

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗ

ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΕΤΑΘΕΤΑΣΗ ΤΥΠΟΥ III: ΠΡΩΤΑΡΧΙΚΟΣ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2001

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του κ. Οικονόμου στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας στο Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Οικονόμου για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή την εργασία στο εργαστήριό του καθώς και για την επιστημονική βοήθεια και υποστήριξη καθ' όλο το διάστημα της διατριβής. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τη Νατάσα Ταμπακάκη και κ. Πανόπουλο καθώς και τον J. Mansfield, τον Ian Brown και το Γιώργο Τσιάμη από το Wye College, University of London για τη συνεργασία χωρίς την οποία δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ πολύ την Amalia Gomez-Serano και τον Μπάμπη Ποζίδα που με την εργασία τους στο ίδιο ερευνητικό θέμα συνέβαλαν σημαντικά στην πρόοδο των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για χρήσιμες συμβουλές και συζητήσεις και συγκεκριμένα τη Λίλη Καραμάνου, την Catherine Baud, την Ελευθερία Βρόντου, το Γιώργο Σιανίδα, το Δήμο Μπόλη και τη Σάννυ Παπανίκου.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
<b>1</b> Εκκριντικές μηχανές Τύπου III: βακτηριακές κατασκευές για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικούς.....	2
1.1 Η λειτουργία της έκκρισης.....	2
<b>1.2 Το μαστίγιο αποτελεί μια πρωτόγονη μηχανή έκκρισης Τύπου III.....</b>	<b>4</b>
1.3 Το εκκριντικό σύστημα Τύπου III στα παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια.....	7
1.4 Σκοπός της παρούσας διατριβής.....	13
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	15
<b>2</b> Ενζυμικός χαρακτηρισμός και ολιγομερική κατάσταση της πρωτεΐνης HrcN.....	15
2.1 Εισαγωγή.....	15
2.2 Εκφραση και καθαρισμός της HisHrcN.....	16
2.3 Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ATPάσης HrcN.....	17
2.4 Ολιγομερική κατάσταση της HrcN.....	20
2.5 Συζήτηση.....	23
<b>3</b> Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και ATPάσης, <i>in vitro</i> .....	24
3.1 Εισαγωγή.....	24
3.2 Εκφραση και καθαρισμός των υποστρωμάτων και των πιθανών σαπερονών.....	25
3.3 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων με Μη Αποδιατακτικό Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης.....	27
3.4 Έλεγχος επιδράσεων των υποστρωμάτων και των πιθανών σαπερονών στην υδρολυτική ικανότητα της ATPάσης.....	28
3.5 Συζήτηση.....	29
<b>4</b> Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών του συστήματος Τύπου III.....	30
4.1 Εισαγωγή.....	30
4.2 Επαγωγή της σύνθεσης και τοπολογία πρωτεϊνών του εκκριντικού	

συστήματος Τύπου III.....	30
4.3 Ανίχνευση συμπλόκων στα οποία συμμετέχουν τα υποστρώματα.....	33
4.4 Ανίχνευση συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η ATPάση.....	36
4.5 Συζήτηση.....	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
<b>5</b> Σύνοψη και Προοπτικές.....	39
5.1 Ολιγομερική κατάσταση της ATPάσης HrcN.....	39
5.2 Σύμπλοκα με την ATPάση και τα υποστρώματα.....	40
5.3 Μελλοντικά σχέδια.....	40
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
<b>6</b> Υλικά και Μέθοδοι.....	42
6.1 Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων και επαγωγή της σύνθεσης του εκκριτικού συστήματος Τύπου III.....	42
6.2 Συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού των πρωτεϊνών.....	43
6.3 Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών.....	45
6.4 Δοκιμασίες υδρόλυσης ATP.....	45
6.5 Χημική Διασύνδεση.....	46
6.6 Ανάλυση κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο της Διαβάθμισης Σουκρόζης.....	47
6.7 Δοκιμασίες αλληλεπίδρασης των HisHrcN και HrpZΔC33His με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η εκκριτική μηχανή Τύπου III απαντάται σε παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια και αποτελεί μηχανισμό απ' ευθείας μεταφοράς παθογονικών πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικούς ξενιστές. Πρόκειται για πολύπλοκη μηχανή, εκτενώς συντηρημένη σε βακτηριακά παθογόνα φυτών και ζώων καθώς και ομόλογη με το μαστιγίο. Ως πρότυπος οργανισμός για τη μελέτη του συστήματος χρησιμοποιήθηκε το φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Η ενζυμική και ολιγομερική ανάλυση της HrcN έδειξε ότι είναι υψηλού ρυθμού ATPάση και ενεργή ως ολιγομερές ~600kDa που είναι μορφή που εντοπίζεται και στο κύτταρο. Στην προσπάθεια παρατήρησης συμπλόκων που συμμετέχει η ATPάση ή/και το εκκρινόμενο υπόστρωμα φάνηκαν κάποια σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους καθώς και μεμονωμένες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, ειδικές στο επαγόμενο σύστημα που αλληλεπιδρούν με τα παραπάνω. Η ταυτότητα και η σημασία τους για τη λειτουργία της έκκρισης μένουν να προσδιοριστούν.

**SUMMARY**

The Type III Secretion (TTS) machine is present in Gram negative pathogenic bacteria and it is used for straight forward delivery of pathogenic proteins into eucaryotic hosts. It is a complex machine, conserved among bacterial pathogens of plants and animals and homologous to the flagellum. The phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* was used as model organism to study TTS. The enzymatic and oligomeric analysis of HrcN showed that it is a high rate ATPase and active as an oligomer of ~600kDa, a conformation that can also be detected in the cell. Trying to visualize complexes that the ATPase and/or the substrate participate, high molecular weight complexes and specifically TTS induced cytoplasmic proteins interacting with the the ATPase and/or the substrate appeared. The identity and the importance of these proteins remain to be found.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ****1. Εκκριτικές μηχανές Τύπου III: βακτηριακές κατασκευές για τη μεταφορά πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικούς ξενιστές****1.1 Η λειτουργία της έκκρισης**

Τα κύτταρα αφιερώνουν περίπου το ένα τρίτο των γονιδίων που εκφράζονται για τη σύνθεση πρωτεϊνών που μεταφέρονται και λειτουργούν στον εξωκυττάριο χώρο ή στην κυτταρική μεμβράνη. Στην πρώτη περίπτωση πρόκειται για υδρόφιλες πρωτεΐνες που πρέπει να εκκριθούν στην κυτταρική επιφάνεια, στον περιβάλλοντα χώρο ή να φύγουν από τον τόπο σύνθεσής τους που είναι το ενδοπλασματικό δίκτυο στα ευκαρυωτικά. Αυτές μπορεί να είναι υδρολυτικά ένζυμα, κυτταρολυτικές τοξίνες, αυξητικοί παράγοντες, ορμόνες ή αντισώματα. Στη δεύτερη περίπτωση ανήκουν πρωτεΐνες που έχουν υδρόφοβες περιοχές και παγιδεύονται στη μεμβράνη όπου λαμβάνουν τη λειτουργική τους μορφή. Πρόκειται για μεμβρανικούς μεταφορείς, κανάλια ιόντων, ένζυμα που βιοσυνθέτουν λιπίδια, αισθητήρες του περιβάλλοντος, δομικές πρωτεΐνες του μαστιγίου στα βακτήρια ή μηχανές μετατροπής ενέργειας.

Η εξέλιξη επέλεξε διάφορες μηχανές έκκρισης πρωτεϊνών. Στα βακτήρια μόνο υπάρχουν τουλάχιστον έξι διαφορετικές, που ονομάζονται πρωτεϊνικές μεταθετάσες. Οι μεταθετάσες φαίνεται να λειτουργούν σύμφωνα με κοινές αρχές αλλά συχνά χρησιμοποιούν διαφορετικά πρωτεϊνικά συστατικά. Η έκκριση συμβαίνει σε τρία διακριτά στάδια. Το πρώτο είναι η στόχευση από το σημείο παραγωγής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο σημείο εξόδου, στη μεμβράνη. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη διασχίζει τη διπλοστιβάδα λιπιδίων, διαμέσου της μεταθετάσης και τέλος απελευθερώνεται στο σημείο δράσης της και παίρνει τη λειτουργική της μορφή αν αυτό δεν έχει γίνει ήδη στο σημείο παραγωγής της (1, 2). Όλα τα συστήματα πρωτεϊνικής έκκρισης περιλαμβάνουν ειδικά σήματα στόχευσης των προς μεταφορά πεπτιδίων στη μεμβράνη. Τα σήματα αυτά αναγνωρίζονται από ειδικούς κυτταροπλασματικούς παράγοντες που οδηγούν και συνδέουν τα εκκρινόμενα μόρια με την εκκριτική μηχανή. Η λειτουργία της έκκρισης απαιτεί κατανάλωση ενέργειας επομένως είναι στενά συνδεδεμένη με κάποιο ειδικό ένζυμο υδρόλυσης του ATP ή χρησιμοποιεί και τη δύναμη κίνησης πρωτονίων (proton motive force). Η ενέργεια από την υδρόλυση του

νουκλεοτιδίου μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια για τη μεταφορά του υποστρώματος διαμέσου του μεμβρανικού εκκριτικού καναλιού. Τέλος όλα τα εκκριτικά συστήματα περιλαμβάνουν ένα μεμβρανικό σχηματισμό που έχει τη μορφή καναλιού και προσφέρει το κατάλληλο υδρόφιλο περιβάλλον για να διαπεράσει μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη το λιπιδικό περιβάλλον της μεμβράνης.

Από τα έξι μη ομόλογα συστήματα πρωτεϊνικής έκκρισης στα βακτήρια, ένα μόνο είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα του κυττάρου. Πρόκειται για το σύστημα Sec (από τη λέξη secretion) του οποίου ομόλογα συστήματα απαντώνται στα Αρχαία και στους Ευκαρυωτικούς οργανισμούς (3). Όλα τα απαραίτητα συστατικά του μονοπατιού Sec είναι γνωστά. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 11 πρωτεΐνες και ένα μόριο RNA που συμμετέχουν σε αυτή τη λειτουργία. Στο πρώτο στάδιο της στόχευσης του πεπτιδίου παίρνουν μέρος δύο ειδικές σαπερόνες, η SecB (4) και το Σωματίο Αναγνώρισης Σήματος (Signal recognition Particle) που αναγνωρίζει το σήμα στόχευσης και που αποτελείται από την πρωτεΐνη Ffh και το 4.5S RNA (2). Έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις που σαπερόνες γενικών καθηκόντων παίρνουν μέρος σε αυτή την εκκριτική διαδικασία, όπως ο GroEL (5) και η DnaK (6). Στο στάδιο της μεταφοράς διαμέσου της μεμβράνης σημαντικό ρόλο έχει μία μεμβρανική κατασκευή που αποτελείται από ετεροτριμερή σύμπλοκα των πρωτεϊνών SecY, SecE και SecG. Με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας υπολογίζεται ότι τρία SecYE διμερή σχηματίζουν ένα δακτύλιο γύρω από ένα πιθανό πόρο (7). Εκτός από αυτές τις δομικές πρωτεΐνες, η μεταθετάση Sec έχει ως κεντρικής σημασίας μόριο την ATPάση SecA. Η SecA εκτός του ότι αποτελεί τον συνδετικό κρίκο για τα διάφορα συστατικά του μονοπατιού, αφού τα φέρνει σε επαφή, παρέχει μάλλον και το μηχανισμό μετατροπής της ενέργειας υδρόλυσης του ATP σε μηχανική (8, 9, 10, 11). Βοηθητικές πρωτεΐνες για την αντίδραση είναι οι SecD (12) και SecF όπως επίσης και τα όξινα φωσφολιπίδια που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της SecA και τη σταθερότητα της SecYEG. Προκειμένου το πεπτίδιο που μεταφέρεται να αποκοπεί από τη μεμβράνη και να λάβει η εκκρινόμενη πρωτεΐνη την ενεργή της διαμόρφωση είναι απαραίτητη η πεπτιδάση Lep (Leader peptidase) που απομακρύνει το οδηγό πεπτιδιο-σήμα για έκκριση (13).

Ενας άλλος μηχανισμός έκκρισης που είναι ανεξάρτητος από το Sec σύστημα και απαντάται σε μια μεγάλη ποικιλία παθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων είναι το εκκριτικό σύστημα Τύπου III (Type III Secretion System, στο εξής TTS). Πρόκειται για μια εξαιρετικά συντηρημένη εκκριτική μηχανή που απαντάται σε διαφορετικά βακτήρια που προσβάλλουν από τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά μέχρι φυτά (14). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ομολογία

του συστήματος Τύπου III με το σύστημα κατασκευής του μαστιγίου, το οποίο δεν έχει σχέση με παθογένεια. Η μεταθετάση Τύπου III δεν είναι απαραίτητη για τη βιοσιμότητα του βακτηρίου αλλά είναι η υπεύθυνη για την παθογένειά του. Η μελέτη του μηχανισμού λειτουργίας της αποτελεί το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

## 1.2 Το μαστίγιο του βακτηρίου αποτελεί μια πρωτόγονη μηχανή έκκρισης Τύπου III

Τα βακτήρια στα οποία έχει μελετηθεί εκτενώς η κατασκευή του μαστιγίου είναι ο *Bacillus subtilis* και τα εντεροπαθγόνα *Escherichia coli* και κυρίως η *Salmonella typhimurium*. Τα βακτήρια αυτά σχηματίζουν μέχρι 10 μαστίγια που ισομοιράζονται σε όλη την κυτταρική περιφέρεια και χρησιμεύουν για τη μετακίνηση τους (15). Τα μαστίγια αυτά κινούνται με ταχύτητα 18000 rpm και μετακινούν τα κύτταρα με ταχύτητα 30μm/s (16). Μοιάζουν να δουλεύουν σαν ένας κινητήρας που γυρνάει μία προπέλλα προκειμένου να μετακινηθεί το βακτήριο. Η ενέργεια που απαιτείται για αυτή τη διαδικασία προέρχεται από τη βαθμίδωση πρωτονίων ή ιόντων Na<sup>+</sup> μεταξύ των δύο πλευρών της κυτταρικής μεμβράνης (17). Το ενδιαφέρον είναι ότι ο κινητήρας του μαστιγίου μπορεί να κινηθεί και προς τις δύο φορές (αριστερόστροφα και δεξιόστροφα), προσδίδοντας έτσι τη δυνατότητα ελέγχου της κίνησης. Πρόκειται για επιλεκτική μετακίνηση προς αυξανόμενη βαθμίδωση ελκτικών ουσιών ή απομάκρυνση από αυξανόμενη βαθμίδωση απωθητικών ουσιών. Ένα μαστίγιο που δουλεύει αποτελείται περίπου από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες ενώ τα γονίδια που εκφράζονται προκειμένου να κατασκευαστεί και να λειτουργήσει είναι περίπου 50.

Το μαστίγιο αποτελείται από δύο διαφορετικά τμήματα, το ινίδιο (flagellum) που έχει το ρόλο της προπέλλας και από το βασικό σωματίο (basal body) που έχει το ρόλο του κινητήρα (**Σχήμα 1 & 2Γ**). Το ινίδιο είναι περίπου 10μm, λεπτό, άκαμπτο και ελικοειδές και εκτείνεται έξω από την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη. Αποτελείται από πολλά αντίτυπα των πρωτεϊνών FliC και FliB ενώ η τελική απόληξή του έχει την πρωτεΐνη FliD (18). Το ινίδιο συνδέεται με το βασικό σωματίο με τις συνδετικές πρωτεΐνες FlgK και FlgL (19). Το βασικό σωματίο αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους (rings) που ενώνονται με ένα ραβδοειδή σχηματισμό και έναν εξωκυττάριο σχηματισμό που το ενώνει με το ινίδιο και μοιάζει με άγκιστρο (hook). Το άγκιστρο αυτό αποτελείται από τις πρωτεΐνες FlgE και FlgD (15). Κάθε ένας από τους δακτυλίους παίρνει το όνομά του από το τμήμα του κυττάρου με το οποίο συνδέεται. Ο δακτύλιος L



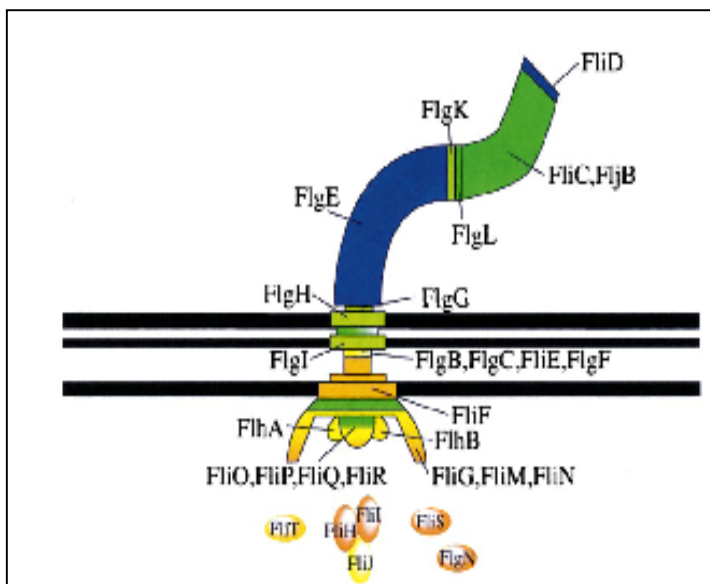
συνδέεται με την εξωτερική μεμβράνη και αποτελείται από την πρωτεΐνη FlgH και ο δακτύλιος και P συνδέεται με το στρώμα πεπτιδογλυκάνης και αποτελείται από την πρωτεΐνη FlgI (20). Θεωρείται ότι λειτουργούν ως αναμεταδότες της ενέργειας που παράγεται από τον κινητήρα, προς το ινίδιο-προπέλλα. Στη συνέχεια υπάρχει ο δακτύλιος MS που διασχίζει την κυτταροπλασματική, εσωτερική μεμβράνη και εκτείνεται και πάνω από αυτήν, στον περιπλασμικό χώρο. Αποτελείται από πολλά αντίτυπα της ίδιας πρωτεΐνης που είναι η FliF (21). Οι δακτύλιοι MS και P συνδέονται με το ραβδοειδή σχηματισμό που αποτελείται από διάφορες πρωτεΐνες όπως οι FlgB, FlgC, FliE και FlgF. Γύρω από τον δακτύλιο MS υπάρχουν οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες MotA και MotB που συμμετέχουν στη δημιουργία περιστροφικής κίνησης αποτελώντας την κυτταρική άγκυρα για τον κινητήρα και σχηματίζοντας το κανάλι πρωτονίων (22).

Ο σχηματισμός που παράγει την περιστροφική κίνηση είναι ο δακτύλιος C που εκτείνεται στο κυτταρόπλασμα και για πάρα πολύ καιρό δεν μπορούσε να διατηρηθεί και να παρατηρηθεί στα παρασκευάσματα της μικροσκοπίας (23). Αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, τη FliG που αλληλεπιδρά με το δακτύλιο MS και τον φέρνει σε επαφή με τις άλλες δύο πρωτεΐνες FliM και FliN. Το σύμπλοκο αυτό είναι υπεύθυνο και για την αποδοχή των σημάτων που λαμβάνονται από το περιβάλλον και αλλάζει ανάλογα τη φορά της περιστροφής του μαστιγίου (24). Κύριος υπεύθυνος για την αλλαγή της φοράς της περιστροφής είναι η FliM και ίσως η FliG. Η FliM έχει περιοχή αλληλεπίδρασης με τη CheY που μεταφέρει σήματα από το περιβάλλον και επηρεάζουν τη χημειοτακτική αντίδραση. Ανάλογα με τα σήματα αλλάζει η δομή της FliM για να τα μεταφράσει σε κίνηση του μαστιγίου προς τη μία ή την άλλη φορά. Στην παραγωγή της περιστροφής εμπλέκεται άμεσα η FliG και παράγει κίνηση ανάλογη με το σήμα που δέχεται από τη FliM. Η FliN φαίνεται να έχει απλώς σταθεροποιητικό ρόλο για το συμπλόκο (27).

Η πρώτη ένδειξη ότι στη βάση του βασικού σωματίου του μαστιγίου υπάρχει μια εκκριτική συσκευή ήταν η παρατήρηση ότι τα μονομερή που σχηματίζουν το αυξανόμενου μήκους ινίδιο προστίθενται στο πιο μακρινό του άκρο. Αυτό απαιτεί την ενεργητική μεταφορά των πρωτεϊνών που συντίθενται στο κυτταρόπλασμα δια μέσου του βασικού σωματίου και την τοποθέτησή τους με ακρίβεια στο πιο μακρινό άκρο του νεοσυντιθέμενου μαστιγίου. Είναι πολύ λίγα γνωστά για το πώς λειτουργεί η μηχανή αυτή. Κεντρικό ρόλο σε αυτή φαίνεται να έχει η ATPάση FliI που ενδεχομένως τροφοδοτεί το σύστημα με την ενέργεια που χρειάζεται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών (28). Άλλες πρωτεΐνες που αποτελούν μέλη της εκκριτικής μηχανής είναι οι FlhA, FlhB, FliO, FliP,

FliQ και FliR (29). Το σύμπλοκο που ενδεχομένως σχηματίζουν πρέπει να είναι εξαιρετικά ασταθές ή μικρού μοριακού βάρους γιατί δεν μπορεί να απομονωθεί με τις μέχρι τώρα μεθόδους προκειμένου να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο. Η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες των δακτυλίων MS και ίσως C αναμένεται να είναι δυναμική. Περιφεριακό ρόλο στη λειτουργία της εκκριτικής μηχανής ενδεχομένως να έχουν και πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τα προς μεταφορά υποστρώματα και τα στοχεύουν σε αυτήν. Τέτοιες μπορεί να είναι οι FliH, FliJ, FliS, FliT και FlgN και να έχουν ρόλο σαπερονών (30, 31, 32). Για μερικές από αυτές υπάρχουν ενδείξεις.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το σύστημα αυτοσυναρμολόγησης του μαστιγίου είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογο με το εκκριτικό σύστημα Τύπου III των παθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων (**Σχήμα 2A & 2Γ**). Παρά το γεγονός ότι οι δύο μηχανές έχουν τελείως διαφορετική λειτουργία, η μία για κινητικότητα και η άλλη για προσβολή ευκαρυωτικών κυττάρων, είναι παρόμοιες όταν εστιάσουμε στη μεταθετάση. Η ομοιότητα είναι εμφανής όταν συγκρίνονται οι εικόνες μικροσκοπίου της υπερδομής του συστήματος Τύπου III και του βασικού σωματίου που αγκυροβολεί το μαστίγιο στην κυτταρική επιφάνεια (33). Πρόκειται για το ίδιο σύστημα έκκρισης με τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: α. δεν απαιτεί τα υποστρώματα να έχουν σήματα έκκρισης που στοχεύουν στο σύστημα Sec, β. είναι ανεξάρτητο από το σύστημα Sec και γ. η συσκευή μεταφοράς διαπερνά και τις δύο μεμβράνες του κυττάρου. Είναι πιθανό το σύστημα του μαστιγίου να είναι ο πρόγονος του παθογονικού συστήματος Τύπου III, αφού στην εξέλιξη η κινητικότητα πιθανότατα προηγήθηκε της μολυσματικότητας.



**Σχήμα 1.** Σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού μαστιγίου.

### 1.3 Το εκκριτικό σύστημα Τύπου III στα παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια

Το εκκριτικό σύστημα Τύπου III που απαντάται στα παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια έχει εξελιχθεί να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα σε αυτό του ξενιστή. Αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται με 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. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα βακτηριακά είδη που είναι γνωστό πως διαθέτουν εκκριτικό σύστημα Τύπου III, τις συνέπειες και το φαινότυπο της προσβολής του ευκαρυωτικού ξενιστή (**Πίνακας 1**).

Όλα τα γνωστά εκκριτικά συστήματα Τύπου III αποτελούνται από περισσότερες από 20 πρωτεΐνες μερικές από τις οποίες είναι συντηρημένες (34). Αυτό κάνει τη μεταθετάση Τύπου III από τα πιο πολύπλοκα συστήματα έκκρισης στα βακτήρια. Στον **Πίνακα 2** παρατίθενται όλες οι πρωτεΐνες που συνθέτουν το σύστημα Τύπου III στα διάφορα παθογόνα βακτήρια καθώς και στο σύστημα κατασκευής του μαστιγίου (35). Στον πίνακα φαίνεται και η πιθανή τοπολογία των πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν τα δομικά συστατικά της συνθετάσης διακρίνονται σε δύο ομάδες (**Σχήμα 2A & 2B**). Η μία αποτελεί αυτές που εντοπίζονται και συνδέονται με την εξωτερική μεμβράνη, που είναι διάφορες λιποπρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης και μίας που παρουσιάζει ομολογία με πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων των σεκρετινών (36). Η δεύτερη ομάδα απαρτίζεται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης. Πρόσφατα απομονώθηκαν σύμπλοκα της μεταθετάσης Τύπου III από τα βακτήρια *Salmonella typhmuri* (33) και *Shigella flexneri* και εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας είναι διαθέσιμες (**Σχήμα 2B**) (37). Αυτή η δομή ονομάζεται σύμπλοκο βελόνας (needle complex), διασχίζει και τις δύο μεμβράνες και αποτελείται από δύο χωριστά τμήματα, την εξωκυττάρια βελόνα και την κυλινδρική βάση που είναι συνδεδεμένη με τις μεμβράνες. Ο σχηματισμός αυτός φαίνεται να είναι συνδεδεμένος με έναν κυτταροπλασματικό λοβό (38). Το μήκος της βελόνας και η μορφολογία της διαφέρει από παθογόνο σε παθογόνο και είναι προσαρμοσμένη στη μορφολογία του ξενιστή.

<b>Είδος Βακτηρίου</b>	<b>Συνέπεια της Μόλυνσης</b>	<b>Φαινότυπος που συνδέεται με τη μεταθετάση Τύπου III</b>
<b>Παθογόνα ζώων</b>		
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Η αιτία του κοκκύτη	Αγνωστος
<i>Chlamydia</i> spp.	Ασθένειες αναπνευστικού, οφθαλμών και σεξουαλικά μεταδιδόμενες	Αγνωστος
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	Διάρροια σε παιδιά, αιμορραγική κολίτιδα	Προσκόλληση στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου
<i>P. aeruginosa</i>	Ευκαιριακές μολύνσεις	Κυτταροτοξικότητα και αντιφαγωκύτωση
<i>S. enterica</i>	Δηλητηρίαση από φαγητό και τυφοειδής πυρετός	Είσοδος σε μή φαγοκύτταρα και επαγωγή απόπτωσης στα μακροφάγα
<i>Shigella</i> spp.	Δυσεντερία	Είσοδος σε μή φαγοκύτταρα και επαγωγή απόπτωσης στα μακροφάγα
<i>Yersinia</i> spp.	Πανούκλα και γαστρεντερίτιδα	Αντιφαγωκύτωση, παρεμπόδιση της παραγωγής κυττοκινών, επαγωγή της απόπτωσης στα φαγοκύτταρα
<b>Παθογόνα Φυτών</b>		
<i>Erwinia amylovora</i>	Κάψιμο του μήλου και ακλαδιού	Αντίδραση υπερευαισθησίας ή/και παθογένεια
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Μαλακές σήψεις και νέκρωση παρεγχυματικών ιστών	Μολυσματικότητα
<i>Erwinia herbicola</i> pv. <i>gypsophila</i>	Καρκινώματα	Αντίδραση υπερευαισθησίας ή/και παθογένεια
<i>Erwinia stewartii</i>	Μαρασμός στο καλαμπόκι	Παθογένεια
<i>P. syringae</i>	Κηλιδώσεις και κάψιμο των φύλλων	Αντίδραση υπερευαισθησίας ή/και παθογένεια
<i>Rhizobium</i> spp.	Δέσμευση αζώτου: φυμάτια στις ρίζες	Δημιουργία φυματίων
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Μαρασμός στρυκνοειδών φυτών	Αντίδραση υπερευαισθησίας ή/και παθογένεια
<i>Xanthomonas</i> spp.	Κηλιδώσεις στα φύλλα και κάψιμο	Αντίδραση υπερευαισθησίας ή/και παθογένεια

**Πίνακας 1.** Εκκριτικά Συστήματα Τύπου III σε παθογόνα βακτήρια ζώων και φυτών.

<i>Yersinia pestis</i>	<i>Salmonella</i> SP-1	<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>	Βιοσύνθεση του Μαστιγίου	Υποκυτταρικός εντοπισμός
YscC	InvG	HrcC		Εξ. Μembrάνη
YscD		HrpQ	FliG	Εσ. Μembrάνη
YscJ	PrgK	HrcJ	FliF	Εξ./Εσ. Μembr.
YscL	OrgB	HrpE	FliH	Κυτταρόπλασμα
YscN	InvC	HrcN	FliI	ΑΤΡάση
YscQ	SpaO	HrcQ	FliN	Εσ. Μembrάνη
YscR	SpaP	HrcR	FliP	Εσ. Μembrάνη
YscS	SpaQ	HrcS	FliQ	Εσ. Μembrάνη
YscT	SpaR	HrcT	FliR	Εσ. Μembrάνη
YscU	SpaS	HrcU	FliB	Εσ. Μembrάνη
YscV	InvA	HrcV	FliA	Εσ. Μembrάνη
YscW	InvH			Εξ. Μembrάνη
YscK	OrgA	HrpD		Κυτταρόπλασμα
YscO	InvI	HrpO		Εκκρινόμενη
YscP	InvJ	HrpP		Εκκρινόμενη
YscF	PrgI			Εκκρ./Βελόνα
YscE				Κυτταρόπλασμα
YscG				Κυτταρόπλασμα
YscI	PrgJ	HrpB		Εκκρινόμενη
YscX				Εκκρινόμενη
YscY				Κυτταρόπλασμα
		HrpA		Εκκρ/Βελόνα
		HrpF		Κυτταρόπλασμα
		HrpG		Κυτταρόπλασμα
		HrpT		Εξ. Μembrάνη
	PrgH			Εσ. Μembrάνη
			FliO	Εσ. Μembrάνη
			FliM	Εσ. Μembrάνη

**Πίνακας 2.** Συντηρημένα και εξειδικευμένα συστατικά του εκκριτικού συστήματος Τύπου III.

Είναι πολύ λίγα γνωστά για τον τρόπο λειτουργίας της μεταθετάσης Τύπου III. Είναι πιθανό το σύμπλοκο της βελόνας να χρησιμεύει ως κανάλι διαμέσου του οποίου τα εκκρινόμενα υποστρώματα μετακινούνται προς το κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Είναι επίσης πιθανό η ενέργεια που απαιτείται για αυτήν τη διαδικασία να παρέχεται από την υδρόλυση του ATP αφού και σε αυτό το σύστημα, όμοια με το σύστημα του μαστιγίου, είναι συντηρημένο ένα ένζυμο

υδρόλυσης ATP που παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την υπομονάδα β της  $F_1$  της  $F_1F_0$  ATPάσης που μεταφέρει πρωτόνια (39). Το ένζυμο αυτό προτείνεται ότι εντοπίζεται στον κυτταροπλασματικό λοβό. Ο φαινότυπος του στελέχους του βακτηρίου *Shigella flexneri* που το γονίδιο της ATPάσης έχει μεταλλαχθεί είναι ελαττωματικά σύμπλοκα της μεταθετάσης Τύπου III και απουσία μόνο της βελόνας και όχι του κυτταροπλασματικού λοβού (38). Από τα παρασκευάσματα αυτά λείπει η πρωτεΐνη που είναι δομικό συστατικό της βελόνας. Επίσης τα στελέχη που είναι μεταλλαγμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί αυτή την πρωτεΐνη έχουν τον ίδιο φαινότυπο όσον αφορά τα σύμπλοκα της μεταθετάσης και επιπλέον δεν μπορούν να εκκρίνουν τις τοξίνες στο κύτταρο ξενιστή. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η ATPάση έχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της βελόνας, ενδεχομένως υποβοηθώντας την έκκριση των δομικών πρωτεϊνών της (37). Αν η βελόνα δεν σχηματιστεί λόγω έλλειψης του δομικού της συστατικού τότε το βακτήριο χάνει την παθογένειά του. Αυτό σημαίνει ότι η βελόνα είναι απαραίτητη για την μεταφορά των τοξινών, ενδεχομένως διαμέσου αυτής.

Λίγα είναι γνωστά και για τα γεγονότα που συμβαίνουν στο κυτταρόπλασμα και για το μηχανισμό στόχευσης των υποστρώματων στο μονοπάτι έκκρισης Τύπου III. Τελευταία πειράματα που έχουν γίνει με τα υποστρώματα του εντεροπαθογόνου βακτηρίου *Yersinia* (τα *YopE* και *YopN*) αποκάλυψαν ότι τα ~15 πρώτα αμινοξέα αυτών των πρωτεϊνών είναι αρκετά για να οδηγήσουν σε έκκριση μια ετερόλογη πρωτεΐνη (40), όμως πειράματα αλλαγής του αναγνωστικού πλαισίου αυτού του ολιγοπεπτιδίου δεν ήταν ικανά να αποτρέψουν την έκκριση της ετερόλογης πρωτεΐνης. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το σήμα για έκκριση πρέπει να βρίσκεται στη δευτεροταγή δομή που λαμβάνει το mRNA και όχι στη συγκεκριμένη πεπτιδική αλληλουχία (41). Επίσης οι αλληλουχίες των 5' mRNA κάποιων υποστρώματων (έχει δειχθεί για το *YopQ*) της *Yersinia* έχουν προβλεπόμενη δομή φουρκέτας που καλύπτει το σημείο έναρξης της μετάφρασης. Αυτό ίσως σημαίνει ότι η μετάφραση των μνημάτων αυτών καθυστερεί μέχρι να αλληλεπιδράσουν με κάποιο συστατικό της μεταθετάσης Τύπου III (42). Ο ίδιος τρόπος αναγνώρισης του υποστρώματος φαίνεται να υπάρχει και στα υποστρώματα *AnrB* και *AnrPto* του φυτοπαθογόνου *P. syringae* (43). Εκτός από το σήμα αναγνώρισης στο 5' mRNA που φαίνεται να είναι γενικευμένος στο εκκριτικό σύστημα Τύπου III υπάρχουν ενδείξεις και για εναλλακτικούς μηχανισμούς. Αυτοί περιλαμβάνουν την εμπλοκή ειδικών πρωτεϊνών που ίσως προσδένονται σε συγκεκριμένες περιοχές των υποστρώματων που εντοπίζονται στα πρώτα 100 αμινοξέα. Ο ρόλος των πιθανών αυτών σαπερονών ενδεχομένως να είναι η στόχευση των υποστρώματων στην εκκριτική μηχανή ή η παρεμπόδιση της πρόωρης αναδίπλωσής τους, κάτι

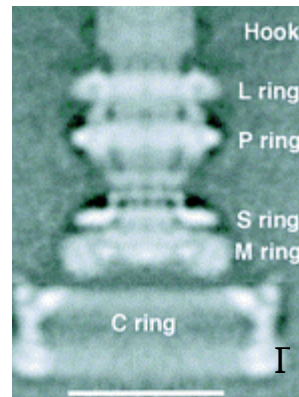
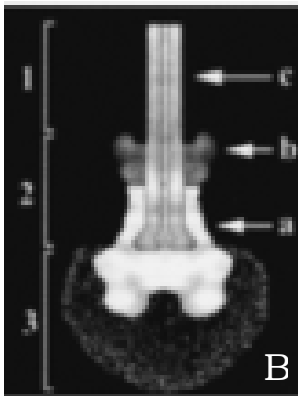
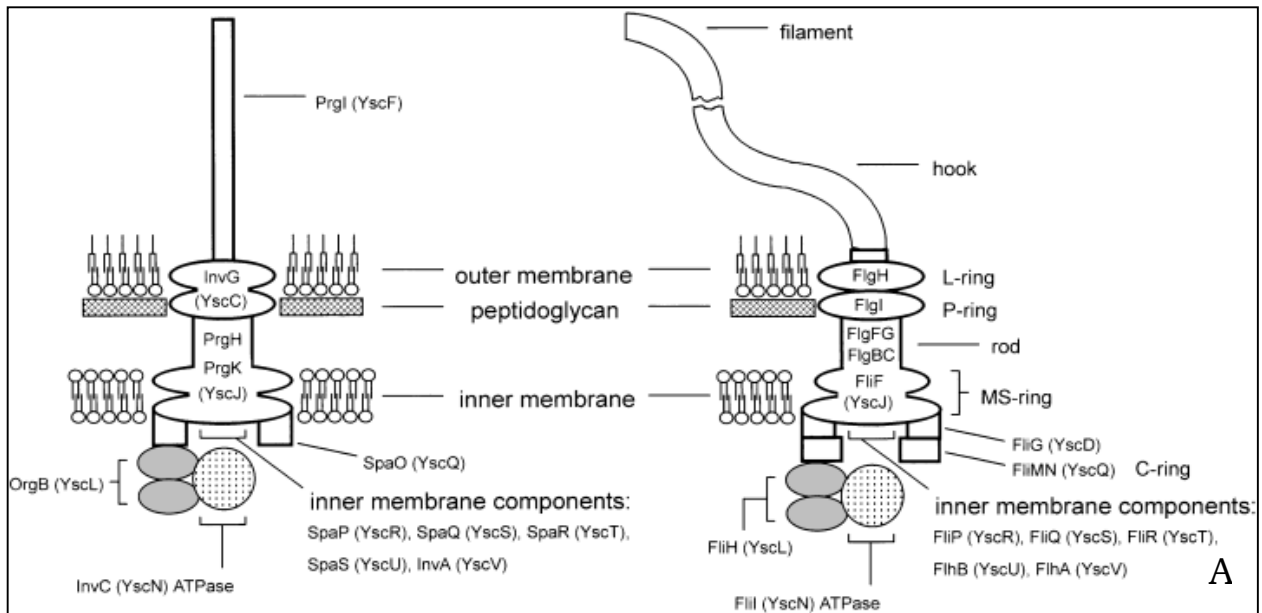
που θα οδηγούσε στην καταστροφή τους στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Σε άλλη περίπτωση εξειδικευμένες σαπερόνες μπορεί να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και να το οδηγούν στην εκκριτική μηχανή για την οποία το ίδιο δεν έχει συνάφεια. Το αποτέλεσμα είναι οι σαπερόνες αυτές να εκκρίνονται μαζί με το υπόστρωμα. Αυτές οι πρωτεΐνες που έχουν ενδεχομένως ρόλο σαπερονών είναι σε μικρό βαθμό συντηρημένες στα διάφορα συστήματα Τύπου III και αυτό ίσως σχετίζεται με το ότι τα υποστρώματα είναι ελάχιστα συντηρημένα και αυτές έχουν εξειδικευτεί να αλληλεπιδρούν με αυτά (44). Ωστόσο όλες είναι μικρού μεγέθους, με χαμηλό ισοΐλεκτρικό σημείο και με δομή πλούσια σε α έλικες. Είναι πιθανό να ισχύουν περισσότεροι από έναν μηχανισμό αναγνώρισης των υποστρωμάτων, τουλάχιστον σε μερικές περιπτώσεις, γιατί έχει δειχθεί ότι οι τοξίνες εκκρίνονται, λιγότερο αποτελεσματικά, παρ' όλο που το 5' mRNA τους λείπει (45). Οι δύο τρόποι αναγνώρισης μπορεί να χρησιμεύουν στη χρονική ρύθμιση της έκκρισης των διαφόρων υποστρωμάτων. Αυτά που πρέπει να μεταφερθούν αμέσως μπορεί να μεταφράζονται αμέσως και να στοχεύονται με τη βοήθεια σαπερονών, ενώ αυτά που μεταφέρονται αργότερα να κρατιούνται με τη μορφή mRNA μέχρι να έρθει η στιγμή της μεταφοράς, οπότε και μεταφράζονται.

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 τη φυσιολογία του ξενιστή (46). Αυτές οι συνθήκες μπορεί να είναι η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα θρεπτικών, δισθενή κατιόντα (όπως  $Ca^{+2}$ ), pH και η φάση ανάπτυξης που βρίσκονται τα βακτήρια. Η μεταμεταγραφική ρύθμιση της διαδικασίας της έκκρισης είναι λιγότερο μελετημένη και κατανοητή. Φαίνεται ότι η επαφή του βακτηρίου με τον ξενιστή επάγει την έκκριση. Τέτοιες περιπτώσεις απαντώνται στα εντεροπαθογόνα *Salmonella*, *Yershinia* και *Shigella* που έχουν βρεθεί παράγοντες που εμποδίζουν την έκκριση τοξινών χωρίς την επαφή με τον ξενιστή. Η απώλεια λειτουργίας αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί στην ανεξέλεγκτη έκκριση τοξινών ακόμη και όταν ταυτόχρονα παρεμποδίζεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Αυτό σημαίνει ότι οι τοξίνες αυτές είχαν συντεθεί σε προηγούμενο στάδιο αλλά η έκκρισή τους παρεμποδιζόταν μέχρι να έρθει η κατάλληλη στιγμή, που είναι η επαφή με τον ξενιστή (47). Όλα αυτά τα επίπεδα ρύθμισης μένουν να διερευνηθούν και να διευκρινιστούν.

Τα εκκριτικά συστήματα Τύπου III των διαφόρων βακτηρίων παρά των υψηλό βαθμό συντήρησης των υπομονάδων τους παρουσιάζουν και υψηλή εξειδίκευση στις πρωτεΐνες που εκκρίνουν. Αυτές οι πρωτεΐνες που έχουν τοξικό ρόλο έχουν προσαρμοστεί να εμπλέκονται στις κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή. Συνήθως οι τοξίνες που εκκρίνουν τα παθογόνα βακτήρια των ζώων παρεμποδίζουν τη λειτουργία του κυτταροσκελετού της ακτίνης (48). Αυτό έχει ως συνέπεια την καταστολή της λειτουργίας της φαγοκύττωσης στα μακροφάγα κύτταρα από τα βακτήρια *P. aeruginosa* και *Yersinia* spp (49). Αλλα βακτήρια, όπως η *Salmonella typhimurium* και η *Shigella* spp. ενύουν τοξίνες στο κύτταρο που προκαλούν αναδιάταξη του κυτταροσκελετού και πινοκύτωση με σκοπό την είσοδό τους στον ευκαρυωτικό ξενιστή. Η *Shigella* spp. έχει βρεθεί επίσης ότι εκκρίνοντας ειδικές τοξίνες επάγει το αποπτωτικό μονοπάτι στα μακροφάγα κύτταρα οδηγώντας τα έτσι στον κυτταρικό θάνατο (50, 51).

Οι πρωτεΐνες που ταξιδεύουν μέσω της μεταθετάσης Τύπου III των φυτοπαθογόνων βακτηρίων έχουν διαφορετικό αποτέλεσμα ανάλογα με το αν το φυτό ξενιστής είναι «δεκτικό» στη μόλυνση από το βακτήριο ή ανθεκτικό. Στην περίπτωση της ανθεκτικότητας το φυτό είναι ικανό να αντιμετωπίσει το παθογόνο βακτήριο εγείροντας την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Η αντίδραση υπερευαισθησίας χαρακτηρίζεται από μία γρήγορη (~24 ώρες) επαγωγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα που είναι σε επαφή με το παθογόνο και έτσι η μόλυνση σταματά εκεί (52). Αντίθετα στην περίπτωση που το φυτό δεν μπορεί να αντιδράσει στην προσβολή από το παθογόνο, το βακτήριο πολλαπλασιάζεται απρόσκοπτα και εξαπλώνεται για μέρες στο φυτό πριν εκδηλωθεί η ασθένεια που είναι σε μεγάλη έκταση. Η αντίδραση της υπερευαισθησίας ενεργοποιείται με τη βοήθεια πρωτεϊνών που εκφράζονται από το φυτό (πρωτεΐνες R: resistance) και αλληλεπιδρούν με τις βακτηριακές πρωτεΐνες αμολυσματικότητας (πρωτεΐνες Avr: Avirulence), σταματώντας την καταστροφική τους δράση. Αντίδραση υπερευαισθησίας προκαλείται και από τις πρωτεΐνες χαρπίνες που είναι πλούσιες σε γλυκίνες, φτωχές σε κυστεΐνες και θερμοσταθερές (53). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι ικανές να προκαλέσουν την αντίδραση του φυτικού κυττάρου βρισκόμενες σε επαφή με το κυτταρικό του τοίχωμα και δεν ενύονται στο κυτταρόπλασμα. Η ακριβής λειτουργία τους δεν είναι γνωστή και παραμένει να διευκρινιστεί.





## Σχήμα 2. Εκκριτικά συστήματα Τύπου III

- A. Υποθετικό σχήμα των TTS των *S. typhimurium* (αριστερά) και του μαστιγίου (δεξιά)  
 Τα συντηρημένα συστατικά είναι σημειωμένα.  
 B. Ηλεκτρονική φωτογραφία του συμπλόκου βελόνας από το *Shigella flexneri*.  
 $1/c$ =βελόνα,  $2/b$ = διαμεμβρανικός επάνω διπλός δακτύλιος,  $3/a$ = βάση/λοβός  
 Γ. Ηλεκτρονική Φωτογραφία του βασικού σωματιού του μαστιγίου.

### 1.4 Σκοπός της παρούσας διατριβής

Σε όλα τα βακτηριακά συστήματα που έχει μελετηθεί η μεταθετάση Τύπου III είναι γνωστά τα γονίδια που εκφράζονται προκειμένου να λειτουργήσει η μηχανή έκκρισης. Έχουν γίνει επίσης προβλέψεις για την τοπολογία όλων των πρωτεϊνών με βάση την πεπτιδική τους αλληλουχία. Ωστόσο η βιοχημική ανάλυση της πρωτεϊνικής συσκευής καθώς και η παρατήρηση αυτής έχει γίνει σε περιορισμένο επίπεδο. Οι εικόνες της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του συμπλόκου της βελόνας ήταν σημαντική πρόοδος αλλά οι

γνώσεις όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας της βρίσκονται ακόμα σε πρωταρχικό στάδιο.

Χρησιμοποιώντας ως πρότυπο οργανισμό για τη μελέτη του εκκριτικού συστήματος Τύπου III το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και μέσω της ανασύστασης αυτού *in vitro* θέτουμε ερωτήματα που αφορούν την ανακάλυψη του μηχανισμού λειτουργίας. Σε ένα πρωταρχικό στάδιο μελέτης που αφορά και αυτή την εργασία, επικεντρωθήκαμε στην ΑΤΡάση του συστήματος, θεωρώντας ότι αποτελεί βασικό συστατικό της μεταθετάσης. Αφού έγινε ο αρχικός χαρακτηρισμός του ενζύμου τέθηκε και το ερώτημα της ολιγομερικής κατάστασης που βρίσκεται τόσο *in vitro* όσο και μέσα στο κύτταρο. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια ανεύρεσης αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών με την ΑΤΡάση με σκοπό την ταυτοποίηση των ικανών και αναγκαίων συστατικών του μονοπατιού έκκρισης. Αυτό προσεγγίστηκε με δύο τρόπους *in vitro* και *in vivo*. Με τον πρώτο δεν στάθηκε δυνατό να έχουμε θετικό αποτέλεσμα ενώ η προσέγγιση *in vivo* δίνει ενδείξεις για σχηματισμό των συμπλόκων. Όταν γίνει δυνατή η ανασύσταση του συστήματος *in vitro* θα είμαστε σε θέση να αναλύσουμε το μηχανισμό λειτουργίας στη λεπτομέρειά του και να απαντηθούν σημαντικά ερωτήματα όπως είναι ο τρόπος στόχευσης στην εκκριτική μηχανή, η έκκριση αυτή καθ' εαυτή, ο ρόλος της ΑΤΡάσης, ο ρόλος των πιθανών σαπερονών.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### **2. Ενζυμικός χαρακτηρισμός και ολιγομερική κατάσταση της πρωτεΐνης HrcN.**

#### **2.1** Εισαγωγή

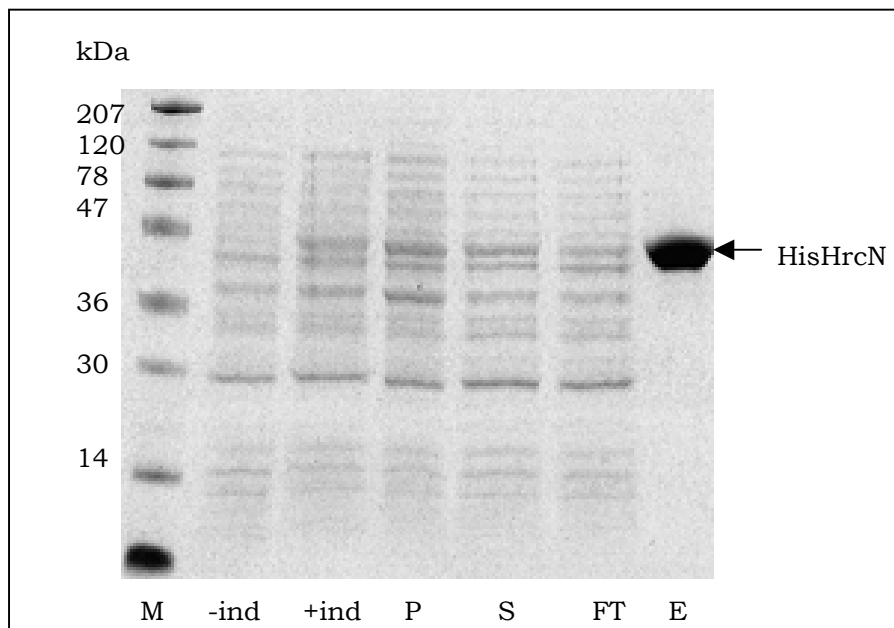
Ενας πιθανός παράγοντας που επιτρέπει τη χρήση μεταβολικής ενέργειας από το εκκριτικό σύστημα Τύπου III του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* είναι η πρωτεΐνη HrcN. Η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία της HrcN που προκύπτει από την αλληλούχιση του γονιδίου της, παρουσιάζει συντήρηση σε ποσοστό 40-60% με πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας άλλων εκκριτικών συστημάτων Τύπου III καθώς και με την ATPάση που συμμετέχει στην κατασκευή του μαστιγίου. Επίσης παρουσιάζει ~30% ομοιότητα με την β υπομονάδα της  $F_1$  που είναι τμήμα της βακτηριακής ATPάσης  $F_0F_1$  (ATPάση που μεταφέρει πρωτόνια) (28). Η  $F_1$  είναι υδατοδιαλυτή και συνδέεται με τη μεμβράνη μέσω της  $F_0$  υπομονάδας. Η HrcN περιέχει τις συντηρημένες περιοχές Walker box A και Walker box B που είναι χαρακτηριστικές σε όλες τις ATPάσες. Η περιοχή Walker box A σχηματίζει μία θηλιά που αλληλεπιδρά με το νουκλεοτίδιο, ενώ η περιοχή Walker box B που περιλαμβάνει υδρόφοβα κατάλοιπα και σχετίζεται με την επίθεση στο γ φώσφορο κατά τη διαδικασία της υδρόλυσης (55).

Η HrcN φαίνεται να είναι κεντρικής σημασίας μόριο για τη διαδικασία έκκρισης Τύπου III. Σημαντικό για την περαιτέρω μελέτη του ενζύμου ήταν να προσδιοριστούν μερικά βασικά κινητικά χαρακτηριστικά όπως  $K_m$ ,  $V_{max}$  καθώς και η θερμοκρασία, το δισθενές ιόν και το pH που το ένζυμο έχει τη μέγιστη υδρολυτική ικανότητα. Επίσης σημαντικό για τη μελέτη της λειτουργίας της πρωτεΐνης ήταν να βρεθεί η ολιγομερική κατάσταση τόσο *in vitro* όσο και μέσα στο κύτταρο. Τα μέχρι τώρα δεδομένα στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι η ομόλογή της από το σύστημα του μαστιγίου είναι μονομερική πρωτεΐνη κάτι που αντίκειται στα δικά μας αποτελέσματα (56).

## 2.1 Έκφραση και καθαρισμός της HisHrcN

Το γονίδιο *hrcN* κλωνοποιήθηκε στο βακτηριακό φορέα έκφρασης pET16b και σε σύμφυση με ακροφύσιο 10 ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της ώστε να είναι ικανός ο καθαρισμός της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας νικελίου (από τη Ν. Ταμπακάκη, διδακτορικό.).

Η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3).pLysS. Οι συνθήκες επαγωγής της έκφρασης προκειμένου να παραμένει ένα μικρό ποσοστό σε διαλυτή μορφή είναι 22°C, 6 ώρες και 0.1mM IPTG (καθορίστηκαν από το Γ. Σιανίδη). Ο καθαρισμός έγινε με τη βοήθεια ρητίνης αγαρόζης Ni<sup>2+</sup>-NTA (**Σχήμα 3**). Με αυτήν την πρωτεΐνη έγιναν όλα τα *in vitro* πειράματα που ακολουθούν.



**Σχήμα 3.** Έκφραση και καθαρισμός της HisHrcN από ρητίνη Ni<sup>2+</sup>-NTA.

M= μάρτυρας μοριακών βαρών σε kDa

-ind= ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πριν την επαγωγή

+ind= ολικό κυτταρικό εκχύλισμα μετά την επαγωγή

P= μεμβρανικά υπολείμματα μετά τη λύση των κυττάρων

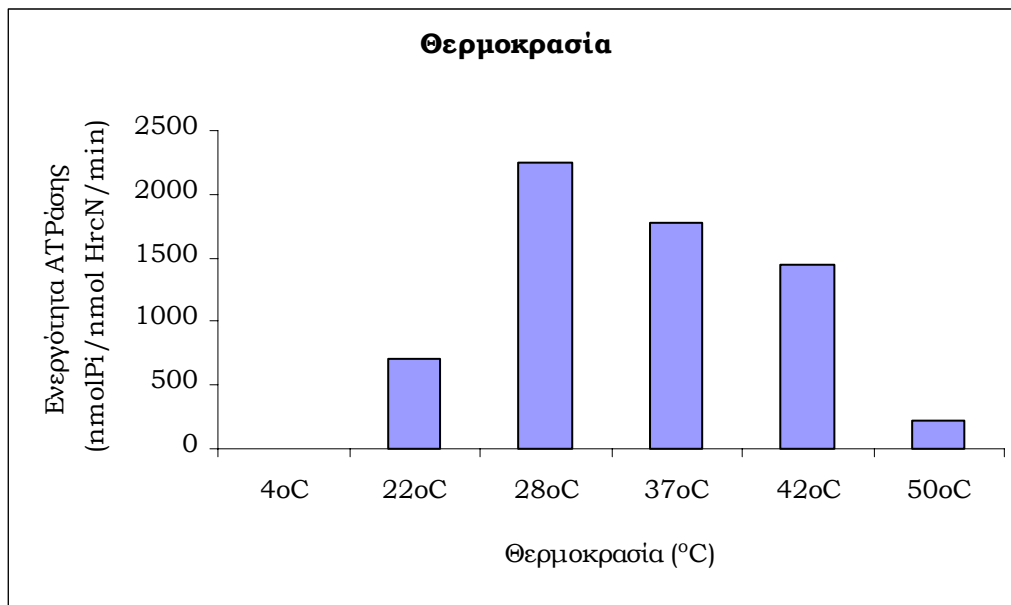
S= κυτταροπλασματικό εκχύλισμα

FT= κυτταροπλασματικό εκχύλισμα που δεν συγκρατήθηκε από τη ρητίνη

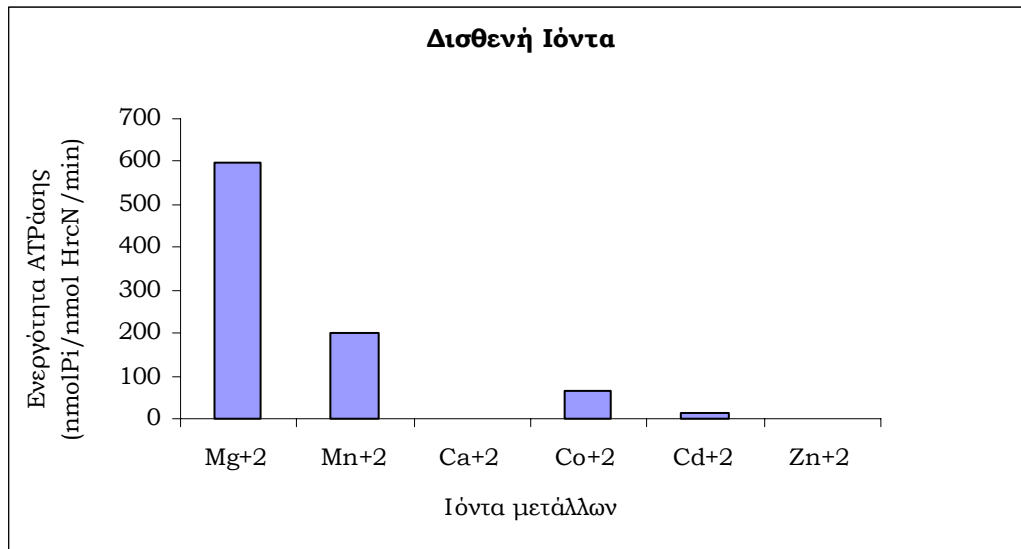
E= έκλυση της HisHrcN από τη ρητίνη

### 2.3 Ενζυμικός χαρακτηρισμός της ΑΤΡάσης HrcN

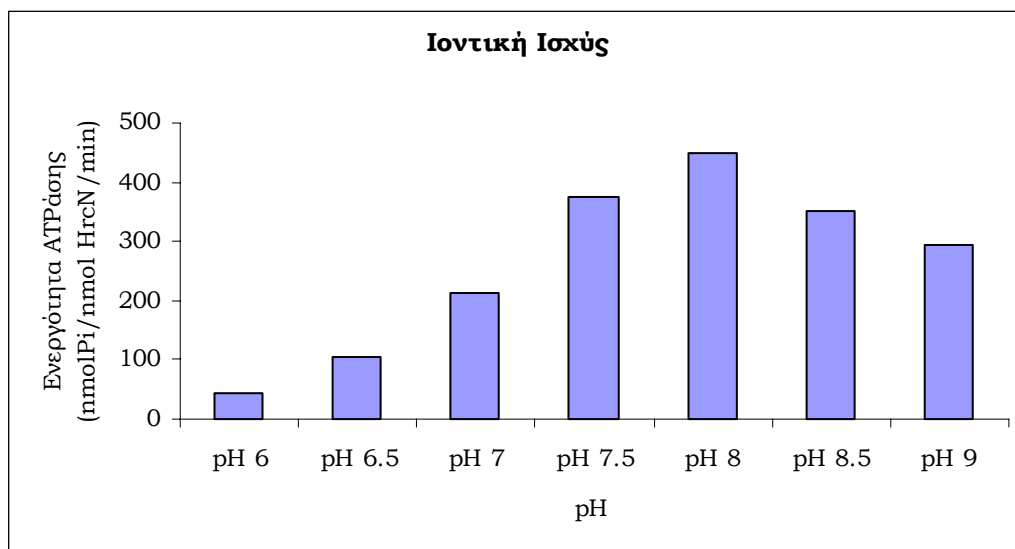
Οι βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, διοθενούς μετάλλου και pH που λειτουργεί το ένζυμο HisHrcN *in vitro* προσδιορίστηκαν με δοκιμασίες υδρόλυσης ATP χρησιμοποιώντας τη χρωστική Πράσινο του Μαλαχίτη. Η θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης βρέθηκε να είναι 28°C όπου εξάλλου είναι και η θερμοκρασία που αναπτύσσεται η *P.s.phaseolicola* και επάγεται το σύστημα έκκρισης Τύπου III (**Σχήμα 4**). Το διοθενές ιόν μετάλλου που βρέθηκε να είναι απαραίτητο για την υδρόλυση είναι το  $Mg^{+2}$  (**Σχήμα 5**). Χαμηλή επίσης δρατικότητα παρατηρείται παρουσία των ιόντων  $Mn^{+2}$  και  $Co^{+2}$ , ενώ με τα ιόντα  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  και  $Cd^{+2}$  το ένζυμο είναι τελείως ανενεργό. Βέλτιστο pH που λειτουργεί η HrcN είναι το 8, ενώ η ενεργότητα πέφτει στο μισό όταν το pH είναι 7 ή 9 και σχεδόν μηδενίζεται στο 6 (**Σχήμα 6**). Οι διαφορές στα απόλυτα νούμερα της ενεργότητας οφείλονται σε διαφορετικά παρασκευάσματα της πρωτεΐνης και σε διαφορετική περιεκτικότητα σε ενεργή μορφή των ~600kDa. Τα αποτελέσματα που αφορούν τα μέταλλα και το pH φαίνεται να είναι κοινά χαρακτηριστικά για όλη την οικογένεια αυτών των ενζύμων αφού παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν και για την FliI που είναι η ΑΤΡάση του συστήματος του μαστιγίου.



**Σχήμα 4.** Ενεργότητα ΑΤΡάσης της HisHrcN σε διάφορες θερμοκρασίες

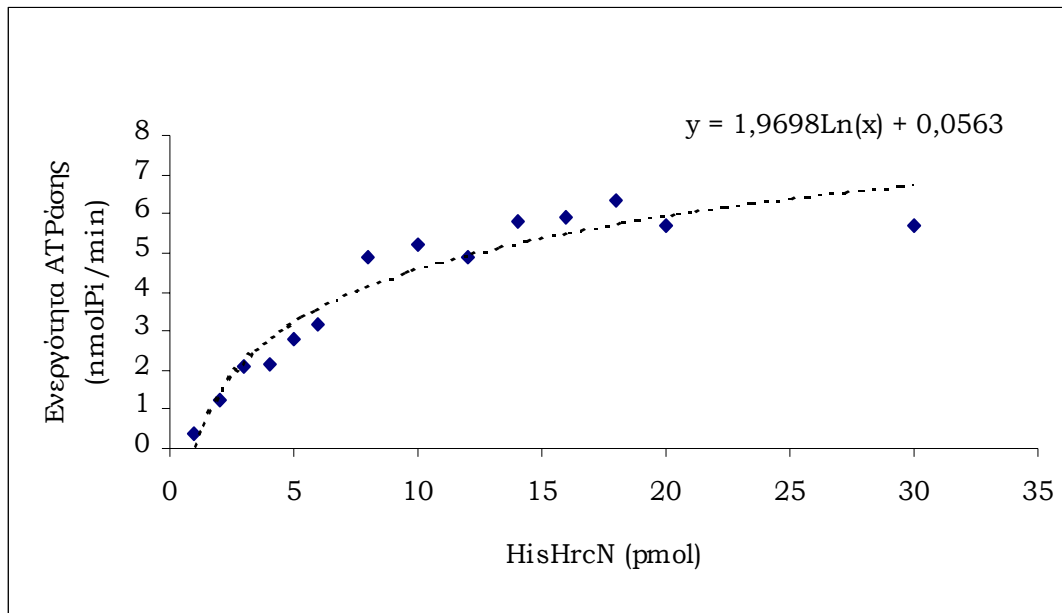


**Σχήμα 5.** Ενεργότητα ΑΤΡάσης της HisHrcN παρουσία διαφόρων διοθενών ιόντων μετάλλων

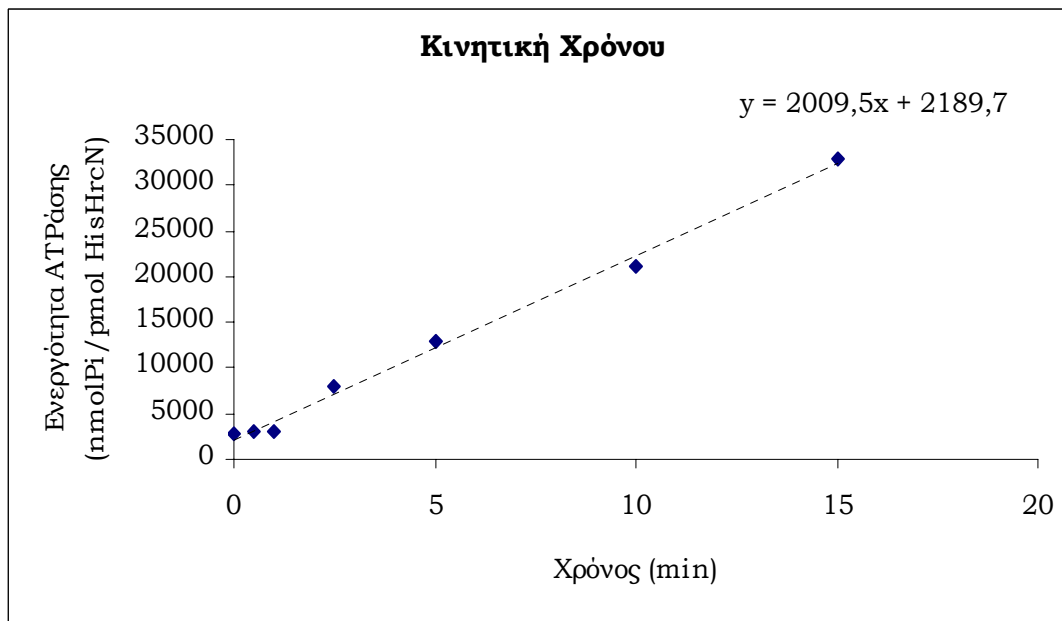


**Σχήμα 6** Ενεργότητα ΑΤΡάσης της HisHrcN σε διαλύματα διαφορετικής ιοντικής ισχύος

Εγιναν επίσης δοκιμασίες υδρόλυσης του ATP με αυξανόμενες ποσότητες ενζύμου (**Σχήμα 7**) καθώς και με κινητική χρόνου (**Σχήμα 8**). Και στις δύο περιπτώσεις προκύπτει μία γραμμική σχέση, με την προϋπόθεση ότι η ποσότητα του ATP δεν είναι περιοριστικός παράγοντας. Στην περίπτωση της κινητικής συγκέντρωσης ενζύμου, σε μεγάλες συγκεντρώσεις η σχέση δεν είναι γραμμική γιατί το ATP δεν είναι αρκετό και έτσι μια ποσότητα ενζύμου μένει ανενεργή. Στα διαγράμματα φαίνεται και η μαθηματική εξίσωση που περιγράφει τις δύο κινητικές.



**Σχήμα 7.** Κινητική ενεργότητα ΑΤΡάσης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της HisHrcN. Η εξίσωση που την περιγράφει είναι λογαριθμική και όχι γραμμική γιατί σε υψηλές συγκεντρώσεις ενζύμου το ΑΤΡ αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, και μια ποσότητα του ενζύμου μένει ανενεργή.



**Σχήμα 8.** Κινητική ενεργότητα ΑΤΡάσης της HisHrcN σε συνάρτηση με το χρόνο. Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση είναι γραμμική.

Όλα τα παραπάνω πειράματα έγιναν με ανομοιογενή πληθυσμό HisHrcN και στην ποσότητα του ενζύμου συνυπολογίζεται και ο ανενεργός πληθυσμός του μονομερούς καθώς και μια μεγάλη ποσότητα πολύ μεγάλων, επίσης ανενεργών μορφών (>2000kD). Για τον προσδιορισμό των  $K_m$  και  $V_{max}$

χρειάστηκε να διαχωριστούν οι δύο μορφές, μονομερές και πολυμερές που έγινε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας Μοριακής Διήθησης μετά τον καθαρισμό από ρητίνη Ni<sup>2+</sup>-NTA (από τον Μ. Ποζίδη). Οι K<sub>m</sub> και V<sub>max</sub> για τις δύο μορφές φαίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 3** και προσδιορίστηκαν επίσης με δοκιμασίες υδρόλυσης ATP με Malachite Green. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη είναι ενεργή ως ολιγομερές γιατί κάθε πρωτομερές είναι ~700 φορές πιο ενεργό όταν είναι μέρος της ολιγομερικής μορφής σε σχέση με όταν βρίσκεται σε μονομερική κατάσταση.

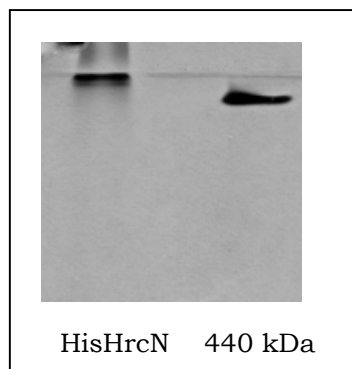
	HisHrcN	
	Μονομερές (~50kDa)	Ολιγομερές (~600kDa)
<b>V<sub>max</sub></b> (nmol Pi/mg HisHrcN/min)	63.5	43,000
<b>K<sub>m</sub></b>	0.114	0.299
<b>K<sub>cat</sub></b> (nmol Pi/mol protein/min)	3.175	26,875
<b>K<sub>cat</sub></b> (nmol Pi/mol protomer/min)	3.175	2,150

**Πίνακας 3** Τιμές που αφορούν την υδρολυτική ταχύτητα των δύο μορφών της HisHrcN.

## 2.4 Ολιγομερική κατάσταση της HrcN

### α. *In vitro*

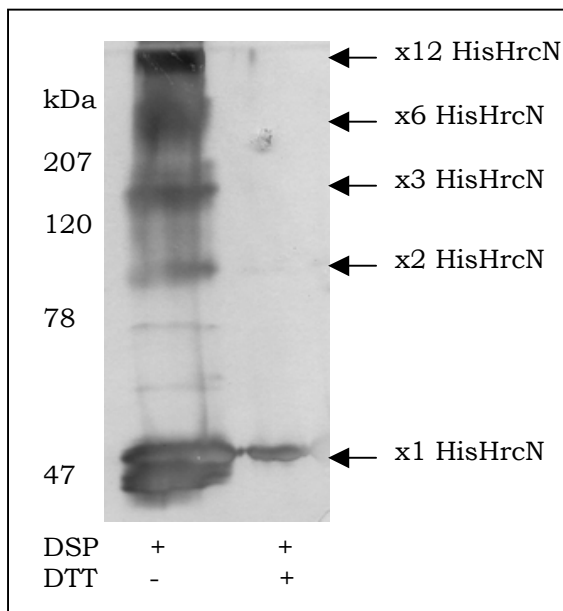
Αρχικά μελετήθηκε η ολιγομερική κατάσταση της βακτηριακά παρασκευασμένης HisHrcN. Το πρώτο πείραμα που έγινε ήταν η ηλεκτροφόρηση της HisHrcN, όπως καθαρίζεται από το Ni<sup>2+</sup>-NTA, σε μή αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (**Σχήμα 9**). Η ηλεκτροφορητική εικόνα είναι χαρακτηριστική ενός πολύ μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεϊνικού συμπλόκου αφού η πρωτεΐνη κινείται πιο αργά από το μοριακό μάρτυρα των 440kDa.



**Σχήμα 9.** Ηλεκτροφόρηση της HisHrcN σε μή αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Κινείται πιο αργά από το μοριακό μάρτυρα των 440kDa.



Το δεύτερο πείραμα ήταν η χημική διασύνδεση της HisHrcN με τον ομοδιλειουργικό χημικό σύνδεσμο DSP. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη στη φυσική της κατάσταση σχηματίζει πολυμερή (**Σχήμα 10**). Τα μοριακά βάρη των ολιγομερικών μορφών που είναι μεγαλύτερες του μάρτυρα των 207kDa υπολογίστηκαν να είναι ~300kDa και >500kDa αλλά ενδέχεται να είναι ανακριβή, ενώ οι μικρότερες ζώνες είναι 150kDa και 100kDa. Το ότι η μεγαλύτερη ζώνη είναι >500kDa υποστηρίζεται και από δεδομένα που προέρχονται από το χρωματογράφημα Μοριακής Διήθησης της καθαρισμένης από ρητίνη Ni<sup>2+</sup>-NTA πρωτεΐνης (πείραμα που έγινε από τον Μ. Ποζίδη). Στο χρωματογράφημα αυτό εμφανίζεται μια μορφή που είναι περίπου 500-800kDa (υπολογίστηκε από την Α. Gomez-Serano). Πειράματα υδρόλυσης ATP δείχνουν ότι αυτή είναι η ενεργή μορφή.

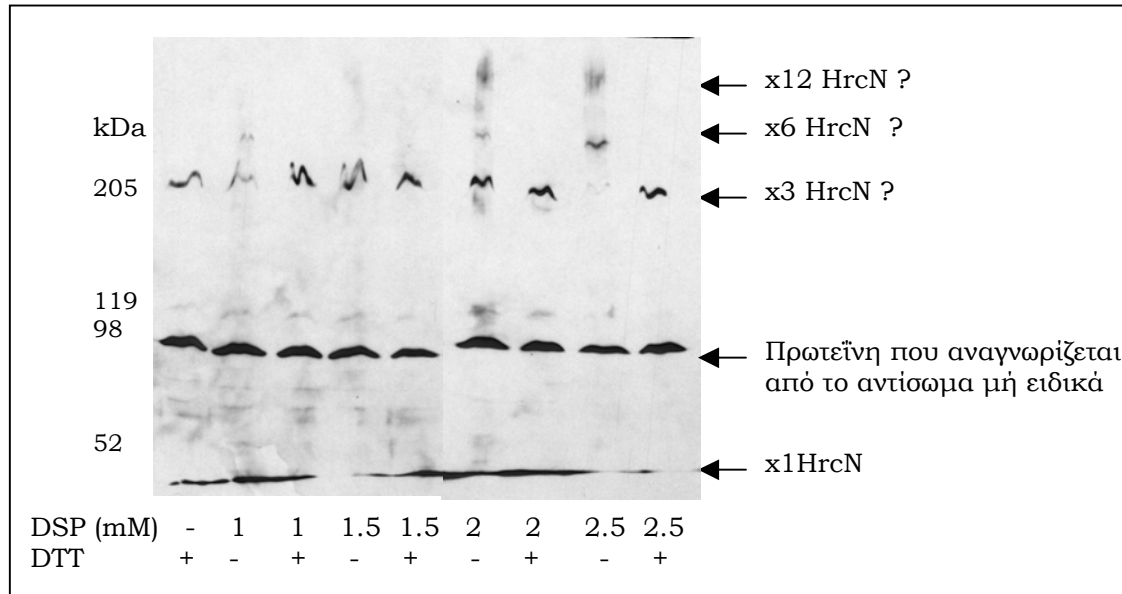


**Σχήμα 10.** Χημική διασύνδεση της HisHrcN με το χημικό DSP.

### β. In vivo

Προκειμένου να πιστοποιηθεί αν οι ολιγομερικές μορφές της HisHrcN αντιπροσωπεύουν εγγενείς μορφές της HrcN στην *P.s.phaseolicola* έγιναν πειράματα χημικής διασύνδεσης σε κύτταρα *P.s.phaseolicola* στα οποία έχει επαχθεί το σύστημα έκκρισης Τύπου III. Το κυτταρικό εκχύλισμα ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η πρωτεΐνη HrcN παρακολουθείται με πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της ανασυνδυασμένης HisHrcN (ετοιμάστηκε από τον Κ. Μπούλια). Προς αποφυγήν μη ειδικών σημάτων ο ορός καθαρίστηκε από τα μη ειδικά αντισώματα IgG, επώάζοντάς τον σε λωρίδα νιτροκυτταρίνης που έφερε HisHrcN και κρατώντας μόνο τα

αντισώματα που την αναγνώρισαν. Η HrcN σχηματίζει σύμπλοκα μοριακού βάρους ~150kD, ~300kD και ίσως 600kD (**Σχήμα 11**). Τα δύο τελευταία νούμερα δεν είναι υπολογισμένα με απόλυτη ακρίβεια αφού δεν υπάρχει μοριακός μάρτυρας μεγαλύτερος των 205kD.



**Σχήμα 11.** Χημική διασύνδεση σε κύτταρα *P.s. phaseolicola* που έχει επαχθεί το σύστημα έκκρισης ΤύπουIII. Φαίνεται ότι όσο αυξάνει η συγκέντρωση του χημικού συνδέτη DSP εμφανίζονται σύμπλοκα μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Με την προσθήκη DTT η χημική διασύνδεση καταστρέφεται. Η ανίχνευση γίνεται με αντίσωμα α-HrcN.

Το κυτταρικό εκκύλισμα από επηγμένα κύτταρα *P.s.phaseolicola* και χημικά διασυνδεδεμένα αναλύθηκε σε Διαβάθμιση Σουκρόζης. Η HrcN παρακολουθείται και πάλι με το ίδιο αντίσωμα και φαίνεται να κινείται ως λίγο πιο μεγάλη από 200kD πρωτεΐνη.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν ικανές να προσδιορίσουν το ακριβές μοριακό βάρος της πρωτεΐνης στο κύτταρο. Ωστόσο συγκλίνουν ότι η HrcN βρίσκεται και λειτουργεί ως ολιγομερές, ομομερές ή ετερομερές. Πειράματα Μοριακής διήθησης και ανάλυσης σε Διαβάθμιση Σουκρόζης του κυτταροπλάσματος από επηγμένα κύτταρα *P.s.phaseolicola* δείχνουν ότι η μορφή της πρωτεΐνης που υπάρχει στο κύτταρο είναι η ολιγομερική και το μοριακό της βάρος υπολογίζεται ~600kDa (πειράματα που έγιναν από τον Μ.Ποζίδα και Α. Gomez-Serano). Κατά τα πειράματα χημικής διασύνδεσης είναι δυνατόν να παρατηρούνται και τα ενδιάμεσα στάδια ολιγομερισμού (150kDa, 300kDa).

## 2.5 Συζήτηση

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρωτεΐνη HisHrcN είναι όντως ΑΤΡάση και μάλιστα υδρολύει με πολύ υψηλό ρυθμό. Ο υψηλός ρυθμός υδρόλυσης θεωρείται δύσκολο να συμβαίνει και μέσα στο κύτταρο ανεξέλεγκτα αφού αυτό θα εξαντλούσε όλα τα αποθέματα ενέργειάς του. Είναι πιθανό η ΑΤΡάση να υπόκειται σε χρονική ή/και χωρική ρύθμιση. Είναι πιθανό να ενεργοποιείται ακριβώς τη χρονική στιγμή που χρειάζεται για να επιτελέσει το έργο της μετατόπισης του υποστρώματος διαμέσου του καναλιού. Αυτό θα σήμαινε ότι κρατιέται ανενεργή όλο το υπόλοιπο διάστημα αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες του συστήματος. Αυτές μπορεί να παρεμποδίζουν την άκαιρη αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα, το οποίο αναμένεται να είναι και το ενεργοποιητικό σήμα, ή να αποτρέπουν το σχηματισμό της ολιγομερικής μορφής που είναι και η ενεργή. Είναι πιθανό ο ολιγομερισμός της να ενεργοποιεί και την υδρολυτική της ικανότητα.

Προκειμένου να εξετάσουμε όλες αυτές τις υποθέσεις έγιναν προσπάθειες να βρεθούν αλληλεπιδρώντα μόρια με την HrcN, *in vitro* και *in vivo* που περιγράφονται στα επόμενα κεφάλαια.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**3. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και ΑΤΡάσης, *in vitro*.****3.1 Εισαγωγή**

Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν ρόλο υποστρώματος της εκκριτικής μηχανής Τύπου III μεταγράφονται και μεταφράζονται μετά το ίδιο σήμα επαγωγής του ρυθμιζονίου Τύπου III. Μια οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι οι χαρπίνες που σε καθαρή μορφή είναι ικανές να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτό. Πρόκειται για θερμοανθεκτικές, όξινες και πλούσιες σε γλυκίνες πρωτεΐνες που όταν το εκκριτικό σύστημα Τύπου III επάγεται *in vitro*, εκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο. Εκκρινόμενη πρωτεΐνη είναι επίσης και αυτή που αποτελεί το δομικό συστατικό του καναλιού της εκκριτικής μηχανής, που μοιάζει με βελόνα.

Δύο πρωτεΐνες χρησιμοποιήσαμε ως πρότυπα υποστρώματα με σκοπό να παρακολουθούμε τη λειτουργία της έκκρισης του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *P.s.phaseolicola*. Η μία είναι η HrpZ που ανήκει στην οικογένεια των χαρπινών και εμπλέκεται στην πρόκληση πόρων στο ευκαρυωτικό φυτικό κύτταρο που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την έκχυση θρεπτικών. Η άλλη είναι η HrpA που αποτελεί το δομικό συστατικό της βελόνας. Εγιναν προσπάθειες να βρεθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα και εμπλέκονται στη διαδικασία της έκκρισης, ενδεχομένως με το να τις στοχεύουν στην ΑΤΡάση. Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε αρχικά ήταν διάφορες δοκιμασίες *in vitro* που έλεγχαν αν τα υποστρώματα αλληλεπιδρούν απ' ευθείας με πρωτεΐνες που είχαν πιθανό ρόλο σαπερόνης, καθώς και αν αυτά ή οι πιθανές σαπερόνες επηρεάζουν την υδρολυτική ικανότητα της ΑΤΡάσης HrcN.

Δύο πρωτεΐνες της *P.s.phaseolicola* είναι υποψήφιες σαπερόνες αφού έχουν τα γενικά χαρακτηριστικά των σαπερονών του TTS. Αυτές είναι οι HrpE και HrpO και τα χαρακτηριστικά που έχουν είναι μικρό μέγεθος, πολλά υδρόφιλα αμινοξέα και μεγάλη προβλεπόμενη περιεκτικότητα σε α έλικες. Αυτά που είναι γνωστά ως τώρα, από πειράματα *in vitro* στο σύστημα του μαστιγίου είναι ότι η ομόλογη πρωτεΐνη της HrpO καθώς και της HrpE αλληλεπιδρούν

ισχυρά με την αντίστοιχη ATPάση καθώς και μεταξύ τους. Η ομόλογη της HrpE επιπλέον παρεμποδίζει την υδρολυτική ικανότητα της ATPάσης. Η υπόθεση που προτείνεται από τους ερευνητές είναι ότι οι δύο πιθανές σαπερόνες σχηματίζουν σύμπλοκο με την ATPάση και με το προς μεταφορά υπόστρωμα και κρατούν ανενεργή την ATPάση μέχρι να αλληλεπιδράσει με μεμβρανικές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος. Θέλαμε να εξετάσουμε αυτές τις υποθέσεις στο TTS του βακτηρίου *P.s.phaseolicola* στα πειράματα που ακολουθούν.

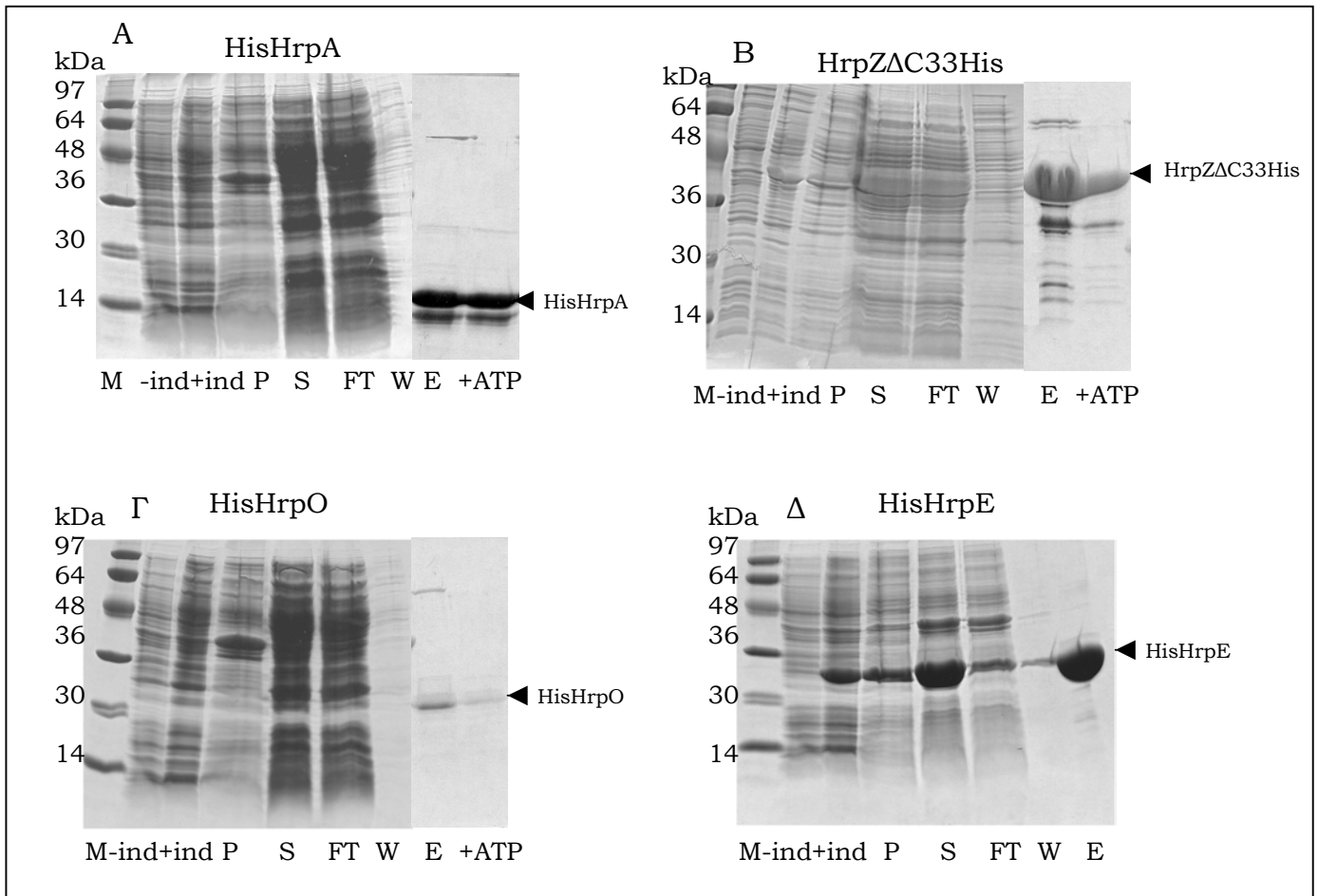
### 3.2 Εκφραση και καθαρισμός των υποστρωμάτων και των πιθανών σαπερονών

Τα γονίδια *hrpA*, *hrpZ*, *hrpE* και *hrpO* κλωνοποιήθηκαν σε βακτηριακούς φορείς έκφρασης και σε σύντηξη με ακροφύσια πολυϊστιδινών για να είναι δυνατός ο καθαρισμός με χρωματογραφία συγγενείας νικελίου. Τα γονίδια *hrpA*, *hrpE* και *hrpO* κλωνοποιήθηκαν στο φορέα pET16b και οι πρωτεΐνες φέρουν ακροφύσιο δεκαϊστιδινών στο αμινοτελικό τους άκρο. Το γονίδιο *hrpZ* κλωνοποιήθηκε στο φορέα pEt26b έχοντας μία έλλειψη 99 νουκλεοτιδίων στο καρβοξυτελικό του άκρο. Στο ίδιο άκρο φέρει και το ακροφύσιο δεκαϊστιδινών. (Οι κλωνοποιήσεις έγιναν από τη Ν. Ταμπακάκη και Α. Παπαϊωάννου). Η πρωτεΐνη που παράγεται θα αναφέρεται ως HrpZΔC33 και θα θεωρείται πλήρως λειτουργική όσον αφορά τη λειτουργία της έκκρισης αφού αυτά τα 33 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου έχουν δείξει ότι δεν επηρεάζουν τη δυνατότητα του βακτηρίου να εκκρίνει τη χαρπίνη.

Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3).pLys και οι συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού αναφέρονται στο κεφάλαιο 6. Οι καθαρισμοί των HisHrpA, HrpZΔC33His και HisHrpO έγιναν κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες και με τη βοήθεια ρητίνης αγαρόζης Ni<sup>2+</sup>-NTA. **(Σχήμα 12A, 12B, 12Γ** αντίστοιχα) Κατά τη διαδικασία καθαρισμού χρειάστηκε να εισαχθεί ένα επιπλέον στάδιο που περιλαμβάνει την επώαση των καθαρισμένων πρωτεϊνών με 1mM ATP. Κατά τη διαδικασία αυτή βρέθηκε ότι αφαιρείται η πρωτεΐνη των 70kD που αλληλεπιδρά με αυτές. Πρόκειται για τη βακτηριακή σαπερόνη Hsp70 όπως έδειξε αμινοτελική αλληλούχιση. Η πρωτεΐνη HisHrpE καθαρίστηκε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες αφού όλη η ποσότητα του πολυπεπτιδίου παρέμενε σε έγκλειστα σωματίδια στα κύτταρα **(Σχήμα 12Δ)**. Η επαναδιάταξη της έγινε με σταδιακή απομάκρυνση της ουρίας.

Προκειμένου να είναι δυνατή η παρακολούθηση αυτών των πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα κυττάρων καθώς και σε δοκιμασίες που ελέγχεται η

αλληλεπίδρασή τους με άλλες ήταν απαραίτητη η παρασκευή αντιϊορών. Παρασκευάστηκε πολυκλωνικός αντιϊρός κατά της πρωτεΐνης HisHrpA που αναγνωρίζει τόσο τη βακτηριακά παρασκευασμένη πρωτεΐνη καθώς και αυτή που εκφράζεται στα κύτταρα της *P.s.phaseolicola* μετά από επαγωγή του συστήματος Τύπου III (**Σχήμα 13**). Αντισώματα κατά των άλλων πρωτεϊνών παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο του κ. Πανόπουλου.



**Σχήμα 12** Εκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών **A.** HisHrpA **B.** HrpZΔC33His **Γ.**

HisHrpO και **Δ.** HisHrpE

M= μάρτυρας μοριακών βαρών σε kDa

-ind= ολικό κυτταρικό εκκύλισμα πριν την επαγωγή

+ind= ολικό κυτταρικό εκκύλισμα μετά την επαγωγή

P= μεμβρανικά υπολείμματα μετά τη λύση των κυττάρων

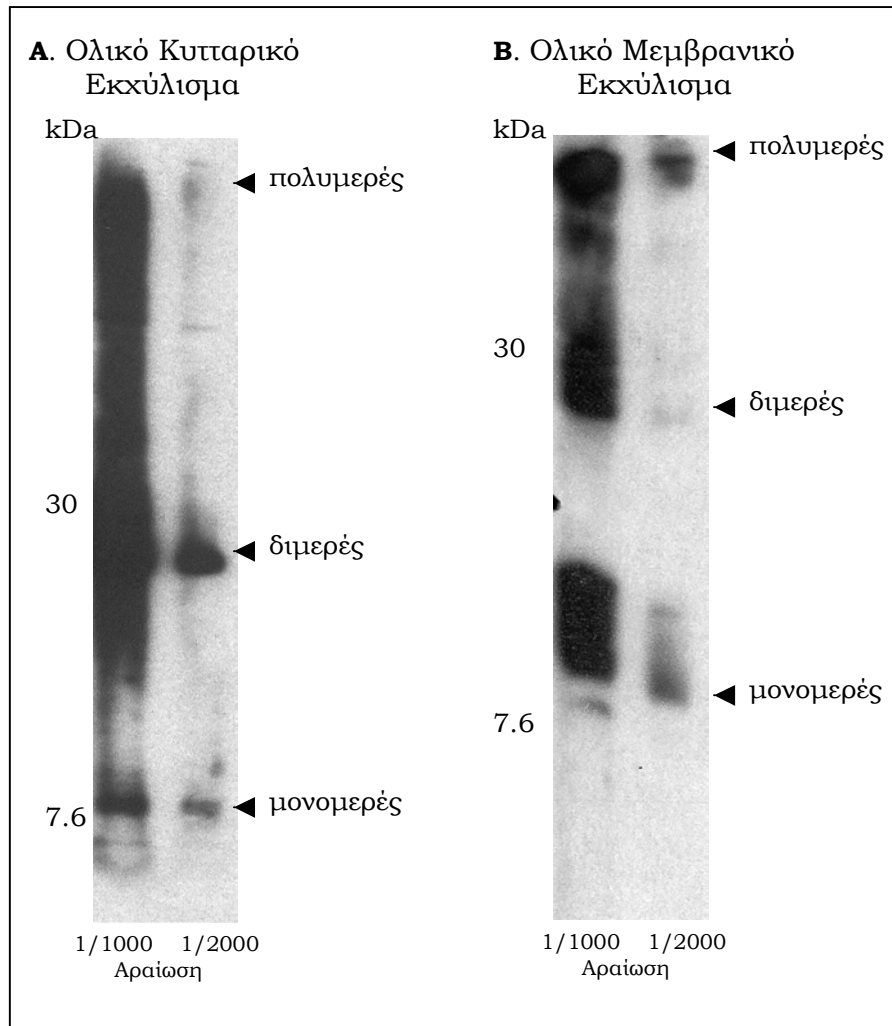
S= κυτταροπλασματικό εκκύλισμα ή πρωτεΐνες διαλυτές σε ουρία στο 7δ

FT= κυτταροπλασματικό εκκύλισμα που δεν συγκρατήθηκε από τη ρητίνη

W= πρωτεΐνες που απομακρύνθηκαν από τη ρητίνη με τις πλύσεις

E= έκλουση της πρωτεΐνης από τη ρητίνη

+ ATP= έκλουση της πρωτεΐνης από τη ρητίνη μετά την επώαση με ATP



**Σχήμα 13** Προσδιορισμός του τίτλου των μονοειδικών αντισωμάτων α-HrpA σε  
**A.** Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων *P.s. phaseolicola* που έχει επαχθεί το TTS και  
**B.** Ολικό μεμβρανικό εκχύλισμα κυττάρων *P.s. phaseolicola* που έχει επαχθεί το TTS

### 3.3 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων με Μή Αποδιατακτικό Πήκτωμα Πολυακρυλαμίδης

Οι βακτηριακά εκφρασμένες πρωτεΐνες (είτε με ακροφύσιο His σε *E. coli* κύτταρα ή ραδιοσημασμένες με  $^{35}\text{S}$  με το πρωτόκολλο των συζευγμένων αντιδράσεων μεταγραφής μετάφρασης και υλικά από την εταιρία Promega) αναμείχθηκαν ανά ζεύγη και σε διάφορες αναλογίες και πάντα τα ζεύγη ήταν υπόστρωμα-πιθανή σαπερόνη. Τα ζεύγη που δοκιμάστηκαν ήταν  $^{35}\text{S}$ -HrpE /HrpZΔC33His,  $^{35}\text{S}$ -HrpE/HisHrpA,  $^{35}\text{S}$ -HrpO/HrpZΔC33His,  $^{35}\text{S}$ -HrpO/HrpA,  $^{35}\text{S}$ -HrpZ/HisHrpE,  $^{35}\text{S}$ -HrpZ/HisHrpO,  $^{35}\text{S}$ -HrpA/HisHrpE,  $^{35}\text{S}$ -HrpA/HisHrpO καθώς και HisHrpE/HrpZΔC33His, HisHrpO/HrpZΔC33His. Σε όλες τις περιπτώσεις οι πρωτεΐνες επώαστηκαν για 10' στον πάγο και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε μή αποδιατακτικό πήκτωμα

πολυακρυλαμίδης. Η τυχόν αλληλεπίδραση αναμενόταν να γίνει αντιληπτή με την υστέρηση της ραδιασημασμένης ζώνης παρουσία άλλης πρωτεΐνης, συγκρίνοντας την κινητικότητα της όταν ηλεκτροφορείται μόνη της. Η ανίχνευσή της έγινε με αυτοραδιογραφία. Στις περιπτώσεις που δεν υπήρχε ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη, η κινητικότητα των πρωτεϊνών και η τυχόν υστέρηση κάποιας παρουσία άλλης, παρακολουθήθηκε με χρώση του πηκτώματος με τη μέθοδο του αργύρου, ή με την ανοσοανίχνευση Western. Στην τελευταία περίπτωση παρακολουθείται μόνο η μία από τις δύο πρωτεΐνες.

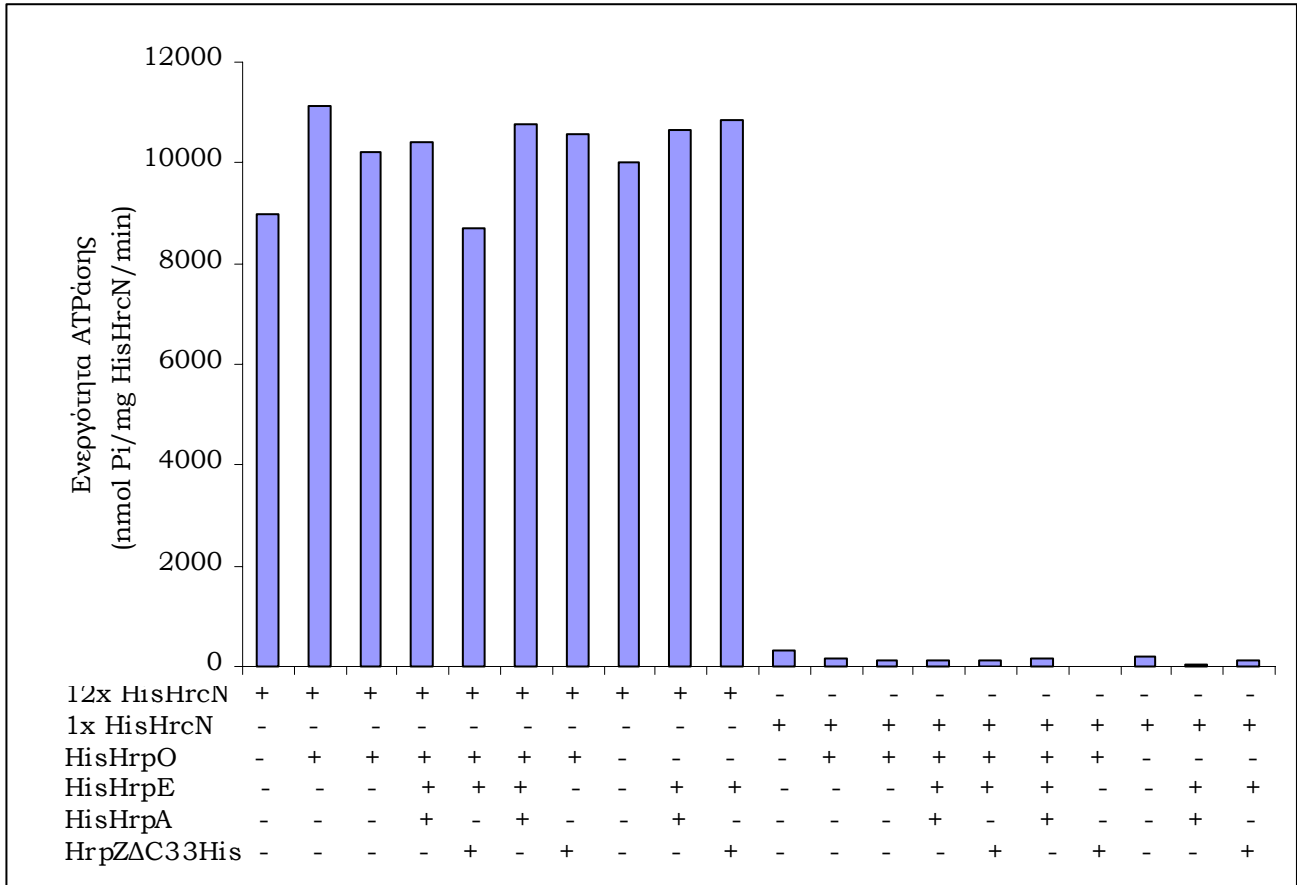
Σε αυτά τα πειράματα δεν στάθηκε δυνατό να παρατηρηθεί κάποια αλληλεπίδραση, είτε γιατί δεν υφίστανται τέτοιες απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις είτε γιατί αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι ασθενείς και οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν ήταν οι κατάλληλες.

### 3.4 Έλεγχος επιδράσεων των υποστρωμάτων και των πιθανών σαπερονών στην υδρολυτική ικανότητα της ATPάσης

Με σκοπό να απαντηθεί το ερώτημα αν οι προβλεπόμενοι κυτταροπλασματικοί παράγοντες, τα υποστρώματα και οι πιθανές σαπερόνες, επηρεάζουν την υδρολυτική ικανότητα του ενζύμου έγιναν δοκιμασίες υδρόλυσης ATP με τη μέθοδο του Πράσινου του Μαλαχίτη. Δοκιμάστηκε η υδρόλυση και από τις δύο μορφές της HisHrcN (μονομερική και ολιγομερική) που περιγράφησαν στο κεφάλαιο 2, παρουσία υποστρώματος, σαπερόνης ή και συνδυασμός των δύο, και σε διάφορες μοριακές αναλογίες. Στο **Σχήμα 14** φαίνονται οι διάφοροι συνδυασμοί και τα αποτελέσματα υδρόλυσης σε nmol Pi/mg HisHrcN/ min. Κανένας συνδυασμός που δοκιμάστηκε δεν φαίνεται να επηρεάζει την υδρόλυση του ATP από την ATPάση που είναι στα ίδια επίπεδα. Η μονομερική μορφή έχει πολύ χαμηλά επίπεδα υδρόλυσης ενώ η ολιγομερική πολύ υψηλά.

Αυτό το αποτέλεσμα σημαίνει ότι είτε οι πρωτεΐνες αυτές δεν αλληλεπιδρούν απ' ευθείας με την ATPάση, είτε ότι η αλληλεπίδραση δεν ρυθμίζει τα επίπεδα υδρόλυσης και η ενδεχόμενη ρύθμιση γίνεται μέσω άλλης οδού ή τέλος οι συνθήκες αντίδρασης δεν ήταν οι βέλτιστες δυνατές για να γίνει ορατό κάποιο αποτέλεσμα.





**Σχήμα 14 6** Ενεργότητα ATPάσης των δύο μορφών της HisHrcN (12x= ολιγομερική και 1x= μονομερής) παρουσία (+) ή μή (-) σαπερονών και υποστρώματων.

### 3.5 Συζήτηση

Η προσπάθεια να βρεθούν σύμπλοκα ανάμεσα σε γνωστά υποστρώματα, πιθανές σαπερόνες και την ATPάση με *in vitro* πειράματα δεν στέφθηκε με επιτυχία. Είναι πιθανό στο κύτταρο να δημιουργούνται σύμπλοκα στα οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες άλλες από αυτές που δοκιμάστηκαν. Επίσης είναι πιθανό οι πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν να μην έχουν την κατάλληλη διαμόρφωση που επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους. Η διαμόρφωση αυτή ίσως να απαιτεί την παρουσία μεμβράνης ή να είναι η ξεδιπλωμένη μορφή για τα υποστρώματα. Με σκοπό να βρεθούν πρωτεΐνες που ανήκουν ή όχι στο εκκριτικό σύστημα Τύπου III και που αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα και την ATPάση και ενδεχομένως να είναι σημαντικές για τη λειτουργία της έκκρισης, ακολουθήθηκε μία λιγότερο κατευθυνόμενη μεθοδολογία που περιλαμβάνει πειράματα *in vivo*.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

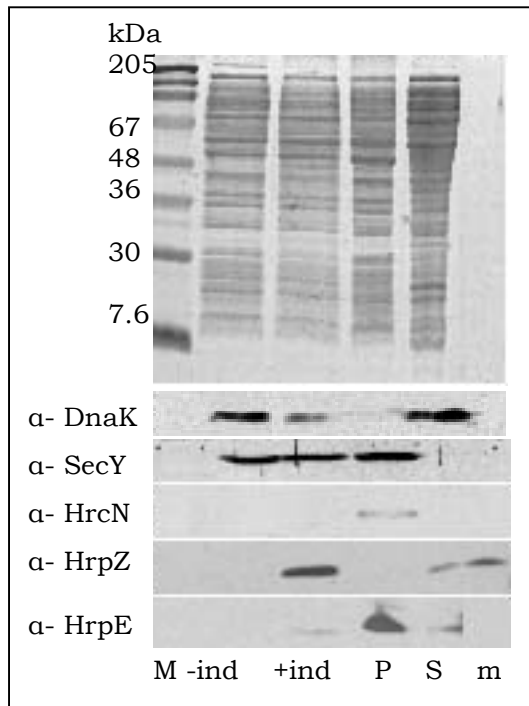
**4. Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών του συστήματος Τύπου III, *in vivo*****4.1** Εισαγωγή

Σκοπός των πειραμάτων που ακολουθούν ήταν να παρατηρηθούν και σε επόμενο στάδιο να απομονωθούν σύμπλοκα πρωτεϊνών που υπάρχουν στο ζωντανό κύτταρο της *P.s.phaseolicola*. Οι πρωτεΐνες που παρακολουθήθηκαν ήταν τα δύο υπόστρωματα HrpZ και HrpA και κυρίως η HrpZ, καθώς και η ΑΤΡάση HrcN που είναι κεντρικό μόριο του εκκριτικού συστήματος.

**4.2** Επαγωγή της σύνθεσης και τοπολογία πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος Τύπου III**α. Στο βακτήριο *P.s.phaseolicola***

Το βακτήριο αυτό είναι παθογόνο για το φυτό *Phaseolus vulgaris* και μη μολυσματικό για το φυτό *Nicotiana tabacum* που παρουσιάζει ανθεκτικότητα. Σε επαφή με τον πληγωμένο ιστό αυτού του φυτού επάγεται το εκκριτικό σύστημα Τύπου III και οι πρωτεΐνες Avr και HrpZ που ενύονται στα κύτταρα του φύλλου και στο διακυττάριο χώρο αντίστοιχα, προκαλούν την αντίδραση υπερευαισθησίας και το φαινόμενο νέκρωσης. Το εκκριτικό σύστημα Τύπου III της *P.s.phaseolicola* μπορεί να επαχθεί τεχνητά καλλιεργώντας το βακτήριο σε θρεπτικό μέσο που μιμείται το διακυττάριο χώρο των ιστών του φυτού. Αυτό το θρεπτικό μέσο είναι φτωχό, με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη και όξινο pH (54). Η επαγωγή του εκκριτικού συστήματος Τύπου III κάτω από αυτές τις συνθήκες πιστοποιήθηκε με την εμφάνιση των πρωτεϊνών HrcN και HrpZ στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα. Κλασμάτωση του κυττάρου αποκάλυψε ότι η HrcN εντοπίζεται κυρίως στο μεμβρανικό κλάσμα. Ένα μεγάλο τμήμα της HrpZ εντοπίζεται στο θρεπτικό μέσο, ενώ το υπόλοιπο είναι κυτταροπλασματικό. Οι υποψήφιες σαπερόνες φαίνεται HrpE και HrpO φαίνεται να υπάρχουν πριν την επαγωγή του συστήματος Τύπου III και η HrpE εντοπίζεται κυρίως στο μεμβρανικό τμήμα. Η DnaK που είναι γενική σαπερόνη του κυττάρου (6) χρησιμοποιήθηκε ως κυτταροπλασματικός μάρτυρας ενώ η SecY που είναι

μεμβρανικό συστατικό του εκκριτικού συστήματος Sec (7), αποτέλεσε το μεμβρανικό μάρτυρα (**Σχήμα 15**).



**Σχήμα 15.** Επαγωγή της σύνθεσης του TTS στη *P. s. phaseolicola*.

M= μάρτυρας μοριακών βαρών

-ind= Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πριν την επαγωγή

+ind= Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα μετά την επαγωγή

P= Ολικό μεμβρανικό εκχύλισμα μετά τη λύση των κυττάρων

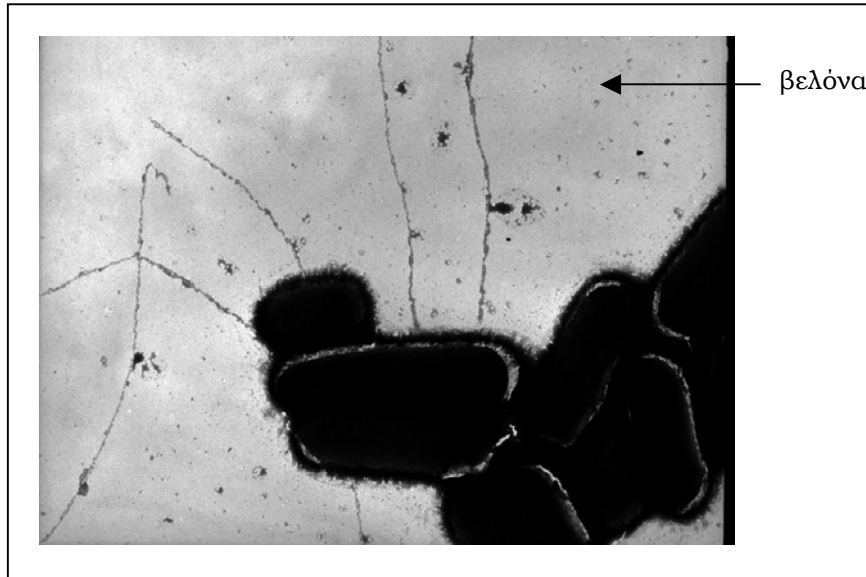
S= Ολικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα μετά τη λύση των κυττάρων

m= Θρεπτικό μέσον μετά την επαγωγή

### β. Στο βακτήριο *E. coli* MC4100 (pPY430 + pHrpL)

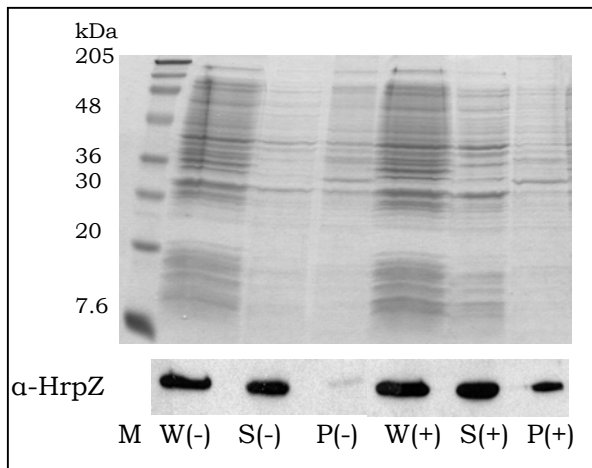
Προκειμένου να έχουμε ως πρότυπο οργανισμό για τη μελέτη του εκκριτικού συστήματος Τύπου III ένα βακτήριο που η φυσιολογία του είναι πολύ περισσότερο γνωστή από την *P.s.phaseolicola*, τα εργαλεία γενετικής, που ίσως χρειαστούν στο μέλλον, είναι ευρέως διαδεδομένα και το πρωτόκολλο ανάπτυξης και επαγωγής είναι πολύ πιο σύντομο, κατασκευάστηκε το παραπάνω βακτήριο (64) (στο εργαστήριο του κ. Mansfield, Wye College, University of London, UK). Αυτό το στέλεχος φέρει σε κοσμίδιο όλο το ρυθμιζόνιο της εκκριτικής μηχανής Τύπου III από τη *P.s.phaseolicola* καθώς και το γονίδιο *hrpL* στο φορέα Bluescript και υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lac*. Το γονίδιο *hrpL* επάγεται με προσθήκη IPTG στο θρεπτικό μέσο που αναπτύσσονται τα κύτταρα. Η πρωτεΐνη HrpL είναι ένας σ παράγοντας και είναι ο φυσικός ενεργοποιητής των γονιδίων του ρυθμιζονίου Τύπου III. Οπότε η προσθήκη IPTG έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του ρυθμιζονίου Τύπου III. Το βακτήριο αυτό προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα *Nicotiana*

*tabacum* (N. Ταμπακάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ο σχηματισμός της βελόνας του εκκριτικού συστήματος Τύπου III (**Σχήμα 16**) (Brown et al. αδημοσίευτα αποτελέσματα).

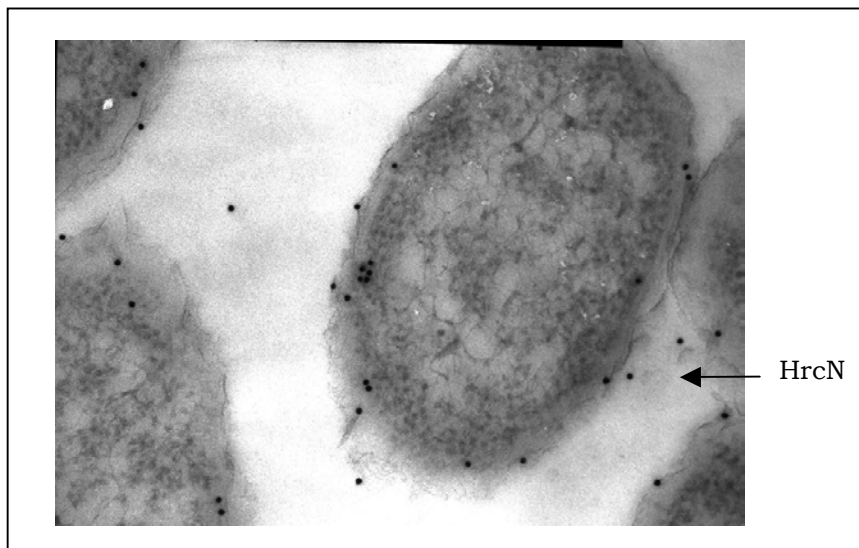


**Σχήμα 16** Ηλεκτρονική φωτογραφία κυττάρων *E. coli* στα οποία έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS και έχει σχηματιστεί «βελόνα». Brown et al. αδημοσίευτα αποτελέσματα

Προκειμένου να επιτευχθούν η μέγιστη παραγωγή της μεταθετάσης Τύπου III δοκιμάστηκαν διάφορες συνθήκες επαγωγής που αφορούσαν το θρεπτικό μέσο επαγωγής, τη διάρκεια της επαγωγής και το βακτηριακό στέλεχος. Πάντα παρακολουθείται η πρωτεΐνη HrpZ ως δείκτης επαγωγής του συστήματος που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταροπλασματικό τμήμα (**Σχήμα 17**). Δεν ήταν δυνατόν να ανιχνευθεί η πρωτεΐνη HrpZ στο περιβάλλον μέσο, είτε γιατί δεν απελευθερώνεται από τη μεμβράνη αποτελεσματικά (κάτι που δικαιολογεί τη μικρή παρουσία της στη μεμβράνη) είτε γιατί εκκρίνεται σε τόσο μικρά ποσά που χάνεται κατά τη διάρκεια παρασκευής του δείγματος. Επίσης κάποια ποσά HrpZ παράγονται και πριν την προσθήκη IPTG που σημαίνει ότι ο υποκινητής *lac* δεν είναι σε πλήρη καταστολή. Στο ίδιο στέλεχος και με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού) φαίνεται ότι η HrcN εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (**Σχήμα 18**) (Brown et al. αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το πρωτόκολλο επαγωγής είναι πολύ συντομότερο και η επαγωγή ικανοποιητική, επειδή όμως δεν ήταν σίγουρο ότι το στέλεχος αυτό είναι πλήρως λειτουργικό όσον αφορά τη διαδικασία έκκρισης Τύπου III δεν έγιναν περαιτέρω πειράματα με αυτό.



**Σχήμα 17.** Επαγωγή της σύνθεσης της HrpZ σε κύτταρα *E. coli*  
 M= μάρτυρας μοριακών βαρών  
 W(-)= Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πριν την επαγωγή  
 S(-)= Ολικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα πριν την επαγωγή  
 P(-)= Ολικό μεμβρανικό εκχύλισμα πριν την επαγωγή  
 W(+)= Ολικό κυτταρικό εκχύλισμα μετά την επαγωγή  
 S(+)= Ολικό κυτταροπλασματικό εκχύλισμα μετά την επαγωγή  
 P(+)= Ολικό μεμβρανικό εκχύλισμα μετά την επαγωγή

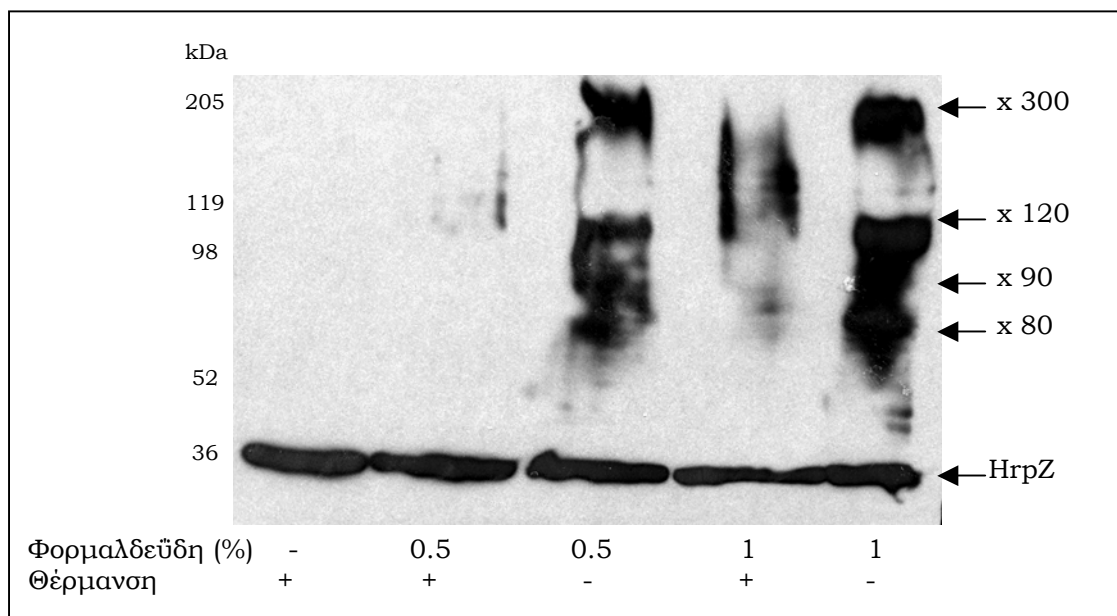


**Σχήμα 18.** Ηλεκτρονική φωτογραφία κυττάρων *E. coli* στα οποία έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS. Η HrcN εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυττάρου, με ανοσοσήμανση με σωματίδια χρυσού.  
 Brown et al. αδημοσίευτα αποτελέσματα

### 4.3 Ανίχνευση συμπλόκων στα οποία συμμετέχουν τα υποστρώματα

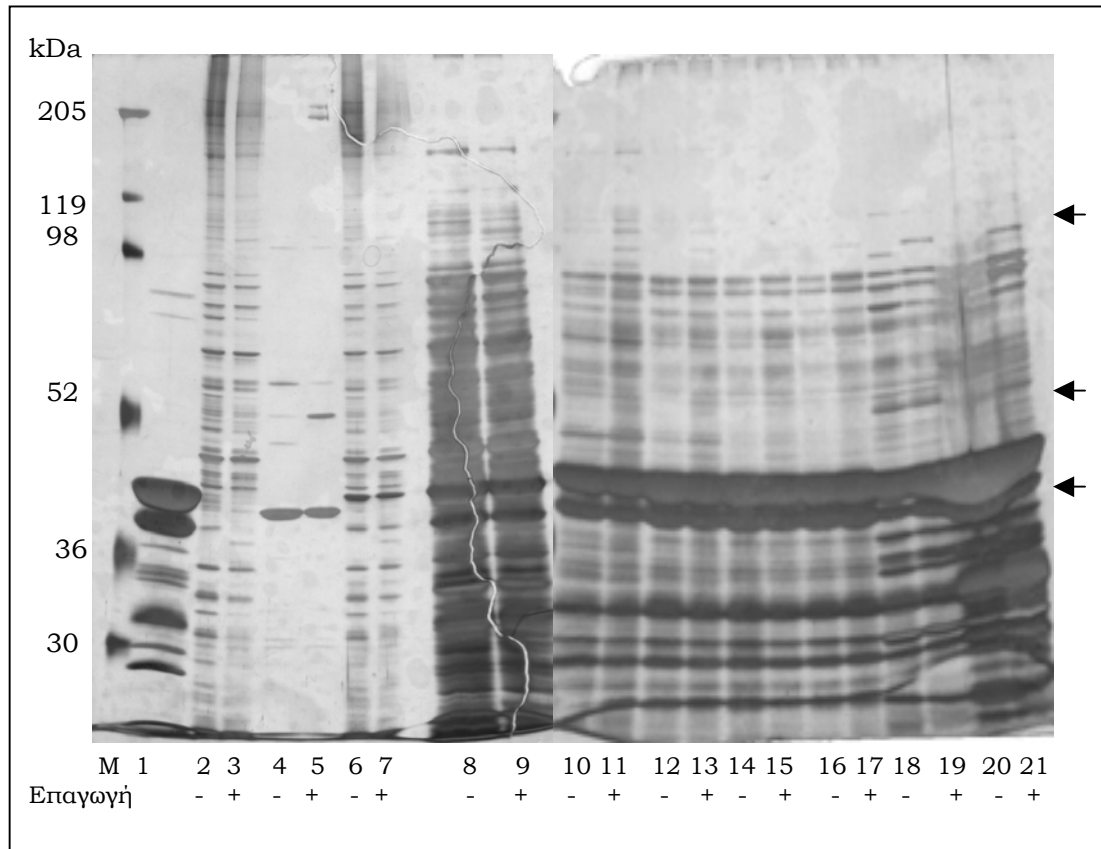
Προκειμένου να παρατηρηθούν συμπλοκα πρωτεϊνών που συμμετέχουν τα υποστρώματα προς έκκριση και έτσι να απομονωθούν πρωτεΐνες που είναι αναγκαίες για την μεταφορά τους έγιναν πειράματα χημικής διασύνδεσης σε

κύτταρα *P.s.phaseolicola* στα οποία έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS. Ολικό εκχύλισμα αυτών των κυττάρων ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και παρακολουθούνται οι πρωτεΐνες HrpZ και HrpA με αντισώματα. Όσον αφορά τη HrpZ παρατηρούμε 4 ζώνες που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη συμμετέχει πιθανά στο σχηματισμό 4 διαφορετικών ή διαδοχικών, ομομερών ή ετερομερών συμπλόκων (**Σχήμα 19**). Για να είναι πιο εύκολος ο υπολογισμός των μοριακών βαρών αυτών των συμπλόκων και για να καταστεί αργότερα πιο εύκολος ο καθαρισμός τους οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του ακινητοποιημένου κυτταρικού εκχυλίσματος διαχωρίστηκαν σε διαβάθμιση σουκρόζης.



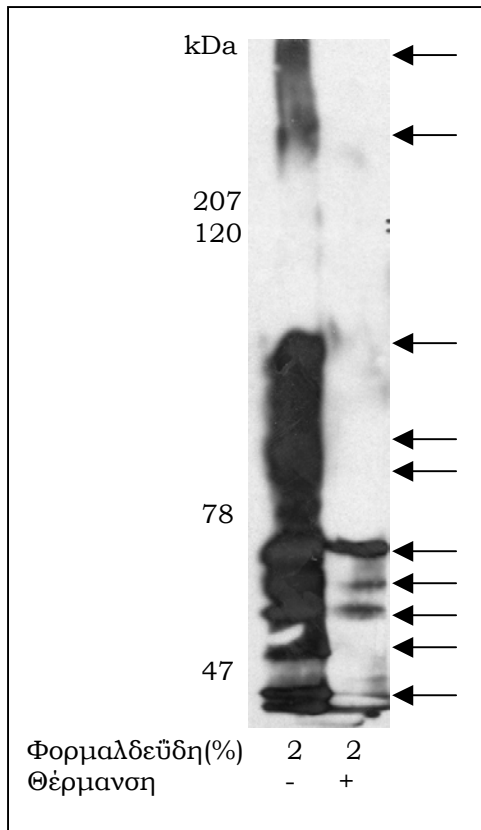
**Σχήμα 19.** Χημική διασύνδεση με φορμαλδεΰδη κυττάρων *P. s. phaseolicola* που έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS. Με θέρμανση καταστρέφεται η χημική διασύνδεση. Στην εικόνα παρακολουθείται η HrpZ με αντίσωμα α-HrpZ και σημειώνονται τα 4 σύμπλοκα που συμμετέχει.

Με σκοπό επίσης να βρεθούν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τη HrpZ ακινητοποιήθηκε σε σφαιρίδια αγαρόζης  $\text{Ni}^{+2}$ -NTA HrpZΔC33His και επώαστηκαν με κυτταροπλασματικό εκχύλισμα από κύτταρα *P.s.phaseolicola* μετά ή πριν την επαγωγή του συστήματος Τύπου III. Στη συνέχεια έγιναν διαδοχικές εκλούσεις με διαλύματα αυξανόμενης περιεκτικότητας σε χλωριούχο νάτριο. Παρόλο που με τη HrpZΔC33His αλληλεπιδρούν πολλές πρωτεΐνες που είναι κοινές στο κυτταρόπλασμα πριν και μετά την επαγωγή, υπάρχουν κάποιες που εμφανίζονται μόνο στο επηγμένο κυτταρόπλασμα (**Σχήμα 20**). Αυτές οι πρωτεΐνες θα πρέπει σε επόμενο στάδιο να ταυτοποιηθούν.



**Σχήμα 20.** Εντοπισμός κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από *P. s. phaseolicola* που έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS που αλληλεπιδρούν με τη HrpZΔC33His (σημειώνονται με βέλη)  
 M= μάρτυρας μοριακών βαρών 1= HrpZΔC33His σε ρητίνη  
 2/3= Κυτταρόπλασμα από κύτταρα πριν(-)/μετά(+) την επαγωγή  
 4/5= Πρωτεΐνες κυτταροπλάσματος που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με τη ρητίνη.  
 6/7= Πρωτεΐνες που δεν συγκατατήθηκαν στη ρητίνη που φέρει HrpZΔC33His.  
 8/9= Πρωτεΐνες κυτταροπλάσματος που απομακρύνθηκαν με τις πλύσεις  
 10/11= Εκλούση με 175mM NaCl 12/13= Εκλούση με 200mM NaCl  
 14/15= Εκλούση με 225mM NaCl 16/17= Εκλούση με 250mM NaCl  
 18/19= Εκλούση με 8M Ουρία 20/21= Εκλούση με 200mM Ιμιδαζόλιο

Η πρωτεΐνη HrpA παρακολούθηθηκε επίσης σε ολικό κυτταρικό εκχύλισμα που έχει ακινητοποιηθεί με τη μέθοδο της χημικής διασύνδεσης (**Σχήμα 21**). Το αποτέλεσμα είναι λιγότερο καθαρό από αυτό της HrpZ. Στο πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν δυνατόν να φανεί η μονομερής μορφή της πρωτεΐνης, ενώ οι ζώνες που φαίνονται μπορεί να αποτελούν σύμπλοκα του υποστρώματος με άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την έκκριση (π.χ σαπερόνες ή ΑΤΡάση) ή να είναι ολιγομερικές μορφές του εαυτού της, τμήμα του καναλιού έκκρισης. Μένει να ταυτοποιηθούν αυτά τα σύμπλοκα για να απαντηθεί το ερώτημα.



**Σχήμα 21.** Χημική Διασύνδεση κυττάρων *P. s. phaseolicola* που έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS. Παρακολουθείται η πρωτεΐνη HrpA με αντίσωμα α-HrpA. Με βέλη σημειώνονται τα σύμπλοκα που συμμετέχει.

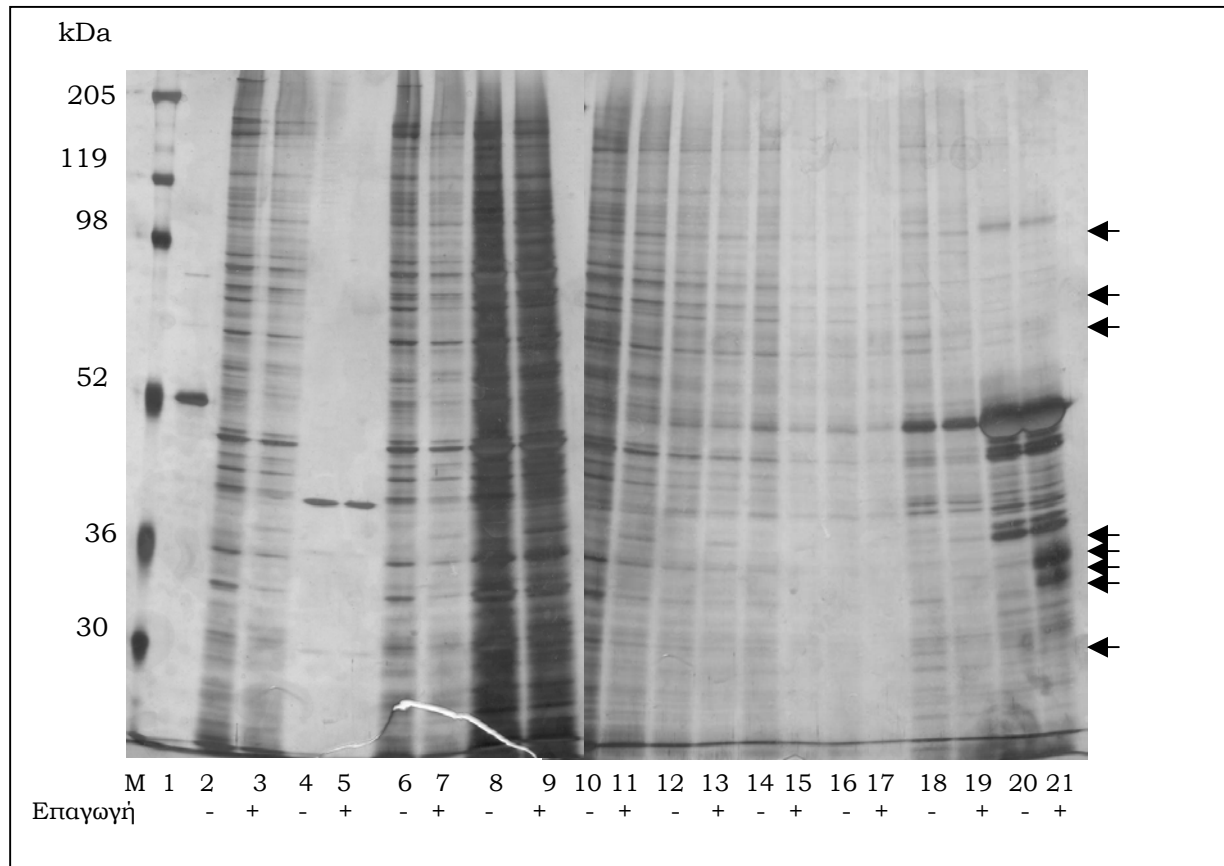
#### 4.4 Ανίχνευση συμπλόκων στα οποία συμμετέχει η ΑΤΡάση

Με σκοπό να ανιχνευθούν πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά η HrcN ακολουθήθηκαν δύο πειραματικές προσεγγίσεις, αντίστοιχες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για τη HrpZ. Στο πείραμα της χημικής διασύνδεσης *in vivo* που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (**Σχήμα 22**) και μένει να εξακριβωθεί αν στα σύμπλοκα που εμφανίζονται συμμετέχει και η HrcN, υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες που έχουν ρόλο στην εκκριτική διαδικασία Τύπου III. Τα σύμπλοκα αυτά πρέπει στη συνέχεια να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες που τα αποτελούν.

Η δεύτερη πειραματική προσέγγιση ήταν η ακινητοποίηση της HisHrcN σε ρητίνη αραρόζης Ni<sup>2+</sup>-NTA και η επώση αυτών με κυτταρόπλασμα από *P.s.phaseolicola* πριν ή μετά την επαγωγή του συστήματος Τύπου III. Εγιναν διαδοχικές εκλούσεις με διαλύματα αυξανόμενης αλατότητας, ουρίας και τέλος ιμιδαζολίου. Οι πρωτεΐνες που εκλούνται είναι πολλές και κοινές για το κυτταρόπλασμα πριν και μετά την επαγωγή, ωστόσο υπάρχουν καθαρά κάποιες



που εμφανίζονται μόνο στο κυτταρόπλασμα μετά την επαγωγή της σύμθεσης του TTS (**Σχήμα 10**). Αυτές οι πρωτεΐνες πρέπει να ταυτοποιηθούν και να αξιολογηθεί η σημαντικότητά τους για τη λειτουργία της έκκρισης.



**Σχήμα 22** Εντοπισμός κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από *P. s. phaseolicola* που έχει επαχθεί η σύνθεση του TTS που αλληλεπιδρούν με τη HisHrcN. Σημειώνονται με βέλη. M= μάρτυρας μοριακών βαρών 1= HisHrcN σε ρητίνη  
 2/3= Κυτταρόπλασμα από κύτταρα πριν(-)/μετά(+) την επαγωγή  
 4/5= Πρωτεΐνες κυτταροπλάσματος που αλληλεπιδρούν μή ειδικά με τη ρητίνη.  
 6/7= Πρωτεΐνες που δεν συγκατατήθηκαν στη ρητίνη που φέρει HisHrcN.  
 8/9= Πρωτεΐνες κυτταροπλάσματος που απομακρύνθηκαν με τις πλύσεις  
 10/11= Εκλουση με 175mM NaCl 12/13= Εκλουση με 200mM NaCl  
 14/15= Εκλουση με 225mM NaCl 16/17= Εκλουση με 250mM NaCl  
 18/19= Εκλουση με 8M Ουρία 20/21= Εκλουση με 200mM Ιμιδαζόλιο

#### 4.5 Συζήτηση

Τα πειράματα *in vivo* που έγιναν για να απαντήσουν το ερώτημα αν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες και η ATPάση συμμετέχουν σε σύμπλοκα είχαν θετικό αποτέλεσμα. Ειδικά με τη HrpZ και με τη HrcN εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν και υπάρχουν μόνο στο επηγμένο κυτταρόπλασμα. Επίσης φαίνεται ότι η HrpZ συμμετέχει σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που εμφανίζεται

μόνο στο ολικό εκχύλισμα και όχι στο κυτταροπλασματικό, αντίστοιχο με την εικόνα που εμφανίζει η HrcN. Ίσως να πρόκειται για το ίδιο σύμπλοκο και να είναι η ολιγομερική μορφή της HrcN που ίσως είναι συνδεδεμένη με τη μεμβράνη. Σημαντικό είναι να γίνει η ταυτοποίηση των συμπλόκων αυτών και να αξιολογηθεί η σημασία τους όσον αφορά τη λειτουργία της έκκρισης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5. Σύνοψη και Προοπτικές

Το εκκριτικό σύστημα Τύπου III των παθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον γιατί είναι μια πολύπλοκη μηχανή μεταφοράς τοξινών εξαιρετικού αρχιτεκτονικού σχεδιασμού. Είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένο στα δομικά και λειτουργικά συστατικά του μηχανισμού έκκρισης, σε όλα τα παθογόνα βακτήρια που δρουν με αυτόν τον τρόπο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η ομολογία του με το σύστημα κατασκευής του μαστιγίου και δίνει ενδείξεις για την προέλευσή του στην πορεία της εξέλιξης. Χαρακτηριστικό είναι επίσης και η μεγάλη εξειδίκευση που έχει όσον αφορά τα πολυπεπτίδια που εκκρίνει και είναι προσαρμοσμένα στη φυσιολογία του ξενιστή που μπορεί να είναι από τον άνθρωπο μέχρι τα φυτά. Λόγω της πολυπλοκότητας της είναι λίγα γνωστά για τον μηχανισμό της λειτουργίας αυτής της εκκριτικής συσκευής σε βιοχημικό επίπεδο και τα ερωτήματα που μπορούν να τεθούν είναι πολλά και βασικής σημασίας.

#### 5.1 Ολιγομερική κατάσταση της ΑΤΡάσης HrcN

Ένα από τα βασικά συστατικά του μονοπατιού είναι η ΑΤΡάση που απουσία της δεν γίνεται έκκριση (28). Είναι η πρώτη φορά που χαρακτηρίζεται η ΑΤΡάση του TTS ως ένζυμο αλλά ο ρόλος της δεν είναι ακόμη κατανοητός. Τα πειράματα διερεύνησης της ολιγομερικής κατάστασης της HrcN δίνουν ενδείξεις για πρώτη φορά ότι η ΑΤΡάση του TTS σχηματίζει ολιγομερή. Αυτό φάνηκε τόσο με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη με ακροφύσιο His όσο και με την πρωτεΐνη στο ζωντανό κύτταρο με πειράματα χημικής διασύνδεσης. Παλαιότερα πειράματα με την ΑΤΡάση από το σύστημα του μαστιγίου δεν είχαν δώσει τέτοια στοιχεία και είχαν δείξει ότι η πρωτεΐνη είναι μονομερής (56). Ενδεχομένως η πειραματική προσέγγιση να μην ήταν ικανή να αποκαλύψει τις ολιγομερικές μορφές ή οι πρωτεΐνες στα διαφορετικά συστήματα να είναι διαφορετικές. Ωστόσο τα πειράματα εκείνα έγιναν μόνο με βακτηριακά καθαρισμένη πρωτεΐνη που λόγω της υπερέκφρασης είναι δυνατόν να σχηματιστεί ίζημα γεγονός που παρατηρούμε και εμείς, εκτός από τη μορφή των ~600kDa. Τα πειράματα όμως στο ζωντανό κύτταρο, που η έκφραση της ΑΤΡάσης είναι πολύ μικρή και δεν υπάρχει το ενδεχόμενο σχηματισμού ιζήματος λόγω υπερέκφρασης, καθώς και το γεγονός ότι η ολιγομερική μορφή είναι ~700 φορές πιο ενεργή από τη

μονομερική μορφή είναι στοιχεία που δείχνουν ότι η ολιγομερής HrcN πιθανότατα να έχει φυσιολογικό ρόλο. Επίσης πρωταρχικά πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της ολιγομερικής μορφής της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HisHrcN έδειξαν ότι έχει οργανωμένη μορφή δακτυλίου και δεν είναι μεγάλα άμορφα πρωτεϊνικά στοιχεία. Ο ολιγομερισμός είναι ένα σημαντικό εύρημα και ίσως σχετίζεται και με την ομολογία της πρωτεΐνης με την υπομονάδα  $F_1$  της ATPάσης  $F_1F_0$  που είναι εξαμερής. Ενδεχομένως το ολιγομερές ( $\sim 600\text{kDa} = 12 \times \text{HrcN}$ ) που παρατηρούμε να αποτελείται από δύο εξαμερικές υπομονάδες. Η σημασία του ολιγομερισμού για τη λειτουργία της έκκρισης είναι στα άμεσα ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν.

## 5.2 Σύμπλοκα με την ATPάση και τα υποστρώματα

Τα σύμπλοκα που παρατηρούνται με τα πειράματα χημικής διασύνδεσης, στα οποία εντοπίζεται η HrcN είναι πολύ πιθανό να είναι ετερομερή και εκτός από πολλά αντίτυπα της ATPάσης να αποτελούνται από υποστρώματα προς έκκριση ή άλλες πρωτεΐνες με βοηθητικό ή ρυθμιστικό ρόλο καθώς και δομικά συστατικά της μεταθετάσης, όπως έχει δειχθεί σε κάποιες περιπτώσεις στο σύστημα του μαστιγίου (30, 31, 32). Το πιθανότερο είναι ότι η ολιγομερική μορφή δεν υπάρχει ή κρατιέται ανενεργή, προκειμένου να μην εξαντληθούν όλα τα αποθέματα ενέργειας στο κύτταρο, μέχρι τη στιγμή που η ενέργεια που παράγεται να χρησιμοποιηθεί για την έκκριση. Το έναυσμα ίσως είναι η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα ή κάποια πρωτεΐνη που οδηγεί το υπόστρωμα στην εκκριτική μηχανή. Η υπόθεση ότι μπορεί να αλληλεπιδρά με μεμβρανικά συστατικά του μονοπατιού στηρίζεται και από το γεγονός ότι η HrcN εντοπίζεται στο μεμβρανικό κλάσμα στα πειράματα κλασμάτωσης και εκεί ίσως να βρίσκεται σε επαφή με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες της εκκριτικής μηχανής. Στο σύστημα του μαστιγίου έχει δειχθεί ότι η ATPάση αλληλεπιδρά με πρωτεΐνη ομόλογη της υποψήφιας σαπερόνης HrpE και καταστέλει τη δραστηριότητά της (32). Τα πειράματα χημικής διασύνδεσης στα οποία παρακολουθούνται τα υποστρώματα έδειξαν ότι και αυτά συμμετέχουν σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα που ίσως να είναι η ATPάση ή και άλλες πρωτεΐνες που έχουν βοηθητικό ρόλο. Σε διάφορα άλλα συστήματα έχει δειχθεί ότι υποστρώματα αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες πρωτεΐνες που έχουν ρόλο σαπερόνης και είναι απαραίτητες για την έκκριση των υποστρωμάτων (30, 31). Τα σύμπλοκα που εντοπίστηκαν μένει τώρα να ταυτοποιηθούν και να διερευνηθεί η σημαντικότητα και αναγκαιότητά τους για τη λειτουργία της έκκρισης.

### 5.3 Μελλοντικά σχέδια

Όσον αφορά το ρόλο και τη λειτουργία της ΑΤΡάσης τα βασικά ερωτήματα που τίθενται είναι πού βρίσκεται τη στιγμή της έκκρισης και με ποιές πρωτεΐνες αλληλεπιδρά, αν είναι αυτή που δίνει την ενέργεια για την μεταφορά των υποστρωμάτων ή η ενέργεια που παράγει χρησιμοποιείται για τυχόν άλλες δομικές αλλαγές του καναλιού και πώς δουλεύει αυτή καθ' εαυτή ως ένζυμο. Επίσης βασικό είναι να διερευνηθεί ο ρόλος και η ρύθμιση του ολιγομερισμού. Όλα αυτά τα ερωτήματα είναι σημαντικό να απαντηθούν προκειμένου να αποκαλυφθεί ο μηχανισμός της έκκρισης.

Σημαντικό για να απαντηθούν πολλά ερωτήματα είναι να αναπτυχθεί ένα *in vitro* σύστημα έκκρισης TTS όπου όλα τα απαραίτητα συστατικά θα είναι *in vitro* παρασκευασμένα και θα προστίθενται σε δοκιμαστικό σωλήνα, για παράδειγμα η ΑΤΡάση, το υπόστρωμα, μεμβράνες από κύτταρα που έχει συντεθεί το TTS και φέρουν τα δομικά συστατικά της μεταθετάσης και άλλες τυχόν απαραίτητες πρωτεΐνες όπως είναι οι σαπερόνες. Έτσι θα έχουμε στη διάθεσή μας το ελάχιστο ικανό και αναγκαίο σύστημα έκκρισης και θα είναι δυνατό να μελετηθούν η σημασία άλλων παραγόντων στην έκκριση, να τεθούν ερωτήματα για τον τρόπο λειτουργίας του ενζύμου παρακολουθώντας μεταλλάγματά του ίδιου, του υποστρώματος ή ενδεχόμενης ρυθμιστικής πρωτεΐνης.

**ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ****6. Υλικά και Μέθοδοι****6.1 Συνθήκες καλλιέργειας βακτηρίων και επαγωγή της σύνθεσης του εκκριτικού συστήματος Τύπου III****α. *Pseudomonas syringae phaseolicola***

Από πρόσφατη στερεή καλλιέργεια σε LB (~48 ώρες, 28-30°C) μολύνουμε με 2-3 αποικίες δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 5ml LB και αντιβιοτικό ριφαμπικίνη στην οποία έχει ανθεκτικότητα το εργαστηριακό στέλεχος. Μετά από ανάπτυξη για 16 ώρες στους 28°C αραιώνουμε τις καλλιέργειες 1/50 σε θρεπτικό μέσο KB και αφήνουμε να αναπτυχθούν στους 28°C (OD<sub>600</sub> να γίνει ~0.8, 10 ώρες). Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 4000rpm για 10' σε στείρες συνθήκες. Ξεπλένονται με θρεπτικό μέσο επαγωγής επαναδιαλύοντας το ίζημα σε αυτό και φυγοκεντρώντας ξανά στις ίδιες συνθήκες. Η επαγωγή του συστήματος γίνεται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε διπλάσιο όγκο θρεπτικού μέσου επαγωγής ώστε η OD<sub>600</sub> να γίνει ~0.4 και αφήνουμε τα κύτταρα να εκφράσουν το ρυθμιζόνιο Hrp/Hrc για 14 ώρες στους 28°C. Τα κύτταρα έχουν κάνει ένα διπλασιασμό και η OD<sub>600</sub> πρέπει να είναι ~0.8.

**β. *E. coli* MC4100 (pPY430 + pHrpL)**

Το στέλεχος αυτό αναπτύσσεται σε μπουκάλι φυγοκέντρησης, ερμητικά κλειστό, σε θρεπτικό μέσο LB (30ml αν πρόκειται για μικρό μπουκάλι και 300ml αν πρόκειται για μεγάλο). Έχει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη (120μg/ml) και στην τετρακυκλίνη (25μg/ml). Η διαδικασία που ακολουθείται για να επαχθεί το εκκριτικό σύστημα Τύπου III έχει ως εξής. Από τα κύτταρα που διατηρούνται στους -20°C σε 20% γλυκερόλη μολύνουμε το θρεπτικό μέσο LB (30ml ή 300ml, ανάλογα το μπουκάλι) που περιέχει τα αντιβιοτικά. Αφήνουμε να αναπτυχθεί στους 37°C, 150rpm για περίπου ~20 ώρες και μέχρι η OD<sub>600</sub> να είναι ~0.5. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 4000rpm και επαναδιαλύουμε στο μισό από το αρχικό όγκο LB που περιέχει αντιβιοτικά και 1mM IPTG. Αφήνουμε τα κύτταρα να επάγουν το εκκριτικό σύστημα Τύπου III στους 28°C, 150rpm για 2.5 ώρες.

### Θρεπτικά μέσα

LB: 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Agar (στο στερεό θρεπτικό μέσο)

KB: 2% Peptone, 8.5mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5% Glycerol

Hrp Inducing: 50mM Potassium Phosphate pH 5.7, 7.6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.7mM NaCl, 1.7mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM Fructose

## **6.2** Συνθήκες έκφρασης και καθαρισμού των πρωτεϊνών

Σε κάθε περίπτωση ξεκινάμε από πρόσφατη στερεή καλλιέργεια βακτηρίων που φέρουν το γονίδιο που θέλουμε να εκφραστεί σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Μολύνουμε μικρή ποσότητα (2-5 ml) θρεπτικού υλικού LB που περιέχει τα αντιβιοτικά στα οποία έχουν αντίσταση τα βακτήρια. Μετά από ανάπτυξη 16 ωρών στους 37°C αραιώνουμε την καλλιέργεια 100 φορές στο ίδιο θρεπτικό μέσο και αφήνουμε να μεγαλώσει μέχρι η OD<sub>600</sub> να είναι 0.6-0.8. Στη συνέχεια προσθέτουμε IPTG και αφήνουμε να εκφραστεί η υβριδική πρωτεΐνη. Οι συνθήκες ποικίλουν ανάλογα τις ιδιότητές της. Όλες οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν στο στέλεχος *E. coli* BL21(DE3)pLysS το οποίο έχει ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη. Ο φορέας pET16b που είναι κλωνοποιημένα όλα τα γονίδια εκτός από το *hrpZΔC* εκφράζει το γονίδιο ανθεκτικότητας της αμπικιλίνης, ενώ ο φορέας pET26b που έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο *hrpZΔC* εκφράζει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη.

### α. HisHrcN

Η επαγωγή γίνεται με 0.1 mM IPTG, στους 22°C, για 3 ώρες. Ιζημα κυττάρων από 1lt καλλιέργεια επαναδιαλύεται σε 20ml Sonication Buffer. Τα κύτταρα λύνονται με υπερήχους και το κυτταρόπλασμα διαχωρίζεται από τα μεμβρανικά υπολοίματα με φυγοκέντρηση στις 14000rpm. Το κυτταρόπλασμα περνάει από κολώνα συγγενείας Ni<sup>2+</sup>-NTA (~ 0.5ml που έχει προηγουμένως εξισοροποιηθεί με Sonication Buffer. Η κολώνα ξεπλένεται με 40 όγκους Sonication Buffer που περιέχει 40mM Ιμιδαζόλιο και η πρωτεΐνη εκλύεται σε 1x BB, 10% γλυκερόλη, 150mM Ιμιδαζόλιο. Το ιμιδαζόλιο φεύγει με διάλυση σε 1x BB, 20% γλυκερόλη και 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Προκειμένου να διαχωριστούν οι μορφές της πρωτεΐνης το δείγμα χρωματογραφείται με τη μέθοδο της Μοριακής Διήθησης σε κολώνα Superose 600 σε διάλυμα που περιέχει 50mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl και 10% γλυκερόλη.

### β. HisHrpO και HisHrpA

Η επαγωγή γίνεται με 0.2 mM IPTG, στους 37°C για 3 ώρες. Το πρωτόκολλο καθαρισμού είναι ίδιο με αυτό της HisHrcN. Υπάρχει ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού προκειμένου να φύγει η πρωτεΐνη Hsp70 που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και περιλαμβάνει την επώαση της καθαρής πρωτεΐνης με 1mM ATP, για 15' στους 28°C σε 1x BB. Στη συνέχεια επαναλαμβάνεται η διαδικασία καθαρισμού από κολώνα συγγενείας Ni-NTA.

### γ. HrpZΔC33His

Η επαγωγή γίνεται με 0.1mM IPTG, στους 22°C για 6 ώρες. Το πρωτόκολλο καθαρισμού είναι ίδιο με παραπάνω, εκτός του ότι το ξέπλυμα της κολώνας πριν την έκλουση γίνεται με Sonication Buffer που περιέχει 20mM Ιμιδαζόλιο. Το στάδια επώασης με 1mM ATP είναι απαραίτητα και σε αυτόν τον καθαρισμό.

### δ. HisHrpE

Η επαγωγή γίνεται με 0.1mM IPTG, στους 37°C για 1.5 ώρα. Επειδή η πρωτεΐνη που εκφράζεται στα κύτταρα εντοπίζεται σε έγκλειστα σωματίδια τα οποία δεν είναι διαλυτά συγκατακρημνίζονται με τα μεμβρανικά υπολείματα μετά τη λύση των κυττάρων με υπερήχους και τη φυγοκέντρωσή τους. Το ίζημα μετά από τη φυγοκέντρωση επαναδιαλύεται σε Διάλυμα 1x BB, 1M NaCl, 10mM Ιμιδαζόλιο και 6M Ουρία και περνάει από κολώνα συγγενείας Ni-NTA που έχει εξισορροπηθεί στο ίδιο διάλυμα. Η κολώνα ξεπλένεται με 40 όγκους από το παραπάνω διάλυμα που όμως περιέχει 20mM Ιμιδαζόλιο. Η έκλουση γίνεται σε διάλυμα 1x BB, 6M Ουρία και 150mM Ιμιδαζόλιο. Η επαναδιάταξη της πρωτεΐνης γίνεται σταδιακά με διάλυση σε 1x BB, 10mM β-μερκαπτοαιθανόλη που περιέχει ελαττούμενες συγκεντρώσεις Ουρίας μέχρι η συγκέντρωση της Ουρίας να μηδενιστεί.

### Διαλύματα

10x Buffer B: 500mM Tris-Cl pH 8, 500mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT

Sonication Buffer: 1x Buffer B, 1M NaCl, 10% Glycerol,

10mM Imidazol (ή όπου είναι διαφορετικό σημειώνεται),

10mM β-mercaptoethanol



### 6.3 Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, η χρώση με το Μπλε της Κουμμάσης, χρώση Αργύρου, η ανάλυση κατά Western και η ποσοτικοποίηση με Bradford έγιναν σύμφωνα με Sambrook et al (65). Στο πείραμα υπολογισμού των  $K_m$  και  $V_{max}$ , που οι μορφές της πρωτεΐνης χρειάστηκε να διαχωριστούν με Μοριακή Διήθηση, η ποσοτικοποίηση έγινε με τη μέθοδο του Scan Densitometry. Τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω αραιώσεις. Οπου παρασκευάζονται μονοειδικά IgGs η μέθοδος αναφέρεται στο Burke, B et al (1982), EMBO J., 1, 1621-1628.

<b>Αντισώματα</b>	<b>Αραίωση</b>
α-His	1/5000
α-HrcN (monospecific IgG)	1/2000
α-HrpE	1/5000
α-HrpO	1/30000
α-HrpA (monospecific IgG)	1/2000
α-HrpZ	1/100000
α-SecB	1/30000
α-SecY	1/10000
α-DnaK	1/100000
Hrp α-mouse IgG	1/20000
Hrp α-rabbit IgG	1/50000

### 6.4 Δοκιμασίες υδρόλυσης ATP

Οι δοκιμασίες υδρόλυσης ATP έγιναν με τη μέθοδο του Πράσινου του Μαλαχίτη. Ο  $P_i$  που απελευθερώνεται από την αντίδραση αντιδρά με το διάλυμα MGR. Η ποσότητα του φωσφόρου (από 0.65 nmol ως 16.25 nmol) που αντιδρά είναι ευθέως ανάλογη με την απορρόφηση στα 660nm. Μια καθιερωμένη αντίδραση περιλαμβάνει 0.5μg HisHrcN, 1mM ATP, 1xBB και 0.4mg/ml BSA. Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 50μl, στους 28°C για 10'. Οπουδήποτε οι συνθήκες ήταν διαφορετικές αναφέρονται στο κείμενο. Η αντίδραση σταματά μεταφέροντας το δοκιμαστικό σωλήνα στον πάγο και προσθέτοντας 800μl MGR. Η αντίδραση του  $P_i$  με το MGR σταματά με 100μl 37% κιτρικού οξέος.

### Διαλύματα

MGR: 50ml MGSS, 250μl 20% Triton

MGSS (1lt): 340mg Malachite Green (Sigma) σε 75ml H<sub>2</sub>O αναμιγνύονται με διάλυμα 250ml (86.2ml συγκεντρωμένο HCl + 163.8ml H<sub>2</sub>O) 4N HCl που περιέχει 10.5gr Ammonium Molybdate. Προστίθεται H<sub>2</sub>O μέχρι τον όγκο του 1lt. Αναδεύεται σε θερμοκρασία 4°C μέχρι να γίνει διαυγές.

## 6.5 Χημική Διασύνδεση

### α. *in vitro*

Η χημική διασύνδεση της πρωτεΐνης HisHrcN *in vitro* έγινε με τη χρήση ομοδιλειτουργικού μορίου DSP (από την εταιρία Pierce). 6μg πρωτεΐνης αντέδρασαν με 0.5μg DSP σε 1x BH σε 50 μl τελικό όγκο. Η αντίδραση γίνεται για 15' στον πάγο και σταματά με την προσθήκη 5μl 1M Tris pH 8 για 5'. Το διάλυμα DSP παρασκευάζεται ζυγίζοντας 2mg χημικού, διαλυτοποιώντας το σε 100μl DMSO και στη συνέχεια αραιώνοντάς το σε 20ml 1x BH. Από αυτό χρησιμοποιούνται 5μl/50μl αντίδρασης. Η μοριακή αναλογία πρωτεΐνης/DSP είναι 1/10 αντίστοιχα. Με την προσθήκη ίσου όγκου 2x SDS Loading Buffer που περιέχει αναγωγικό μέσο και τη θέρμανση στους 97°C για 5' η αντίδραση της χημικής διασύνδεσης αντιστρέφεται.

### β. *in vivo*

Η χημική διασύνδεση *in vivo* έγινε σε ίζημα κυττάρων *Pseudomonas syringae phaseolicola* που είχε επαχθεί το εκκριτικό σύστημα Τύπου III. Ιζημα κυττάρων που προέρχεται από καλλιέργεια 100ml OD600 0.8-0.9 επαναδιαλύθηκε σε 500μl 1x BH και σε αυτό προστέθηκε το αντιδραστήριο χημικής διασύνδεσης. Ως τέτοιο χρησιμοποιήθηκε είτε το ομοδιλειτουργικό μόριο DSP σε τελική συγκέντρωση από 1mM ως 3mM, είτε η φορμαλδεΐδη σε τελική συγκέντρωση 0.5-2.5%. Η αντίδραση και στις δύο περιπτώσεις έγινε στους 24°C για 40' και σταμάτησε με 150mM γλυκίνη (10' στους 24°C). Προκειμένου να καταστραφεί η χημική διασύνδεση στην περίπτωση του DSP το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο 2x SDS Loading Buffer που περιέχει αναγωγικό μέσο και θερμάνθηκε στους 97°C για 5', ενώ στην περίπτωση της φορμαλδεΐδης αρκεί η θέρμανση για 5' στους 97°C.

### Διαλύματα

10x BH: 500mM Hepes pH 8, 500mM KCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>

2x SDSLoading Buffer: 0.1M Tris pH6.8, 0.2M DTT, 4% SDS, 20% Γλυκερόλη.

## 6.6 Ανάλυση κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος με τη μέθοδο της Διαβάθμισης Σουκρόζης.

Τα κύτταρα, που προηγουμένως είχαν υποστεί χημική διασύνδεση, φυγοκεντρήθηκαν στις 6000rpm και επαναδιαλύθηκαν σε 1ml διαλύματος που περιείχε 25mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 50mM γλυκόζη, 2mM PMSF και 1mg/ml λυσοζύμη. Το δείγμα αφήνεται για 0.5 ώρα στον πάγο για να δράσει η λυσοζύμη και στη συνέχεια τα κύτταρα λύνονται με μηχανικό τρόπο (50x douncing). Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 50000rpm, 20' για να διαχωριστούν τα κυτταρικά υπολείματα από το κυτταρόπλασμα. 200μl από το υπερκείμενο φορτώνεται σε βαθμίδωση σουκρόζης.

Η βαθμίδωση σουκρόζης είναι συνολικά 2ml και αποτελείται από 5 στρώματα των 400μl αυξανόμενης πυκνότητας, από πάνω προς τα κάτω. Η σουκρόζη επαναδιαλύεται σε διάλυμα που περιέχει 25mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 50mM γλυκόζη, 200mM NaCl, 0.1% NP40, 0.2mM PMSF, 0.1mM DTT. Η βαθμίδωση σχηματίζεται και αφήνεται να ομαλοποιηθεί με διάχυση, στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια φορτώνεται το δείγμα και ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 50000 rpm, για 14 ώρες, στους 4°C. Συλλέγονται δείγματα των 100μl.

## 6.7 Δοκιμασίες αλληλεπίδρασης των HisHrcN και HrpZΔC33His με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

Ιζημα από καλλιέργεια 100ml κυττάρων ( $OD_{600} = 0.8$ ) *P.s.phaseolicola* στα οποία έχει επαχθεί ή όχι το εκκριτικό σύστημα Τύπου III επαναδιαλύονται σε 10 ml Lysis Buffer και λύνονται με υπερήχους. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση στις 50000rpm για 20' για να κατακρημνιστούν τα μεμβρανικά υπολείματα και το υπερκείμενο επώαζεται με ρητίνη αγαρόζης  $Ni^{2+}$ -NTA για να απαλοιφθούν πρωτεΐνες που έχουν μη ειδική συνάφεια με τη ρητίνη. Η επώαση γίνεται στους 4°C για 1 ώρα. Το κυτταρόπλασμα (1ml) στη συνέχεια επώαζεται με ρητίνη αγαρόζης  $Ni^{2+}$ -NTA (100μl) που έχει προσδεθεί σε περίσσεια πρωτεΐνη με ακροφύσιο πολυϊσοτιδινών, για 2 ώρες στους 4°C. Η ρητίνη ξεπλένεται με 40x τον όγκο της με Lysis Buffer και στη συνέχεια ακολουθούν διαδοχικές εκλούσεις των πρωτεϊνών που συγκρατήθηκαν με 500μl διαλυμάτων

αυξανόμενης αλατότητας, προσθήκη ουρίας και τέλος προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης Ιμιδαζολίου. Η σύσταση των διαλυμάτων είναι ίδια για τις δύο περιπτώσεις πρωτεϊνών με ακροφύσιο His εκτός από τη συγκέντρωση του Ιμιδαζολίου, που για τη HisHrcN είναι 40mM ενώ για την περίπτωση της HrpZΔC33His που είναι 10mM.

#### Διαλύματα

Lysis Buffer: 1x BB, 150 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο, 2mM PMSF

Elution Buffer 1: 1x BB, 175 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο

Elution Buffer 2: 1x BB, 200 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο

Elution Buffer 3: 1x BB, 225 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο

Elution Buffer 4: 1x BB, 250 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο

Elution Buffer 5: 1x BB, 250 mM NaCl, 10/40mM Ιμιδαζόλιο, 8M Ουρία

Elution Buffer 6: 1x BB, 250 mM NaCl, 200mM Ιμιδαζόλιο, 8M Ουρία

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Economou, A. (1998). *Mol. Microbiol.* 27 (3), 511-518.
2. Economou, A. (1999). *Trends Microbiol.* 7 (8), 315-320.
3. Pohlschroder, M., Prinz, W.A., Hartmann, E. and Beckwith, J. (1997). *Cell* 91, 563-566.
4. Fekkes, P., van der Does, C. and Driessen, A.J.M. (1997). *EMBO J.* 16, 6105-6113.
5. Bochkareva, E.S., Solovieva, M.E. and Girshovich, A.S. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 478-483.
6. Wild J., Rossmeyssl P., Walter W.A., Gross C.A. (1996). *J. Bacteriol.* 178, 3608-13.
7. Meyer T.H., Menetret, J.F., Breitling, R., Miller, K.R., Akey, C.W., Rapoport, T.A. (1999). *J. Mol. Biol.* 285 (4), 1789-1800.
8. Economou, A. and Wickner, W. (1994). *Cell* 78 (5), 835-843.
9. Economou, A., Pogliano, J.A., Beckwith, J., Oliver, D.B. and Wickner, W. (1995.) *Cell* 83, 1171-1181.
10. Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A.S. and Economou, A. (1999). *Mol. Microbiol.* 34, 1133-1145.
11. Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Repanas, K., Kyripides, N., Politou, A.S. and Economou, A. (2001). *EMBO J.* 20, 961-970.
12. Duong, F., and Wickner, W. (1997). *EMBO J.* 16, 2756-2768.
13. Paetzel, M., Dalbey, R.E., Strynadka, N.C. (1998). *Nature* 396 (6707), 186-190.

- 
14. Hueck, C. (1998). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 379–433.
  15. Macnab, R.M. (1996). Flagella and motility, In F. C. Neidhart et al. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 123-145.
  16. Lowe, G., Meister, M., and Berg, H.C. (1987). *Nature* 325, 637–640.
  17. Manson, M.D., Tedesco, P., Berg, H.C., Harold, F.M., and van der Drift, C. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3060–3064.
  18. Ikeda, T., Oosawa, K. and Hotani, H. (1996). *Mol. Biol.* 259, 679-686.
  19. Jones, C. J., and Macnab, R.M. (1990). *J. Bacteriol.* 172, 1327–1339.
  20. Jones, C.J., Homma, M., and Macnab, R.M. (1989) *J. Bacteriol.* 171, 3890–3900.
  21. Ueno, T., Oosawa, K., and Aizawa, S.-I. (1992). *J. Mol. Biol.* 227, 672–677.
  22. Zhou, J.D., Lloyd, S.A., and Blair, D.F. (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6436–6441.
  23. Katayama, E., Shiraishi, T., Oosawa, K., Baba, N., and Aizawa, S.-I. (1996). *J. Mol. Biol.* 255, 458-475.
  24. Francis, C.L., Starnbach, M.N., and Falkow, S. (1992). *Mol. Microbiol.* 6, 3077–3087.
  25. Sockett, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V.M., and Macnab, R.M. (1992). *J. Bacteriol.* 174, 793-806.
  26. Toker, A.S., and Macnab, R. M. (1997). *J. Mol. Biol.* 273, 623–634.
  27. Kubori, T., Yamaguchi, S. and Aizawa, S.-I. (1997). *J. Bacteriol.* 179, 813-817.

- 
28. Vogler, A.P., Homma, M., Irikura, V.M., and Macnab, R.M. (1991). *J. Bacteriol.* 173, 3564–3572.
  29. Minamino, T., and Macnab, R.M. (1999). *J. Bacteriol.* 181, 1388–1394.
  30. Fraser, G.M., Bennett, J.C.Q., and Hughes, C. (1999). *Mol. Microbiol.* 32, 569–580.
  31. Bennett, J.C., and Hughes, C. (2000). *Trends Microbiol.* 8, 202–204.
  32. Minamino, T., and Macnab, R.M. (2000) *Mol. Microbiol.* 37, 1494–1503.
  33. Kubori, T., Matsushima, D. Nakamura, Y., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., and Aizawa, S.-I. (1998). *Science* 280, 602–605.
  34. Rosqvist, R., Hekansson, S., Forsberg, E., and Wolf-Watz, H. (1995). *EMBO J.* 14, 4187–4195.
  35. Aizawa, S.I. (2001) *FEMS* 202, 157–164.
  36. Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M., and Bonas, U. (1996). *J. Bacteriol.* 178, 1061–1069.
  37. Tamano, K., Aizawa, S.-I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., *et al.* (2000). *EMBO J.* 19, 3876–3887.
  38. Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) *Mol. Microbiol.* 39, 652–663.
  39. Block, S.M. (1997). *Nature* 386, 217–219.
  40. Sory, M.-P., Boland, A., Lambermont, A., and Cornelis, G. R. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11998–12002.
  41. Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1997). *Science* 278, 1140–1143.
  42. Anderson, D.M. and Schneewind, O. (1999). *Mol. Microbiol.* 31, 1139–1148.

- 
43. Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A., and Schneewind, O. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12839–12843.
  44. Neyt, C. and Cornelis, G.R. (1999). *Mol. Microbiol.* 31, 143–156.
  45. Cheng, L.W., Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1997). *Mol. Microbiol.* 24, 757–765.
  46. Wei, Z.-M., and Beer, S.V. (1995). *J. Bacteriol.* 177, 6201–6210.
  47. Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., and Galan, J.E. (1994). *Cell* 76, 717–724.
  48. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1997). *Trends Microbiol.* 5, 109–114.
  49. Cornelis, G.R., and van Gijsegem, F. (2000). *Annu Rev. Microbiol.* 54, 735–774.
  50. Black, D.S., and Bliska, J.B. (1997). *EMBO J.* 16, 2730–2744.
  51. Yahr, T.L., Goranson, J. and Frank, D.W. (1996). *Mol. Microbiol.* 22, 991–103.
  52. Leach, J.E., and White, F.F. (1996). *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 153.
  53. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). *Science* 276, 726–733.
  54. Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S.V. (1992). *Science* 257, 85–88.
  55. Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Northrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M.J., Saraste, M., and Tybulewicz, V.L.J. (1985). *J. Mol. Biol.* 184, 677–701.
  56. Fan, F., and Macnab, R.M. (1996). *J. Biol. Chem.* 271, 31981–31988.



- 
57. Lee, J., Klusener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, L.W., and Nurnberger, T. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 289-294.
58. Preston, G., Huang, H.C., He, S.Y., and Collmer, A. (1995). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 717-732.
59. He, S.Y., Huang, H.-C., and Collmer, A. (1993). *Cell* 73, 1255-1266.
60. Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., and He, S.Y. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3459-3464.
61. Minamino, T., and Macnab, R.B. (2000). *Mol. Microbiol.* 35, 1052-1064.
62. Lidell, M.C., and Hutcheson, S.W. (1994). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 488-497.
63. Alfano, J.R., Bauer, D.W., Milos, T.M., and Collmer, A. (1996). *Mol. Microbiol.* 19, 715-728.
64. Puri, N., Jenner, C., Bennett, M., Stewart, R., Mansfield, J., Lyons, N., and Taylor, J. (1997). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10, 247-256.
65. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY