παρατηρούνται ελάχιστα ποσοστά α-έλικας, ενώ τα CD φάσματα είναι παραπλήσια με φάσματα εγγενών αδιπλωτων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα μοιάζουν πολύ με το φάσμα του αποδιατεταγμένου κολλαγόνου (denaturated collagen).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές τεχνικές για την περαιτέρω διερεύνηση της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HgrA. Συγκεκριμένα η HgrA υποβλήθηκε σε φασματοσκοπία Raman και φασματοσκοπία υπερύθρου σε pH 5.8. Από την ανάλυση Raman οι συχνότητες που αναλύονται οι Αμίδιο I και III ζώνες της HgrA, αντιστοιχούν σε δομές β-πτυχωτών φύλλων σε pH 5.8. Από την φασματοσκοπία FT-IR οι συχνότητες που αναλύονται οι Αμίδιο I και II ζώνες της HgrA, αντιστοιχούν εξίσου σε δομές β-πτυχωτών φύλλων σε pH 5.8.

Η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HgrA, η οποία αποτελεί την κύρια υπομονάδα του T3SS πύλου της *P. syringae* pv. *phaseolicola*, μέσω του προγράμματος PSIPRED υποδεικνύει έξι προβλεπόμενες α-έλικες, καθώς επίσης και μέσω του προγράμματος Matcher προβλέπεται ποσοστό επαναλήψεων επτάδας που ανέρχεται στο 45% της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. το πρόγραμμα Έτσι λοιπόν, παρόλο που η HgrA προβλέπεται σαν α-ελικοειδής πρωτεΐνη, τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα δεν υποστηρίζουν αυτήν την πρόβλεψη. Ειδικότερα, το φάσμα κυκλικού διχρωισμού της παρουσιάζει πολύ χαμηλά ποσοστά α-έλικας ενώ μοιάζει πολύ με το φάσμα των β-II πρωτεϊνών ή/και με το φάσμα των αποδιπλωμένων πρωτεϊνών, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την πρόβλεψη μέσω του προγράμματος Foldindex, το οποίο προβλέπει την HgrA να είναι μην είναι ολόκληρη αναδιπλωμένη. Τα πειράματα Raman, FTIR και SAXS που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις από το CD. Μία λοιπόν πιθανή εξήγηση για την απόκλιση της HgrA από τις ομόλογες α-ελικοειδείς πρωτεΐνες της, είναι ότι αυτό το μικρό εγγενώς αδίπλωτο μόριο, έχει την ευκαμψία να αλλάζει δομή όταν το χειριζόμαστε εμείς *in vitro*, ενώ διατηρεί την τάση για σχηματισμό σπειρωμένου σπειράματος μόνο για μεταβατικές αλληλεπιδράσεις, όταν τα μονομερή της HgrA εκκρίνονται και δομούν τον πύλο *in vivo*. Παρόμοιο παράδειγμα αποτελούν τα μέλη των πρωτεϊνών HgrO/FliJ/YscO. Στη περίπτωση της HgrA, το γεγονός ότι μπορεί να υιοθετήσει δομή αδίπλωτης πρωτεΐνη *in vitro*, ίσως να ερμηνεύεται με τη θεωρία ότι ο Hgr/Hgc πύλος έχει πολύ μεγάλο μήκος και έτσι η υπομονάδα του, HgrA μπορεί να αποκτά εκτεταμένη δομή για να καλύψει όλη αυτή την απόσταση, η οποία ανέρχεται σε τάξη μικρομέτρων.

Η δομική μελέτη της HgrA και του μεταλλάγματος HgrADC8, ολοκληρώθηκε με πειράματα HRTEM, σε μια ποικιλία pH από 3.5 μέχρι 9.5, και σε διάφορες χρονικές περιόδους επώασης των δειγμάτων. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο υψηλής διακριτικής ικανότητας, η HgrA αυτό-οργανώνεται *in vitro*, σχηματίζοντας ινίδια στο εύρος pH από 4.5 μέχρι 9.5, με διαστάσεις που μοιάζουν σημαντικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του αγωγού του T3SS της *P. syringae* pv. *phaseolicola*, γεγονός που για να το αποδείξουμε απομονώσαμε το T3SS και πραγματοποιήσαμε δομικό χαρακτηρισμό του Hgr/Hgc πύλου της *P. syringae* pv. *phaseolicola* με HRTEM Τα αποτελέσματα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδειξαν ότι οι απομονωμένοι T3SS πύλοι, σχηματίζουν ινώδεις διαμορφώσεις με διάμετρο περίπου 10 nm, που συμπίπτει με τη διάμετρο των ινιδίων που σχηματίζει η HgrA *in vitro*. Το μετάλλαγμα HgrADC8 παρατηρήθηκε ότι πολυμερίζεται, σχηματίζοντας ινίδια στο εύρος pH από 3.5 μέχρι 9.5, με διαστάσεις παρόμοιες με τα ινίδια της αγρίου τύπου HgrA.

Συμπερασματικά λοιπόν, η απώλεια της καρβοξυτελικής ουράς:

- Αύξησε την διαλυτότητα και προώθησε την μονοδιασπορά του δείγματος, κάτι που έλειπε από την αγρίου τύπου HgrA και έτσι μας επέτρεψε να πραγματοποιήσουμε τα πειράματα SAXS και να πάρουμε ένα low-resolution σχήμα του σωματιδίου μας.
- Δεν κατέστρεψε την ικανότητα πολυμερισμού της πρωτεΐνης, καθώς όλα τα δείγματα σε pH 3-5- 9.5 παρουσίασαν ινίδια στο HRTEM.

- Σε pH 3.5 η παρουσία της ουράς οδήγησε σε σχηματισμό υδρογέλης, ενώ η απώλειά της οδήγησε σε σχηματισμό ινιδίων με μορφολογία παρόμοια με τα ινίδια που παρατηρήσαμε σε όλα τα υπόλοιπα pH. Ειδικότερα ο σχηματισμός «hydrogel» της ολόκληρης πρωτεΐνης σε pH 3.5, ίσως να οφείλεται στην παρουσία του καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, γιατί δεν παρατηρήθηκε υδρογέλη όταν αυτό αφαιρέθηκε. Ειδικότερα το καρβοξυτελικό άκρο της HgrA αποτελείται από πολλές λυσίνες που ανήκουν στα αμινοξέα που προωθούν το σχηματισμό β-πτυχωτών φύλλων και έτσι το όξινο pH, επιδρά στις λυσίνες, αποσταθεροποιώντας την πρωτεΐνη. Επίσης μακροσκοπικά, σε χαμηλά pH, παρατηρήσαμε σχηματισμό παχύρεστου υλικού της HgrA, με αυξημένο ιξώδες, το οποίο με μέχρι τώρα πειράματα ρεολογίας τα οποία μένουν να ολοκληρωθούν, μπορεί να χαρακτηριστεί σαν « τέλειο gel »

Σημαντικές εφαρμογές της υδρογέλης μπορούμε να βρούμε στην Ιατρική. Έχει βρεθεί ότι ο συνδυασμός βλαστοκυττάρων και υδρογέλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη Θεραπεία Κακώσεων Νωτιαίου Μυελού (KNM). Το βασικό πλεονεκτήματα της υδρογέλης είναι ότι αποτελεί ένα σύστημα μέσα στο οποίο οι νευρώνες αναπτύσσονται εύκολα, ενώ ένα μειονέκτημα της, ότι έχει εφαρμογή προς το παρόν μόνο σε ζώα. Ακόμα η υδρογέλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ενέσιμο εμφύτευμα για την αποκατάσταση των ρυτίδων και των εμβαθύνσεων του δέρματος. Αποτελείται από εύκαμπτα μικροσωματίδια ακρυλικής υδρογέλης και υαλουρονικού οξέος μη ζωϊκής προέλευσης. Σαν αποτέλεσμα: το υαλουρονικό οξύ απορροφάται σε λίγες εβδομάδες ενώ τα σωματίδια της υδρογέλης εγκαθίστανται στο δέρμα και διεγείρουν τον οργανισμό ώστε να παράγει δικό του κολλαγόνο. Τέλος μπορεί να βρει εφαρμογή σε Φακούς [σίλικόνης-υδρογέλης \(SiH\)](#) οι οποίοι επιτρέπουν 5-8 φορές περισσότερη διέλευση οξυγόνου στον κερατοειδή σε σχέση με τους συμβατικούς φακούς.

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό αυτών των πολλά υποσχόμενων νανοδομών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές, όπως μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM), για να μετρηθεί η δύναμη των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα ινίδια, δυναμική σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), για να προσδιοριστεί ο συντελεστής μοριακής διάχυσης των ινιδίων και τέλος X-ray Free Electron (XFEL), για να προσδιορίσουμε τον τρόπο που πακετάρονται τα ινίδια μεταξύ τους.

4.2 Βιβλιογραφία

- Dunkerley, J.A., and Zadow, J.G., 1984. *Australian J. Dairy Technol.* 3: 44.
 Hienonen, E., Romantschuk, M., Fenel, F., & Taira, S., 2007. *J Biotechnol.* Feb 1;128(2):258-67.
 Jones, D.T., 1999. *J Mol Biol.* Sep 17;292(2):195-202.
 Sreerama N. & Woody R.W., 2004. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods Enzymol.* 383, 318-51.
 Taira, S., et al., 1999. *Mol Microbiol.* Nov;34(4):737-44.