



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ
«ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ HrcQ_A-HrcQ_B ΑΠΟ ΤΟ ΤΥΠΟΥ ΙΙΙ
ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟΥ
P. syringae pv phaseolicola

ΤΣΙΓΚΡΗ Ν. ΘΕΟΚΛΗΤΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2007

Κατατίθεται στη γραμματεία μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Βιολογίας ως μέρος των υποχρεώσεων για τη λήψη μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης

Τσιγκρή Ν. Θεόκλητη

Πρώτος επιβλέπων Καθηγητής κ. Κοκκινίδης Μιχαήλ

.....

Δεύτερος επιβλέπων Καθηγητής κ. Πανόπουλος Νικόλαος

.....

Μελέτη του συμπλόκου HrcQa-HrcQb από το τύπου III εκκριτικό σύστημα του φυτοπαθογόνου *P. syringae* pv *phaseolicola*

Τσιγκρή Ν. Θεόκλητη

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη του συμπλόκου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες HrcQa & HrcQb. Οι δύο πρωτεΐνες, αποτελούν μέρη του βασικού σώματος του τύπου III εκκριτικού συστήματος, μιας πολυπρωτεϊνικής εκκριτικής μηχανής που συναντάται στα παθογόνα βακτήρια, και η οποία είναι αφιερωμένη στην εξ επαφής μεταφορά παθογόνων παραγόντων στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Βάσει των έντονων ομοιοτήτων των HrcQa/HrcQb με τις FliM/FliN του βακτηριακού μαστιγίου, έχει προταθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες σχηματίζουν μία υπερμοριακή δομή ανάλογη αυτής του κυτταροπλασματικού δακτυλίου (C-ring) του μαστιγίου, ο οποίος τοποθετείται στην απόληξη του βασικού σώματος.

Σε προηγούμενες δουλειές είχε δειχθεί ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, αλλά δεν είχε καταστεί δυνατή η απομόνωση διαλυτού συμπλόκου. Από πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού που είχαν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν αλλά και από βιουπολογιστικές μελέτες, διαπιστώθηκε ότι το πρόβλημα της διαλυτότητας οφείλεται σε υδρόφοβες περιοχές της HrcQa και συγκεκριμένα στην αμινοτελική της περιοχή. Για την επίτευξη της απομόνωσης διαλυτού συμπλόκου, σχεδιάστηκε μία μορφή του συμπλόκου από την οποία αποκλείστηκαν τα 80 πρώτα αμινοτελικά κατάλοιπα της HrcQa. Η γονιδιακή κατασκευή περιελάμβανε την υπολειμματική αυτή μορφή της HrcQa (HrcQa^{-N^{ter}}) καθώς και την πλήρους μήκους HrcQb η οποία έφερε ακροφύσιο 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο.

Το αποτέλεσμα ήταν η απομόνωση διαλυτού συμπλόκου. Το σύμπλοκο απομονώθηκε με χρωματογραφία Ni-NTA, για το οποίο μόνο η HrcQb-His είχε συγγένεια. Ο συνκαθαρισμός των δύο πρωτεϊνών ήταν αποτέλεσμα του σχηματισμού συμπλόκου. Η στοιχειομετρία του συμπλόκου προβλέπεται ~ 1:3-1:4 (HrcQa:HrcQb) βάσει της στοιχειομετρίας που έχει παρατηρηθεί στο ομόλογο σύμπλοκο FliM:FliN από το βακτηριακό μαστίγιο. Δεδομένου ότι

οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται ισόποσα, η περίσσεια της HrcQa^{Nter} ανακτάται σε ένα πρώιμο βήμα έκλυσης από τη στήλη Ni-NTA.

Η μορφή αυτή του συμπλόκου παρουσίασε πρόβλημα πρωτεόλυσης μετά το πέρας μερικών ημερών από την απομόνωσή του. Η πρωτεόλυση συνέβη στην πρωτεΐνη HrcQa^{Nter}, με ειδικό τρόπο, ώστε να προκύπτει μια ελλειμματική μορφή της ~14 kDa. Η ελλειμματική αυτή μορφή της HrcQa όχι μόνο είναι ιδιαίτερα σταθερή αλλά διατηρεί την ικανότητα για αλληλεπίδραση με τη HrcQb προς σχηματισμό συμπλόκου. Η ταυτοποίηση της περιοχής αυτής πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας η οποία υπέδειξε την περιοχή των αμινοξέων 129-238 στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα τα οποία ανέφεραν την καρβοξυτελική περιοχή της HrcQa ως αναγκαία και επαρκή για την αλληλεπίδραση με τη HrcQb. Βελτιστοποίηση του πρωτοκόλου απομόνωσης συνέβαλε ώστε το πρόβλημα σχεδόν να εξαλειφθεί.

Το σύμπλοκο σχηματίζει μεγαλομοριακές δομές, των οποίων τα ακριβή μοριακά βάρη δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν.

Για τη HrcQa^{Nter} προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος και η υδροδυναμική ακτίνα δύο πληθυσμών που διαχωρίζονται κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης και οι οποίοι αντιστοιχούν (βάσει θεωρητικών υπολογισμών) σε 10μερές και 5μερές με μεγαλύτερη αφθονία να παρουσιάζει ο πληθυσμός που αντιστοιχεί σε 10μερές.

Επιχειρήθηκαν προκαταρκτικές δομικές μελέτες για το σύμπλοκο με τη μέθοδο της σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες. Οι μετρήσεις δεν ήταν επαρκείς, ωστόσο απέδωσαν τρισδιάστατα μοντέλα για το σχήμα των μεγαλομοριακών δομών που σχηματίζει το σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών.

Τέλος, στα πλαίσια της εργασίας σχεδιάστηκαν γονιδιακές κατασκευές οι οποίες αποσκοπούσαν σε σταθερότερα προϊόντα. Τα προϊόντα που αποδίδουν βρίσκονται ακόμη υπό μελέτη.

Study of the HrcQa-HrcQb complex from the type III secretion system of the plant pathogen *P. syringae* pv *phaseolicola*

Tsigkri N. Theokliti

Abstract

At the present work, the HrcQa-HrcQb complex was studied. The two proteins are part of the type III secretion system basal body. The type III secretion system is a multiprotein pathogenicity machinery through which Gram negative bacteria deliver virulence proteins directly into the cytoplasm of the host cell. Based on the striking analogies between HrcQa/HrcQb and FliM/FliN it has been proposed that HrcQa-HrcQb complex might form a macromolecular structure similar to that of the cytoplasmic ring (C-ring) of the flagellum, which is placed at the bases of the basal body cylinder.

Previous studies have shown that the two proteins interact, but the efforts for the isolation of a soluble complex remained unsuccessful. Subcellular localization experiments performed in the past, as well as biocomputic studies, indicate that the solubility problem is caused due to hydrophobic regions of the HrcQa protein located at its N-terminus. For the isolation of a soluble product, a form of the complex was designed to contain HrcQa lacking its first 80 N-terminal residues (HrcQa^{Nter}) and the full-length HrcQb carrying a 6 histidine tag.

That form of the complex was indeed soluble. It was isolated via Ni-NTA chromatography, for which only HrcQb-His had affinity. The co-purification of the two proteins was the result of the complex formation. The stoichiometry of the complex is expected to be similar to that of the flagellum counterparts which is ~1:3-1:4 (FliM:FliN→HrcQa:HrcQb). Given that HrcQa and HrcQb are expressed in equal amounts, excess of HrcQa^{Nter} is recovered in an early elution step.

The HrcQa^{Nter}-HrcQb-His complex displayed a degradation problem due to proteolysis in the course of few days after isolation. HrcQa^{Nter} was affected by proteolysis in a specific way, resulting in fragment of about 14 kDa. This truncated form of HrcQa not only is it stable

but it retains the ability of complex formation with HrcQb-His. The identification of the truncated HrcQa was done via mass spectrometry which indicated the C-terminus of the protein and specifically residues 129-238, confirming previously reported results which described the C-terminal region of HrcQa to be necessary and sufficient for the binding of HrcQb. Improvement of the isolation protocol resulted in the elimination of the proteolysis problem and more stable products.

HrcQa-HrcQb complex forms macromolecular structures the exact molecular weight of which is not determined in the present work.

For HrcQa^{-Nter}, the molecular weight and hydrodynamic radius was determined for both of the populations that are separated by size exclusion chromatography and correspond to a decamer and a pentamer.

Primary structural studies were attempted for the complex with the method of small angle X ray scattering from solution. Although the original data were not sufficient, an idea for the shape of the complex in solution was derived after analysis and modeling.

Finally, constructs designed to express more stable products are presented here though their study is still in progress.

Περιεχόμενα

| | |
|------------------|-----|
| Περίληψη..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Περιεχόμενα..... | vii |
| Ευχαριστίες..... | xi |

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή – Θεωρητικό υπόβαθρο.....1

| | |
|---|----|
| 1.1 Μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης στα Gram αρνητικά βακτήρια..... | 1 |
| 1.2 Το τύπου III εκκριτικό σύστημα..... | 2 |
| 1.3 Περιγραφή του συστήματος – μορφολογικά χαρακτηριστικά..... | 4 |
| 1.4 Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb..... | 6 |
| 1.5 Το ομόλογο σύστημα του μαστιγίου : οι πρωτεΐνες FliN και FliM..... | 9 |
| 1.6 Στόχοι της εργασίας..... | 12 |

Κεφάλαιο 2

Υλικά, Μέθοδοι & πειραματικές διαδικασίες.....13

| | |
|---|----|
| 2.1 Χειρισμοί DNA – κλωνοποίηση..... | 13 |
| 2.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR..... | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.1.2 Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού..... | 16 |
| 2.1.3 Αντίδραση λιγάσης..... | 17 |
| 2.1.4 Μετασχηματισμός επιλεκτικών κυττάρων..... | 17 |
| 2.1.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA..... | 18 |
| 2.1.6 Μακρά αποθήκευση κυττάρων σε γλυκερόλη (glycerol stock)..... | 18 |
| 2.2 Επαγόμενη ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών..... | 19 |
| 2.2.1 Πλασμιδιακοί φορείς – μηχανισμοί ελέγχου έκφρασης..... | 19 |
| 2.2.2 Διαδικασία επαγωγής έκφρασης σε υγρές κυτταρικές καλλιέργειες..... | 20 |
| 2.3 Χρωματογραφία συγγένειας..... | 20 |
| 2.3.1 Απομόνωση πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας με Ni-NTA..... | 21 |
| 2.3.2 Απομόνωση πρωτεΐνης μικρής κλίμακας με Ni-NTA..... | 22 |
| 2.3.3 Απομόνωση πρωτεΐνης μικρής κλίμακας με Ni-NTA υπό αποδιατακτικές συνθήκες..... | 23 |
| 2.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης..... | 23 |
| 2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS (SDS-PAGE)..... | 25 |
| 2.5.1 Χρώση με κυανό του Coomassie..... | 26 |
| 2.5.2 Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης..... | 26 |
| 2.6 Ανίχνευση His-Tagged πρωτεϊνών με Ni-NTA AP conjugate..... | 26 |
| 2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford..... | 26 |
| 2.8 Ελεγχόμενη πρωτεόλυση..... | 27 |
| 2.9 Σκέδαση ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες (SAXS)..... | 27 |
| 2.9.1 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων – Μετασχηματισμός Fourier..... | 28 |
| 2.9.2 <i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος..... | 30 |
| 2.9.3 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες..... | 31 |

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα & Συζήτηση.....33

-Μέρος Α-

| | |
|--|----|
| 3Α. 1 Εντοπισμός υδρόφοβης περιοχής στην πρωτεΐνη HrcQa..... | 33 |
| 3Α.2 Σύντομη περιγραφή γονιδιακών κατασκευών και των προϊόντων τους..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 3A.2.1 HrcQa ^{-Nter} -HrcQb-His / pET26b (+)..... | 36 |
| 3A.2.2 His/TEV-HrcQa ^{-Nter} -HrcQb / pPROpET..... | 38 |
| 3A.2.3 His/TEV-HrcQa ^{-Nter} / pPROEX-HTb..... | 40 |
| 3A.3 Το διαλυτό σύμπλοκο HrcQa ^{-Nter} -HrcQb-His..... | 42 |
| 3A.3.1 Συνθήκες ελαγωγής και προσπάθειες βελτίωσης της απόδοσης υπερέκφρασης..... | 43 |
| 3A.3.2 Αρχικό σχήμα καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA)..... | 44 |
| 3A.3.3 Ταυτοποίηση προϊόντων καθαρισμού..... | 45 |
| 3A.3.4 Η HrcQa ^{-Nter} υφίσταται πρωτεόλυση μετά την απομόνωση..... | 47 |
| 3A.3.5 Η σταθερή περιοχή της HrcQa ^{-Nter} και η περιοχή αλληλεπίδρασης με τη HrcQb εντοπίζονται στην καρβοξυτελική περιοχή της..... | 48 |
| 3A.3.6 Βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού..... | 49 |
| 3A.3.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης..... | 51 |
| 3A.3.8 Η HrcQb σταθεροποιείται όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη HrcQa ^{-Nter} | 55 |

- Μέρος Β -

| | |
|---|----|
| 3B.1 Περιγραφή γονιδιακών κατασκευών και των προϊόντων τους..... | 58 |
| 3B.1.1 HrcQaC-HrcQb-His / pET26b(+)...... | 58 |
| 3B.1.2 HrcQa ^{tr} -HrcQb-His / pET26b(+)...... | 63 |
| 3B.1.3 HrcQaC-HrcQbC-His / pPROpET..... | 64 |

-Μέρος Γ-

| | |
|--|----|
| 3Γ.1 SAXS - Ο πρώτος πληθυσμός..... | 66 |
| 3Γ.1.1 Μετρήσεις και ανάλυση των δεδομένων..... | 66 |
| 3Γ.1.2 <i>Ab initio</i> καθορισμός σχήματος..... | 68 |
| 3Γ.2 SAXS - Ο δεύτερος πληθυσμός..... | 69 |
| 3Γ.2.1 Μετρήσεις και ανάλυση των δεδομένων..... | 69 |
| 3Γ.1.2 <i>Ab initio</i> καθορισμός σχήματος..... | 71 |

Κεφάλαιο 4

Συμπεράσματα - προοπτικές.....73

Βιβλιογραφία.....78

Παράρτημα Α.....85

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μιχάλη Κοκκινίδη για τη σημαντική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εργασίας. Οι συμβουλές του ήταν υψίστης σημασίας σε κρίσιμα σημεία. Επίσης, τον ευχαριστώ που φροντίζει να μη μας λείπει τίποτα από άποψη αναλώσιμων και υλικοτεχνικού εξοπλισμού.

Ένα επίσης μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή κ. Νικόλαο Πανόπουλο, τον δεύτερο εξεταστή αυτής της εργασίας. Οι γονιδιακές κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών υπό την επίβλεψή του.

Να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου όλη την ομάδα του TTSS, τη Σπυριδούλα, τη Βίκυ, την Τάνυα, το Νίκο και τη Μαρίνα. Συγκεκριμένα, η Σπυριδούλα έπαιξε το ρόλο της δασκάλας και καθοδηγήτριάς μου στα πρώτα μου βήματα στο σκληρό κόσμο της μοριακής βιολογίας. Αν και μικρή κι ανίδεη από πειράματα κλωνοποίησης, μου έμαθε τόσα πολλά και την ευχαριστώ για το χρόνο της και την υπομονή της. Η Βίκυ και η Τάνυα, γνώστες των πρωτεϊνικών πραγμάτων, με ξελάσπωσαν ουκ ολίγες φορές και μου μετέδωσαν σημαντικές γνώσεις. Η Βίκυ, σημαντικό παράδειγμα προς μίμηση στον πάγκο, ήταν πάντα πρόθυμη να συζητήσει σοβαρά μαζί μου αλλά και να αστειευτεί. Η Τάνυα, μου έμαθε τα μυστικά του AKTA και των SAXS κληροδοτώντας μου τις γνώσεις της (αλλά και τα διαλύματά της). Και τέλος ο Νικολάκης, ο μικρός αδερφός όλης της ομάδας, μας έκανε να γελάμε.... Η ομάδα του TTSS είναι μία ομάδα πρότυπο για τη συνεργασία και την αλληλοϋποστήριξη που τη διακρίνει. Τέτοιες συνεργασίες σπανίζουν στο χώρο της έρευνας και χαίρομαι που έμπλεξα με την ομάδα αυτή και ελπίζω τα πράγματα να συνεχιστούν σε αυτό το κλίμα...

Να ευχαριστήσω επίσης, όλο τον κόσμο που βρέθηκε στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου, όλοι με κάποιον τρόπο με βοήθησαν, η Ντίνα, η Μαίρη, η Μαρίζα, ο Γιάννης, ο Γιώργος, η Βάνια.

Τα κορίτσια από το εργαστήριο Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας για την παρέα τους στα διαλείμματα από τη δουλειά, την Εύη, την Αλεξάνδρα και τη Δήμητρα.

Τέλος, ίσως οι άνθρωποι που βοήθησαν περισσότερο και που θα βοηθούν πάντα και αξίζουν το μεγαλύτερο ευχαριστώ, οι δικοί μου άνθρωποι. Η οικογένειά μου, που με στηρίζει με όλους τους δυνατούς τρόπους. Και φυσικά ο Γιώργος. Τον ευχαριστώ για την αγάπη και τη συντροφιά του αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και προειδοποιήσεις του, που ως παλιότερος στο χώρο της έρευνας, φρόντισε να μου επισημάνει τα κακώς κείμενα εγκαίρως, πριν τα διαπιστώσω μόνη μου.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή – Θεωρητικό υπόβαθρο

1.1 Μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης στα Gram-αρνητικά βακτήρια

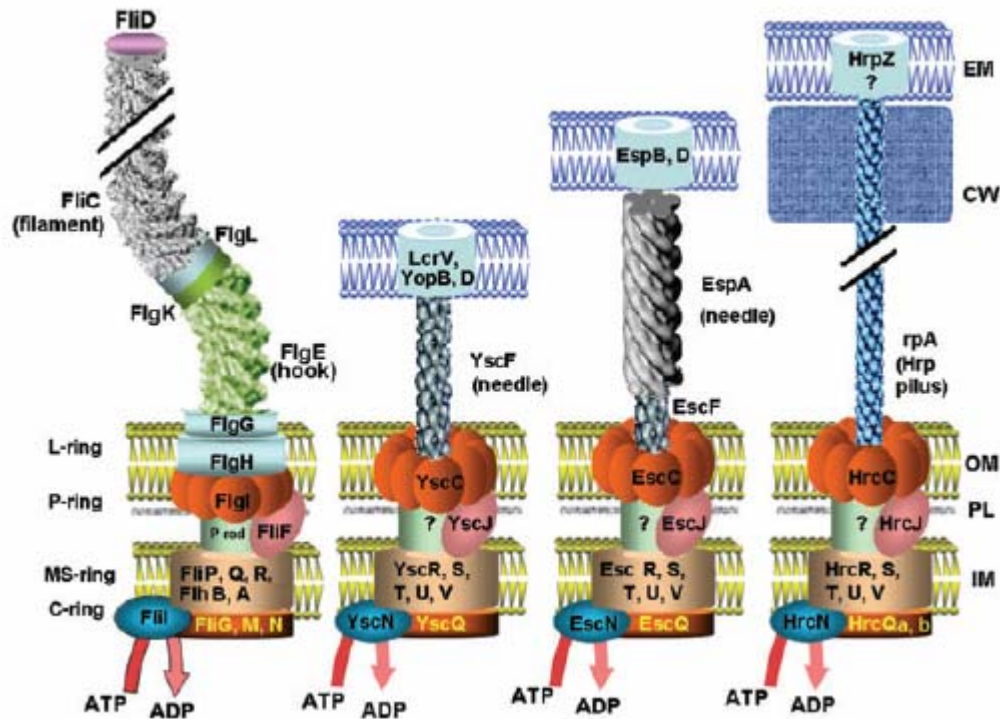
Στα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης που χαρακτηρίζονται ως τύπου I, II, III, IV και V [Hueck 1998]. Από αυτά το τύπου V είναι ελάχιστα χαρακτηρισμένο ενώ τα υπόλοιπα μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν η έκκριση γίνεται σε διακριτά στάδια ή είναι μια συνεχής πορεία. Έτσι, η τύπου II και IV έκκριση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά βήματα. Αρχικά, το εκκρινόμενο μόριο μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα του βακτηρίου ‘διασχίζοντας’ την εσωτερική μεμβράνη και στη συνέχεια μεταφέρεται –‘διασχίζοντας’ την εξωτερική μεμβράνη- στον εξωκυττάριο χώρο. Το πρώτο βήμα είναι κοινό στα δύο εκκριτικά μονοπάτια και λαμβάνει χώρα μέσω του ευρέως διαδεδομένου και συντηρημένου Sec-συστήματος μεταφοράς [Economidou 1999]. Η Sec-εξαρτώμενη έκκριση διακρίνεται: (i) στον εντοπισμό της προς έκκριση πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, (ii) στη μεταφορά της διαμέσου της μεμβράνης και (iii) στην απελευθέρωση της στο περίπλασμα. Στα τύπου I και III μονοπάτια η έκκριση είναι μια συνεχόμενη πορεία χωρίς διακριτό περιπλασματικό ενδιάμεσο. Το τύπου I εκκριτικό μονοπάτι είναι ιδιαίτερα απλό αφού περιλαμβάνει μόνο τρεις πρωτεΐνες. Αντίθετα, το τύπου III είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός για τη λειτουργία του οποίου απαιτείται η συνδυασμένη δράση μιας πλειάδας πρωτεϊνών [Alfano & Collmer, 1997; Baker, 1997; He, 1997; Hueck, 1998; Cornelis & Gijsegem, 2000; Büttner & Bonas, 2002; Cornelis 2002].

1.2 Το τύπου III εκκριτικό σύστημα

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα είναι ένας μηχανισμός παθογένειας μέσω του οποίου παθογόνα βακτήρια καθίστανται ικανά να εκκρίνουν και να διοχετεύουν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή τους τοξικές πρωτεΐνες. Το σύστημα είναι συντηρημένο σε ένα ευρύ φάσμα Gram-αρνητικών παθογόνων που μολύνουν ζωικούς και φυτικούς ξενιστές. Είναι χαρακτηριστικό ότι δεν αποτελεί ένα απλό σύστημα έκκρισης αλλά ένα μηχανισμό αφιερωμένο στην εξ' επαφής μεταφορά παθογόνων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα ευκαρυωτικών ξενιστών.

Η ανακάλυψη μιας ομάδας συντηρημένων γονιδίων, κοινών σε ζωο- και φυτο-παθογόνα βακτήρια και σχετιζόμενων με έναν εκκριτικό μηχανισμό παθογένειας –που ακολούθως ονομάστηκε τύπου III εκκριτικός μηχανισμός- χρονολογείται στις αρχές της δεκαετίας του '90 [Galán, 1996; Alfano & Collmer, 1997; Charkowski et al., 1997]. Στα φυτικά παθογόνα ο μηχανισμός και τα σχετιζόμενα με αυτόν γονίδια ονομάστηκαν *Hrp* και *hrp* αντίστοιχα (Hypersensitive response and pathogenicity) επειδή συνδέθηκαν όχι μόνο με την εκδήλωση ασθένειας στους ξενιστές αλλά και με την εμφάνιση μιας αμυντικής αντίδρασης, της λεγόμενης αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά [Lindgren et al. 1986; He, 1997; Büttner & Bonas, 2002; Jin et al., 2003]. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι ορισμένα από τα *hrp* γονίδια παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με γονίδια που συμμετέχουν στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου και επιβεβαιώθηκε ο υψηλός βαθμός συντήρησής τους σε όλα τα παθογόνα βακτήρια που διαθέτουν τύπου III εκκριτικά συστήματα. Τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hrc* (Hypersensitive response and conserved) και τα προϊόντα τους θεωρείται ότι συνθέτουν τον πυρήνα της εκκριτικής μηχανής [Alfano & Collmer, 1997]. Η ευρεία συντήρησή τους υποδηλώνει παρόμοιους μηχανισμούς μεταξύ της τύπου III-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής έκκρισης και της πορείας βιογένεσης του μαστιγίου. Όπως θα αναφερθεί αναλυτικά στη συνέχεια, η αρχική αυτή υπόθεση επιβεβαιώνεται από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται ότι η τύπου III εκκριτική μηχανή των ζωοπαθογόνων έχει αξιοσημείωτες μορφολογικές ομοιότητες με το βασικό σώμα του μαστιγίου [Εικόνα 1.1].

Στις υψηλές ομοιότητες, σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, ανάμεσα στα συστατικά του πυρήνα της εκκριτικής μηχανής όλων των τύπου III εκκριτικών συστημάτων στηρίζεται η υπόθεση ότι αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναγνώριση του σήματος έκκρισης και ότι είναι υπεύθυνες για την μη-ειδικότητα που έχει παρατηρηθεί στην αναγνώριση των εκκρινόμενων υποστρωμάτων από τη συσκευή [Rossier et al., 1999; Collmer et al., 2000; Anderson et al., 1999].



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση εκκριτικών μηχανών και βακτηριακού μαστιγίου. Από αριστερά προς τα δεξιά : βακτηριακό μαστίγιο, TTSS της *Yersinia*, TTSS της *Escherichia coli*, TTSS της *Pseudomonas syringae*. Παρατηρούνται οι έντονες μορφολογικές ομοιότητες, ειδικά στο βασικό σώμα (basal body). Η εικόνα αναπαράχθηκε και τροποποιήθηκε από Tampakaki et al., 2004

Μερικές από τις ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τον τύπου III εκκριτικό μηχανισμό είναι: (i) Η πλήρης ενεργοποίηση του μηχανισμού έκκρισης γίνεται μέσω επαφής του βακτηρίου με τον ξενιστή του. (ii) Στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες δεν έχει ταυτοποιηθεί μια αποκολλούμενη πεπτιδική αλληλουχία ικανή να κατευθύνει την έκκριση (secretion signal). (iii) Η παρουσία βοηθητικών πρωτεϊνών (σαπερονών, chaperones) είναι απαραίτητη για την έκκριση πολλών παραγόντων παθογένειας.

Τουλάχιστον για τη *Yersinia* και τη *Shigella flexneri* έχει δειχτεί ότι ο τύπου III-ελεγχόμενος μηχανισμός έκκρισης ενεργοποιείται μέσω φυσικής επαφής με την επιφάνεια του κυττάρου-στόχου [Hueck, 1998]. Φαίνεται επίσης πως στη *Yersinia* ακόμη και η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με παθογένεια τύπου III παραμένει σε καταστολή μέχρι τη στιγμή της επαφής. Αντίθετα, η *S. flexneri* παράγει εκ των προτέρων και αποθηκεύει στο κυτταρόπλασμα της τις προς έκκριση πρωτεΐνες. Σε αναλογία με τη *Yersinia*, η *Pseudomonas syringae* πιστεύεται πως δεν εκφράζει Hrp πρωτεΐνες –τουλάχιστον σε υψηλά επίπεδα- μέχρι να βρεθεί στο φυτικό

αποπλάστη [Rosqvist et al., 1994; Hueck, 1998; Van Dijk et al., 1999; Cornelis & Gijsegem, 2000; Cornelis, 2002; Jin et al., 2003].

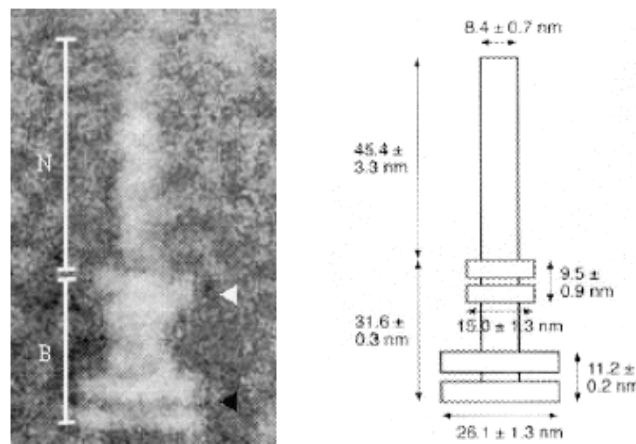
Μέχρι στιγμής δεν έχει προσδιοριστεί με βεβαιότητα ένα εκκριτικό σήμα που να σηματοδοτεί την έκκριση των υποστρωμάτων του τύπου III μηχανισμού. Τα δεδομένα φαίνεται να αποκλίνουν υποστηρίζοντας την ύπαρξη τριών τουλάχιστον παραγόντων που εμπλέκονται στη διαδικασία της έκκρισης. Οι παράγοντες αυτοί είναι: (i) η αμινοξική αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, (ii) η πρόσδεση στην εκκρινόμενη πρωτεΐνη ενός ειδικού βοηθητικού παράγοντα και (iii) η δομή του 5' άκρου του mRNA της εκκρινόμενης πρωτεΐνης [Mudgett et al., 2000; Aldridge & Hughes, 2001; Hienonen et al., 2002].

2.3 Περιγραφή του συστήματος – μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει μια πλειάδα πρωτεϊνών που μπορούν να διακριθούν σε δομικές, εκκρινόμενες και βοηθητικές. Οι δομικές σχηματίζουν: (i) Το βασικό σώμα (basal body) της εκκριτικής μηχανής που είναι μια υπερμοριακή δομή που διαπερνά τις δύο μεμβράνες και το περίπλασμα του βακτηρίου και συνδέει το κυτταρόπλασμα με τον εξωκυττάριο χώρο, (ii) μια εξωκυττάρια προέκταση του βασικού σώματος, που είναι μια επιμήκης, κυλινδρική δομή και λειτουργεί πιθανότατα ως αγωγός μέσω του οποίου μεταφέρονται οι μολυσματικοί παράγοντες στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διακρίνονται: (i) Στους παράγοντες παθογένειας (effectors) που δρουν στο εσωτερικό του ξενιστή και (ii) στις πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς (translocators) που θεωρούνται υπεύθυνες για τη διάνοιξη πόρου στη μεμβράνη του ξενιστή. Τέλος, υπάρχει μια ομάδα βοηθητικών πρωτεϊνών (chaperones, σαπερόνες) που είναι απαραίτητες για την έκκριση ορισμένων παραγόντων. Οι πρωτεΐνες αυτές πιστεύεται ότι μεταξύ άλλων εμπλέκονται στην ιεραρχική έκκριση των υποστρωμάτων του εκκριτικού συστήματος και παράλληλα διασφαλίζουν την ακεραιότητα τους στο κυτταρόπλασμα του παθογόνου. Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος αφού έχει δείχτεί ότι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση άλλων παραγόντων του συστήματος (π.χ. HirA) [Wei et al., 2000] ενώ σε ορισμένες πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς έχει αποδοθεί και τοξική δράση (π.χ. IpaB, SipB) [Cornelis, 2000]. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που δομούν την εξωκυττάρια προέκταση του βασικού σώματος αποτελούν και υποστρώματα του εκκριτικού μηχανισμού.

Η εκκριτική μηχανή απαρτίζεται από το βασικό σώμα και ένα κυλινδρικό σχηματισμό που εκτείνεται πέρα από την επιφάνεια του βακτηρίου. Το βασικό σώμα είναι ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο που δομείται από περίπου 20-25 πρωτεΐνες [Hueck 1998]. Διαπερνά τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και το περίπλασμα και συνδέει το κυτταρόπλασμα με τον εξωκυττάριο

χώρο [Εικόνες 1.1, 1.2]. Μέσω αυτής της δομής οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες υπερπηδούν τα εμπόδια των λιπιδικών διπλοστοιβάδων και του στρώματος των πεπτιδογλυκανών στο δρόμο τους προς την έξοδο. Η μορφολογία του βασικού σώματος της εκκριτικής συσκευής του μαστιγίου (basal body) των ζωοπαθογόνων *Salmonella* και *Shigella* είναι σήμερα γνωστή σε χαμηλή διακριτικότητα από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που αποκαλύπτουν σημαντική μεταξύ τους ομοιότητα [Kubori et al., 1998; Tamano et al., 2000; Kimbrough & Miller, 2000; Blocker et al., 2003; Thomas et al., 2006]. Πρόκειται για μια κυλινδρική δομή που περιβάλλεται από δύο ζεύγη δακτυλίων. Το ένα ζεύγος εντοπίζεται στην περιοχή της εξωτερικής μεμβράνης και το δεύτερο στην περιοχή της εσωτερικής. Στην περίπτωση του μαστιγίου η συσκευή απολήγει στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου σε ένα δακτύλιο που ονομάζεται κυτταροπλασματικός δακτύλιος (Cytoplasmic ή C-ring, περισσότερες λεπτομέρειες για τη δομή αυτή αναφέρονται στη συνέχεια).



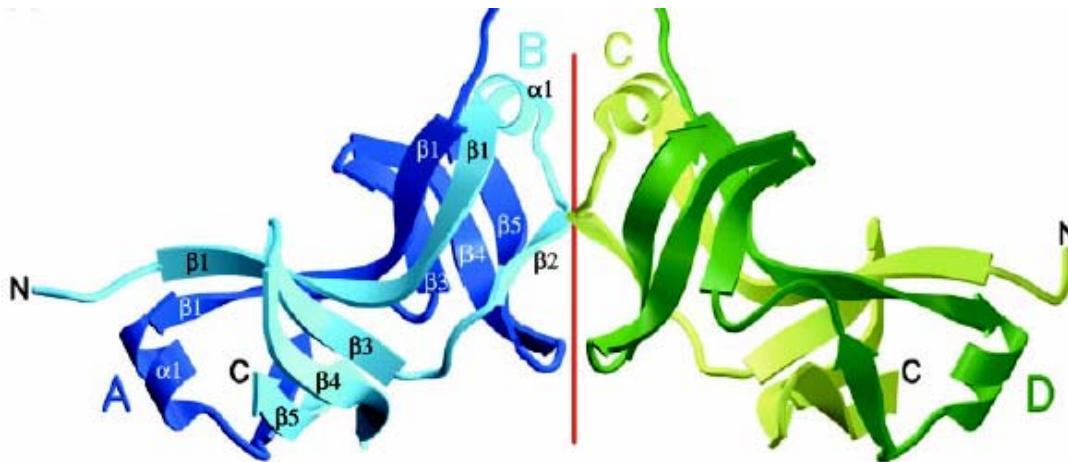
Εικόνα 1.2 Η εκκριτική μηχανή του τύπου III εκκριτικού συστήματος. (Α) Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της τύπου III εκκριτικής μηχανής του βακτηρίου *Shigella*. Το 'N' αναφέρεται στο 'Needle' ενώ το 'B' στο 'Basal body' της εκκριτικής μηχανής. Το άσπρο βέλος δείχνει το ζεύγος δακτυλίων της εξωτερικής μεμβράνης ενώ το μαύρο βέλος τη θέση του ζεύγους δακτυλίων στην εσωτερική μεμβράνη. (Β) Σχηματικό μοντέλο της εκκριτικής μηχανής της *Shigella* και προτεινόμενα μεγέθη για τις υποδομές που συνθέτουν τη μηχανή. Οι εικόνες αναπαράχθηκαν και τροποποιήθηκαν από Tamano et al., 2000

Η προέκταση του βασικού σώματος της εκκριτικής συσκευής στον εξωκυττάριο χώρο είναι μια επιμήκης, κυλινδρική δομή που ανάλογα με το παθογόνο στο οποίο παρατηρείται αναφέρεται ως pilus (στα φυτοπαθογόνα) ή needle (στα ζωοπαθογόνα) [Kubori et al., 2000; Kimbrough & Miller, 2000]. Η δομή αυτή θεωρείται ανάλογη του μαστιγίου [Yonekura et al., 2003] και συνίσταται από τη συμμετρική επανάληψη μιας ή περισσότερων μικρών, υδρόφιλων πρωτεϊνών. Από δεδομένα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας γίνεται φανερό ότι παρουσιάζει μεγάλες ομοιότητες

μεταξύ ζωο- και φυτοπαθογόνων. Η σημαντικότερη διαφορά που παρατηρήθηκε είναι το πολύ μεγαλύτερο μήκος του pilus συγκριτικά με το needle που είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι το pilus πρέπει να διαπερνά όλο το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος (>100 nm) των φυτικών κυττάρων προκειμένου να προσεγγίσει το κυτταρόπλασμα τους [Büttner & Bonas, 2003].

1.4 Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb

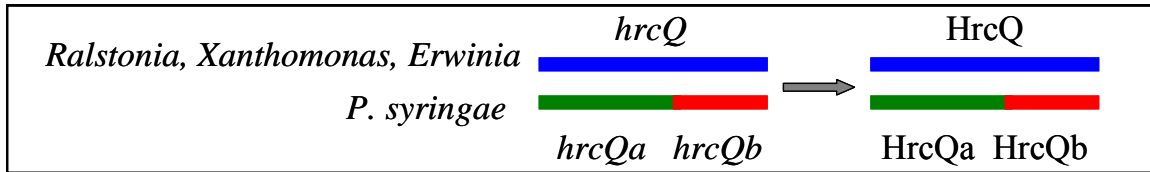
Η πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb εκφράζονται από τα γονίδια *hrcQa* και *hrcQb* αντίστοιχα, τα οποία βρίσκονται διαδοχικά (*hrcQa* upstream of *hrcQb*) στο οπερόνιο *hrpU*. Η HrcQa αποτελείται από 238 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 26 kDa. Η HrcQb είναι μία μικρή υδρόφιλη πρωτεΐνη 128 αμινοξέων, με μοριακό βάρος 14 kDa, η οποία είναι εξαιρετικά συντηρημένη σε όλα τα βακτήρια που εκφράζουν τύπου III εκκριτικά συστήματα αλλά και στο μαστίγιο. Συγκεκριμένα, η ομολογία εντοπίζεται μεταξύ των 80 καρβοξυτελικών αμινοξέων. Η δομή της συντηρημένης καρβοξυτελικής περιοχής (HrcQb-C) έχει προσδιοριστεί σε διακριτικότητα 2.3 Å [Fadoulglou et al., 2004, PDB accession code 1O9Y] όπου η πρωτεΐνη παρουσιάζεται ως ομοτετραμερές (διμερές διμερών) [Εικόνα 1.3].



Εικόνα 1.3 Σχηματική απεικόνιση της δομής του τετραμερούς της HrcQb-C. Κάθε αλυσίδα παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα. Η κόκκινη γραμμή υποδεικνύει τον διπλό άξονα συμμετρίας μεταξύ των διμερών [Fadoulglou et al., 2004]. [PDB ID code 1O9Y]

Στο τύπου III εκκριτικό σύστημα του βακτηρίου *P. Syringae* έχει δειχθεί ότι : (i) Η HrcQb προσδένεται ισχυρά στη HrcQa, (ii) η HrcQb-C διατηρεί την ικανότητα της πλήρους μήκους

πρωτεΐνης να προσδένεται στη HrcQa, (iii) μόνο η καρβοξυτελική περιοχή της HrcQa εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με τη HrcQb [Fadouloglou et al., 2004]. Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι σε αντίθεση με το *P. syringae*, τα φυτοπαθογόνα *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia* διαθέτουν ένα μόνο γονίδιο, το *hrcQ*. Το προϊόν αυτού του γονιδίου είναι η πρωτεΐνη HrcQ της οποίας το αμινοτελικό άκρο είναι ομόλογο με την HrcQa και το καρβοξυτελικό με την HrcQb [Charkowski et al., 1997] [Εικόνα 1.4].



Εικόνα 1.4 Τα φυτοπαθογόνα *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia* διαθέτουν ένα μόνο γονίδιο, το *hrcQ*. Το προϊόν αυτού του γονιδίου είναι η πρωτεΐνη HrcQ της οποίας το αμινοτελικό άκρο είναι ομόλογο με την HrcQa και το καρβοξυτελικό με την HrcQb

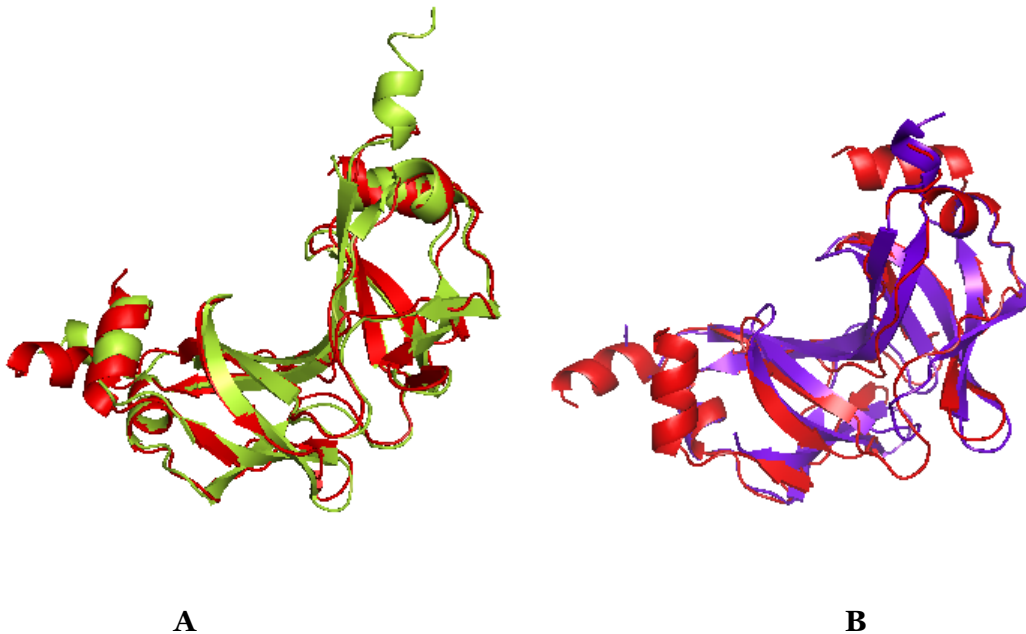
Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb θεωρούνται μέρη του πυρήνα του βασικού σώματος της εκκριτικής μηχανής λόγω της υψηλής συντήρησής τους που είναι χαρακτηριστικό των δομικών πρωτεϊνών του συστήματος [Winstanley and Hart, 2001].

Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού, έδειξαν ότι ούτε η HrcQa ούτε η HrcQb εκκρίνονται στο θρεπτικό μέσο κυττάρων *P. Syringae* αποδεικνύοντας ότι δεν είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες [Fadouloglou et al., 2004]. Τα ίδια πειράματα έδειξαν ότι η HrcQb εντοπίζεται και στο μεμβρανικό και στο κυτταροπλασματικό κλάσμα, δίνοντας ενδείξεις ότι είναι είτε κυτταροπλασματική είτε ελαφρώς συνδεδεμένη με την εσωτερική μεμβράνη. Αντίθετα, η HrcQa βρέθηκε αποκλειστικά στο μεμβρανικό κλάσμα. Αυτό συμφωνεί με πρόβλεψη διαμεμβρανικής περιοχής που πραγματοποιήθηκε βάσει δεδομένων πρωτοταγούς αλληλουχίας (βλ. Κεφ.3, § 3A.1).

Σημαντική ομολογία παρουσιάζεται μεταξύ των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb. Η ομολογία που εντοπίζεται μεταξύ της HrcQb-C και του καρβοξυτελικού άκρου της HrcQa είναι 20.5% identity και 54.5% similarity. Η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής για τη HrcQa για την περιοχή 170-185 συμπίπτει πλήρως με την πειραματικά προσδιορισμένη δευτεροταγή δομή της HrcQb-C στην περιοχή 27-35 (αναφέρονται στην αριθμηση της HrcQb-C, για την πλήρους μήκους είναι 71-79) . Οι περιοχές αυτές εμπεριέχονται στην περιοχή με τη μέγιστη τοπική ομολογία μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (25.6% identity, 46.2% similarity) (βλ. Κεφ.3, §3A.3.5). Η περιοχή αυτή της

HrcQb περιλαμβάνει μία σειρά καταλοίπων τα οποία έχει προταθεί, βάσει δεδομένων της δομής σε συνδυασμό με μία πολλαπλή αμινοξική στοίχιση, ότι πιθανόν να λαμβάνουν μέρος σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις άρα πιθανόν να αποτελεί τη θέση αλληλεπίδρασης με τη HrcQa [Fadouloglou PhD dissertation, Univ. of Crete, 2004].

Τα παραπάνω, είναι σύμφωνα με ευρήματα τα οποία αναφέρονται στο ομόλογο, εκτενέστερα μελετημένο, σύστημα του μαστιγίου. Οι πρωτεΐνες FliM και FliN αποτελούν τις ανάλογες των HrcQa και HrcQb αντίστοιχα. Η δομή του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης FliN του θερμόφιλου βακτηρίου *Thermotoga maritima* έχει προσδιοριστεί σε ανάλυση 1.85 Å (Joint Center for Structural Genomics, 2003, PDB accession code 1O6A) και 3.40 Å [Brown et al., 2005, PDB accession code 1YAB] και παρόλο που προσδιορίστηκε ως ομοδιμερές, σε αντίθεση με τη HrcQb-C που σχηματίζει ομοτετραμερή [Fadouloglou et al., 2004], οι τριτοταγείς δομές των μονομερών των δύο πρωτεϊνών παρουσιάζουν σημαντικότερες ομοιότητες [Εικόνα 1.5]. Η HrcQa με τη FliM (*T. maritima*) παρουσιάζουν ομολογία σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας (13.9% identity, 24.3% similarity). Η δομή μόνο ενός μικρού τμήματος της FliM (middle domain, aa 44-226) έχει προσδιοριστεί κρυσταλλογραφικά [Park et al., 2006, PDB accession code 2HP7], ενώ η δομή της HrcQa δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι στιγμής.



Εικόνα 1.5 (A) Εικονική εναπόθεση των δυο προσδιορισμένων δομών της FliN-C [PDB ID codes : red 1O6A, green 1YAB], (B) Εικονική εναπόθεση της FliN-C (red 1O6A) πάνω στο διμερές HrcQb-C (purple 1O9Y). Παρατηρείται σημαντική δομική ομολογία μεταξύ των δύο πρωτεϊνών στο (B)

Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μόνο το καρβοξυτελικό τμήμα της FliN είναι απαραίτητο όχι μόνο για την σύνδεση με τη FliM αλλά και για τη βιογένεση και λειτουργία του μαστιγίου [Francis et al., 1994; Tang et al., 1995; Mathews et al., 1998; Zhao et al., 1996; Gonzalez-Pedrajo et al., 2006]. Το σύμπλοκο των FliN-FliM τοποθετείται στο κυτταρόπλασμα και η σύνδεσή του με το μεμβρανικό MS-ring επιτυγχάνεται μέσω της FliM έμμεσα, μέσω σύνδεσής της με τη FliG [Francis et al., 1994; Tang et al., 1995; Mathews et al., 1998; Zhao et al., 1996; Gonzalez-Pedrajo et al., 2006; Lloyd et al., 1999]. Αυτό υποδεικνύει πιθανούς ανάλογους ρόλους της FliM με τη HrcQa η οποία εντοπίζεται στο μεμβρανικό κλάσμα [Fadoulglou et al., 2004].

Η σύνδεση των πρωτεϊνών FliN και FliM έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερμοριακής δομής, σχήματος δακτυλιδιού (C-ring) στον οποίο σχηματισμό πιθανότατα λαμβάνουν μέρος τα καρβοξυτελικά τμήματα των δύο πρωτεϊνών [Francis et al., 1994; Tang et al., 1995; Mathews et al., 1998; Zhao et al., 1996; Gonzalez-Pedrajo et al., 2006].

Βάσει μελετών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας οι οποίες δείχνουν σημαντικές μορφολογικές ομοιότητες (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω) μεταξύ της τύπου III εκκριτικής υπερμοριακής μηχανής με το σύστημα του μαστιγίου [Francis et al., 1994; Tang et al., 1995; Mathews et al., 1998; Zhao et al., 1996; Gonzalez-Pedrajo et al., 2006; Lloyd et al., 1999; Tamano et al., 2000; Khan et al., 1998] και βάσει των ομοιοτήτων μεταξύ των HrcQa/HrcQb με τις FliM/FliN, έχει προταθεί [Fadoulglou et al., 2004] ότι οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb πιθανόν να σχηματίζουν υπερμοριακή δομή ανάλογη αυτής του κυτταροπλασματικού δακτυλίου του μαστιγίου (C-ring).

Παρακάτω γίνεται μία συνοπτική παρουσίαση του ομόλογου συστήματος με έμφαση στον κυτταροπλασματικό δακτύλιο (C-ring). Το σύστημα του μαστιγίου είναι εκτενέστατα μελετημένο και αποτελεί σημαντική πηγή πληροφορίας και ιδεών για τη μελέτη του συμπλόκου HrcQa-HrcQb της εκκριτικής μηχανής.

1.5 Το ομόλογο σύστημα του μαστιγίου : οι πρωτεΐνες FliN και FliM

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υπερμοριακή μηχανή του τύπου III εκκριτικού συστήματος παρουσιάζει έντονες μορφολογικές ομοιότητες με το βακτηριακό μαστίγιο. Το μαστίγιο αποτελεί το σύστημα προώθησης-κίνησης των βακτηριακών κυττάρων. Σε σύγκριση με τα μαστίγια των ευκαριωτικών κυττάρων, τα βακτηριακά μαστίγια εκτείνονται πολύ περισσότερο εξωτερικά των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, οι πρωτεϊνικές υπομονάδες πρέπει να εξαχθούν ώστε να σχηματιστεί το υπόλοιπο της μηχανής. Το μονοπάτι έκκρισης των εξωτερικών πρωτεϊνών του μαστιγίου από το ίδιο το μαστίγιο (τις σχηματισμένες εσωτερικές υπερμοριακές δομές του) είναι ένα τύπου III

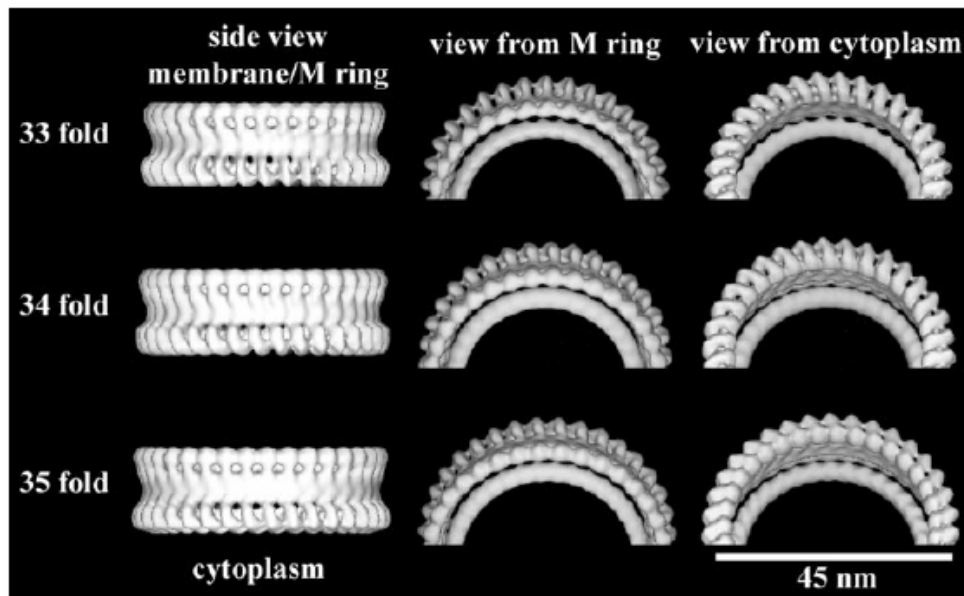
μονοπάτι με τη διαφορά ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες δεν είναι παράγοντες παθογένειας αλλά υπομονάδες της μηχανής του μαστιγίου [Plano et al., 1991; Ramakrishnan et al., 1991].

Η βακτηριακή κίνηση επιτυγχάνεται μέσω περιστροφής των μαστιγίων [recent reviews, Berg, 2003; Blair, 2003; Macnab, 2003]. Στα εντεροβακτήρια όπως το *Escherichia coli* και το *Sallmonela enterica* serovar Typhimurium, η κινητήρια δύναμη της μηχανής του μαστιγίου παρέχεται από βαθμίδωση πρωτονίων [Larsen et al., 1974] και η φορά περιστροφής (clockwise-CW, counterclockwise-CCW) ελέγχεται από τις πρωτεΐνες FliG, FliM και FliN [Yamaguchi et al., 1986a,b; Magariyama et al., 1990; Sockett et al., 1992; Irikura et al., 1993]. Ποικίλα γενετικά και βιοχημικά πειράματα παρέχουν αποδείξεις ότι οι τρεις αυτές πρωτεΐνες συνδέονται μεταξύ τους για το σχηματισμό του συμπλόκου-‘διακόπτη’ του μαστιγίου (flagellar switch complex) [Yamaguchi et al., 1986a; Tang and Blair, 1995; Tang et al., 1995; 1996; Marykwas et al., 1996]. Ακόλουθες μορφολογικές μελέτες, τοποθέτησαν τοπολογικά τις πρωτεΐνες του ‘διακόπτη’ στη βάση του μαστιγίου, όπου σχηματίζουν μία υπερμοριακή δομή σε σχήμα δακτυλιδίου, το C-ring, το οποίο προβάλλει εντός του κυτταροπλάσματος [Khan et al., 1992; Francis et al., 1994].

Έχει δειχθεί ότι η FliG λαμβάνει απευθείας μέρος στην παραγωγή κίνησης [Yamaguchi et al., 1986b; Lloyd et al., 1996; Lloyd and Blair, 1997]. Επίσης, η FliG συνδέεται με τη FliF, την πρωτεΐνη που σχηματίζει το διαμεμβρανικό δακτύλιο MS και ουσιαστικά αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ των δύο δακτυλίων (MS-ring και C-ring) [Francis et al., 1992; Grunenfelder et al., 2003; Kihara et al., 2000; Oosawa et al., 1994]. Έχει επίσης δειχθεί ότι η FliM έχει καθοριστικό ρόλο στη μεταγωγή μεταξύ CW και CCW κατάστασης [Sockett et al., 1992] μέσω αλληλεπίδρασης με τη φωσφορυλιωμένη μορφή της CheY [Welch et al., 1993]. Για τη FliN είχε αρχικά προταθεί ότι ο κύριος ρόλος της ήταν η παραγωγή κίνησης, καθώς διάφορες σημειακές μεταλλάξεις επηρέαζαν τη λειτουργία της μηχανής, παράγοντας φαινοτυπικά παράλυτα μαστίγια [Irikura et al., 1993]. Ωστόσο, αργότερα αποδείχθηκε ότι οι FliN και FliM δεν είναι στενά σχετιζόμενες με την παραγωγή κίνησης και ότι ο ρόλος τους στη λειτουργία της μηχανής είναι έμμεσος [Tang and Blair, 1995; Tang et al., 1995; Lloyd et al., 1996].

Εκτός του ρόλου τους στην αλλαγή φοράς περιστροφής, οι τρεις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τη βιογένεση του μαστιγίου. Οι περισσότερες από τις πρωτεϊνικές υπομονάδες του μαστιγίου που συντίθενται εντός του κυτταροπλάσματος πρέπει να διασχίσουν τις βακτηριακές μεμβράνες για να φθάσουν στον τελικό προορισμό τους. Με μερικές εξαιρέσεις, αυτό συμβαίνει με τρόπο μη εξαρτώμενο από το Sec μονοπάτι αλλά μέσω ενός τύπου III μονοπατιού έκκρισης από τις νεοσυντιθέμενες υπερμοριακές δομές του κεντρικού καναλιού του ίδιου του μαστιγίου [recent reviews : Macnab, 2004; 2004; Minamino and Namba, 2004]. Έχει προταθεί ότι η FliN εμπλέκεται στη διαδικασία της ειδικής έκκρισης από το μαστίγιο [Vogler et al., 1991].

Το σύμπλοκο του 'διακόπτη' περιλαμβάνει πάνω από 100 αντίγραφα της FliN, περίπου 34 αντίτυπα της FliM [Zhao et al., 1996; Thomas et al., 1999] και 25 αντίγραφα της FliG [Francis et al., 1992; Jones et al., 1990; Sosinsky et al., 1992; Suzuki et al., 2004; Zhao et al., 1996; Thomas et al., 2006]. Η αφθονία της FliM καθορίζει και τη συμμετρία του δακτυλίου. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί συμμετρίες από 32 έως 38 υπομονάδων με συχνότερες αυτές των 34 και 35, σε απομόνωση βασικών σωμάτων των μαστιγίων [Young et al., 2003; Thomas et al., 2006]. Η διάμετρος του C-ring είναι 45nm και το ύψος του 15nm [Francis et al., 1994; Khan et al., 1992; Thomas et al., 2001]. Από την αφθονία της κάθε πρωτεΐνης που αναγράφεται παραπάνω συμπεραίνεται και η στοιχειομετρία FliM:FliN = 1:3. Όντως, σε απομονωμένα βασικά σώματα από τον οργανισμό *Salmonella enterica* serovar Typhimurium η στοιχειομετρία που παρουσιάζεται είναι 1:3 [Zhao et al., 1996]. Ωστόσο, σε *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με καθαρές ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (του *E. coli*), η στοιχειομετρία του συμπλόκου FliM:FliN βρέθηκε 1:4 με αναλυτική υπερφυγοκέντρηση [Brown et al., 2005; Paul., 2006].



Εικόνα 1.6 Όψεις επιφάνειας από τους τρισδιάστατους χάρτες του κυτταροπλασματικού δακτυλίου από απεικονίσεις ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ύστερα από επεξεργασία και μοντελοποίηση. Παρουσιάζονται τρεις μορφές του C-ring με συμμετρίες 33, 34 και 35 από τρεις διαφορετικές γωνίες : από το πλάι (αριστερά), από πάνω δηλαδή από το MS-ring (στη μέση), και από κάτω δηλαδή από το κυτταρόπλασμα (δεξιά). Η εικόνα έχει αναπαράχθει και τροποποιηθεί από Thomas et al., 2006

1.6 Στόχοι της εργασίας

Ο γενικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η δομική μελέτη του συμπλόκου που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *P. syringae*. Γνωρίζοντας από προηγούμενες μελέτες ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, ο πρώτος στόχος ήταν η απομόνωση μιας ανασυνδυασμένης διαλυτής και σταθερής μορφής του συμπλόκου. Στη συνέχεια, οι περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών και η στοιχειομετρία, αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης. Το ενδιαφέρον για το σύμπλοκο αυτό έγκειται στο γεγονός ότι πιθανότατα σχηματίζει υπερμοριακή δομή αντίστοιχη αυτής του C-ring του βασικού σώματος του μαστιγίου, βάση της ομολογίας που παρουσιάζουν οι υπομονάδες τους. Συνεπώς, η δομική μελέτη προσανατολίζεται όχι μόνο στον κρυσταλλογραφικό προσδιορισμό της δομής αλλά γενικότερα στην εύρεση των δομικών χαρακτηριστικών αυτής της υπερμοριακής δομής και διερεύνηση του κατά πόσο είναι δυνατόν να συντεθεί εκτός του βακτηρίου του *P. syringae* και απουσία των λοιπών πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος. Επίσης, επιχειρήθηκε η απομόνωση και κρυστάλλωση της HrcQa, της οποίας η δομή δεν έχει προσδιοριστεί. Αυτό δεν επετεύχθη άλλα εξακολουθεί να αποτελεί στόχο για περαιτέρω μελέτη. Ο μακροπρόθεσμος και βασικότερος στόχος της ενασχόλησης με το σύμπλοκο αυτό είναι η κρυστάλλωση και λύση της δομής του.

Κεφάλαιο 2

Υλικά, μέθοδοι & πειραματικές διαδικασίες

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι βασικές τεχνικές που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής. Περιγράφονται τόσο οι αρχές που τις διέπουν όσο και οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν σε γενικά πλαίσια. Όπου οι διαδικασίες υπέστησαν τροποποιήσεις, αυτές αναφέρονται στο επόμενο κεφάλαιο όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα.

2.1 Χειρισμοί DNA – κλωνοποίηση

Μία σειρά τεχνικών λαμβάνουν χώρα για την επίτευξη της κλωνοποίησης μιας αλληλουχίας DNA εντός πλασμιδίου-φορέα. Στην περίπτωση της εργασίας αυτής, πλασμίδιο που φέρει την προς κλωνοποίηση αλληλουχία χρησιμοποιείται ως αρχική μήτρα, ενισχύεται το κατάλληλο τμήμα με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ενώ κατάλληλα σχεδιασμένοι εκκινητές φέρουν περιοριστικές θέσεις. Ακολουθεί προετοιμασία του προϊόντος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και του φορέα με κατάλληλες πέψεις με περιοριστικά ένζυμα ώστε να προκύψουν συγκολλητικά άκρα, και στη συνέχεια, αντίδραση λιγάσης ενώνει τα άκρα αυτά. Το υλικό αυτό χρησιμοποιείται ακολούθως για να μετασηματίσει επιλεκτικά κύτταρα *E.coli* τα οποία

μεγαλώνουν σε επιλεκτικό μέσο παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού και οι αποικίες τους τέλος ελέγχονται για την παρουσία του επιθυμητού κλώνου.

2.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές αλληλουχίες. Οι γνωστές αυτές αλληλουχίες αποκρίνονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως : να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (pair-dimers) κυρίως όχι στο 3' άκρο. Το περιεχόμενο σε GC πρέπει να είναι από 40% ως 60%, η χρήση περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται προς το 5' άκρο. Μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους είναι η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} . Υψηλά ποσοστά του ιόντος προκαλούν μη ειδικό πολυμερισμό, ενώ πολύ λίγα καταστέλλουν την αντίδραση. Οι θερμοκρασίες annealing είναι επίσης κρίσιμες. Η υψηλή θερμοκρασία αυξάνει την ειδικότητα της αντίδρασης.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε η Taq πολυμεράση [Minotech], είτε η Pfu πολυμεράση [Promega], είτε η Ext [Finnzymes]. Η Taq πολυμεράση δεν διαθέτει 3' προς 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης όπως οι Pfu και Ext και δεν μπορεί να διορθώσει τα λάθη της έτσι τα ενισχυμένα τμήματα πιθανών να φέρουν συχνότερες μεταλλαγές. Οι εκκινητές συντίθενται από το εργαστήριο Μικροχημείας (IMBB-FORTH) κατόπιν παραγγελίας.

Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται 30 φορές (κύκλοι). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα (cycler), το οποίο είναι σε θέση να θερμαίνει και να ψύχει τις αντιδράσεις σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα:

1. Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της μήτρας DNA με επώαση στους $94^{\circ}C$: Κατά την αποδιάταξη, η δίκλωνη έλικα ανοίγει σε δύο αλυσίδες μονόκλωνου DNA και όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (για παράδειγμα, η επιμήκυνση του προηγούμενου κύκλου).

2. Υβριδισμός των εκκινητών : Οι εκκινητές υπόκεινται στο διάλυμα σε διαρκή κίνηση Brown. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δίκλωνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις

πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μήτρας και εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης.

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

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται στοιχεία για τις αντιδράσεις που έλαβαν χώρα για κάθε μια από τις 5 γονιδιακές κατασκευές ενώ οι χάρτες των πλασμιδιακών φορέων βρίσκονται στο παράρτημα Α. Οι υπογραμμισμένες βάσεις στους εκκινητές (primers) υποδεικνύουν τις θέσεις περιορισμού.

| | HrcQa ^{-Nter-} HrcQb | HrcQa ^{-Nter} | HrcQaC-HrcQb | HrcQa ^{-tr-} HrcQb | HrcQaC-HrcQbC | |
|------------------------|---|--|--|---|---|--|
| | | | | | MCSI | MSCII |
| Upper primer (18μM) | 5' - <u>GATATCCCCCA</u> <u>TATGCTCG</u> -3' | 5' - <u>CCTTACCATGG</u> GGGGCG- 3' | 5'- <u>CAGCTTCACGCGC</u> <u>ATATGCAT</u> -3' | 5' - GGTGCCGGGT <u>TCAGATACATA</u> <u>TGGGTGG</u> - 3' | 5'- CGCAAGCACCCAC <u>CCATGGCTTAAGG</u> AGTCAGATACGG ATGGGT-3' | 5'- GCAGCATATGC AGGACGAGC-3' |
| Lower primer (18μM) | 5' - CGCCCTCCACT <u>CGAGTGATC</u> - 3' | 5' - <u>CTCGAAAGCTT</u> CCTGATAC- 3' | 5'- CGCCCTCCACTCG <u>AGTGATC</u> - 3' | 5'- <u>TGGTGCTCGAG</u> TGATC-3' | 5'- <u>CTCGAAAGCTTCC</u> TGATAC-3' | 5'- CTTGTAGGA <u>TCCGGATCTCA</u> G-3' |
| dNTPs | 0.25mM | 0.25mM | 0.25mM | 0.25mM | 0.25mM | 0.25mM |
| Mg ²⁺ | 4mM | 4mM | 4mM | 4mM | 4mM | 4mM |
| Polymerase | Taq 0.025u/μl | Taq 0.025u/μl | Ext 0.02u/μl | Pfu 0.03u/μl | Pfu 0.03u/μl | Pfu 0.03u/μl |
| Template | HrcQa-HrcQb/ pET16b | HrcQa-HrcQb/ pET16b | HrcQa-HrcQb/ pET16b | HrcQa ^{-Nter-} HrcQb/pET26b | HrcQa ^{-Nter} PCR product | HrcQa ^{-Nter-} HrcQb/pET26b |
| Buffer | 1x Taq buffer | 1x Taq buffer | 1x Ext buffer | 1x Pfu buffer | 1x Pfu buffer | 1x Pfu buffer |
| T annealing | 48°C | 50°C | 50°C | 55°C | 50°C | 50°C |
| PCR product | 880 bp | 509 bp | 712 bp | 741 bp | 400 bp | 293 bp |

Πίνακας 1 Συνθήκες στις οποίες έλαβε χώρα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για κάθε μία από τις γονιδιακές κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν

Οι παρασκευαστικές αντιδράσεις PCR, οι οποίες πραγματοποιούνται στις παραπάνω συνθήκες, ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αгарόζης και οι ζώνες αποκόπτονται από την πηκτή με ένα καθαρό νυστέρι, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αгарόζης κατά το δυνατόν περισσότερο. Η ζώνες ζυγίζονται και απομονώνεται το προϊόν PCR με το QiaQuick Gel Extraction kit [Qiagen] βάσει του πρωτοκόλου που περιγράφεται στο εγχειρίδιο του kit.

2.1.2 Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων και των ενθεμάτων έτσι ώστε να έχουν συγκολλητικά άκρα για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation), πραγματοποιούνται πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα των εταιρειών Biolabs και Minotech, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία 0.1μg/ml BSA όπου προτείνεται. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα περιορισμού πραγματοποιούνται στους 37°C για 2 ώρες. Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά υπακούν στον κανόνα-ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1 μg DNA σε 1 ώρα, στους 37°C.

Συγκεκριμένα, για τα προϊόντα PCR γίνονται διαδοχικές πέψεις με τα δύο ένζυμα και κάθε φορά μετά την πέψη το προϊόν καθαρίζεται με το QiaQuick kit [Qiagen]. Τμήματα που είναι μεταξύ 100bp και 10kbp μπορούν να διαχωριστούν από εκκινητές, νουκλεοτίδια, ένζυμα και αλάτια. Για την κάθε μία από τις κατασκευές που πραγματοποιηθήκαν χρησιμοποιήθηκαν τα δύο ένζυμα που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Με τα ίδια ένζυμα υπέστησαν πέψεις οι πλασμιδιακοί φορείς ανά περίπτωση.

| PCR product | | Restriction enzyme I | Restriction enzyme II |
|-------------------------------|--------|----------------------|-----------------------|
| HrcQa ^{-Nter} -HrcQb | | NdeI | XhoI |
| HrcQa ^{-Nter} | | NcoI | HindIII |
| HrcQaC-HrcQb | | NdeI | XhoI |
| HrcQa ^{-tr} -HrcQb | | NdeI | XhoI |
| HrcQaC-HrcQbC | HrcQaC | NcoI | HindIII |
| | HrcQbC | NdeI | BamHI |

Πίνακας 2 Τα δύο περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε PCR προϊόν ώστε να προκύψει το ένθεμα το οποίο εισάγεται στη συνέχεια στον πλασμιδιακό φορέα ο οποίος έχει υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα

2.1.3 Αντίδραση λιγάσης

Η T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' ομάδας –OH μεταξύ δύο δίκλωνων άκρων DNA, είτε αυτά είναι τυφλά είτε προεξέχοντα. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml BSA). Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιούνται με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση [Minotech], στους 19°C για 14-16 ώρες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ζευγάρια ενθεμάτων-πλασμιδιακών φορέων που πήραν μέρος στις αντιδράσεις λιγάσης ώστε να προκύψουν κλωνοποιημένοι πλασμιδιακοί φορείς. Οι χάρτες και οι περιοχές κλωνοποίησης των φορέων παρουσιάζονται στο παράρτημα Α ενώ το τι επιδιώκεται με την κάθε κατασκευή αναλύεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων [Κεφ. 3].

| | | |
|-------------------------------|--------|---|
| HrcQa ^{-Nter} -HrcQb | | pET26b(+) [Novagen] |
| HrcQa ^{-Nter} | | pPROEX-HTb [Invitrogen] |
| HrcQaC-HrcQb | | pET26b(+) [Novagen] |
| HrcQa ^{-tr} -HrcQb | | pET26b(+) [Novagen] |
| | HrcQaC | MCSI of pPROpET [Plant Biotechnology Lab, Univ. of Crete] |
| HrcQaC-HrcQbC* | HrcQbC | MCSII of pPROpET (already cloned in MCSI) [Plant Biotechnology Lab, Univ. of Crete] |

Πίνακας 3 Τα ζευγάρια ενθεμάτων – πλασμιδιακών φορέων τα οποία μετά τις πέψεις φέρουν συγκολλητικά άκρα και συνδέονται μετά την αντίδραση λιγάσης.

* Η σύνθετη διαδικασία κλωνοποίησης αυτής της κατασκευής παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων

2.1.4 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Μια ποσότητα 100 μl επιδεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80°C όπου φυλάσσονται και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθεται ποσότητα πλασμιδιακού DNA στα κύτταρα (είτε 10μl αντίδρασης λιγάσης σε κύτταρα *E. coli* DH5a τα οποία είναι κατάλληλα για να διατηρούν το πλασμίδιο, είτε όπως θα αναφερθεί παρακάτω, 1μl θετικού κλώνου πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) που είναι κατάλληλα για υπερέκφραση) και επωάζονται στον πάγο για 30min. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 90 sec. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 5min, ακολουθεί προσθήκη 900μl LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) και επώαση στους 37°C

για 1.5 ώρα. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται σε ποιο αντιβιοτικό προσδίδει ανθεκτικότητα ο κάθε φορέας και σε ποια τελική συγκέντρωση αυτό χρησιμοποιείται είτε σε στερεά είτε σε υγρά θρεπτικά μέσα.

| Vector | Resistance |
|---|-----------------------|
| pET26b(+) [Novagen] | Kanamycin (40μg/ml) |
| pPROEX-HTb [Invitrogen] | Ampicillin (100μg/ml) |
| pPROpET [Plant Biotechnology Lab, Univ. of Crete] | Kanamycin (40μg/ml) |

Πίνακας 4 Η ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που προσδίδει ο κάθε φορέας και η συγκέντρωση στην οποία χρησιμοποιείται το κάθε αντιβιοτικό σε υγρά και στερεά θρεπτικά μέσα ώστε να γίνεται επιλογή και να επιβιώνουν μόνο κύτταρα που φέρουν το φορέα αυτό

2.1.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες από τα τρυβλία μετασχηματισμού της αντίδρασης λιγάσης και προστίθενται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εφοδιασμένο με κατάλληλο αντιβιοτικό. Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37°C υπό γρήγορη ανάδευση (250 rpm) για 14-16 ώρες. Από τις μικρές αυτές καλλιέργειες απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA με τη μέθοδο “Boiling miniprep for plasmid DNA” όπως ακριβώς περιγράφεται στο εγχειρίδιο “Molecular Biology Protocols”, Sathasivan, 2001. Μόλις απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA υφίσταται πέψη και με τα δύο ένζυμα ταυτόχρονα και ύστερα από ηλεκτροφόρηση επιλέγονται οι θετικοί κλώνοι που φέρουν το ένθεμα. Οι θετικοί κλώνοι ή κάποιοι από αυτούς στέλνονται στο εργαστήριο Μικροχημείας (IMBB-FORTH) για αλληλούχηση DNA ώστε να διαπιστωθεί εάν έχουν γίνει σημειακά λάθη.

2.1.6 Μακρά αποθήκευση κυττάρων σε γλυκερόλη (glycerol stock)

Μετασχηματισμένα κύτταρα *E. coli* DH5a από μικρές καλλιέργειες των θετικών κλώνων αναμειγνύονται με γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% και φυλάσσονται στους -80°C για μακράς διάρκειας αποθήκευση. Τα απομονωμένα πλασμίδια από τους θετικούς κλώνους χρησιμοποιούνται για να μετασχηματίσουν κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) τα οποία με τον ίδιο τρόπο φυλάσσονται στους -80°C και χρησιμοποιούνται για το μπόλιασμα καλλιεργειών για υπερέκφραση και παραγωγή ανασυνδιασμένου προϊόντος.

2.2 Επαγόμενη ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

2.2.1 Πλασμιδιακοί φορείς – μηχανισμοί ελέγχου έκφρασης

Τρεις πλασμιδιακοί φορείς χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία για την ετερόλογη έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια *E. coli*. Ο κάθε φορέας προσδίδει στοιχεία ελέγχου της έκφρασης βασισμένα σε διαφορετικά συστήματα, ενώ η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση ήταν η BL21(DE3), ανεξάρτητα από το φορέα.

Ο φορέας pPROEX-HTb [Invitrogen] και υπόκειται στο σύστημα ελέγχου *trc*. Ο εκκινητής (promoter) *trc* αποτελεί υβρίδιο του εκκινητή του οπερονίου *trp* (consensus -35 περιοχή και ιδανικού μήκους spacer μέχρι το -10) και του εκκινητή *lacUV5* (consensus -10 περιοχή). Η έναρξη της μεταγραφής-μετάφρασης επιτυγχάνεται με προσθήκη IPTG το οποίο προσδένεται στον αναστολέα (LacI) του ρυθμιστή (operator) *lac*, και τον κάνει να απελευθερώνεται από αυτόν, τερματίζοντας την αναστολή της μεταγραφής. Η αλληλουχία του *trc* υβριδικού εκκινητή αναγνωρίζεται από RNA πολυμεράση του *E. coli* και αυτή χρησιμοποιείται για τη μεταγραφή.

Η έκφραση στους φορείς pET26b(+) [Novagen] και pPROpET [Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Πανεπιστημίου Κρήτης] ελέγχεται από το σύστημα του T7 εκκινητή του βακτηριοφάγου. Η αλληλουχία του δεν αναγνωρίζεται από RNA πολυμεράσες του *E. coli* και για το λόγο αυτό, οι φορείς πρέπει να χρησιμοποιούνται συνδιαζόμενοι με κυτταρικές σειρές που φέρουν στο χρωμοσωμικό τους DNA γονίδιο που να κωδικοποιεί για την T7 RNA πολυμεράση (λDE3 lysogen). Τέτοιες σειρές είναι οι χαρακτηριζόμενες DE3. Η έκφραση της T7 πολυμεράσης από το κύτταρο ξεκινά με την προσθήκη IPTG, καθώς το γονίδιο υπόκειται σε έλεγχο από το *lac* εκκινητή και το *lac* ρυθμιστή ο οποίος αναστέλεται από το LacI αναστολέα. Ο ίδιος ρυθμιστής βρίσκεται και downstream του T7 εκκινητή στον πλασμιδιακό φορέα. Έτσι, υπάρχει διπλός έλεγχος για να μην ξεκινήσει η υπερέκφραση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης πριν την επαγωγή με IPTG με συνέπειες στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Ο φορέας pPROpET έχει κατασκευαστεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Πανεπιστημίου Κρήτης από τη διδακτορική φοιτήτρια Σ. Χαρόβα. Είναι υβρίδιο των φορέων pET26b(+) και pPROEX-HTb. Διαθέτει δύο θέσεις κλωνοποίησης (multiple cloning sites, MCS), υπόκειται στο σύστημα ελέγχου T7, μπορεί να προσδώσει N-τερματική 6His αλληλουχία και αλληλουχία αναγνώρισης TEV πρωτεάσης στην άνω θέση κλωνοποίησης, ενώ μπορεί να προσδώσει 6His αλληλουχία στο C-τερματικό άκρο της κάτω θέσης κλωνοποίησης. Προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Ο χάρτης του pPROpET, όπως και των λοιπών πλασμιδιακών φορέων, βρίσκεται στο παράστημα Α.

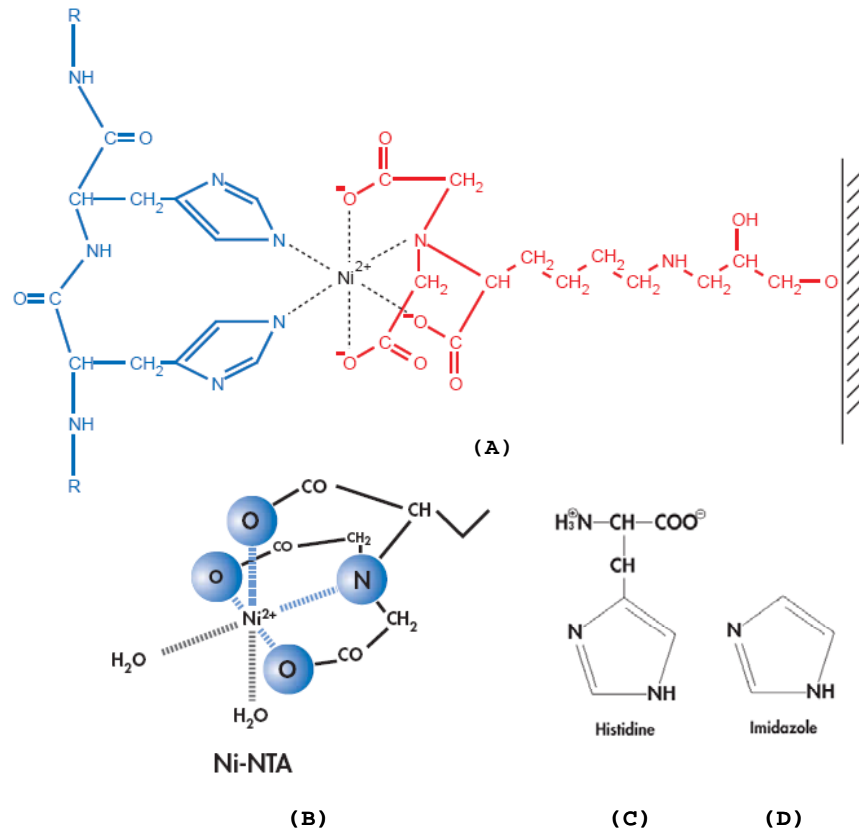
2.2.2 Διαδικασία επαγωγής έκφρασης σε υγρές κυτταρικές καλλιέργειες

Πειραματικά, η επαγωγή πραγματοποιείται όταν οι καλλιέργειες των κυττάρων βρίσκονται στην εκθετική φάση (Optical Density(600nm) ~ 0.6). Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται είναι το LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) και περιέχει πάντα το κατάλληλο αντιβιοτικό για το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα ο εκάστοτε φορέας [βλ. Πίνακα 4].

Αρχικά, μπολιάζεται μικρού όγκου καλλιέργεια από glycerol stock η οποία επωάζεται για ~14 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, γίνεται αραιώση 1:50 αυτής της καλλιέργειας σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Η καλλιέργεια επωάζεται εκ νέου στους 37°C και όταν βρεθεί στην εκθετική φάση, προστίθεται ποσότητα IPTG κατά περίπτωση (συνήθως ~0.5mM τελική συγκέντρωση). Η επαγωγή γίνεται σε θερμοκρασία και για διάρκεια τέτοια ώστε να μην επηρεαστεί η απόδοση σε διαλυτό πρωτεϊνικό προϊόν.

2.3 Χρωματογραφία συγγένειας

Μια βασική μέθοδος χρωματογραφίας συγγένειας που χρησιμοποιείται ευρέως για τις ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες που φέρουν επίτοπο 6 ιστιδινών είναι η χρήση νικελίου (IMAC, immobilized metal chelate affinity chromatography). Στην παρούσα εργασία η απομόνωση των ανασυνδιασμένων His-tagged πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρήση προπακαταρισμένων στηλών ρητίνης που περιέχουν είτε Sepharose® CL-6B (agarose) ή Superflow ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το Ni²⁺ μέσω νίτριλο τριοξυκού οξέος (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης στη σφαίρα συναρμογής του Ni²⁺ αφήνοντας 2 θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με το εξαϊστιδινικό επίτοπο. Έτσι, κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 6 ιστιδίνες αντιστοιχεί σε 3 ιόντα Ni²⁺. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την ιστιδίνη στην πρόσδεση Ni²⁺ και με τον τρόπο αυτό μπορεί να εξασφαλιστεί η μη ειδική πρόσδεση με προσθήκη μικρής ποσότητας ιμιδαζολίου στο πρωτεϊνικό διάλυμα που φορτώνεται στην κολώνα Ni-NTA και με εκπλύσεις με διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου απομακρύνονται οι τυχόν μη ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες. Η αποδέσμευση της His-tagged πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με μεγάλη συγκέντρωση ιμιδαζολίου που αντικαθιστά τις ιστιδίνες που είναι συνδεδεμένες στο Ni²⁺.



Εικόνα 2.1 (A) Αλληλεπίδραση δύο γειτονικών ιστιδινών με το υλικό Ni-NTA, (B) Ni-NTA με δύο θέσεις ελεύθερες στη σφαίρα συναρμογής του Ni²⁺, (C) η χημική δομή της ιστιδίνης σε σύγκριση με τη χημική δομή του ιμιδαζολίου (D). Οι εικόνες έχουν αναπαράχθει από το εγχειρίδιο QiaExpressionist, Qiagen, 2003

2.3.1 Απομόνωση πρωτεΐνης μεγάλης κλίμακας με Ni-NTA

Η κυτταρική πάστα που έχει προκύψει από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας επαναδιαλυτοποιείται σε lysis buffer (το lysis buffer που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία είναι συνήθως το lysis buffer A : [20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 20% Glycerol, 0.5% Triton-X, 20mM 2-mercaptoethanol] όγκου ~10ml/g κυτταρικής πάστας. Στο διάλυμα προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (benzamidine 150mg/ml, leupeptin 20μg/ml, PMSF 1mM – τελικοί όγκοι). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπέρηχους για συνολικό χρόνο ~4 λεπτά. Η λύση σταματάει όταν το διάλυμα γίνεται διαυγές. Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται (13,000rpm, Jouan MR-23, rotor AM100.13/1hr) για το διαχωρισμό των μη διαλυτών (ίζημα) και διαλυτών σωματίων (υπερκείμενο). Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη που περιέχει υλικό Ni-NTA agarose ή superflow το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 10 όγκους κολώνας buffer A. Η ταχύτητα ροής μέσω της στήλης ελέγχεται από περισταλτική αντλία και είναι

0.5ml/min για το Ni-NTA agarose και 2ml/min για το Ni-NTA superflow που είναι η προτεινόμενη για την πρόσδεση των his-tagged πρωτεϊνών πάνω στο Ni-NTA [The QIAexpressionist handbook, Qiagen, 2003]. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις της κολώνας με wash buffers που περιέχουν 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl και αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, συνήθως με μέγιστη τα 40mM. Οι εκλούσεις της His-tagged πρωτεΐνης πραγματοποιούνται σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου κατά περίπτωση, και είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγγένεια που παρουσιάζει η κάθε His-tagged πρωτεΐνη εγγενώς για το Ni²⁺. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στους 4°C για την αποφυγή δράσης πρωτεασών ή και αλλοίωσης της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται τη διαδικασία της διαπίδωσης έναντι 2 λίτρων διαλύματος 20mM Tris pH 8, 50mM NaCl για την ελαχιστοποίηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Κατά τη διαδικασία αυτή το πρωτεϊνικό διάλυμα διαχωρίζεται από το εξωτερικό διάλυμα με μία ημιπερατή μεμβράνη που επιτρέπει ελεύθερη διέλευση σε μικρά μόρια αλλά εμποδίζει τη διέλευση του μακρομορίου, ώστε στο τέλος οι συγκεντρώσεις να εξισορροπούνται και να αραιώνεται η συγκέντρωση ιμιδαζολίου στον όγκο των 2 λίτρων. Στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα συγκεντρώνεται σε τελικό όγκο που εξαρτάται από τη μετέπειτα χρήση της πρωτεΐνης. Όπου η διαδικασία παρεκκλίνει από αυτό το σχήμα, αυτό αναφέρεται στο κεφάλαιο 3 όπου γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων.

2.3.2 Απομόνωση πρωτεΐνης μικρής κλίμακας με Ni-NTA

Η απομόνωση ξεκινά από μικρές καλλιέργειες (100-200ml) και έχει σκοπό διερευνητικό και όχι παρασκευαστικό. Η διαδικασία είναι η ίδια με αυτή της μεγάλης κλίμακας απομόνωση με τη διαφορά ότι δεν τηρούνται συνήθως τα μέτρα για την προστασία της πρωτεΐνης (παραλείπονται οι ακριβοί αναστολείς, η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου με κρύα buffers) καθώς δεν θα χρησιμοποιηθεί περαιτέρω. Επίσης, γίνεται συνήθως μία έκλυση στα 300mM ιμιδαζολίου.

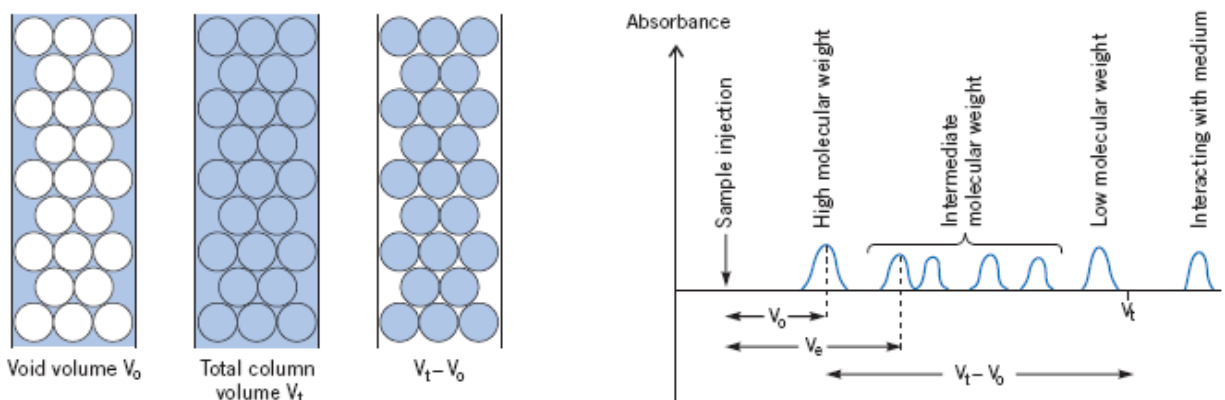
2.3.3 Απομόνωση πρωτεΐνης μικρής κλίμακας με Ni-NTA υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Ο σκοπός για τον οποίο χρησιμοποιήθηκε αυτή η πειραματική διαδικασία σε αυτή την εργασία είναι για την ταυτοποίηση της πρωτεΐνης του συμπλόκου που φέρει το His-Tag. Υπό αποδιατακτικές συνθήκες οι δύο πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και δεν είναι δυνατόν να αλληλεπιδράσουν και ως σύμπλοκο να συνδεθούν μαζί πάνω στο Ni-NTA αλλά η πρωτεΐνη που φέρει την ουρά των 6 ιστιδινών συνδέεται και μάλιστα με πολύ μεγάλη συγγένεια πάνω στο Ni-NTA.

Η διαδικασία είναι να διατηρείται η κυτταρική πάστα σε διάλυμα 8M ουρίας για τουλάχιστον 2 ώρες υπό ανάδευση, στη συνέχεια να κατακρημνίζονται τα αδιάλυτα σωματίδια με φυγοκέντρηση και τα διαλυτά να φορτώνονται σε μικρή στήλη Ni-NTA. Τα διαλύματα των εκπτώσεων περιέχουν επίσης 8M ουρία καθώς και το διάλυμα έκλουσης των 300mM ιμιδαζολίου. Η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου υποχρεωτικά για την αποφυγή κρυστάλλωσης της ουρίας.

2.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης επιτυγχάνει το διαχωρισμό μορίων με βάση την υδροδυναμική ακτίνα τους η οποία είναι ανάλογη του μοριακού βάρους για σφαιρικές πρωτεΐνες. Η στατική φάση στη χρωματογραφία αυτή συνίσταται από σφαιρίδια πολυμερούς υλικού που χαρακτηρίζονται από μεγάλο βαθμό πορωσιμότητας και σταθερό μέγεθος πόρων. Μόρια αρκετά μικρότερα σε μέγεθος από τη διάμετρο των πόρων διαχέονται εύκολα στο εσωτερικό των σφαιριδίων και παραμένουν εκεί για αρκετό χρόνο. Αντίθετα μόρια με μέγεθος πολύ μεγαλύτερο από τη διάμετρο των πόρων δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό, διαφεύγουν από τα κενά μεταξύ των πόρων και εκλούνται πρώτα από όλα τα συστατικά του μίγματος σε ένα χαρακτηριστικό όγκο που ονομάζεται νεκρός όγκος. Γενικά, τα συστατικά του προς διαχωρισμού μίγματος δεν αλληλεπιδρούν με το χρωματογραφικό υλικό. Η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά, οι μεγάλοι μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκλούνται πρώτες από τη στήλη και ακολούθως εκείνες με διαδοχικά μικρότερα μοριακά βάρη.



Εικόνα 2.2 Συνήθεις όροι που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης [Gel Filtration, Principles & Methods, Amersham Biosciences Handbook]

Τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πρωτεϊνών εξετάστηκαν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Για το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν τα χρωματογραφικά υλικά Sephacryl S-200, S-300 και S-400 [Amersham]. Οι στήλες S-200 και S-300 είχαν βαθμονομηθεί με τα LMW και HMW calibration kits [Amersham] ενώ για την S-400 δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο kit για βαθμονόμηση και δεν έχει βαθμονομηθεί ακόμη με κάποιον άλλο τρόπο ο οποίος πρέπει να διερευνηθεί. Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλουσης και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h καθορίστηκε άμεσα από διάγραμμα που έφερε στον άξονα Y τις τιμές του όγκου έκλουσης κάθε πρωτεΐνης – μάρτυρα και στον άξονα X τις τιμές των υδροδυναμικών τους ακτίνων. Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλουσης και του φαινομενικού μοριακού βάρους προσδιορίζεται έμμεσα μέσω του συντελεστή $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ όπου V_e είναι ο όγκος έκλουσης, V_o ο νεκρός όγκος και V_t ο συνολικός όγκος της στήλης. Ο συντελεστής K_{av} καθορίζει το ποσοστό των πόρων του χρωματογραφικού υλικού που μπορούν να καταληφθούν από το συγκεκριμένου μεγέθους σωματίδιο. Η ευθεία βαθμονόμησης είναι ο συντελεστής K_{av} συναρτήσεως του λογαρίθμου του μοριακού βάρους, $\log MW$ των γνωστών πρωτεϊνών. Στον παρακάτω πίνακα [Πίνακας 5] εμφανίζονται στοιχεία για την κάθε στήλη που χρησιμοποιήθηκε.

| Material | Column | Fractionation Range | Best Separation Volume* | V_t | V_o | $V_e(R_h)$ Calibration curve | $K_{av}(\log MW)$ Calibration curve |
|--------------------|-----------------|---------------------|-------------------------|--------|-------------|------------------------------|-------------------------------------|
| S-200 Sephacryl | XK 26/60 | 5-250 kDa | 192 ml | 320 ml | 123.2 ml | $Y = -0.47X + 119.9$ | $Y = -0.188X + 0.543$ |
| S-300 Sephacryl | HiPrep 16/60 | 10-1500 kDa | 72 ml | 120 ml | 37 ml | - | $Y = -1.96X + 5.96$ |
| S-400 Sephacryl | XK 16/40 | 20-8000 kDa | 45 ml | 75 ml | ~22.5-26 ml | - | - |

Πίνακας 5 Στοιχεία για τις χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν

* Η βέλτιστη ανάλυση για μία στήλη όγκου 100 ml παρουσιάζεται σε όγκο έκλουσης 60 ml, ανεξαρτήτως υλικού, αρκεί να έχει σφαιρικά beads. Εδώ γίνεται αναγωγή για τους όγκους των στηλών που χρησιμοποιήθηκαν [Scopes, 1982]

** Ο νεκρός όγκος προσδιορίζεται με Blue dextran-2000 (2000kDa). Για την S-400, δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με τον τρόπο αυτό γιατί τα 2000kDa είναι εντός της διαχωριστικής της ικανότητας. Όμως, όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο του Scopes [Scopes, 1982] ο νεκρός όγκος είναι το 30-35% του V_t

Το απαλλαγμένο από μιδαζόλιο πρωτεϊνικό διάλυμα που προκύπτει από τη χρωματογραφία Ni-NTA συγκεντρώνεται μέχρι τελικού όγκου ~2.5ml. Η ανάλυση μέσω μοριακής διήθησης των

υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιείται στους 18°C με ροή 0.8 ml/min (S-300, S-400) και 1ml/min (S-200) και η απορρόφηση του εκλούσματος καταγράφεται για δύο μήκη κύματος στα 280nm και 255nm με τη χρήση του λογισμικού UNICORN3.0 [Amersham]. Τα δείγματα φορτώνονται στην προεξισορροπημένη (με 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl buffer) στήλη με λούπα των 2 ml. Η κινητή φάση που συμπαρασύρει το δείγμα αποτελείται από το ίδιο buffer. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για την όλη διαδικασία είναι το ÄKTA purifier [Amersham].

2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS (SDS-PAGE)

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

Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli συμβαίνει πολυμερισμός της πηκτής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτή συσσώρευσης (stacking) γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων [Laemmli, 1970]. Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται 2-μερκαπτοεθανόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (sodium dodecyl sulfate) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται με 1(sample buffer):5(sample) με το διάλυμα φόρτωσης (6 x concentrated : 750mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 52% glycerol, some Bromophenol blue, 4M 2-mercaptoethanol). Ακολουθεί πεντάλεπτος βρασμός των πρωτεϊνών και γρήγορη περιστροφή στην φυγόκεντρο πριν την φόρτωση τους στην πηκτή. Για την κατασκευή της πηκτής στήνεται πρώτα η συσκευή του πολυμερισμού (κατά Laemmli). Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού –separating gel [10% μείγματος ακρυλαμίδης (29% ακρυλαμίδη, 1% N,N' – μεθυλενοδιακρυλαμίδη), 0.375 M Tris- HCl pH 8.8, 0.2% SDS, 0.2% APS, TEMED] και αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτή συσσώρευσης –stacking gel αποτελείται από 5% μείγμα ακρυλαμίδης, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS και TEMED. Το ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM Glycine pH 8.3, 0.1% SDS. Οι συνθήκες τιτλοδότησης του δείγματος στην πηκτή συσσώρευσης είναι στα 100V και στην πηκτή διαχωρισμού στα 150V.

2.5.1 Χρώση με κυανό του Coomassie

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Η πηκτή τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 2.5% w/v Coomassie blue) όπου και αφήνεται για 10min σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως, τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (15% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 1 ώρα σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι εμφανίζονται οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

2.5.2 Μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

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

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

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

2.7 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Ιδιαίτερα στο τέλος ενός καθαρισμού είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται το συνολικό ποσό καθαρής πρωτεΐνης που απομονώθηκε. Για το σκοπό αυτό πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί από τις

οποίες ιδιαίτερα δημοφιλής είναι η μέθοδος Bradford. Υπό κατάλληλες συνθήκες οι όξινες και βασικές ομάδες των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με αποχρωστές ομάδες οργανικών χρωστικών και σχηματίζουν έγχρωμα ιζήματα. Στο φαινόμενο αυτό στηρίζεται η μέθοδος Bradford κατά την οποία χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που σχηματίζει σύμπλοκα πρωτεΐνης-χρωστικής με μέγιστο απορρόφησης στα 595nm. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του δείγματος στα 595nm, με μια πρότυπη καμπύλη που σχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών διαλυμάτων της πρωτεΐνης BSA με τη απορρόφηση τους στα 595nm. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι ευαίσθητη, γρήγορη και σχετικά ακριβής. Αλλά έχει δύο βασικά μειονεκτήματα : παρουσιάζει σημαντική εξάρτηση από την αμινοξική αλληλουχία και είναι ευαίσθητη σε χημικά που χρησιμοποιούνται ευρέως στα εργαστήρια (π.χ. φαινόλη, Tris, EDTA).

2.8 Ελεγχόμενη πρωτεόλυση

Για τα πειράματα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης χρησιμοποιείται η πρωτεάση Subtilisin Carlsberg Type VIII Bacterial από τον *Bacillus licheniformis* ως στερεό υλικό ενεργότητας 10.6 units/mg [Sigma]. Το στερεό υλικό διαλύεται σε διάλυμα 10mM CH₃COONa, 5mM CaCl, pH 7.4. Η πρωτεάση αυτή δε διαθέτει ειδικότητα σε κάποια αλληλουχία, αλλά δείχνει μια προτίμηση να δρα σε θέσεις όπου βρίσκονται μεγάλα αφόρτιστα αμινοξέα. Στο προς πρωτεόλυση πρωτεϊνικό διάλυμα προστίθενται αυξανόμενες ποσότητες διαλύματος πρωτεάσης και διατηρείται για 15min ή 30min στον πάγο (ενδεικτικά οι ποσότητες ήταν από 1μg protein : 1.4x10⁻⁷ units of protease έως 1μg protein : 2.8x10⁻⁵ units of protease). Οι αντιδράσεις πρωτεόλυσης τερματίζονται με προσθήκη sample buffer που περιέχει SDS και 2-μερκαπτοεθανόλη, και βρασμό για 10min.

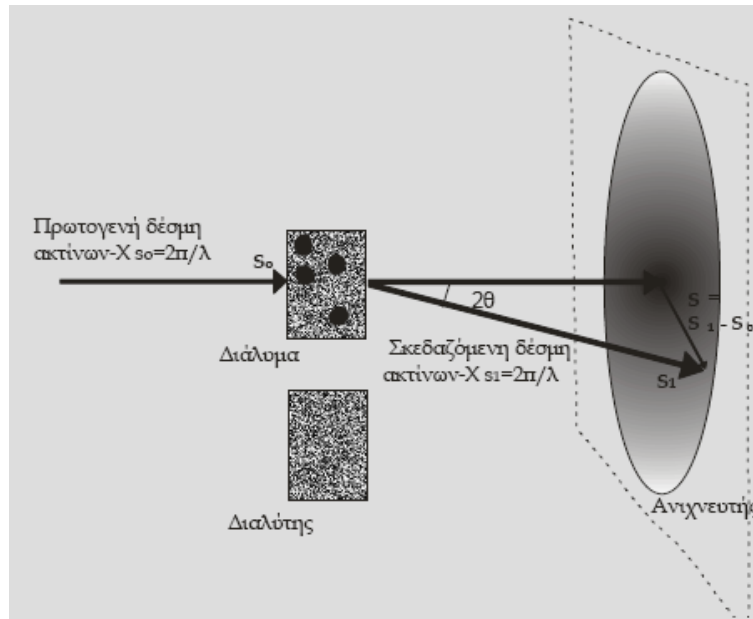
2.9 Σκέδαση ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες (SAXS)

Η σκέδαση από ένα μονοδιάσπαρτο (monodisperse) διάλυμα μακρομορίου δίνεται από τον τύπο:

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

όπου, N_M, είναι ο αριθμός των μακρομορίων, I(s) είναι η σκέδαση από ένα μακρομόριο/σωματίδιο στο διάλυμα στρογγυλοποιημένο στο μέσο όρο προς όλους τους προσανατολισμούς του (averaged over all directions), ή διαφορετικά ο παράγοντας σχήματος και τέλος όπου F(s) είναι ο παράγοντας δομής στο διάλυμα. Ο παράγοντας δομής συμπεριλαμβάνει

τις ελκτικές ή απωστικές μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων και δύναται να διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα στις μικρές γωνίες. Σε ένα διάλυμα άπειρης αραιώσης όμως ο παράγοντας δομής τείνει στην μονάδα και η ένταση της σκέδασης είναι ανάλογη του παράγοντα σχήματος.



Εικόνα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα (εικόνα τροποποιημένη από [Svergun & Koch, 2003], αναπαράχθηκε από τη διδακτορική διατριβή της Δρ Α. Δ. Γαζή [A.D. Gazi, PhD dissertation, Univ. Of Crete, 2007])

2.9.1 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων – Μετασχηματισμός Fourier

Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $P(r)$, είναι όμοια με μία μονοδιάστατη συνάρτηση Patterson - αν αφαιρεθεί η πυκνότητα που αντιστοιχεί στην κορυφή της αρχής (origin) - και περιγράφει την κατανομή των αποστάσεων μεταξύ στοιχειωδών όγκων εντός του σωματιδίου παρέχοντας πληροφορίες για την γεωμετρία του μορίου. Ονομάζεται και electron pair distribution function καθώς μπορεί να θεωρηθεί σαν το ιστόγραμμα των αποστάσεων όλων των πιθανών ζευγών ηλεκτρονίων του σωματιδίου. Η σχέση μεταξύ της $p(r)$ και της καμπύλης σκέδασης $I(s)$ για ένα μονοδιάστατο σύστημα δίνεται από την σχέση:

$$p(r) = r^2 \gamma(r)$$

Όπου $\gamma(r)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier της έντασης της σκέδασης:

$$\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds$$

Η συνάρτηση $P(r)$ μπορεί να υπολογιστεί ικανοποιητικά μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier [Glatter 1977, Glatter & Kratky, 1982, Svergun 1993], i) ορίζοντας τη μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου πέρα από την οποία η συνάρτηση παίρνει την τιμή μηδέν και ii) κάνοντας χρήση γραμμικού συνδυασμού K ορθογώνιων συναρτήσεων, $\varphi_k(r)$, ως εξής:

$$p(r) = \sum_{k=1}^K c_k \varphi_k(r)$$

όπου οι συντελεστές c_k καθορίζονται μέσω προσέγγισης των πειραματικών δεδομένων, $I_e(s_i)$, ελαχιστοποιώντας τη συνάρτηση:

$$\Phi_\alpha(c_k) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{I_e(s_i) - \sum_{k=1}^K c_k \psi_k(s_i)}{\sigma(s_i)} \right]^2 + a \int_0^{D_{\max}} \left[\frac{dp}{dr} \right]^2 dr$$

όπου $\psi_k(s)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier των συναρτήσεων $\varphi_k(r)$, και $\sigma(s_i)$ είναι η τυπική απόκλιση. Η παράμετρος ομαλότητας $a \geq 0$ ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ της προσέγγισης της πειραματικής καμπύλης (πρώτος προσθετός της εξίσωσης) και της ομαλότητας της συνάρτησης $p(r)$, (δεύτερος προσθετός της εξίσωσης).

Η σκέδαση στην μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου μπορούν εκ νέου να εκτιμηθούν μέσω της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων σύμφωνα με τις εξισώσεις:

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \quad R_g = \int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr \left[2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \right]^{-1}$$

Τα σφαιρικά σωματίδια διαθέτουν κωδωνοειδούς σχήματος συναρτήσεις $p(r)$ οι οποίες παρουσιάζουν ένα μέγιστο περίπου στο μισό της μέγιστης διαμέτρου D_{\max} . Τα επιμηκυμένα σωματίδια διαθέτουν ασύμμετρες κατανομές με καθαρό μέγιστο στις μικρές αποστάσεις που αντιπροσωπεύει την ακτίνα της εγκάρσιας διατομής τους $R_{g,cs}$. Τα επίπεδα σωματίδια διαθέτουν ένα ευρύ μέγιστο μετατοπισμένο σε τιμές μικρότερες του μισού της μέγιστης διαμέτρου του

σωματιδίου. Πολύ ανισόμετρα σωματίδια παράγουν καμπύλες της εντάσεως της σκέδασης $I(s)$ χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εξασθενούν βραδύτερα από αυτές των σφαιρικών σωματιδίων. Οι πιο συχνά απαντούμενες αποστάσεις φανερώνονται σαν μέγιστα ή ώμοι στα μοτίβα της σκέδασης. Γενικά όμως οι καμπύλες σκέδασης είναι λιγότερο ενδεικτικές από την συνάρτηση κατανομής αποστάσεων.

2.9.2 *Ab initio* καθορισμός του σχήματος

Η πληροφορία για το σχήμα όμοιων σωματιδίων τυχαία προσανατολισμένων στο διάλυμα σε χαμηλή διακριτικότητα και της εσωτερικής δομής τους είναι δυνατόν να καθοριστεί από την σκέδαση ακτίνων- X στις μικρές γωνίες. Η μοντελοποίηση μέσω ψευδών ατόμων [Agarwal & Isaacs, 1977] στηρίζεται στην διευθέτηση ψευδών ατόμων ακτίνας r_0 σε μια σφαίρα διαμέτρου $D_{\max} \gg r_0$. Η διάμετρος D_{\max} αποτελεί την μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου όπως αυτή εκτιμάται από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου $M \gg (D_{\max}/r_0)^3$ είναι πολύ μεγάλος για τις συμβατικές μεθόδους ελαχιστοποίησης. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις τύπου Monte Carlo όπως η προσομοίωση απόπτωσης. [Chacon et al., 1998, Svergun et al., 1999]. Το πρόγραμμα DAMMIN [Svergun et al., 1999] με τη χρήση προσομοίωσης απόπτωσης επιλέγει τη διαμόρφωση πακεταρισμένων ψευδών ατόμων X που προσεγγίζουν τα πειραματικά δεδομένα ελαχιστοποιώντας την συνάρτηση:

$$f(X) = \chi^2 + aP(X)$$

όπου χ είναι η ασυμφωνία μεταξύ της πειραματικής και της υπολογιζόμενης καμπύλης, $P(X)$ είναι η ποινή για την εξασφάλιση του συμπαγούς και συνεχούς μοντέλου και $a > 0$ η βαρύτητα της τιμής $P(X)$. Πρακτικά το πρόγραμμα ξεκινάει από μία τυχαία διαμόρφωση x σε «υψηλή» θερμοκρασία T . Κάνει ένα μικρό βήμα (τυχαία τροποποίηση της διαμόρφωσης: x') και υπολογίζει την διαφορά $\Delta = f(x') - f(x)$. Αν $\Delta < 0$ αποδέχεται το βήμα αν $\Delta > 0$ το αποδέχεται με μια συγκεκριμένη πιθανότητα $e^{-\Delta/T}$. Κάνει ακόμα ένα βήμα από την διαμόρφωση x αν η x' έχει απορριφθεί ή από την x' αν έχει γίνει αποδεκτή. Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές. Ακολουθώντας μειώνεται η θερμοκρασία σε $T' = cT$, $c < 1$. Το σύστημα συνεχίζει να ψύχεται ωσότου δεν παρατηρείται βελτίωση στο $f(x)$, [Svergun, 1999]. Κατά την ανάκτηση του σχήματος του σωματιδίου από τα δεδομένα σκέδασης σε διάλυμα η επιλογή του εναντιόμορφου γίνεται αυθαίρετα και δεν λαμβάνεται υπόψη παρά μόνο κατά την σύγκριση δύο διαφορετικά παραγόμενων μοντέλων του ίδιου σωματιδίου μεταξύ τους

2.9.3 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων σκέδασης ακτίνων-Χ σε μικρές γωνίες

Δείγματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε τρεις τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν στην γραμμή ακτινοβολίας X33 του γερμανικού συγχροτρονίου (DESY) του Αμβούργου σε συνεργασία με τον εκεί εξωτερικό σταθμό του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL-Hamburg Outstation). Στα δείγματα προστέθηκε DTT (2 mM) και φυγοκεντρήθηκαν σε υψηλές στροφές (18000g για 1 min) μόλις πριν την τοποθέτησή τους σε θερμοελεγχόμενη κυψελίδα mica. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 12°C. Η έκθεση στις ακτίνες-Χ ήταν συνεχής με εναλλαγή δείγματος / διαλύτη και διαρκούσε 3 min. Τα δείγματα εναλλάσσονταν με το ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου η ένταση της σκέδασης επίσης καταγραφόταν για 3 min. Ο ανιχνευτής ήταν δίσκος ειδώλου MAR345 (MarResearch). Τα πρότυπα σκέδασης καταγράφονταν για μία απόσταση 3 έως 4 μέτρων, καλύπτοντας το εύρος του ανύσματος σκέδασης (momentum transfer) $0.15 < s < 5.5 \text{ nm}^{-1}$. ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$, όπου 2θ είναι η γωνία σκέδασης και $\lambda=1.5 \text{ \AA}$ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Η ένταση της σκέδασης που καταγραφόταν στο δίσκο ειδώλου μετατρέποταν σε μονοδιάστατα δεδομένα μέσω του πακέτου προγραμμάτων PRIMUS-MAR [ATSAS2.1, Konarev et al., 2003, 2006]. Τα δεδομένα στρογγυλεύθηκαν στον μέσο όρο έπειτα από κανονικοποίηση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η συνάρτηση απόκρισης του ανιχνευτή για την βαθμονόμηση των δεδομένων υπολογίστηκε επίσης στο PRIMUS. Ο άξονας του ανύσματος της σκέδασης δημιουργούταν χρησιμοποιώντας πρότυπα από καθορισμένα δείγματα με κατάλληλες περιοδικότητες. Τα τελικά αρχεία δεδομένων περιέχουν τρεις στήλες δεδομένων, εκ των οποίων η πρώτη αντιστοιχεί στο άνυσμα σκέδασης, η δεύτερη στην ένταση και η τρίτη στην τυπική απόκλιση των σφαλμάτων (standard error), $\sigma(s)$. Το άνυσμα σκέδασης μπορεί να δίνεται είτε ως $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ είτε ως $S = 2\sin\theta/\lambda$ σε μονάδες nm^{-1} ή \AA^{-1} . Τα δεδομένα αναλύθηκαν για την παρουσία ή όχι φθοράς λόγω ακτινοβολίας με την επαναληπτική ακτινοβολία του ίδιου δείγματος και την σύγκριση των τιμών τους.

Για τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, το PRIMUS αλληλεπιδρά με το πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier GNOM [Semenyuk & Svergun, 1991; Svergun, 1992].

Η μοντελοποίηση μέσω ψευδών ατόμων γίνεται με το πρόγραμμα DAMMIN [Svergun et al., 1999]. Είναι φανερό ότι διαφορετικές τυχαίες αρχικές κατανομές των ψευδών ατόμων στο χώρο έρευνας καταλήγουν σε διαφορετικές λύσεις με τον ίδιο βαθμό ερμηνείας των δεδομένων. Γι' αυτό τα 15 μοντέλα κάθε μελέτης υπερτίθενται ανά ζεύγη με τα εκτελέσιμα DAMSEL/DAMAVER/SUPCOMB [Kozin & Svergun, 2000]. Το μοντέλο αναφοράς επιλέγεται

κατάλληλα από το πρόγραμμα έτσι ώστε να απέχει λιγότερο από το μέσο όρο. Το εκτελέσιμο DAMSUP παρατάσσει τα μοντέλα σύμφωνα με το μοντέλο αναφοράς. Στη συνέχεια το DAMAVER υπολογίζει ένα χάρτη πιθανοτήτων από τα παραταγμένα μοντέλα και τέλος το DAMFILT φιλτράρει αυτό το χάρτη παράγοντας το πιθανότερο μοντέλο (most probable). Στα 15 αυτά μοντέλα εκτιμώνται οι τιμές Κανονικοποιημένης Χωρικής Ασυμφωνίας NSD (Normalized Spatial Discrepancy). Τιμές NSD ανώτερες των 0.7 δίνουν μεγάλες περιοχές εξάπλωσης που υποδεικνύουν την αστάθεια των μοντέλων. Σε αυτές τις περιπτώσεις περισσότερη πληροφορία απαιτείται για τον αξιόπιστο καθορισμό του σχήματος του σωματιδίου. Για την περαιτέρω βελτιστοποίηση του μέσου μοντέλου το εκτελέσιμο DAMSTART παράγει από αυτό έναν σταθερό πυρήνα ψευδών ατόμων ο οποίος εισάγεται εκ νέου στο DAMMIN.

Συγκεκριμένα, τα δεδομένα τα οποία ήταν διαθέσιμα για το σύμπλοκο, οδήγησαν σε μοντέλα των οποίων οι τιμές NSD ήταν πολύ μεγαλύτερες από 0.7 υποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα που προέκυψαν από ανεξάρτητες λύσεις ήταν ιδιαίτερα ασταθή. Έτσι λοιπόν, στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται μοντέλα ως λύση του προγράμματος DAMMIN σε slow mode. Επιλέχθηκαν τα πιο αξιόπιστα από πολλές ανεξάρτητες μοντελοποιήσεις.

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα & Συζήτηση

- Μέρος Α -

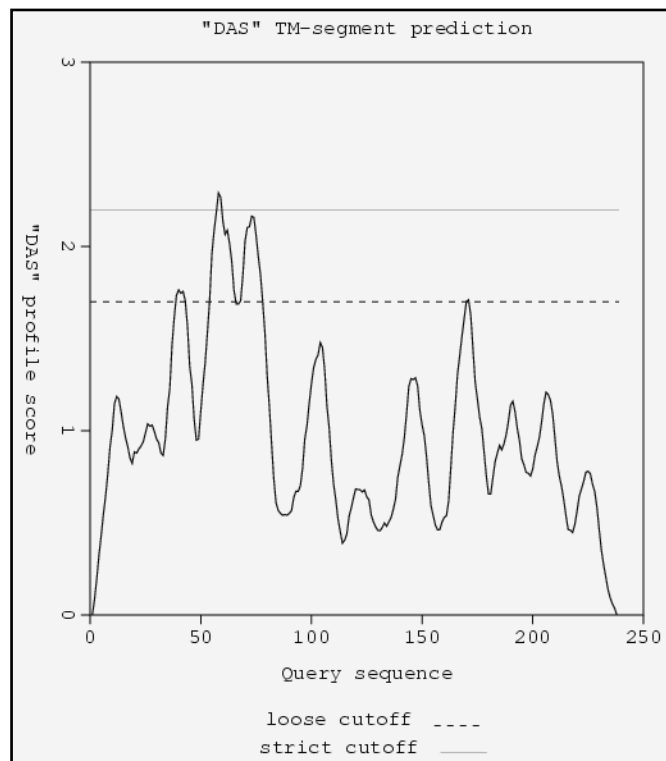
Στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται 3 γονιδιακές κατασκευές οι οποίες σχεδιάστηκαν αρχικά με σκοπό την απομόνωση διαλυτών προϊόντων σε αντίθεση με τα αγρίου τύπου ανασυνδιασμένα προϊόντα τα οποία δεν είχε καταστεί δυνατόν στο παρελθόν να απομονωθούν. Δύο από αυτά είχαν ως στόχο την απομόνωση του συμπλόκου των πρωτεϊνών HrcQa-HrcQb ενώ το τρίτο σχεδιάστηκε με σκοπό να απομονωθεί η πρωτεΐνη HrcQa. Η μια από τις γονιδιακές κατασκευές του συμπλόκου απέδωσε το βασικό προϊόν με το οποίο διενεργήθηκαν τα περισσότερα από τα πειράματα τα οποία περιγράφονται στην παρούσα διατριβή.

3Α. 1 Εντοπισμός υδρόφοβης περιοχής στην πρωτεΐνη HrcQa

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 1, ο δακτύλιος (C-ring) ο οποίος σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb ενώ είναι κατά το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλασματικός, πιθανότατα διατηρεί επαφές και με την εσωτερική μεμβράνη.

Η απομόνωση διαλυτού συμπλόκου με τις πλήρους μήκους πρωτεΐνες κατέστη αδύνατη στο παρελθόν. Ωστόσο, η πλήρους μήκους πρωτεΐνη HrcQb είχε επιτυχώς απομονωθεί ως διαλυτό προϊόν [Fadoulglou V., PhD dissertation, Univ. Of Crete, 2004]. Συνεπώς, το πρόβλημα διαλυτότητας του συμπλόκου πιθανότατα προκύπτει από υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης HrcQa οι οποίες έρχονται σε επαφή με τη μεμβράνη. Πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού (subcellular localization experiments) έδειξαν πως η πρωτεΐνη HrcQa εντοπίζεται αποκλειστικά στο μεμβρανικό κλάσμα [Fadoulglou et al., 2004].

Αυτό είναι συμβατό με την ύπαρξη μίας διαμεμβρανικής περιοχής η οποία προβλέπεται βάσει της αλληλουχίας της πρωτεΐνης και εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της. Η πρόβλεψη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας υπολογιστικά προγράμματα των οποίων οι αλγόριθμοι βασίζονται σε δεδομένα πρωτοταγούς δομής. Αρχικά, έγινε εντοπισμός διαμεμβρανικών περιοχών [DAS program, Czerzo et al., 1997, www.sbc.su.se/~milkos/DAS]. Εντοπίστηκε μία περιοχή 30 αμινοξέων (αα 50-80) η οποία χαρακτηρίζεται ως διαμεμβρανική [Εικόνα 3.1].



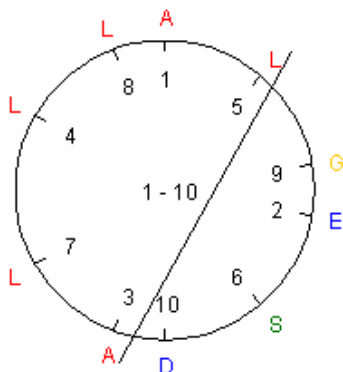
Εικόνα 3.1 Υπολογιστική πρόβλεψη διαμεμβρανικών περιοχών με το πρόγραμμα DAS. Εντοπισμός διαμεμβρανικής περιοχής αα 50-80 [www.sbc.su.se/~milkos/DAS]

Στη συνέχεια, έγινε πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής [Jones et al., 1999, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>] στην οποία υποδεικνύονται για τη διαμεμβρανική περιοχή (αα 50-80) δύο β-strands και μια α-έλικα. Η α-έλικα τοποθετείται μεταξύ των αμινοξέων 67 και 76 [Εικόνα 3.2].



Εικόνα 3.2 Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής με το πρόγραμμα psipred για την περιοχή που προβλέφθηκε ως διαμεμβρανική (αα 50-80). Εμφανίζονται δύο β-strands και μια α-έλικα (αα 67-76) [<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>]

Εάν τα αμινοξέα που σχηματίζουν την α-έλικα τοποθετηθούν με τη σειρά σε μία κάτοψη της έλικας με τις ανάλογες αποστάσεις (μοντέλο helical wheel), τότε παρατηρείται ο αμφιπαθικός χαρακτήρας αυτής της προβλεπόμενης α-έλικας [Εικόνα 3.3]. Η έλικα αυτή λοιπόν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως μια έλικα «ακουμπισμένη» στη μεμβράνη.



Εικόνα 3.3 Κάτοψη της προβλεπόμενης α-έλικας που βρίσκεται εντός της διαμεμβρανικής περιοχής. Η α-έλικα παρουσιάζει αμφιπαθικό χαρακτήρα και πιθανόν να διατηρεί επαφές με τη μεμβράνη στην υδρόφοβη πλευρά της (αμινοξέα με κόκκινο χρώμα)

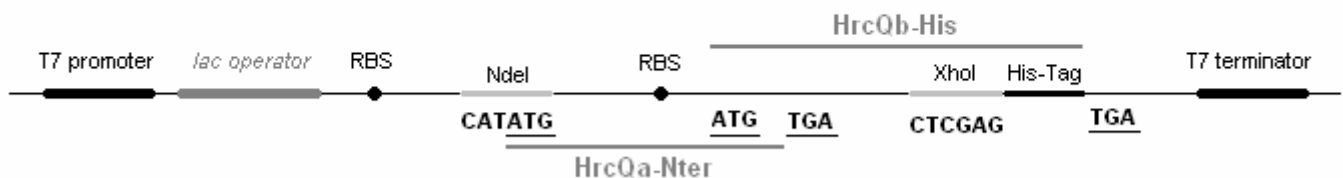
Στις τρεις γονιδιακές κατασκευές που παρουσιάζονται στο πρώτο μέρος των αποτελεσμάτων, η πρωτεΐνη HrcQa είναι μειωμένη κατά 80 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο με σκοπό την απομόνωση διαλυτών προϊόντων. Από αυτό το σημείο και μετά, οι αναφορές σε αυτή την υπολειμματική μορφή της HrcQa θα γίνονται με το συμβολισμό HrcQa^{Nter}.

3A.2 Σύντομη περιγραφή γονιδιακών κατασκευών και των προϊόντων τους

3A.2.1 HrcQa^{Nter}-HrcQb-His / pET26b (+)

Η γονιδιακή αυτή κατασκευή αποσκοπεί στη λήψη ανασυνδιασμένου πρωτεϊνικού προϊόντος το οποίο θα περιλαμβάνει την υπολειμματική μορφή της πρωτεΐνης HrcQa (HrcQa^{Nter}) και την πλήρους μήκους πρωτεΐνη HrcQb με μία ουρά 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της.

Τα δύο πλήρους μήκους διαδοχικά γονίδια (*hrcQa*, *hrcQb*) είχαν στο παρελθόν κλωνοποιηθεί στο φορέα pET16b [Novagen] (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Παν. Κρήτης). Η κατασκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την κατασκευή της υπολειμματικής μορφής των γονιδίων του συμπλόκου με χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων και ενίσχυση με τη μέθοδο PCR. Έγινε μετάλλαξη του αμινοξέος θρεονίνη 80 σε μεθειονίνη (της πρωτεΐνης HrcQa). Το νέο γονιδιακό προϊόν PCR, το οποίο έφερε στα άκρα του αλληλουχίες-στόχους περιοριστικών ενζύμων, αφού υπέστη πέψη με τα ειδικά αυτά ένζυμα, κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET26b(+) [Novagen] ο οποίος είχε προηγουμένως υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Στην εικόνα 3.4 παρουσιάζεται σχηματικά η περιοχή κλωνοποίησης και έκφρασης στο φορέα.

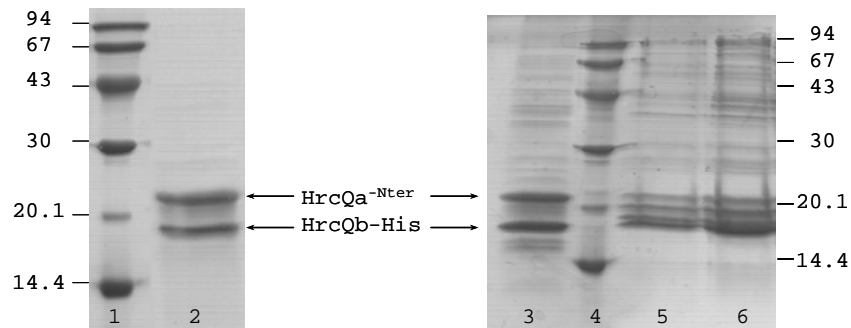


Εικόνα 3.4 Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κλωνοποίησης – έκφρασης στο φορέα pET26b(+). Μεταξύ άλλων, παρουσιάζονται και οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων και των κωδικονίων έναρξης και λήξης του κάθε γονιδίου. RBS = ribosome binding site

Ο φορέας εισήχθη σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) και ύστερα από μεγάλωμα των κυττάρων και υπερέκφραση, το προϊόν που απομονώθηκε με χρήση μικρής στήλης Ni-NTA (Qiagen) ήταν διαλυτό και διαχωριζόταν σε δύο διακριτές ζώνες στο SDS-PAGE. Η έκφραση του ανασυνδιασμένου προϊόντος ωστόσο, ήταν εξαιρετικά μικρή καθιστώντας αδύνατον να παρατηρηθεί το εκάστοτε στάδιο κατά τη διαδικασία απομόνωσης. Συνεπώς, στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 3.5] παρουσιάζεται το τελικό καθαρό προϊόν όπως αυτό εκλύεται από τη στήλη

νικελίου ακολουθώντας ένα σύντομο πρωτόκολο απομόνωσης μικρής κλίμακας (βλ. Κεφάλαιο 2). Οι δύο ζώνες παρατηρούνται στο SDS-PAGE (βάσει του πρωτεϊνικού μάρτυρα) στα ~22kDa (άνω ζώνη) και στα ~18kDa (κάτω ζώνη). Οι αναμενόμενες θεωρητικές τιμές για τις πρωτεΐνες του ανασυνδιασμένου συμπλόκου είναι ~18kDa για τη HrcQa^{-Nter} και ~14.9 για τη HrcQb-6His, συνεπώς, και δεδομένης της μοναδικής ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς της κάθε πρωτεΐνης, η άνω ζώνη αντιστοιχεί στην HrcQa^{-Nter} και η κάτω ζώνη στη HrcQb-6His. Ο συνκαθαρισμός των δύο πρωτεϊνών από στήλη νικελίου είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους, καθώς μόνο η HrcQb φέρει ουρά ιστιδινών και έχει συγγένεια για το νικέλιο. Αυτό, καθώς και το ότι η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στη HrcQb-6His, φαίνονται στην εικόνα 3.5 όπου παρουσιάζεται SDS-PAGE από απομόνωση σε αποδιατακτικές συνθήκες (παρουσία 8M ουρίας).

Οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται ισόποσα αλλά όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια (§3A.3.2) είναι δυνατή η απομάκρυνση της περίσσειας της HrcQa^{-Nter} η οποία δε συμμετέχει στο σχηματισμό του συμπλόκου.



Εικόνα 3.5 SDS-PAGE (14%). (1,4) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2,3) καθαρισμένο σύμπλοκο από συνέκλιση των δύο πρωτεϊνών από στήλη νικελίου μικρής κλίμακας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, (5,6) έκλυση από στήλη νικελίου μικρής κλίμακας υπό αποδιατακτικές συνθήκες (αποτροπή αλληλεπίδρασης), παρατηρείται ότι απομονώνεται μόνο η κάτω ζώνη η οποία αντιστοιχεί στην HrcQb η οποία φέρει ουρά ιστιδινών. Η μη καθαρότητα που φαίνεται έντονα στα (5) και (6) οφείλεται στην παρουσία αποδιατακτικών συνθηκών οι οποίες επιτρέπουν σε πολλές πρωτεΐνες του κυττάρου που φέρουν ιστιδίνες να προσδεθούν μη ειδικά στο νικέλιο καθώς και στο σύντομο πρωτόκολο που ακολουθήθηκε

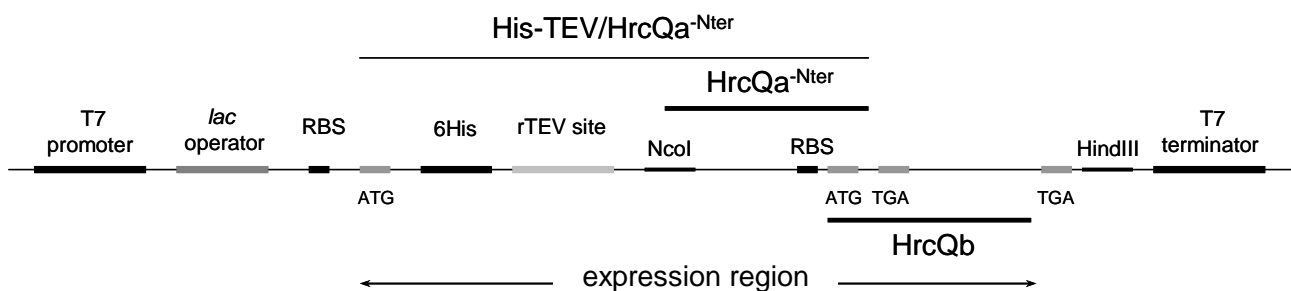
Το πρωτεϊνικό προϊόν αυτής της γονιδιακής κατασκευής αποτέλεσε το βασικό αντικείμενο μελέτης αυτής της διατριβής και για το λόγο αυτό θα αναλυθεί περισσότερο στη συνέχεια. Αυτή η σύντομη παρουσίαση θεωρήθηκε αναγκαία για να γίνει σύγκριση με τις άλλες κατασκευές οι οποίες δε μελετήθηκαν περαιτέρω και από τις οποίες μπορούν μόνο περιορισμένα συμπεράσματα να εξαχθούν.

3A.2.2 His/TEV-HrcQa^{Nter}-HrcQb / pPROpET

Η κατασκευή αυτή δημιουργήθηκε με σκοπό να συγκριθεί η συμπεριφορά του συμπλόκου όταν αυτό φέρει την ουρά ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της HrcQa^{Nter} με τη συμπεριφορά που έχει όταν η ουρά βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της HrcQb (βλ. § 3A.2.1).

Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 1, οι ομόλογες πρωτεΐνες, FliN και FliM οι οποίες σχηματίζουν την υπερμοριακή δομή του κυτταροπλασματικού δακτυλίου του μαστίγιου παρουσιάζουν στοιχειομετρία 1:4 *in vitro* – *Thermotoga maritima* [Brown et al, 2005] και 1:3 σε απομονωμένα basal bodies – *Salmonella typhimurium* [Zhao et al., 1996]. Τα στοιχεία αυτά για τη στοιχειομετρία του ομόλογου συστήματος οδήγησαν στην υπόθεση ότι ίσως να επηρεάζεται η *in vitro* απομόνωση του συμπλόκου από το ποια πρωτεΐνη θα φέρει την ουρά ιστιδινών και συνεπώς θα έχει τη συγγένεια για το νικέλιο. Τελικά, συμπεράσματα πάνω στη βάση αυτής της υπόθεσης δεν μπόρεσαν να εξαχθούν καθότι η δημιουργία συμπλόκου από αυτήν την κατασκευή δεν πραγματοποιήθηκε καν. Οι δύο πρωτεΐνες δεν πραγματοποίησαν αλληλεπίδραση επαρκή για τον συνκαθαρισμό τους. Η περιγραφή της κατασκευής και της συμπεριφοράς των πρωτεϊνικών προϊόντων κατά την απομόνωση περιγράφονται ακριβώς στη συνέχεια καθώς επίσης γίνεται και συζήτηση για τους πιθανούς λόγους για τους οποίους οι δύο πρωτεΐνες δε συνδέθηκαν.

Η παρούσα γονιδιακή κατασκευή πραγματοποιήθηκε από τη Σπ. Χαρόβα, διδακτορική φοιτήτρια στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Παν. Κρήτης. Μια σχηματική περιγραφή της κατασκευής παρουσιάζεται στην εικόνα 3.6. Η κατασκευή περιέχει το γονίδιο της υπολειμματικής μορφής της HrcQa καθώς και το πλήρους μήκους γονίδιο της HrcQb.

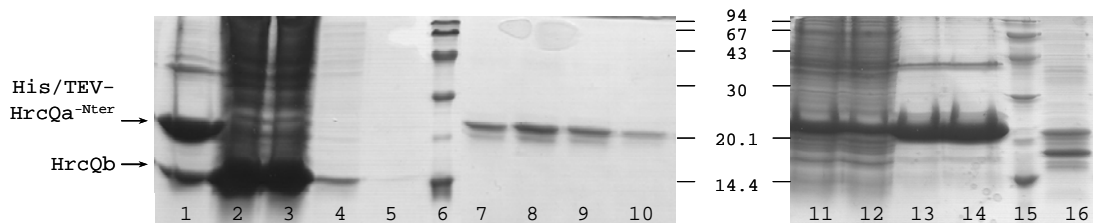


Εικόνα 3.6 Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κλωνοποίησης στο φορέα pPROpET. Υποδεικνύεται η περιοχή έκφρασης των δύο πρωτεϊνών του συμπλόκου (expression region). RBS = ribosome binding site

Το γονιδιακό κομμάτι κλωνοποιήθηκε στο φορέα pPROpET (MCSI) (βλ. παράρτημα Α) με τρόπο τέτοιο ώστε η πρωτεΐνη HrcQa^{Nter} που θα προκύψει να φέρει ουρά 6 ιστιδινών στο

αμινοτελικό άκρο της καθώς και αλληλουχία αναγνώρισης από την πρωτεάση rTEV για τη μετέπειτα αποκοπή της ουράς ιστιδινών. Ο φορέας εισήχθη σε κύτταρα BL21(DE3) τα οποία μεγάλωσαν και υπερέκφρασαν τα ανασυνδιασμένα προϊόντα ύστερα από επαγωγή με IPTG, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2. Τα αναμενόμενα θεωρητικά μοριακά βάρη των δύο πρωτεϊνών είναι 20.9kDa για τη His/TEV-HrcQa^{Nter} και 14kDa για τη HrcQb.

Πραγματοποιήθηκε ένας μόνο καθαρισμός για τον έλεγχο της συμπεριφοράς της μορφής αυτής του συμπλόκου : κύτταρα από 1 λίτρο καλλιέργειας διαλύθηκαν σε 100ml lysis buffer A και αφού έγινε λύση των κυττάρων με υπέρηχους και φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό των διαλυτών (supernatant) και μη διαλυτών (pellet) σωμάτων, το υπερκείμενο (διαλυτά) φορτώθηκε σε στήλη 3ml υλικού Ni-NTA agarose. Έγιναν πλύσεις με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου έως τα 40mM και εκλούσεις σε κλάσματα του 1ml σε συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου 60mM, 150mM και 300mM. Η πορεία παρουσιάζεται στην εικόνα 3.7. Παρουσιάζεται επίσης μικρής κλίμακας απομόνωση σε αποδιατακτικές συνθήκες (8M ουρία) όπου φαίνεται αποκλειστικά η πάνω ζώνη που αντιστοιχεί στη His/TEV-HrcQa^{Nter}.



Εικόνα 3.7 SDS-PAGE (14%). Αριστερά : καθαρισμός σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, δεξιά : μικρής κλίμακας καθαρισμός σε αποδιατακτικές συνθήκες. (1) Pellet - αδιάλυτα, (2) supernatant – διαλυτά, υλικό που φορτώθηκε στην κολώνα, (3) flow through – ό,τι δεν προσδέθηκε στην κολώνα, (4,5) wash - έκπλυση, (6,15) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (7,8) elution 150mM imidazole - έκλουση, (9,10) elution 300mM imidazole, (11) supernatant, (12) flow through, (13,14) elution, (16) καθαρισμένο σε μη αποδιατακτικές συνθήκες σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His για σύγκριση (βλ. § 3Α.2.1)

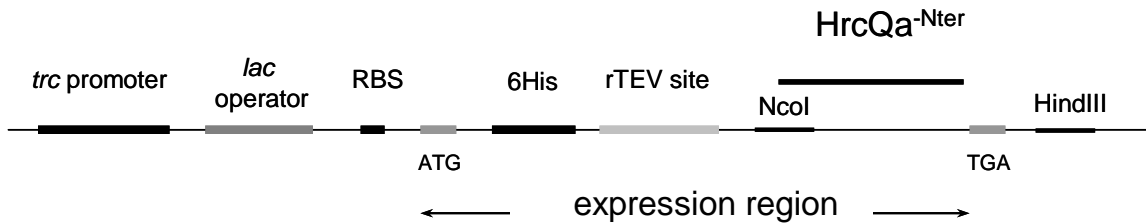
Αυτό που παρατηρείται είναι ότι δεν έγινε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών οπότε και δημιουργία συμπλόκου. Η His/TEV-HrcQa^{Nter} εντοπίζεται ως επί το πλείστον αδιάλυτη (pellet) ενώ η HrcQb είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου διαλυτή (supernatant). Το αποτέλεσμα είναι η HrcQb να μην κατακρατείται από τη στήλη καθώς δε φέρει His-tag, ενώ κατακρατείται μικρή ποσότητα της His/TEV-HrcQa^{Nter} η οποία είναι διαλυτή. Η μικρή αυτή ποσότητα δε φαίνεται πολύ ξεκάθαρα στο δείγμα του supernatant στο παρακάτω gel αλλά εμφανίζεται στα εκλούσματα στα 150mM ιμιδαζολίου.

Τα ερωτήματα που προκύπτουν είναι τα εξής δύο : γιατί η His/TEV-HrcQa^{Nter} είναι μη διαλυτή εφ' όσον η λογική για την υπολειμματική μορφή είναι η ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε και στην κατασκευή που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, στην οποία δεν εμφανίστηκε πρόβλημα διαλυτότητας; Και γιατί η μικρή αυτή διαλυτή ποσότητα της His/TEV-HrcQa^{Nter} δε σχημάτισε σύμπλοκο με τη HrcQb έτσι ώστε οι δυο πρωτεΐνες να συνεκλουσθούν από τη στήλη ως διαλυτό σύμπλοκο; Μια υπόθεση ικανή να απαντήσει και στα δύο ερωτήματα είναι ότι η ουρά ιστιδινών και η αλληλουχία αναγνώρισης της πρωτεάσης rTEV, βρισκόμενα στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης , πιθανόν να την εμποδίζουν να διπλωθεί σωστά. Υιοθετώντας μια λανθασμένη αναδίπλωση, η υπολειμματική πρωτεΐνη HrcQa, η οποία στην προηγούμενη παράγραφο αποδείχθηκε πως δεν έχει πρόβλημα διαλυτότητας (δε διέθετε ούτε His-tag ούτε TEV site), πιθανόν να δημιουργεί συσσωματώματα τα οποία κατακρημνίζονται. Ακόμη και η μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης που παραμένει διαλυτή, εάν δεν είναι φυσιολογικά διπλωμένη, είναι αδύνατον να σχηματίσει σύμπλοκο με τη HrcQb. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται με την παρουσίαση της επόμενης γονιδιακής κατασκευής (§3A.2.3) κατά την οποία η His/TEV-HrcQa^{Nter} εκφράζεται μόνη της στο φορέα pPROEX-HTb [Invitrogen] και παρουσιάζει το ίδιο πρόβλημα διαλυτότητας.

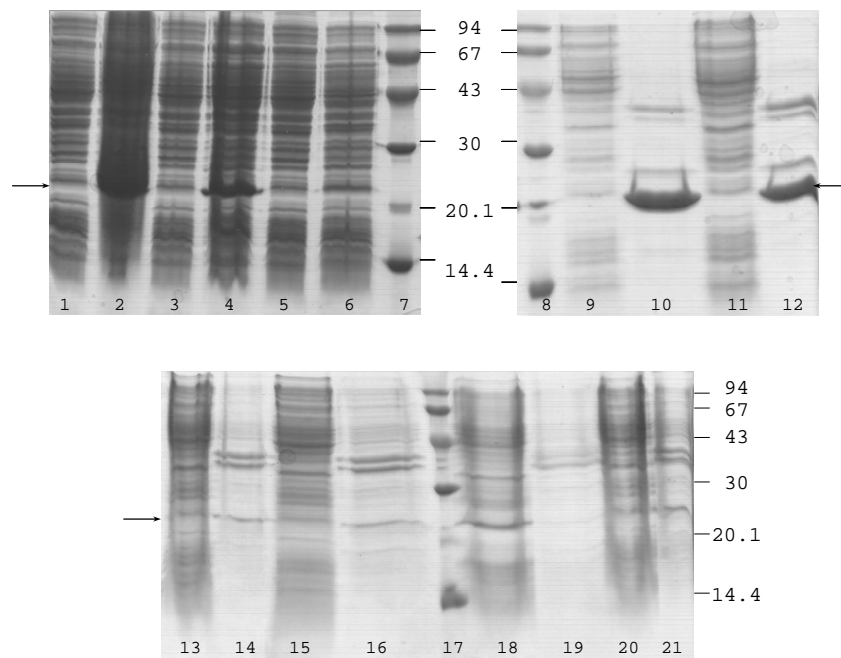
3A.2.3 His/TEV-HrcQa^{Nter} / pPROEX-HTb

Με αυτήν την κατασκευή επιχειρείται η απομόνωση διαλυτής πρωτεΐνης HrcQa^{Nter}. Η δομή της HrcQa δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι σήμερα, ενώ μόνο ένα μικρό τμήμα της δομής της ομόλογης πρωτεΐνης FliM (middle domain) έχει λυθεί [Park et al, 2006], το οποίο μάλιστα δεν περιλαμβάνει την περιοχή πρόσδεσης με τη FliN (ομόλογη της HrcQb). Στα πλαίσια της μελέτης του συμπλόκου HrcQa-HrcQb, ένας από τους στόχους είναι και η κρυστάλλωση και ο προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης HrcQa.

Το υπολειμματικό γονίδιο της HrcQa κλωνοποιήθηκε στο φορέα pPROEX-HTb [Invitrogen]. Η περιοχή κλωνοποίησης και έκφρασης παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 3.8. Το πρωτεϊνικό προϊόν της κατασκευής είναι η υπολειμματική μορφή της HrcQa φέροντας ουρά 6 ιστιδινών καθώς και αλληλουχία αναγνώρισης από την πρωτεάση rTEV στο αμινοτελικό άκρο της. Με το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο έγινε μετάλλαξη του αμινοξέος λευκίνη 81 σε μεθειονίνη, όχι για την έναρξη της μετάφρασης (η μετάφραση ξεκινά στην πρώτη ATG τριπλέτα που βρίσκεται μετά τη θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος – RBS, η οποία βρίσκεται πάνω στο φορέα) αλλά για λόγους ευκολίας, καθώς στη θέση περιορισμού του NcoI (CATATG) το ATG είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το ATG του φορέα. Το αναμενόμενο θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης His/TEV-HrcQa^{Nter} είναι 20.9kDa.



Εικόνα 3.8 Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κλωνοποίησης στο φορέα pPROEX-HTb. Υποδεικνύεται η περιοχή έκφρασης της His/TEV-HrcQa^{Nter} (expression region) καθώς και οι θέσεις περιορισμού. RBS = ribosome binding site



Εικόνα 3.9 SDS-PAGE (14%). (1) Πριν την επαγωγή, 37 °C, (2) μετά την επαγωγή, 37 °C, (3) πριν την επαγωγή, 28 °C, (4) μετά την επαγωγή, 28 °C, (5) πριν την επαγωγή, 23 °C, (6) μετά την επαγωγή, 23 °C, (7,8,17) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (9) supernatant, 37 °C, buffer A, (10) pellet, 37 °C, buffer A, (11) supernatant, 28 °C, buffer A, (12) pellet, 28 °C, buffer A, (13) supernatant, 23 °C, buffer A, (14) pellet, 23 °C, buffer A, (15) supernatant, 23 °C, buffer 1, (16) pellet, 23 °C, buffer 1, (18) supernatant, 23 °C, buffer 2, (19) pellet, 23 °C, buffer 2, (20) supernatant, 23 °C, buffer 3, (21) pellet, 23 °C, buffer 3. Τα βέλη υποδεικνύουν τη His/TEV-HrcQa^{Nter}

Αρχικά δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες επαγωγής (37°C, 28°C, 23°C) με την ίδια συγκέντρωση IPTG (0.5mM). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.9, η απόδοση της υπερέκφρασης είναι ανάλογη της θερμοκρασίας επαγωγής. Στη συνέχεια, έγινε διερεύνηση της διαλυτότητας της

πρωτεΐνης όταν αυτή υπερεκφράζεται στις θερμοκρασίες 28°C και 37°C, όπου παρατηρείται και η μέγιστη απόδοση. Για τον έλεγχο αυτό, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν και λύθηκαν στο Buffer A (20mM Tris pH 8, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 20% Glycerol, 0.5% Triton-X, 20mM 2-mercaptoethanol). Ο έλεγχος έδειξε ότι και στις δύο αυτές θερμοκρασίες η πρωτεΐνη είναι μη διαλυτή. Οπότε, στη συνέχεια, διενεργήθηκε έλεγχος διαλυτότητας για τις πιο ήπιες συνθήκες επαγωγής στους 23°C. Δοκιμάστηκαν 4 διαφορετικά buffers για την επαναδιάλυση και λύση των κυττάρων : buffer A (20mM Tris pH 8, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 20% Glycerol, 0.5% Triton-X, 20mM 2-mercaptoethanol), buffer 1 (20mM Tris pH 8, 300mM NaCl, 5mM Imidazole), buffer 2 (50mM Tris pH 8, 8M urea), buffer 3 (20mM Tris pH 8, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 50% Glycerol, 20mM 2-mercaptoethanol). Όπως φαίνεται στο SDS-PAGE μόνο στο buffer 2 που περιέχει ουρία η πρωτεΐνη εμφανίζεται διαλυτή (lane 18, supernatant). Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, όπου δεν υπάρχει αποδιατακτικός παράγοντας, η πρωτεΐνη είναι μη διαλυτή.

Τελικά, δεν κατέστη δυνατόν να ληφθεί διαλυτή πρωτεΐνη, παρότι δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες επαγωγής της υπερέκφρασης και διαφορετικά διαλύματα για τη λύση των κυττάρων. Ο λόγος πιθανόν να είναι αυτός που αναφέρθηκε παραπάνω για την κατασκευή His/TEV-HrcQa^{Nter}-HrcQb, δηλαδή η λανθασμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης λόγω της ουράς ιστιδινών και της αλληλουχίας αναγνώρισης της rTEV στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αυτό που πρέπει να γίνει στο άμεσο μέλλον είναι να κλωνοποιηθεί η υπολειμματική μορφή της πρωτεΐνης στο φορέα pET26b(+) [Novagen] ώστε η ουρά ιστιδινών να βρίσκεται στο καρβοξυτελικό της άκρο.

Στη συνέχεια, ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων και αποτελεσμάτων για το διαλυτό σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His που αποτέλεσε το βασικό αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας.

3A.3 Το διαλυτό σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His

Η κατασκευή αυτή παρουσιάστηκε συνοπτικά στην παράγραφο 3A.2.1. είναι η μορφή του συμπλόκου η οποία μπορεί να απομονωθεί ως διαλυτό προϊόν. Αποτελείται από την υπολειμματική μορφή της HrcQa, HrcQa^{Nter}, και από την πλήρους μήκους HrcQb, η οποία φέρει ουρά 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η επιτυχής αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών έχει ως αποτέλεσμα τον συνκαθαρισμό τους από στήλη νικελίου για το οποίο μόνο η HrcQb-His έχει συγγένεια. Η απομόνωση διαλυτού συμπλόκου οφείλεται στην αποκοπή των 80 αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο της HrcQa (πιθανή διαμεμβρανική περιοχή) καθώς και στο ότι στα αμινοτελικά άκρα των πρωτεϊνών δεν υπάρχουν παράγοντες οι οποίοι παρεμποδίζουν τη σωστή

αναδίπλωσή τους (όπως ουρά ιστιδινών ή αλληλουχία αναγνώρισης rTEV). Στη συνέχεια, γίνεται λεπτομερής περιγραφή των πειραμάτων που διενεργήθηκαν με αυτό το σύμπλοκο και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν.

3A.3.1 Συνθήκες επαγωγής και προσπάθειες βελτίωσης της απόδοσης υπερέκφρασης

Ένα βασικό πρόβλημα του συμπλόκου αυτού είναι η χαμηλή απόδοση υπερέκφρασης. Παρότι έγιναν οι απαραίτητες προσπάθειες βελτίωσης της απόδοσης, η βέλτιστες εξακολουθούν να είναι χαμηλές. Αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι δεν αρκεί να βρεθεί η μέγιστη δυνατή απόδοση υπερέκφρασης αλλά η μέγιστη απόδοση σε τελικό διαλυτό προϊόν. Πρέπει δηλαδή να βρεθεί η χρυσή τομή ανάμεσα στις συνθήκες μέγιστης υπερέκφρασης με τις ελάχιστες απώλειες σε μη διαλυτό προϊόν. Ωστόσο, η υπερέκφραση ήταν τόσο χαμηλή ώστε ήταν αδύνατον να γίνουν έλεγχοι σε επίπεδο κυττάρων από μικρής κλίμακας καλλιέργειες με σύγκριση μη επαγόμενων και επαγόμενων κυττάρων. Η υπερέκφραση δεν ήταν ορατή όταν αυτά τα δείγματα ηλεκτροφορούνταν σε αποδιατακτικό gel. Έπρεπε δηλαδή να γίνει ολόκληρη η διαδικασία μικρής κλίμακας καθαρισμού και σύγκριση της απόδοσης στο τελικό στάδιο του καθαρού προϊόντος. Αυτό ήταν αδύνατον να γίνει για όλες τις συνθήκες επαγωγής που δοκιμάστηκαν αρχικά και για αυτό το λόγο ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά έγινε επαγωγή σε διαφορετικές θερμοκρασίες (18°C, 22°C, 28°C, 30°C, 37°C) και με συγκεντρώσεις IPTG 0.05mM, 0.5mM, 1mM για την κάθε μία από αυτές τις θερμοκρασίες. Ελήφθησαν δείγματα πριν την επαγωγή και μετά την επαγωγή σε χρόνους 3h, 5h, 7h, και 18h (για τις χαμηλές θερμοκρασίες, 18°C και 22°C) από την προσθήκη του IPTG. Οι μόνες συνθήκες όπου η επαγωγή ήταν ορατή ήταν αυτές στους 37°C. Στη θερμοκρασία όμως αυτή οι απώλειες σε μη διαλυτό προϊόν ήταν μεγάλες οπότε επειλέχθησαν να ελεγχθούν δύο πιο ήπιες συνθήκες επαγωγής : 28°C/0.5mM IPTG/5hrs, και 23°C/0.5mM IPTG/5hrs. Οι απώλειες ήταν μικρότερες σε σύγκριση με τους 37°C και οι διαφορές μεταξύ τους μικρές.

Συνεπώς, η διαδικασία μεγάλωματος κυττάρων και επαγωγής υπερέκφρασης έχουν ως εξής : Μικρή προ-καλλιέργεια μπολιάζεται από glycerol stock κυττάρων (κύτταρα *E. coli* BL21(DE3) μετασηματισμένα να φέρουν το πλασμίδιο-φορέα της γονιδιακής κατασκευής HrcQa^{Nter}-HrcQb-His από υγρή καλλιέργεια σε 20% glycerol, αποθηκευμένα στους -80°C) και επωάζεται για 14-16 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, θρεπτικό υλικό LB (+kanamycin) μπολιάζεται με προ-καλλιέργεια σε αραιώση 1:50. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για να πολλαπλασιαστούν. Όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600nm φτάσει στο 0.6-0.7 (OD₆₀₀~0.6-0.7),

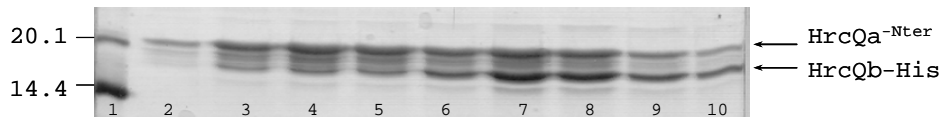
προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5mM. Οι καλλιέργεια επωάζεται για επιπλέον 5 ώρες για την επαγωγή της υπερέκφρασης και στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση.

Τελικά, η σχετική απόδοση σε διαλυτό σύμπλοκο είναι ~ 0.5 mg ανά 1 λίτρο αρχικής καλλιέργειας. Η ποσότητα αυτή είναι πολύ μικρή και δυσχεραίνει τις διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Επίσης, δεν είναι δυνατή η παρακολούθηση των σταδίων απομόνωσης καθώς το προϊόν εμφανίζεται μόνο στο τελικό στάδιο των εκλουσμάτων όπου είναι καθαρό και όχι πολύ αραιωμένο.

3A.3.2 Αρχικό σχήμα καθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας (Ni-NTA)

Η κυτταρική πάστα επαναδιαλύεται σε lysis buffer A [20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 20% Glycerol, 0.5% Triton-X, 20mM 2-mercaptoethanol] όγκου ~10ml/g κυτταρικής πάστας. Στο διάλυμα προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (benzamidine 150mg/ml, leupeptin 20μg/ml, PMSF 1mM – τελικοί όγκοι). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπέρηχους για συνολικό χρόνο ~4 λεπτά. Η λύση σταματάει όταν το διάλυμα γίνεται διαυγές. Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται (13,000rpm, Jouan MR-23, rotor AM100.13/1hr) για το διαχωρισμό των μη διαλυτών (ίζημα) και διαλυτών σωματίων (υπερκείμενο). Το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη που περιέχει υλικό Ni-NTA agarose το οποίο έχει προηγουμένως εξισορροπηθεί με 10 όγκους κολώνας buffer A. Ο όγκος της κολώνας (cv) είναι κάθε φορά ~1ml για κάθε δύο λίτρα καλλιέργειας δεδομένης της μικρής απόδοσης έκφρασης. Η ταχύτητα ροής μέσω της στήλης ελέγχεται από περισταλτική αντλία και είναι 0.5ml/min που είναι η προτεινόμενη για την πρόσδεση των his-tagged πρωτεϊνών πάνω στο Ni-NTA [The QIAexpressionist handbook, Qiagen, 2003]. Στη συνέχεια γίνονται 4 πλύσεις της κολώνας με τα ακόλουθα wash buffers : 1) 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM Imidazole - 20 cv, 2) 20mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM Imidazole – 10 cv, 3) 20mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 30mM Imidazole – 10 cv, 4) 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 40mM Imidazole – 20 cv. Ακολουθώντας, πραγματοποιείται μία πρώτη έκλυση πρωτεΐνης με το buffer E1 [20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 60mM Imidazole] σε κλάσματα του 1 cv. Κατά την πρώτη αυτή έκλυση, ανακτάται η περίσσεια της HrcQa^{Nter} η οποία δε λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό συμπλόκου και η οποία έχει συνδεθεί μη ειδικά. Δεδομένου ότι οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται σε ίσες ποσότητες, κάτι τέτοιο είναι συμβατό με την αναμενόμενη στοιχειομετρία του συμπλόκου (εάν δεχθούμε ότι είναι αντίστοιχη με αυτή του ομόλογου συστήματος του μαστιγίου, βλ. Κεφ. 1). Η δεύτερη έκλυση πραγματοποιείται με το buffer E2 [20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 150mM Imidazole] σε κλάσματα του 1 cv. Το σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών εκλύεται από την κολώνα. Κατά τις εκλύσεις, συλλέγονται τα κλάσματα, και μικρή ποσότητα από το κάθε ένα ελέγχεται με διάλυμα Bradford το οποίο αλλάζει

χρώμα παρουσία πρωτεΐνης (από καφέ γίνεται μπλε). Συλλέγονται κλάσματα μέχρι να εκλουσθεί όλη η ποσότητα πρωτεΐνης. Έπειτα, τα κλάσματα κάθε πληθυσμού ξεχωριστά (HrcQa^{-Nter} και συμπλόκου) ενώνονται και υφίστανται διαπίδυση έναντι διαλύματος που περιέχει 20mM Tris pH 8.0 και 50mM NaCl για να μειωθεί στο ελάχιστο η συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα των δύο πληθυσμών συγκεντρώνονται μέχρι τελικού όγκου ~2.5-3 ml για να ακολουθήσει στη συνέχεια το επόμενο στάδιο του καθαρισμού που είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (περιγράφεται παρακάτω § 3A.3.7). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στους 4°C (coldroom).



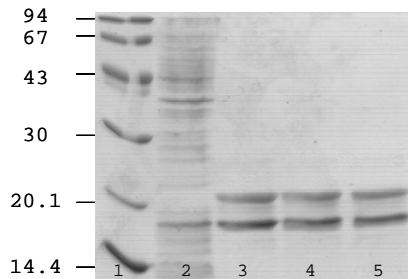
Εικόνα 3.10 SDS-PAGE (14%). Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας. (1) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2-5) διαδοχικά κλάσματα έκλυσης με το buffer E2, στα 60mM ιμιδαζόλιο, (6-10) διαδοχικά κλάσματα έκλυσης με το buffer E2, στα 150 mM ιμιδαζόλιο. Στο πρώτο βήμα έκλυσης απομονώνεται ο πληθυσμός που περιλαμβάνει τη HrcQa^{-Nter} ενώ στο δεύτερο βήμα ανακτάται το σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών. Στις εκλούσεις του δεύτερου βήματος (6-10), είναι εμφανής η διαφορά στην ένταση των δύο ζωνών. Η κάτω ζώνη (HrcQb-His) είναι πιο έντονη από την πάνω (HrcQa^{-Nter}) επαληθεύοντας τις υποψίες για στοιχειομετρία αντίστοιχη με αυτή των ομόλογων πρωτεϊνών του μαστιγίου (Κεφ. 1)

3A.3.3 Ταυτοποίηση προϊόντων καθαρισμού

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (§ 3A.2.1) τα αναμενόμενα θεωρητικά μοριακά βάρη των δύο πρωτεϊνών αυτής της μορφής του συμπλόκου είναι 18kDa για τη HrcQa^{-Nter} και 14.9kDa για τη HrcQb-His. Είναι λοιπόν λογικό να θεωρηθεί αυτονόητο (και δεδομένης της μοναδικής ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς της κάθε πρωτεΐνης) ότι η πάνω ζώνη στα SDS-PAGE είναι η HrcQa^{-Nter} και η κάτω ζώνη η HrcQb-His. Θέλοντας αυτό το συμπέρασμα να επιβεβαιωθεί και πειραματικά έγιναν οι διαδικασίες που περιγράφονται παρακάτω. Επίσης, έπρεπε να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο η κάτω ζώνη που εμφανίζεται στο gel να είναι προϊόν πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης στην οποία αντιστοιχεί η πάνω ζώνη.

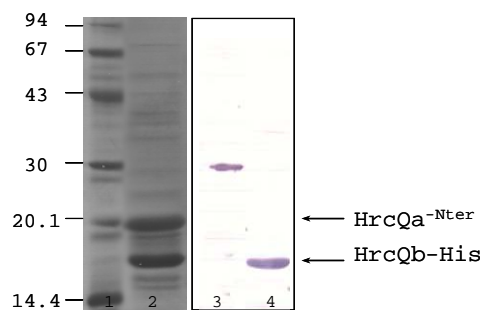
Για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο της πρωτεόλυσης, καθαρό σύμπλοκο διατηρήθηκε στους 4°C, θερμοκρασία δωματίου (RT) και 37°C για δύο εβδομάδες με σκοπό να διαπιστωθεί τυχόν αλλαγή στη σχετική ένταση των ζωνών. Όπως φαίνεται στο παρακάτω πήκτωμα, δεν έχει μεταβληθεί καθόλου η σχετική ένταση των ζωνών στις διαφορετικές θερμοκρασίες κάνοντας την

υπόθεση της πρωτεόλυσης μάλλον απίθανη. Επίσης, στην εικόνα 3.11 παρουσιάζεται δείγμα κυττάρων ύστερα από επαγωγή σε πολύ ισχυρές συνθήκες, στην οποία φαίνεται η κάτω ζώνη αποδεικνύοντας ότι είναι ένα προϊόν που παράγεται ήδη μέσα στο κύτταρο και όχι προϊόν κάποιας διεργασίας που συμβαίνει μετέπειτα.



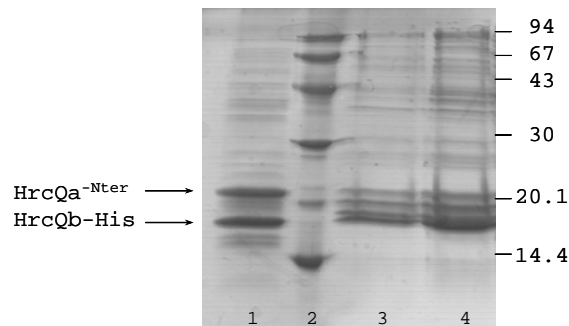
Εικόνα 3.11 SDS-PAGE (14%). (1) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2) Δείγμα από καλλιέργεια κυττάρων μετά από ισχυρές συνθήκες επαγωγής, εμφανής η κάτω ζώνη, (3-5) Καθαρό σύμπλοκο διατηρημένο για 2 εβδομάδες σε : (3) 4° C, (4) room temperature, (5) 37° C. Δεν παρατηρείται διαφορά στη σχετική ένταση των ζωνών στις διαφορετικές θερμοκρασίες διατήρησης

Η ταυτοποίηση των ζωνών έγινε έμμεσα. Ουσιαστικά, αποδείχθηκε ότι η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στη HrcQb-His συνεπώς η πάνω ζώνη πρέπει να είναι η HrcQa^{Nter}. Αυτό έγινε μέσω ανίχνευσης του ακροφυσίου των 6 ιστιδινών με Ni-NTA που προσδένονται πάνω σε αυτό και τα οποία είναι συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Ni-NTA AP conjugate). Το ένζυμο στη συνέχεια ανιχνεύεται με χρωστικές οπότε, έμμεσα, ανιχνεύεται το 6His-tag συνεπώς και η πρωτεΐνη που το φέρει.



Εικόνα 3.12 Αριστερά : SDS-PAGE (14%), δεξιά : μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι ζώνες του gel και στην οποία έχει γίνει ανίχνευση με Ni-NTA AP conjugate. (1) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2) καθαρισμένο σύμπλοκο, (3) το Ni-NTA AP conjugate δεσμεύεται στον πρωτεϊνικό δείκτη των 30 kDa (bovine carbonic anhydrase) ο οποίος είναι ένα μεταλλοένζυμο με ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn²⁺) ανά μόριο [Tanis et al., 1974, QIAexpress detection & assay handbook, Qiagen, 2002], (4) το Ni-NTA AP conjugate δεσμεύεται στην κάτω ζώνη του καθαρισμένου συμπλόκου, συνεπώς αυτή είναι η ζώνη της πρωτεΐνης που φέρει το ακροφύσιο ιστιδινών δηλαδή η HrcQb-His

Μία ακόμη επιβεβαίωση για το ότι η κάτω ζώνη είναι η HrcQb-His είναι το ότι μόνο αυτή προσδένεται στη στήλη νικελίου όταν γίνεται μικρής κλίμακας καθαρισμός υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Παρουσία 8M ουρίας, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται χάνοντας τα στοιχεία δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής και συνεπώς δεν μπορεί να προκύψει σύμπλοκο και να συνκαθαριστούν. Η πρωτεΐνη που φέρει τις 6 ιστιδίνες εξακολουθεί να έχει συγγένεια για το νικέλιο και προσδένεται στη στήλη. Η παρακάτω εικόνα (3.13) έχει παρουσιαστεί και παραπάνω στην παράγραφο 3A.2.1.



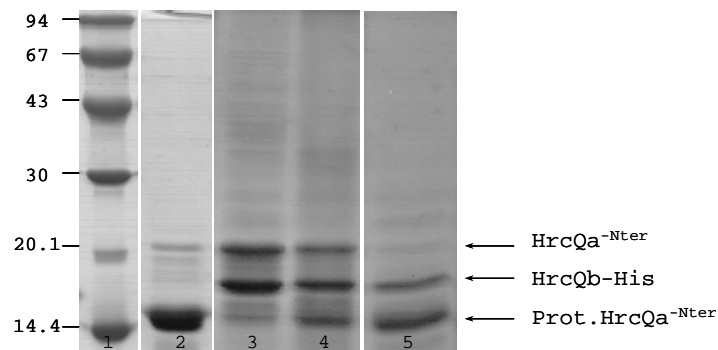
Εικόνα 3.13 SDS-PAGE (14%). (1) Καθαρισμένο σύμπλοκο από συνέκλυση των δύο πρωτεϊνών από στήλη νικελίου μικρής κλίμακας σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, (2) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (3,4) έκλυση από στήλη νικελίου μικρής κλίμακας υπό αποδιατακτικές συνθήκες (αποτροπή αλληλεπίδρασης), παρατηρείται ότι απομονώνεται μόνο η κάτω ζώνη η οποία αντιστοιχεί στην HrcQb η οποία φέρει ουρά ιστιδινών. Η μη καθαρότητα που φαίνεται έντονα στα (3) και (4) οφείλεται στην παρουσία αποδιατακτικών συνθηκών οι οποίες επιτρέπουν σε πολλές πρωτεΐνες του κυττάρου που φέρουν ιστιδίνες να προσδεθούν μη ειδικά στο νικέλιο καθώς και στο σύντομο πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε

Πλέον λοιπόν, πέρα από τις προφανείς ενδείξεις, υπάρχουν και οι πειραματικές αποδείξεις για την αντιστοιχία ζωνών – πρωτεϊνών. Άλλωστε, η συμπεριφορά του συμπλόκου κατά τον καθαρισμό που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο καθώς και η σχετική αφθονία των δύο πρωτεϊνών στο σύμπλοκο, δικαιολογείται (βάσει της θεωρίας για τη στοιχειομετρία, κεφ. 1) μόνο εάν αποδοθεί η άνω ζώνη στη HrcQa^{-Nter} και η κάτω στη HrcQb-His.

3A.3.4 Η HrcQa^{-Nter} υφίσταται πρωτεόλυση μετά την απομόνωση

Σε δείγματα καθαρισμένου συμπλόκου αλλά και απομονωμένης HrcQa^{-Nter} (ανάκτηση της περίσσειας μέσω του πρώτου βήματος έκλυσης στα 60mM ιμιδαζολίου) παρατηρήθηκε με την πάροδο του χρόνου πρωτεόλυση της πρωτεΐνης HrcQa^{-Nter} από πρωτεολυτικούς παράγοντες που

βρίσκονται παρόντες σε κάποιο από τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης. Η πρωτεόλυση είναι ειδική, που σημαίνει ότι η πρωτεΐνη κόβεται σε συγκεκριμένο σημείο και προκύπτει ένα τμήμα της πρωτεΐνης μοριακού βάρους ~14kDa. Το τμήμα αυτό, εκτός από σταθερό, εξακολουθεί να έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τη HrcQb-His και να συνεκλύεται από μία δεύτερη κολώνα νικελίου. Συνεπώς, οι πρωτεολυτικοί παράγοντες δρουν σε κάποιο σημείο της HrcQa^{Nter} το οποίο πιθανόν να είναι εκτεθειμένο ή χαλαρά αναδιπλωμένο χωρίς όμως να επηρεάζεται η θέση αλληλεπίδρασης με τη HrcQb. Η πρωτεόλυση παρατηρείται έντονη ύστερα από 30 μέρες, ενώ αν το δείγμα έχει υποστεί και τη διαδικασία της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης είναι ακόμη πιο ευαίσθητο στην πρωτεόλυση και αυτή παρατηρείται από τις πρώτες κιάλας μέρες.



Εικόνα 3.14 SDS-PAGE (14%). (1) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2) Καθαρό δείγμα HrcQa^{Nter} από το πρώτο βήμα έκλυσης στα 60mM ιμιδαζόλιο αποθηκευμένο για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό στους 4 °C, σχεδόν όλη η HrcQa^{Nter} έχει υποστεί πρωτεόλυση, (3) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 4 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, η HrcQa^{Nter} έχει αρχίσει να πρωτεολύεται, (4) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 37 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, εμφανής η πρωτεόλυση της HrcQa^{Nter}, (5) δείγμα καθαρού συμπλόκου στο οποίο όλη η ποσότητα της HrcQa^{Nter} έχει υποστεί πρωτεόλυση περασμένο από δεύτερη κολώνα νικελίου όπου όπως φαίνεται εξακολουθεί να έχει τη δυνατότητα να προσδένεται ως σύμπλοκο. Το σταθερό τμήμα της HrcQa^{Nter} που προκύπτει μετά την πρωτεόλυση φέρει την περιοχή αλληλεπίδρασης με τη HrcQb

3A.3.5 Η σταθερή περιοχή της HrcQa^{Nter} και η περιοχή αλληλεπίδρασης με τη HrcQb εντοπίζονται στην καρβοξυτελική περιοχή της

Η πρωτεόλυση της HrcQa^{Nter} υπέδειξε πως υπάρχει μία περιοχή της η οποία είναι σταθερή και διατηρεί τη δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκου με τη HrcQb. Ο προσδιορισμός της θεωρήθηκε απαραίτητος για τη μετέπειτα δημιουργία γονιδιακών κατασκευών των οποίων τα προϊόντα θα είναι σταθερότερα και συνεπώς θα έχουν περισσότερες πιθανότητες να κρυσταλλώσουν, κάτι το οποίο αποτελεί και τον απώτερο σκοπό της ενασχόλησης με τις πρωτεΐνες αυτές. Ο

ουσιαστικά. Τα σημεία τα οποία μεταβλήθηκαν παρουσιάζονται σε αυτή την παράγραφο. Το βελτιωμένο σχήμα αποδείχθηκε αποτελεσματικό ως προς τη σταθερότητα της HrcQa^{Nter}.

Οι διαφορές εντοπίζονται στα παρακάτω σημεία :

- Προσθήκη 0.5mM EDTA στο lysis buffer A με σκοπό την απενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών που πιθανόν να είναι παρούσες μετά τη λύση των κυττάρων. Το EDTA είναι ένας χειλικός πολυδοντικός υποκαταστάτης ο οποίος μπορεί να συνδεθεί σε ένα μεταλλικό κέντρο με 6 το πολύ άτομα-δότες. Κάνει πολύ ισχυρές ενώσεις συναρμογής με δι- και τρισθενή μεταλλοϊόντα τα οποία πολύ συχνά συναντιόνται στα ενεργά κέντρα των ενζύμων και των πρωτεασών. (Το υλικό Ni-NTA εξισορροπείται με lysis buffer A χωρίς EDTA, για την αποφυγή συμπλοκοποίησης του EDTA με τα Ni²⁺).

- Προσθήκη δεύτερης δόσης από το κοκτέιλ των αναστολέων πρωτεασών (PMSF, benzamidine, leupeptin) πριν το φόρτωμα στη στήλη.

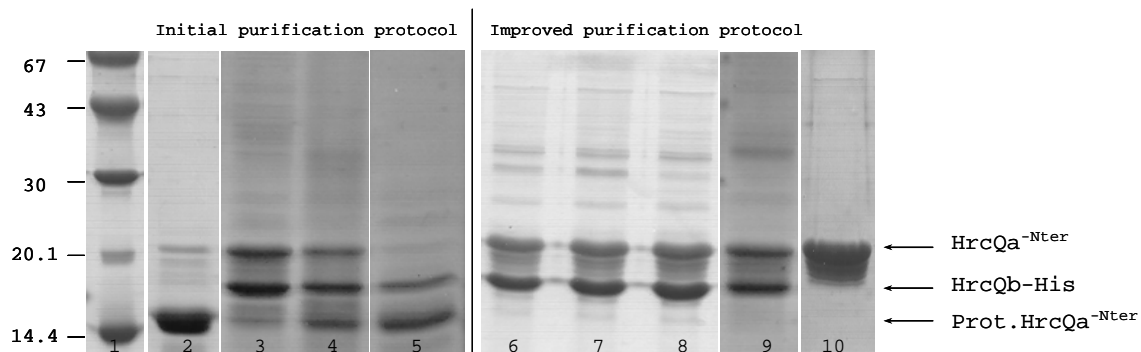
- Οι όγκοι των εκπλύσεων γίνονται πολύ μεγαλύτεροι και προστίθεται ακόμη μία έκπλυση η οποία αφήνεται να ρέει στην κολώνα για ένα βράδυ. Συγκεκριμένα οι εκπλύσεις διαμορφώνονται ως εξής : 1) 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM Imidazole - 70 cv, 2) 20mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 20mM Imidazole - 30 cv, 3) 20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 25mM Imidazole - 800ml (O/N wash), 4) 20mM Tris pH 8.0, 300mM NaCl, 30mM Imidazole - 40 cv, 5) 20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 40mM Imidazole - 70 cv. Η ταχύτητα ροής κατά τη διάρκεια των εκπλύσεων είναι 2ml/min εκτός από την O/N έκπλυση στην οποία η ροή μειώνεται στο 0.5ml/min. Η αύξηση των όγκων των εκπλύσεων αποσκοπεί στην καλύτερη απομάκρυνση πρωτεϊνών (και πρωτεασών) που έχουν προσδεθεί μη ειδικά πάνω στην κολώνα ώστε να μη συνεκλουσθούν με το καθαρό προϊόν.

- Κατά τις εκκλύσεις, τα σωληνάκια στα οποία συλλέγεται το καθαρό προϊόν περιέχουν EDTA σε τόση ποσότητα ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.5mM. EDTA (0.5mM) προστίθεται επίσης στο buffer στο οποίο γίνεται η διαπίδυση καθώς και στα buffers που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

- Το υλικό Ni-NTA agarose (ή Ni-NTA superflow) που χρησιμοποιείται είναι είτε μη χρησιμοποιημένο στο παρελθόν είτε αναγεννημένο με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εγχειρίδιο του υλικού [QIAexpressionist, p.109, Qiagen, 2003]. Επίσης, οι κολώνες που χρησιμοποιούνται κατά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης έχουν προηγουμένως ξεπλυθεί με φιλτραρισμένο διάλυμα NaOH 0.2mM και φιλτραρισμένο pH H₂O. Τα χρωματογραφικά υλικά μπορούν να κατακρατήσουν μολυσματικούς παράγοντες, ένζυμα, πρωτεάσες και άλλα μη

βιολογικά μόρια, συνεπώς η σχολαστικότητα με την καθαρότητά τους είναι μέγιστης σημασίας για την αποφυγή παραγόντων οι οποίοι μπορεί να βλάψουν το προϊόν.

Τα μέτρα που ελήφθησαν για την προστασία των καθαρών προϊόντων από βλαβερούς παράγοντες που έχουν ως αποτέλεσμα την πρωτεόλυση της HrcQa^{-Nter} είχαν εμφανές αποτέλεσμα όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα [Εικόνα 3.16]. Με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού, η HrcQa^{-Nter} διατηρείται για πάνω από 75 ημέρες είτε όταν είναι σε σύμπλοκο με τη HrcQb-His είτε όταν βρίσκεται μόνη της.



Εικόνα 3.16 SDS-PAGE (14%). Αριστερά : δείγματα από πρωτεΐνες καθαρισμένες ακολουθώντας το αρχικό σχήμα καθαρισμού, δεξιά : δείγματα από πρωτεΐνες καθαρισμένες με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού. (1) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών, (2) Καθαρό δείγμα HrcQa^{-Nter} από το πρώτο βήμα έκλουσης στα 60mM ιμιδαζόλιο αποθηκευμένο για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό στους 4 °C, σχεδόν όλη η HrcQa^{-Nter} έχει υποστεί πρωτεόλυση, (3) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 4 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, η HrcQa^{-Nter} έχει αρχίσει να πρωτεολύεται, (4) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 37 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, εμφανής η πρωτεόλυση της HrcQa^{-Nter}, (5) δείγμα καθαρού συμπλόκου στο οποίο όλη η ποσότητα της HrcQa^{-Nter} έχει υποστεί πρωτεόλυση περασμένο από δεύτερη κολώνα νικελίου όπου όπως φαίνεται εξακολουθεί να έχει τη δυνατότητα να προσδένεται ως σύμπλοκο, (6) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 4 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, η πρωτεόλυση έχει αποφευχθεί, (7) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο σε RT για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, δεν έχει συμβεί πρωτεόλυση, (8) καθαρό δείγμα συμπλόκου αποθηκευμένο στους 37 °C για ένα μήνα μετά τον καθαρισμό, και πάλι το δείγμα διατηρήθηκε σταθερό σε καλή κατάσταση, (10) καθαρό δείγμα HrcQa^{-Nter} από το πρώτο βήμα έκλουσης στα 60mM ιμιδαζόλιο αποθηκευμένο για πάνω από τρεις μήνες στους 4 °C, η πρωτεΐνη είναι ακόμη σταθερή

3A.3.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

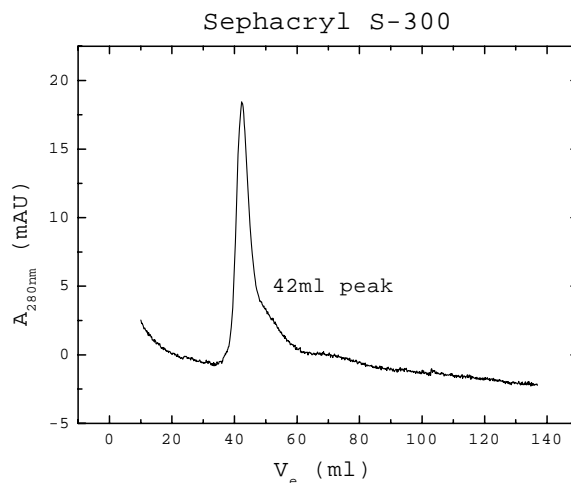
Το τελευταίο στάδιο καθαρισμού για το οποίο έχει γίνει αναφορά αλλά δεν έχει αναλυθεί είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Η μέθοδος αυτή εκτός από την επιπλέον καθαρότητα που προσδίδει στην πρωτεΐνη, αποσκοπεί στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της υδροδυναμικής ακτίνας του μορίου, και συνεπώς σε συμπεράσματα που αφορούν τον

ολιγομερισμό της. Στην περίπτωση του συμπλόκου δεν είναι επαρκής η μέθοδος αυτή για την εξαγωγή των συμπερασμάτων αυτών και οι λόγοι θα αναλύονται παρακάτω.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά υλικά για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του συμπλόκου : Sephacryl S-200 (fractionation range 5-250 kDa), Sephacryl S-300 (fractionation range 10-1500 kDa), και S-400 (20-8000 kDa) – περισσότερες πληροφορίες για τη μέθοδο και τα υλικά βλ. κεφάλαιο 2.

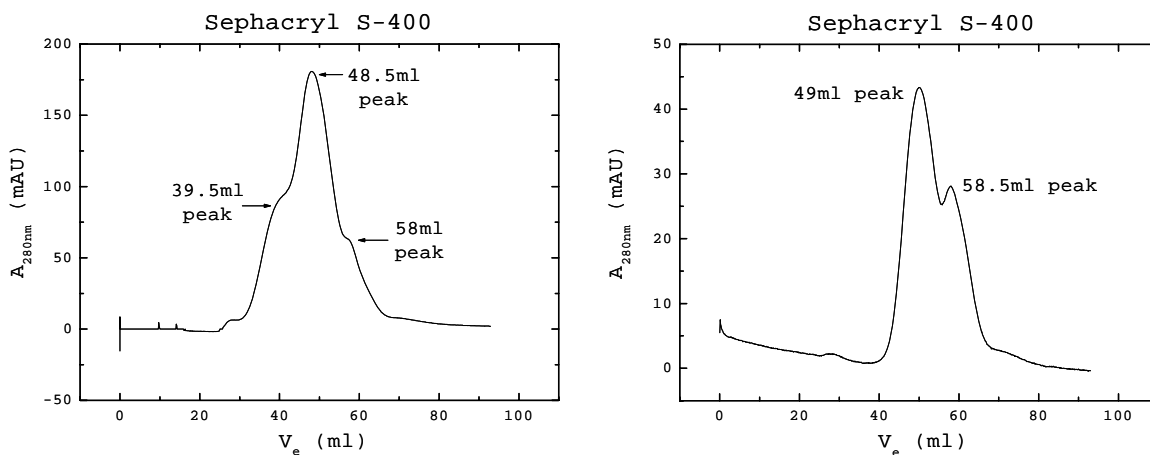
Στην S-200 το σύμπλοκο εξέρχεται στο νεκρό όγκο (void volume) όπου εκλύονται τα συσσωματώματα καθώς και τα μεγάλα μόρια τα οποία βρίσκονται εκτός της διαχωριστικής ικανότητας του υλικού. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι το σύμπλοκο σχηματίζει μία μεγαλομοριακή δομή μοριακού βάρους μεγαλύτερου από 250kDa.

Στη συνέχεια, το ίδιο δείγμα πέρασε από κολώνα που περιείχε υλικό Sephacryl S-300. Από την κολώνα αυτή, το σύμπλοκο εκλούσθηκε ως μοναδικός πληθυσμός. Ο πληθυσμός εκλούσθηκε σε όγκο τέτοιο ώστε να είναι μεν εντός της διαχωριστικής ικανότητας της κολώνας δεν είναι όμως εντός της καμπύλης βαθμονόμησης καθώς η μεγαλύτερη πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση είχε μοριακό βάρος 669kDa (thyroglobulin). Εάν προεκταθεί η ευθεία βαθμονόμησης, ο όγκος στον οποίο εκλούσθηκε το σύμπλοκο (42ml) αντιστοιχεί στα ~1000kDa. Ο τρόπος αυτός όμως δεν είναι αξιόπιστος και αποτελεί μόνο μία ένδειξη για το μέγεθος του συμπλόκου.



Εικόνα 3.17 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με υλικό S-300 Sephacryl. Παρατηρείται μία κορυφή για το σύμπλοκο (ένας πληθυσμός). Το μοριακό βάρος στο οποίο αντιστοιχεί η κορυφή εάν προεκταθεί η ευθεία βαθμονόμησης είναι 1000kDa αλλά αυτό δεν είναι απολύτως αξιόπιστο

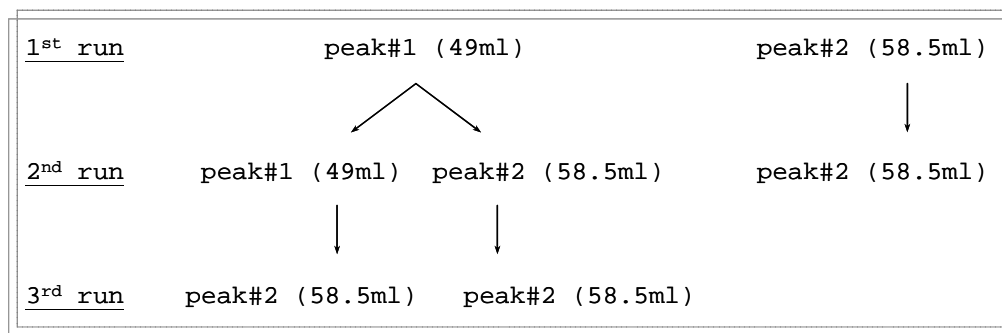
Στους επόμενους καθαρισμούς που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το υλικό Sephacryl S-400 το οποίο έχει μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα στα μεγάλα μοριακά βάρη. Το πρόβλημα είναι ότι για το υλικό αυτό δεν διατίθενται στο εμπόριο πρωτεΐνες για τη βαθμονόμηση του και συνεπώς πάλι δεν μπορεί να γίνει προσδιορισμός του μοριακού βάρους του συμπλόκου (ούτε της ολιγομερικής κατάστασης του). Αυτό το οποίο μπορεί να δείξει αυτή κολώνα είναι το εάν το σύμπλοκο σχηματίζει έναν (όπως έδειξε η S-300) ή περισσότερους πληθυσμούς και αν σχηματίζει περισσότερους, να τους διαχωρίσει. Όντως, οι πληθυσμοί που λαμβάνονται είναι 2 ενώ σε έναν καθαρισμό (το μεγαλύτερο που πραγματοποιήθηκε - ξεκίνησε από 10 λίτρα κυτταρικής καλλιέργειας) οι πληθυσμοί ήταν 3. Οι δύο πληθυσμοί που λαμβάνονται συστηματικά ήταν επίσης επαναλήψιμοι όταν ελήφθησαν οι τρεις πληθυσμοί. Ο ένας επιπλέον πληθυσμός αντιστοιχεί σε κάποιο είδος μεγαλύτερου μοριακού βάρους από ότι οι άλλοι δύο πληθυσμοί. Το γιατί δεν κατέστη δυνατόν να ανακτηθεί ξανά αυτός ο πληθυσμός ίσως να οφείλεται σε παράγοντες που έχουν να κάνουν με τη συγκέντρωση, η οποία σε εκείνον τον καθαρισμό, αν και γενικά ήταν μικρή, ήταν μεγαλύτερη από κάθε άλλη φορά (το υλικό που φορτώθηκε στην κολώνα ήταν ~4mg/ml, συνήθως φορτώνεται υλικό συγκέντρωσης μικρότερης από τη μισή αυτής).



Εικόνα 3.18 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με υλικό S-400 Sephacryl. Αριστερά : η μοναδική φορά που το σύμπλοκο σχημάτισε τρεις πληθυσμούς, η πρώτη κορυφή στα 39.5ml δεν απομονώθηκε ξανά, δεξιά : οι επαναλήψιμες δύο κορυφές που αντιστοιχούν στους δύο πληθυσμούς του συμπλόκου

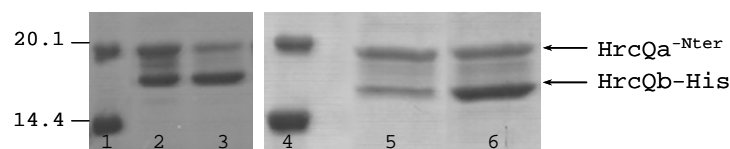
Κάτι ακόμη που έπρεπε να διερευνηθεί ήταν το κατά πόσο οι δύο συστηματικά ανακτώμενοι πληθυσμοί είναι σταθεροί και αν όχι τι είδους ισορροπία διατηρείται μεταξύ τους. Ο πληθυσμός με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος εκλύεται στα ~49ml ενώ ο δεύτερος πληθυσμός μικρότερου μοριακού βάρους εκλύεται στα ~58.5ml. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν να

ξαναφορτώνονται ξεχωριστά οι πληθυσμοί που ανακτώνται κάθε φορά από την κολώνα. Σχηματικά, τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 3.19. Το συμπέρασμα είναι πως πραγματικά υπάρχει μια ισορροπία η οποία κινείται προς τον πληθυσμό του χαμηλότερου μοριακού βάρους και τελικά καταλήγει όλη η ποσότητα του συμπλόκου να αποτελείται από είδη αυτού του μοριακού βάρους. Στο τέλος δηλαδή, υπάρχει ένας μόνο πληθυσμός, αυτός του χαμηλότερου μοριακού βάρους. Αυτό που πρέπει να γίνει στο μέλλον, είναι να διατηρηθεί το πρωτεϊνικό διάλυμα που λαμβάνεται από τη στήλη Ni-NTA και περιέχει το σύμπλοκο, για ένα διάστημα 2-3 ημερών στους 4°C πριν φορτωθεί στη στήλη μοριακής διήθησης για να ελεγχθεί η συμπεριφορά του σε αυτήν την περίπτωση.



Εικόνα 3.19 Σχηματικά τα αποτελέσματα από τα διαδοχικά φορτώματα των διαφορετικών πληθυσμών ξεχωριστά στη στήλη S-400. Στο τέλος δεν υπάρχει διαχωρισμός σε δύο πληθυσμούς

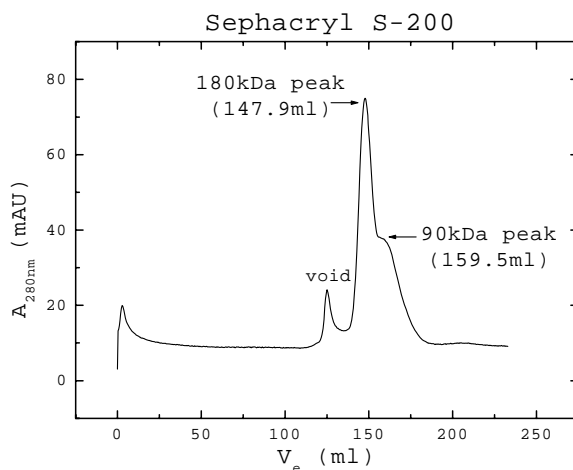
Κάτι άλλο που παρατηρείται είναι το γεγονός ότι ο πληθυσμός που εκλύεται στα 58.5ml φαίνεται να περιέχει τη HrcQa^{Nter} σε μεγαλύτερη ποσότητα από ότι συνήθως και συγκριτικά πάντα με τη HrcQb-His. Ενώ η ζώνη της HrcQa^{Nter} φαίνεται συνήθως δύο ή και τρεις φορές λιγότερο έντονη από τη ζώνη της HrcQb-His (επιβεβαιώνοντας και τις προβλέψεις για τη στοιχειομετρία του συμπλόκου), στα δείγματα από τον πληθυσμό αυτό η ζώνη φαίνεται έντονη, σχεδόν ίση με τη ζώνη της HrcQb-His. Πιθανόν λοιπόν, μόρια της HrcQa^{Nter} να συνδέονται μη ειδικά σε ορισμένα ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα και στη συνέχεια να αποδεσμεύονται.



3.20 SDS-PAGE (14%) (1,4) Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (2) δείγμα του πληθυσμού που εκλύεται στα 49ml (peak#1) από την S-400, (3) δείγμα του πληθυσμού που εκλύεται στα 58.5ml (peak#2) από την S-400, είναι

εμφανής η διαφορά στην ένταση της HrcQa^{Nter} ανάμεσα στα δύο δείγματα και αναλογικά με τη ζώνη της HrcQb-His, (5) δείγμα του πληθυσμού που εκλούεται στα 49ml (peak#1) από την S-400 και (6) το πρωτεϊνικό διάλυμα του συμπλόκου όπως αυτό εκλούεται από τη στήλη Ni-NTA, πριν φορτωθεί στην S-400, και πάλι φαίνεται η ένταση της HrcQa^{Nter} στο δείγμα (5) η οποία δεν διατηρεί την αναλογία που συνήθως έχει με τη HrcQb-His

Για τη HrcQa^{Nter} τα πράγματα ήταν απλούστερα. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που εκλούστηκε από τη στήλη Ni-NTA στα 60mM ιμιδαζολίου φορτώθηκε σε στήλη με υλικό S-200 Sephacryl. Η στήλη αυτή είναι βαθμονομημένη συνεπώς βρέθηκε το μοριακό βάρος και εξήχθησαν συμπεράσματα για την ολιγομερική κατάσταση και την υδροδυναμική ακτίνα. Οι δύο πληθυσμοί που διαχωρίστηκαν αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη 90kDa και 180kDa και υδροδυναμικές ακτίνες ~44 Å και ~49 Å αντίστοιχα, σύμφωνα με την ευθεία βαθμονόμησης (βλ. κεφάλαιο 2). Τα μοριακά βάρη υποδεικνύουν ολιγομερική κατάσταση 5μερούς για τα μόρια του πληθυσμού που αντιστοιχούν στα 90kDa και 10μερούς για τον πληθυσμό των 180kDa που είναι και ο βασικός πληθυσμός (πολύ υψηλότερη κορυφή). Το θεωρητικό μοριακό βάρος της μονομερούς HrcQa^{Nter} όπως έχει προαναφερθεί είναι 18kDa.

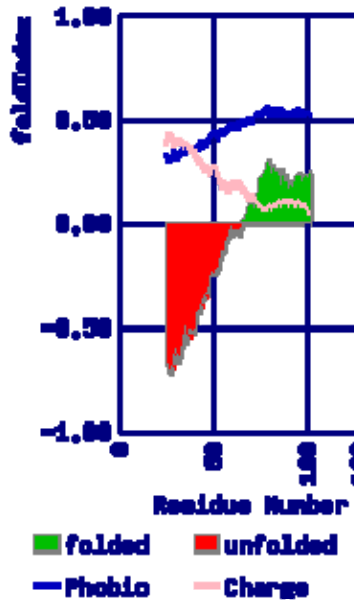


Εικόνα 3.21 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης με υλικό S-200 Sephacryl. Χρωματογράφημα της HrcQa^{Nter} όπου φαίνονται οι κορυφές των δύο πληθυσμών που διαχωρίζονται και τα μοριακά βάρη στα οποία αντιστοιχούν

3A.3.8 Η HrcQb σταθεροποιείται όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη HrcQa^{Nter}

Στο παρελθόν, η πλήρους μήκους HrcQb, η οποία είχε απομονωθεί επιτυχώς ως διαλυτό προϊόν, παρουσίασε επίσης πρόβλημα πρωτεόλυσης ύστερα από κάποιες μέρες [Fadoulglou V., PhD

dissertation, Univ. Of Crete, 2004]. Το πρόβλημα αντιμετωπίστηκε με εκτεταμένες πλύσεις της κολώνας Ni-NTA όταν η πρωτεΐνη ήταν προσδεσμένη σε αυτό. Ανεπιτυχείς προσπάθειες κρυστάλλωσης της πλήρους μήκους HrcQb οδήγησαν στην παρατήρηση ότι πιθανόν διαθέτει μία εγγενώς αδίπλωτη περιοχή η οποία ύστερα από βιοϋπολογιστική έρευνα εντοπίστηκε στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης [Εικόνα 3.22]. Όταν αυτή η περιοχή αποκλείστηκε από την κατασκευή η πρωτεΐνη κρυστάλλωσε οδηγώντας στη λύση της δομής της HrcQb-C [Fadoulglou et al., 2004].

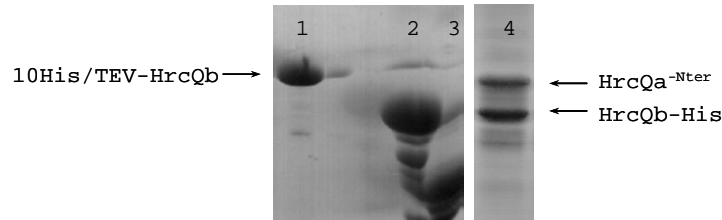


Εικόνα 3.22 Πρόβλεψη αναδίπλωσης της πρωτεΐνης HrcQb βάσει δεδομένων πρωτοταγούς αλληλουχίας. Διακρίνεται η αδίπλωτη περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 1-60 [<http://biportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex>]

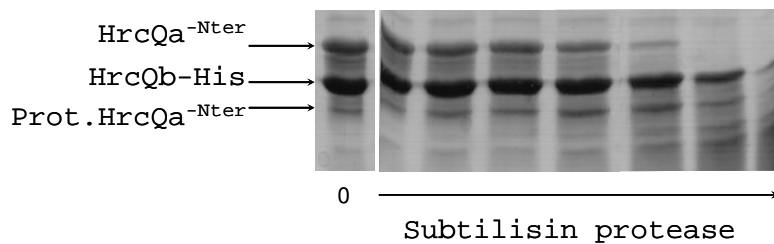
Ωστόσο, η HrcQb φαίνεται να σταθεροποιείται όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη HrcQa^{Nter} και δεν πρωτεολύεται ακόμη κι όταν το σύμπλοκο απομονώνεται με το αρχικό, σύντομο πρωτόκολο καθαρισμού [Εικόνα 3.23]. Πιθανότατα η αδίπλωτη περιοχή προστατεύεται με κάποιον τρόπο από τη διαμόρφωση που λαμβάνουν οι δύο πρωτεΐνες προκειμένου να δημιουργήσουν σύμπλοκο.

Η πρωτεΐνη HrcQb-His όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη HrcQa^{Nter} δεν είναι προσβάσιμη σε μικρές ποσότητες της πρωτεάσης Subtilisin σε πειράματα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης (limited proteolysis experiments). Η πρωτεάση Subtilisin είναι μία μη ειδική πρωτεάση η οποία αν και έχει προτίμηση να δρα σε θέσεις όπου βρίσκονται μεγάλα αφόρτιστα αμινοξέα, γενικά προσβάλλει τις αδίπλωτες προεξέχουσες περιοχές τις οποίες συναντά. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.24, η HrcQb-His παραμένει άθικτη παρουσία μικρών ποσοτήτων Subtilisin ενώ η HrcQa^{Nter} είναι το

πρώτο μόριο που αρχίζει και αποδομεί η πρωτεάση στο διάλυμα. Η πρωτεόλυση δεν είναι ειδική και για το λόγο αυτό δεν παρατηρείται ενίσχυση της ζώνης των 14kDa η οποία αντιστοιχεί στη HrcQa^{Nter} η οποία έχει υποστεί ειδική πρωτεόλυση από μολυσματικούς παράγοντες που συναντά σε κάποιο από τα βήματα της απομόνωσης (βλ. § 3Α.3.4). Ωστόσο, η ζώνη αυτή επίσης δε φαίνεται να επηρεάζεται από την πρωτεάση Subtilisin αποδεικνύοντας όχι μόνο ότι αποτελεί τη σταθερή περιοχή της HrcQa^{Nter} αλλά και ότι επαρκεί για να σταθεροποιήσει τη HrcQb-His.



Εικόνα 3.23 SDS-PAGE (14%). (1) Καθαρό δείγμα 10His/TEV-HrcQb την πρώτη μέρα μετά την απομόνωση, (2) το ίδιο δείγμα μετά από 25 μέρες έχει υποστεί πρωτεόλυση, (3) το ίδιο δείγμα μετά από 40 μέρες, η πρωτεόλυση εξελίσσεται, (4) καθαρό δείγμα από το σύμπλοκο απομονωμένο με το σύντομο πρωτόκολο καθαρισμού, η HrcQb-His είναι άθιχτη μετά από 30 μέρες, σταθεροποιημένη από τη HrcQa-Nter σε σύγκριση με τα (2) και (3), οι αχνή ζώνη που διακρίνεται κάτω από τη HrcQb-His είναι της πρωτεολυμένης HrcQa-Nter (που συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται το σύντομο πρωτόκολο). Η εικόνα στα αριστερά (1-3) έχει αναπαραχθεί από τη διδακτορική διατριβή της Δρ. Φαδούλογλου Β. [Fadouloglou V. , PhD dissertation, Univ. of Crete, 2004]



Εικόνα 3.24 SDS-PAGE (14%). Πείραμα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης με χρήση της πρωτεάσης Subtilisin. Η φορά του βέλους δείχνει την αυξανόμενη ποσότητα της πρωτεάσης που προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα του συμπλόκου. Φαίνεται η σταδιακή αποδόμηση της HrcQa^{Nter} και οι σταθερές ζώνες των HrcQb-His και Prot.HrcQa^{Nter} οι οποίες είναι οι τελευταίες που εξαφανίζονται παρουσία μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεάσης

- Μέρος Β -

Στο δεύτερο μέρος των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται τρεις γονιδιακές κατασκευές οι οποίες αποσκοπούν στην παραγωγή σταθερότερων μορφών του συμπλόκου και βασίζονται στα ευρήματα που παρουσιάστηκαν στο μέρος Α των αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με αυτά, η σταθερή περιοχή της HrcQa εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της και συγκεκριμένα μεταξύ των αμινοξέων 129-238. Η περιοχή αυτή διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά με τη HrcQb με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκου.

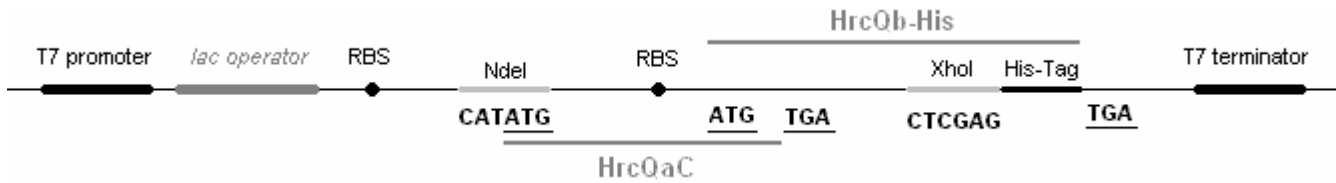
Για τις κατασκευές που παρουσιάζονται παρακάτω έχουν γίνει μόνο προκαταρκτικά πειράματα και τα πειράματα θα συνεχιστούν έπειτα από τη συγγραφή αυτής της διατριβής. Οι δύο από αυτές τις κατασκευές έδωσαν προϊόντα τα οποία είναι όμως δύσκολο να ταυτοποιηθούν για τους λόγους που θα αναλυθούν στη συνέχεια, ενώ η τρίτη κατασκευή δεν απέδωσε προϊόν.

3B.1 Περιγραφή γονιδιακών κατασκευών και των προϊόντων τους

3B.1.1 HrcQaC-HrcQb-His / pET26b(+)

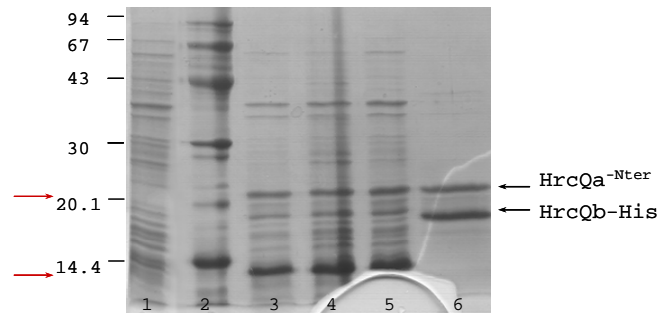
Η πρώτη γονιδιακή κατασκευή έγινε πριν ληφθούν τα αποτελέσματα από τη φασματομετρία μάζας. Στο παρελθόν είχε δειχθεί ότι οι καρβοξυτελικές περιοχές των δύο πρωτεϊνών είναι επαρκείς για τη δημιουργία του συμπλόκου [Fadoulouglou et al., 2004]. Η παρούσα κατασκευή φέρει την καρβοξυτελική περιοχή της HrcQa και συγκεκριμένα τα αμινοξέα 137-238 και την πλήρους μήκους HrcQb η οποία βάσει του σχεδιασμού φέρει ακροφύσιο 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της.

Για την κατασκευή, χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα η κατασκευή για την οποία έγινε λόγος και παραπάνω όπου τα δύο πλήρους μήκους διαδοχικά γονίδια (*hrcQa*, *hrcQb*) είχαν στο παρελθόν κλωνοποιηθεί στο φορέα pET16b [Novagen] (Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, Παν. Κρήτης). Το γονιδιακό κομμάτι ενδιαφέροντος, με τη βοήθεια ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενισχύθηκε με τη μέθοδο PCR και τα άκρα του υπέστησαν πέψη εκατέρωθεν με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI. Η ήδη υπάρχουσα μεθειονίνη 137 σήμανε την έναρξη της μετάφρασης. Το ένθεμα κλωνοποιήθηκε στο φορέα pET26b(+) [Novagen] ο οποίος είχε προηγουμένως υλοστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Σχηματικά, η περιοχή κλωνοποίησης-έκφρασης παρουσιάζεται στην εικόνα 3.25.



Εικόνα 3.25 Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κλωνοποίησης – έκφρασης στο φορέα pET26b(+). Μεταξύ άλλων, παρουσιάζονται και οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων και των κωδικονίων έναρξης και λήξης του κάθε γονιδίου. RBS = ribosome binding site

Δεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) μετασηματίστηκαν ώστε να φέρουν τον κλωνοποιημένο φορέα και πραγματοποιήθηκε επαγωγή για 5 ώρες στους 23°C με 0.5mM IPTG. Η υπερέκφραση ήταν έντονη και δύο έντονες ζώνες διακρίνονταν σε σύγκριση δειγμάτων από κύτταρα πριν υποστούν επαγωγή και μετά. Ωστόσο το ύψος στο οποίο εμφανίζονταν οι ζώνες αυτές δημιούργησε αμέσως ερωτηματικά.

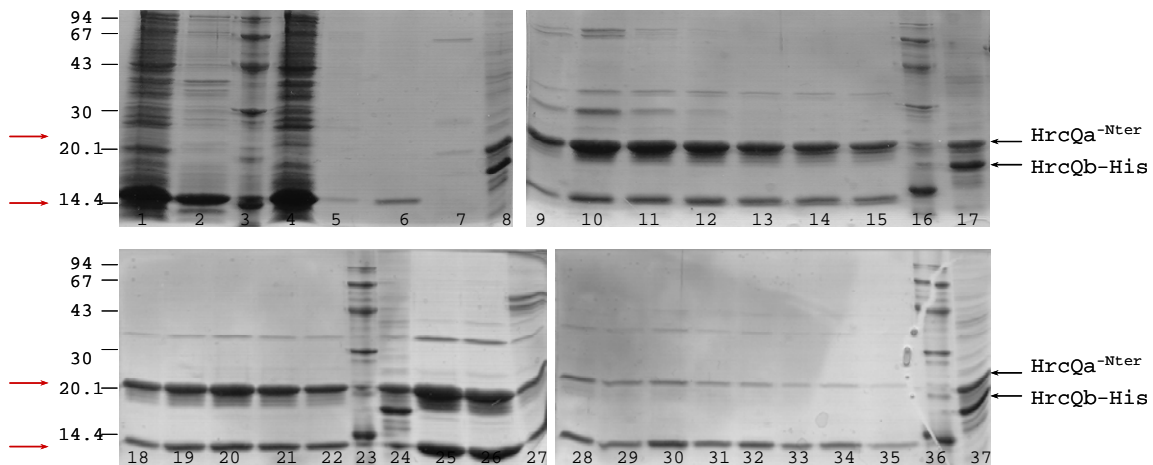


Εικόνα 3.26 SDS-PAGE (14%). (1) Δείγμα από κύτταρα πριν την επαγωγή, (2) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (3,4,5) δείγματα από κύτταρα μετά την επαγωγή (από διαφορετικές αποικίες) στα οποία διακρίνονται οι δύο ζώνες του υπερέκφρασμένου προϊόντος στα σημεία που υποδεικνύουν τα κόκκινα βέλη, (6) καθαρισμένο δείγμα του συμπλόκου HrcQa^{Nter}-HrcQb-His για σύγκριση

Το θεωρητικά αναμενόμενο μοριακό βάρος των δύο πρωτεϊνών είναι 11.5kDa για τη HrcQaC και 14.9kDa για τη HrcQb-His ενώ οι ζώνες που παρατηρούνται είναι η μία χαμηλότερα από τον πρωτεϊνικό δείκτη των 14.4kDa και η άλλη πάνω από το δείκτη των 20.1kDa. Επίσης, συγκριτικά με τη μορφή του συμπλόκου που παρουσιάστηκε αναλυτικά παραπάνω, το HrcQa^{Nter}-HrcQb-His, η HrcQb-His (κάτω ζώνη) δεν έχει μεταβληθεί συνελώς δε θα έπρεπε να έχει αλλάξει και η ηλεκτροφορητική της συμπεριφορά ενώ η HrcQa^{Nter} έχει ελαττωθεί κατά 7.5kDa. Δηλαδή, θα έπρεπε να φαίνεται μία ζώνη ακριβώς εκεί όπου εμφανιζόταν η ζώνη της HrcQb-His (δηλ. η κάτω

ζώνη του συμπλόκου HrcQa^{Nter}-HrcQb-His) και άλλη μία πολύ χαμηλότερα και από τις δύο ζώνες του προηγούμενου συμπλόκου που να αντιστοιχεί στα 11.5kDa της HrcQaC. Αντί αυτού, οι δύο ζώνες που παρουσιάζονται στο παρακάτω πήκτωμα [Εικόνα 3.26] εάν συγκριθούν με τις δύο ζώνες της προηγούμενης μορφής του συμπλόκου, να μεν η μία βρίσκεται πολύ χαμηλότερα και από τις δύο ζώνες αλλά η άλλη, αντί να βρίσκεται στο ύψος της HrcQb-His βρίσκεται στο ύψος της HrcQa^{Nter}. Η περιοχή έκφρασης του φορέα είχε ελεγχθεί με αλληλούχηση DNA [Εργαστήριο Μικροχημείας, IMBB-FORTH] και δεν είχαν βρεθεί λάθη. Στη συνέχεια, έγιναν πειράματα με σκοπό την ταυτοποίηση των δύο ζωνών.

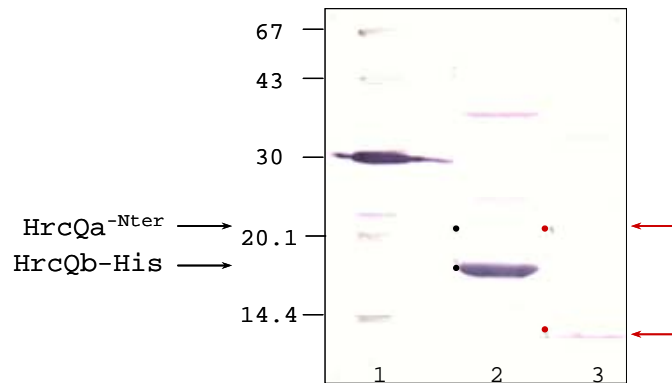
Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός δύο λίτρων καλλιέργειας με διερευνητικό χαρακτήρα. Η κυτταρική πάστα επαναδιαλύθηκε σε lysis buffer A [20mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM Imidazole, 20% Glycerol, 0.5% Triton-X, 20mM 2-mercaptoethanol], τα κύτταρα λύθηκαν με υπέρηχους και έγινε διαχωρισμός των διαλυτών (supernatant) και μη διαλυτών (pellet) σωματιδίων με φυγοκέντρηση. Το διαλυτό κλάσμα φορτώθηκε σε κολώνα νικελίου και υπέστη πλύσεις. Πραγματοποιήθηκαν κλιμακωτά βήματα έκλυσης, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (30mM, 40mM, 80mM, 100mM, 130mM, 160mM, 300mM) ώστε να διαπιστωθεί σε ποια συγκέντρωση εκλύεται η κάθε ζώνη, δίνοντας έτσι κάποια ένδειξη για το ποια ζώνη αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη που φέρει την ουρά των 6 ιστιδινών.



Εικόνα 3.27 SDS-PAGE (14%). (1) Supernatant, διαλυτό κλάσμα, το υλικό που φορτώθηκε στη στήλη Ni-NTA, (2) pellet, το μη διαλυτό κλάσμα, (3,16,23,36) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (4) flow through, ό,τι δε συνδέθηκε με το Ni-NTA, (5,6,7) εκπλήξεις με διαλύματα που περιέχουν 10mM, 15mM και 20mM imidazole αντίστοιχα, (8,17,24,37) καθαρισμένο σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His για σύγκριση, (9-15) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 30mM, (18-22) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 40mM, (25-27) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 80mM, (28,29) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 100mM, (30,31) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 130mM, (32,33) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 160mM, (34,35) διαδοχικές εκλούσεις σε συγκέντρωση ιμιδαζολίου 300mM

Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η κάτω ζώνη βρίσκεται και στο διαλυτό και στο μη διαλυτό κλάσμα ενώ υπάρχουν και μεγάλες απώλειες αυτής στο υλικό που δεν πιάστηκε στην κολώνα (flow through) δίνοντας έτσι μία ένδειξη ότι η κάτω ζώνη δε φέρει ιστιδίνες. Στις εκλούσεις, και οι δύο ζώνες εξέρχονται μαζί από τη στήλη ήδη από τα 30mM ιμιδαζολίου. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (μέχρι τα 80mM) η άνω ζώνη φαίνεται πιο έντονη σε σχέση με την κάτω ζώνη ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (100-300mM) η αναλογία αντιστρέφεται. Αυτό ίσως υποδηλώνει ότι η κάτω ζώνη να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το νικέλιο και επομένως είναι αυτή που φέρει την ουρά ιστιδινών, ανατρέποντας το προηγούμενο συμπέρασμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.27. Τα αποτελέσματα από αυτόν το διερευνητικό καθαρισμό ήταν αντιφατικά και καθόλου κατατοπιστικά ως προς την ταυτοποίηση των ζωνών.

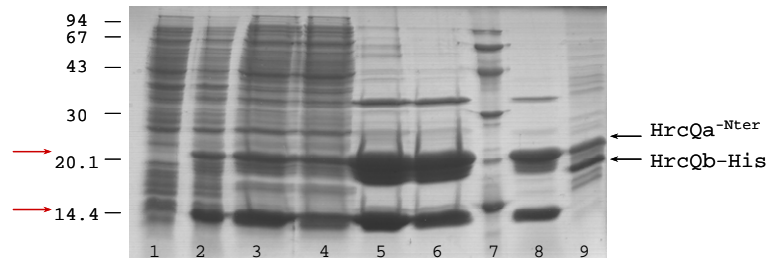
Με το πείραμα που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.28 επιχειρήθηκε να εντοπιστεί η πρωτεΐνη που φέρει την ουρά ιστιδινών πιο άμεσα με Ni-NTA AP conjugate. Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται στο κεφάλαιο 2. Στην εικόνα φαίνεται να ανιχνεύεται η κάτω από τις δύο ζώνες, αλλά η ένταση είναι πολύ μικρή (ειδικά συγκρίνοντας με τη ζώνη της HrcQb-His από δείγμα καθαρού συμπλόκου HrcQa^{Nter}-HrcQb-His που βρίσκεται ακριβώς δίπλα, και στην ίδια ποσότητα), και συνεπώς μπορεί να είναι μη ειδική ανίχνευση.



Εικόνα 3.28 Μembrάνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι ζώνες από SDS-PAGE που είχε στο (1) πρωτεϊνικό δείκτη μοριακών βαρών (kDa), στο (2) καθαρό δείγμα από το σύμπλοκο HrcQa-Nter-HrcQb-His, οι μαύρες κουκκίδες υποδεικνύουν το ύψος στο οποίο είχαν μεταφερθεί οι ζώνες του συμπλόκου πάνω στη μεμβράνη όταν αυτή βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau S, στο (3) δείγμα του προϊόντος καθαρισμού της κατασκευής που αναλύεται, οι κόκκινες κουκκίδες υποδεικνύουν το ύψος στο οποίο είχαν μεταφερθεί οι ζώνες πάνω στη μεμβράνη όταν αυτή βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau S

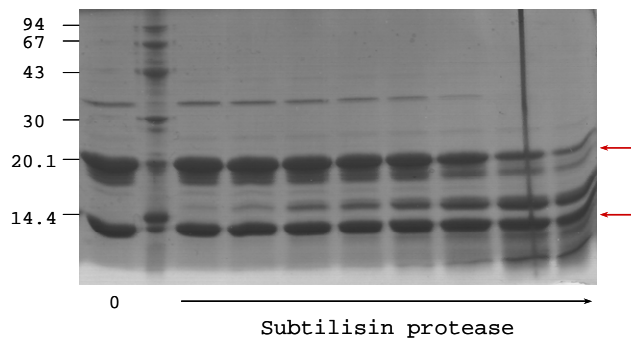
Στη συνέχεια, έγινε μικρής κλίμακας καθαρισμός με ουρία έτσι ώστε να συνδεθεί στην κολώνα Ni-NTA μόνο η πρωτεΐνη που φέρει His-tag. Το αποτέλεσμα οδήγησε σε ακόμη

μεγαλύτερη σύγχυση παρά σε εξήγηση για το τι συμβαίνει : και οι δύο ζώνες εμφανίστηκαν στα εκλούσματα.



Εικόνα 3.29 SDS-PAGE (14%). (1) Δείγμα κυττάρων πριν την επαγωγή, (2) δείγμα κυττάρων μετά την επαγωγή, (3) supernatant, διαλυτό κλάσμα που φορτώθηκε στην κολώνα (παρουσία αποδιατακτικού, 8M ουρία), (4) flow through, ό,τι δεν πιάστηκε στην κολώνα, (5,6) εκλούσματα, (7) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa), (8) καθαρισμένο προϊόν σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, (9) καθαρισμένο σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His για σύγκριση

Ένα τελευταίο πείραμα που έγινε, χωρίς όμως να δώσει αποτελέσματα που ξεδιαλύνουν την κατάσταση ήταν το πείραμα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης με Subtilisin που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.30. Η πρωτεΐνη της άνω ζώνη φαίνεται πιο εύκολα προσβάσιμη στην πρωτεάση από ότι η πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στην κάτω ζώνη. Επίσης, η άνω ζώνη πρωτεολύεται ειδικά από τη Subtilisin και καταλήγει σε μία ζώνη περίπου στα 16kDa.

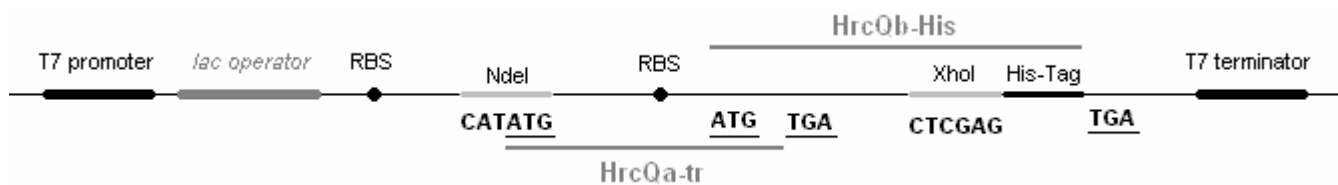


Εικόνα 3.30 SDS-PAGE (14%). Πείραμα ελεγχόμενης πρωτεόλυσης με χρήση της πρωτεάσης Subtilisin. Η φορά του βέλους δείχνει την αυξανόμενη ποσότητα της πρωτεάσης που προστέθηκε στο πρωτεϊνικό διάλυμα

Συμπερασματικά, τα προϊόντα αυτής της κατασκευής δεν έχουν ταυτοποιηθεί έως τώρα αλλά είναι απαραίτητο να γίνει, καθώς όπως παρουσιάζεται παρακάτω, η επόμενη γονιδιακή κατασκευή, η οποία έχει πολύ μικρή διαφορά με αυτή που μόλις παρουσιάστηκε, δίνει σχεδόν τις ίδιες ζώνες, κάτι το οποίο δεν μπορεί να είναι τυχαίο.

3B.1.2 HrcQa^{tr}-HrcQb-His / pET26b(+)

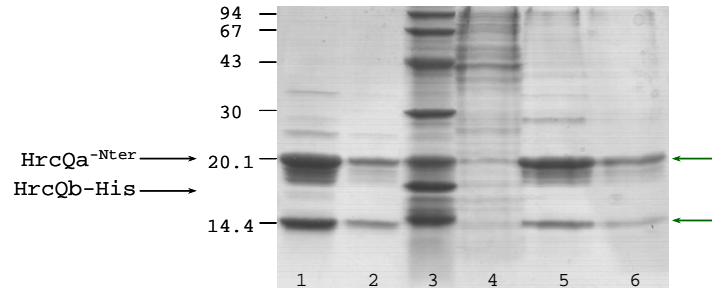
Η κατασκευή αυτή διαφέρει ελάχιστα από αυτή που μόλις παρουσιάστηκε. Η διαφορά της είναι στη HrcQa, η οποία έχει σχεδιαστεί ώστε το προϊόν να είναι το τμήμα αυτό το οποίο υπέδειξε η ανάλυση της φασματομετρίας μάζας, δηλαδή τα αμινοξέα 129-238 (μετάλλαξη του αμινοξέος αργινίνη 128 σε μεθειονίνη για την έναρξη της μετάφρασης). Ο συμβολισμός της μορφής αυτής της HrcQa θα είναι HrcQa^{tr} (tr = truncated) για αποφυγή σύγχυσης με την προηγούμενη κατασκευή. Η HrcQb σε αυτή την κατασκευή σχεδιάστηκε να είναι πλήρης και να φέρει ακροφύσιο 6 ιστιδινών. Η εικόνα 3.31 παρουσιάζει την περιοχή έκφρασης-κλωνοποίησης στο φορέα pET26b(+).



Εικόνα 3.31 Σχηματική απεικόνιση της περιοχής κλωνοποίησης – έκφρασης στο φορέα pET26b(+). Μεταξύ άλλων, παρουσιάζονται και οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων και των κωδικονίων έναρξης και λήξης του κάθε γονιδίου. RBS = ribosome binding site

Τα αναμενόμενα θεωρητικά μοριακά βάρη των δύο πρωτεϊνών είναι 12.5kDa για τη HrcQa^{tr} και 14.9kDa για τη HrcQb-His. Η HrcQa διαφέρει από την προηγούμενη κατασκευή (HrcQaC-HrcQb-His) κατά 9 αμινοξέα (1kDa). Και πάλι δηλαδή αναμένεται μία ζώνη εκεί όπου εμφανιζόταν η ζώνη της HrcQb-His (δηλ. η κάτω ζώνη του συμπλόκου HrcQa^{Nter}-HrcQb-His) και άλλη μία πολύ χαμηλότερα και από τις δύο ζώνες του προηγούμενου συμπλόκου που να αντιστοιχεί στα 12.5kDa της HrcQa^{tr}. Όμως οι ζώνες που παρατηρούνται είναι η μία χαμηλότερα από τον πρωτεϊνικό δείκτη των 14.4kDa και η άλλη πάνω από το δείκτη των 20.1kDa, ακριβώς όπως τα προϊόντα της προηγούμενης κατασκευής (HrcQaC-HrcQb-His).

Επίσης, η συμπεριφορά υπό αποδιατακτικές συνθήκες για το προϊόν είναι ακριβώς οι ίδιες με αυτή της προηγούμενης κατασκευής : και τα δύο προϊόντα που αντιστοιχούν στις δύο ζώνες συνδέονται με το Ni-NTA και εκλύονται [Εικόνα 3.32].



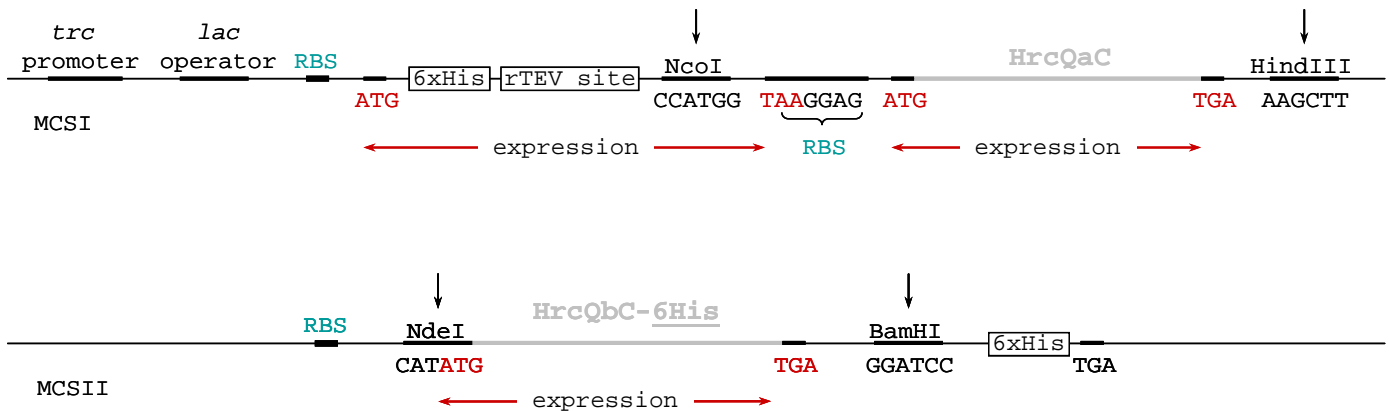
Εικόνα 3.32 SDS-PAGE (14%). (1,2) Το προϊόν όπως εκλούεται από μικρής κλίμακας καθαρισμό σε μη αποδιατακτικές συνθήκες, (3) πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών βαρών (kDa) ανακατεμένος με καθαρό σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His για σύγκριση, σε τι αντιστοιχεί η κάθε ζώνη φαίνεται στα αριστερά, (4) flow through από τον μικρής κλίμακας καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες, (5,6) το προϊόν όπως εκλούεται από μικρής κλίμακας καθαρισμό υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Εκλούνται και οι δύο ζώνες. Με τα πράσινα βέλη υποδεικνύονται οι δύο μη ταυτοποιημένες ζώνες της κατασκευής

3B.1.3 HrcQaC-HrcQbC-His / pPROpET

Η κατασκευή αυτή αποσκοπεί στη δημιουργία προϊόντος το οποίο να περιλαμβάνει τα καρβοξυτελικά άκρα των δύο πρωτεϊνών τα οποία είναι αναγκαία και επαρκή για το σχηματισμό του συμπλόκου και τα οποία είναι σταθερά. Η HrcQaC περιλαμβάνει το τμήμα το οποίο υπέδειξε η φασματομετρία μάζας δηλαδή τα αμινοξέα 129-238 και η HrcQbC περιλαμβάνει το σταθερό τμήμα του οποίου έχει προσδιοριστεί η δομή δηλαδή τα αμινοξέα 50-128. Η κατασκευή έχει σχεδιαστεί ώστε η HrcQbC να φέρει ακροφύσιο 6 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η κλωνοποίηση έγινε στο φορέα pPROpET (βλ. παράρτημα Α) και ήταν ιδιαίτερα σύνθετη. Προϊόν από την κατασκευή αυτή δεν έχει ληφθεί ακόμη, συνεπώς σε αυτή την παράγραφο η περιγραφή θα περιοριστεί στο σύνθετο τρόπο με τον οποίο έγινε η πλασμιδιακή κατασκευή.

Ο φορέας pPROpET διαθέτει δύο θέσεις κλωνοποίησης. Η άνω θέση μπορεί να προσδώσει στο τελικό προϊόν ακροφύσιο 6 ιστιδινών και θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης rTEV στο αμινοτελικό άκρο. Στη συγκεκριμένη κατασκευή δεν ήταν επιθυμητό να υπάρχουν αυτοί οι παράγοντες στο αμινοτελικό άκρο κάποιας από τις πρωτεΐνες για να μην εμποδίζουν τη σωστή αναδίπλωση. Ως μήτρα για την ενίσχυση του ενθέματος που προορίζεται για την άνω θέση κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το προϊόν PCR που είχε προκύψει από την κατασκευή His/TEV-HrcQa^{Nter}/pPROEX-HTb. Έτσι, με ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο (upper primer), το οποίο σχεδιάστηκε να υβριδίζει στη θέση NcoI που βρίσκεται μετά από τους παράγοντες 6His και rTEV-site της μήτρας, εισήχθησαν ένα κωδικόνιο λήξης, μια νέα θέση δέσμευσης ριβοσώματος (ribosome binding site, RBS), και ένα κωδικόνιο έναρξης που μεταλλάξει το αμινοξύ αργινίνη 128

της HrcQa σε μεθειονίνη. Το δεύτερο ολιγονουκλεοτίδιο (lower primer) το οποίο είναι το ίδιο με αυτό που είχε χρησιμοποιηθεί για την απόκτηση του PCR προϊόντος της His/TEV-HrcQa^{Nter}, υβριδίζει πλήρως με τη μήτρα και περιλαμβάνει τη θέση περιορισμού του ενζύμου HindIII. Έτσι, το νέο PCR προϊόν διαθέτει θέσεις περιορισμού NcoI-HindIII και αφού υποστεί πέψη, κλωνοποιείται στην άνω θέση κλωνοποίησης του pPROpET (MCSI) ο οποίος έχει επίσης υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Αυτό που προκύπτει για την άνω θέση, είναι να εκφράζονται οι παράγοντες 6His και rTEV (RBS και ATG υπάρχουν στο φορέα) αλλά η μετάφραση να διακόπτεται λόγω του κωδικονίου λήξης που εισήχθη. Το τμήμα αυτό που εκφράζεται είναι πολύ μικρό και αναμένεται να μην επιβιώνει μέσα στο κύτταρο. Στην κάτω θέση κλωνοποίησης (MCSII) του pPROpET κλωνοποιείται η καρβοξυτελική περιοχή της HrcQb και ως μήτρα χρησιμοποιείται η κατασκευή HrcQa^{Nter}-HrcQb-His/pET26b(+). Το άνω ολιγονουκλεοτίδιο (upper primer) φέρει θέση περιορισμού NdeI στην οποία υπάρχει κωδικόνιο έναρξης (μετάλλαξη αμινοξέος γλουταμικό 49 της HrcQb σε μεθειονίνη) ενώ το κάτω ολιγονουκλεοτίδιο σχεδιάστηκε ώστε να περιέχεται η περιοχή 6His και το κωδικόνιο λήξης της μήτρας πριν τη θέση περιορισμού BamHI. Δηλαδή, το προϊόν που προκύπτει από την PCR θα φέρει ήδη τις 6 ιστιδίνες και το κωδικόνιο λήξης και μετά τη θέση περιορισμού ενώ οι 6 ιστιδίνες και το κωδικόνιο λήξης που προσφέρει ο φορέας δε θα εκφράζονται. Το προϊόν της PCR ύστερα από πέψη με τα ένζυμα NdeI-BamHI κλωνοποιείται στο φορέα pPROpET ο οποίος είναι ήδη κλωνοποιημένος στην άνω θέση με το ένθεμα της HrcQaC και έχει υποστεί πέψη στην κάτω θέση με τα ένζυμα NdeI-BamHI. Σχηματικά οι περιοχές κλωνοποίησης και έκφρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 3.33.



Εικόνα 3.33 Οι δύο περιοχές κλωνοποίησης (MCSI, MCSII) στον pPROpET και οι περιοχές έκφρασης. Παρουσιάζονται τα κωδικόνια έναρξης και λήξης (κόκκινο), οι θέσεις πρόσδεσης του ριβοσώματος (γαλάζιο), και οι θέσεις περιορισμού (βέλη). Η ουρά των έξι ιστιδινών εμπεριέχεται στο ένθεμα που κλωνοποιήθηκε στην κάτω θέση κλωνοποίησης (MCSII)

-Μέρος Γ-

Στο τρίτο μέρος των αποτελεσμάτων γίνεται λόγος για τις μετρήσεις σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες (Small Angle X-ray Scattering, SAXS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για το σύμπλοκο HrcQa^{Nter}-HrcQb-His. Τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα συλλέχθηκαν στη γραμμή ακτινοβολήσης X33 όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2. Για το σύμπλοκο μετρήθηκαν ως ξεχωριστά προϊόντα δύο πληθυσμοί οι οποίοι διαχωρίζονται στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης : 1) ο μη επαναλήψιμος πληθυσμός που εκλούστηκε στα 39.5ml από την S-400 μία μόνο φορά, 2) ο πληθυσμός που εκλούεται στα 49ml αλλά καταλήγει να αποτελείται από μοριακές δομές μικρότερου μοριακού βάρους (εκλούεται στα 58.5ml).

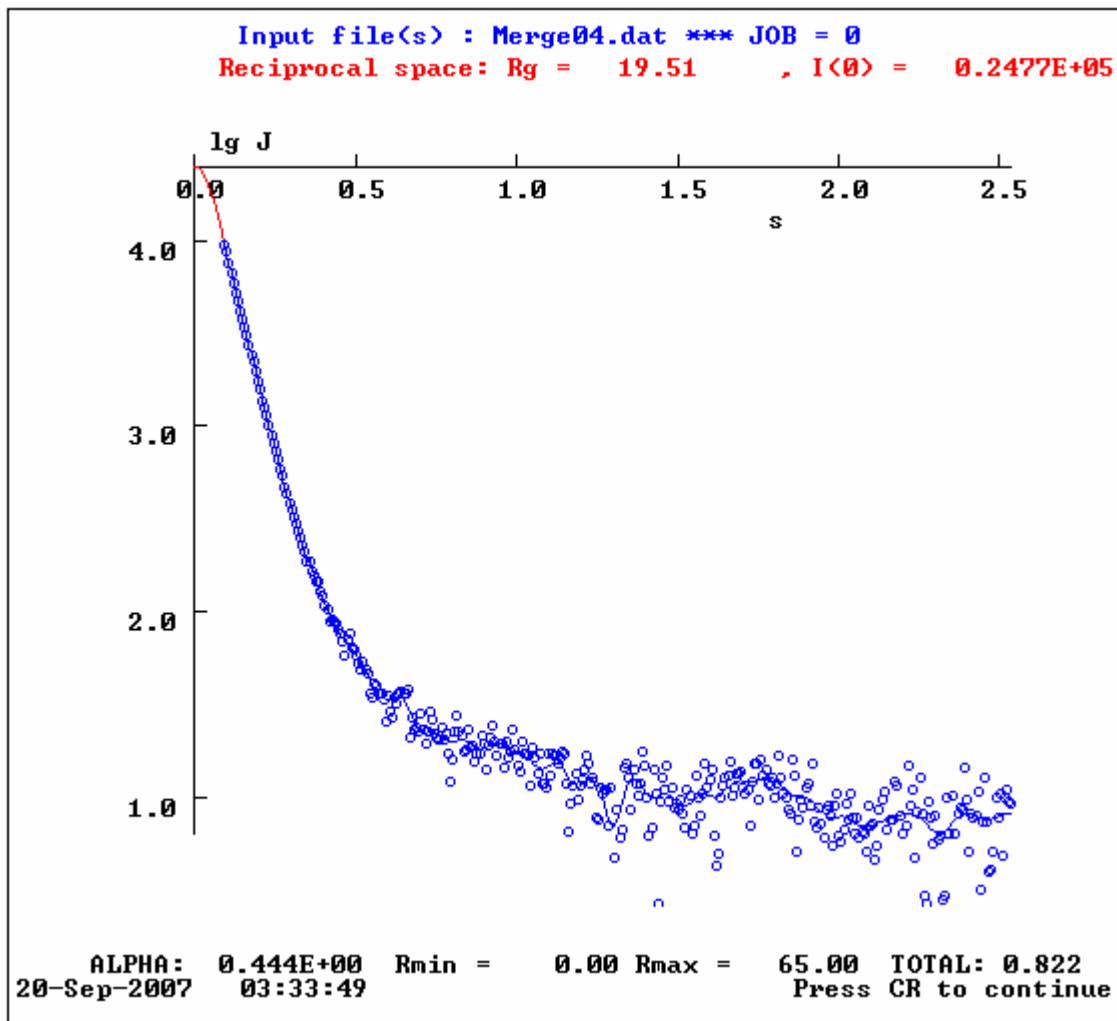
Τα πρωτογενή δεδομένα δεν ήταν ολοκληρωμένα καθότι, λόγω της χαμηλής απόδοσης απομόνωσης του συμπλόκου (το οποίο διαχωρίζεται στη συνέχεια σε ξεχωριστούς πληθυσμούς), δεν υπήρχε διαθέσιμη ποσότητα για να γίνουν όλες οι απαιτούμενες μετρήσεις. Το θετικό είναι ότι οι συγκεντρώσεις που απαιτούνται για τη σκέδαση είναι χαμηλές (και ειδικά για τις μεγαλομοριακές δομές), και όσο χαμηλότερες τόσο το καλύτερο για την αποφυγή θορύβου. Ωστόσο, οι ελλιπείς μετρήσεις δυσχέραναν την ανάλυση των δεδομένων, και τα τελικά μοντέλα δεν μπορούν να αποτελέσουν ένδειξη για το πώς μοιάζει το σύμπλοκο στο διάλυμα. Οπωσδήποτε, τα πειράματα σκέδασης θα πρέπει να επαναληφθούν στο μέλλον και εφόσον υπάρχει μία πιο ξεκάθαρη εικόνα για τους διάφορους πληθυσμούς και τα μοριακά βάρη στα οποία αυτοί αντιστοιχούν.

3Γ.1 Ο πρώτος πληθυσμός

3Γ.1.1 Μετρήσεις και ανάλυση των δεδομένων

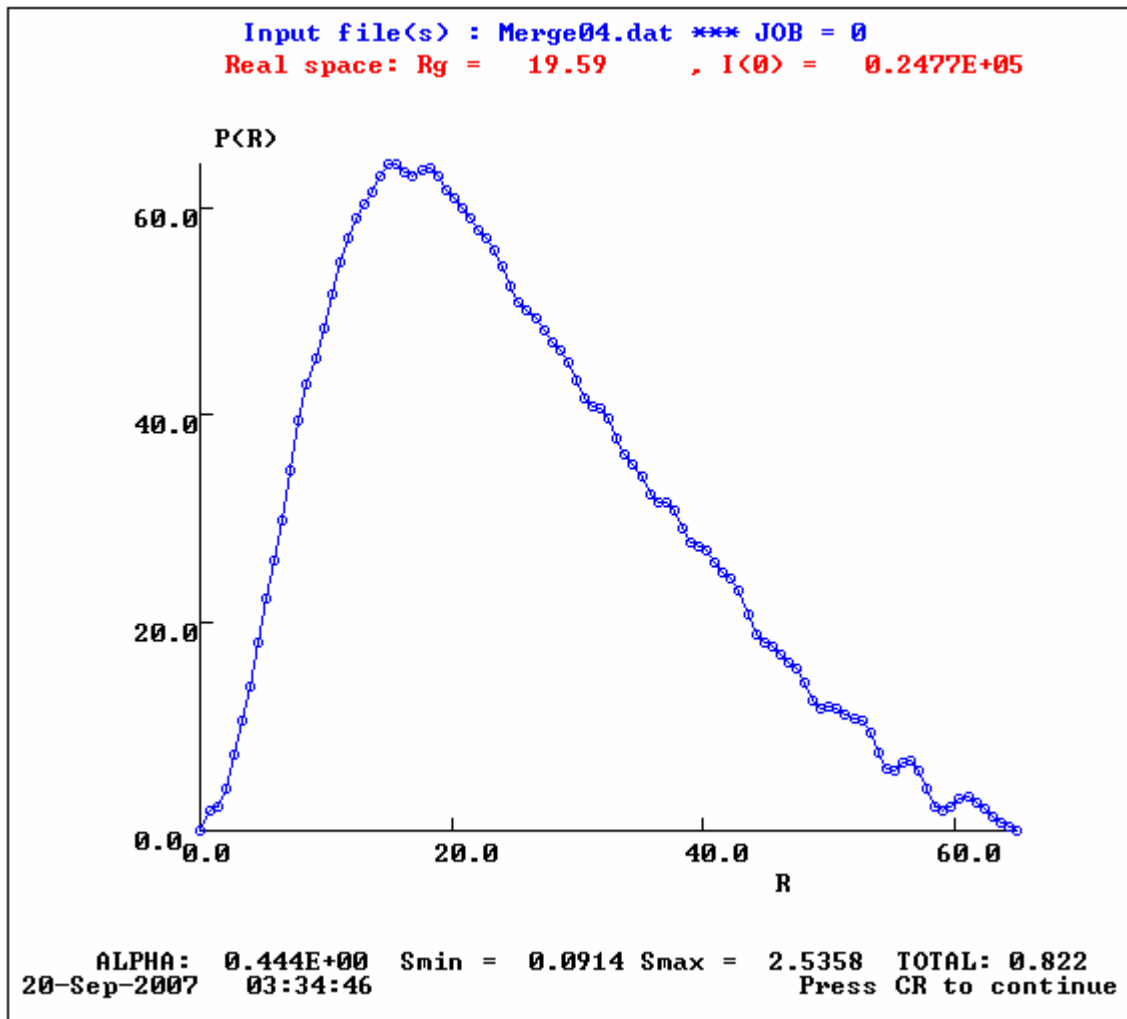
Μετρήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του συμπλόκου (0.45mg/ml και 0.25mg/ml όπως εκτιμήθηκε από την απορρόφηση του δείγματος στα 280 nm) σε διάλυμα 20mM Tris/HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 0.5mM EDTA, 2mM DTT. Η έκθεση στις ακτίνες – X ήταν συνεχόμενη με εναλλαγή δείγματος/διαλύματος και διαρκούσε 3 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων είναι πολύ μικρές αλλά σκεδάζουν.

Η τελική καμπύλη σκέδασης αποτελεί συγχώνευση των δευτερογενών καμπύλων από δείγματα σωματιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (οι δευτερογενείς καμπύλες προέρχονται από τις πρωτογενείς καμπύλες σκέδασης του δείγματος από όπου αφαιρούνται οι επίσης πρωτογενείς καμπύλες σκέδασης του διαλύτη δίνοντας την «καθαρή» σκέδαση που οφείλεται στο σωματίδιο). Στην εικόνα 3.34 παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δεδομένα της μέτρησης του διαλύματος των 0.25mg/ml και μόνο το 1/2 αυτών (αποκρίστηκαν οι τιμές στις ευρείες γωνίες για αποφυγή του θορύβου). Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης της σκέδασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å].



Εικόνα 3.34 Η τελική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα για τον πρώτο πληθυσμό

Στην εικόνα 3.35 παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $p(r)$ όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier για μέγιστη διάμετρο σωματιδίου 65nm. Η μέγιστη τιμή της $p(r)$ εμφανίζεται περίπου στην απόσταση των 19.59nm (± 0.371 nm) και αντιπροσωπεύει την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου ενώ η τιμή $I(0)$ είναι 24,770 (± 923). Η μοριακή μάζα εκτιμάται (έμμεσα, και χωρίς ακρίβεια) από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα (BSA) σε ~4800kDa (!).

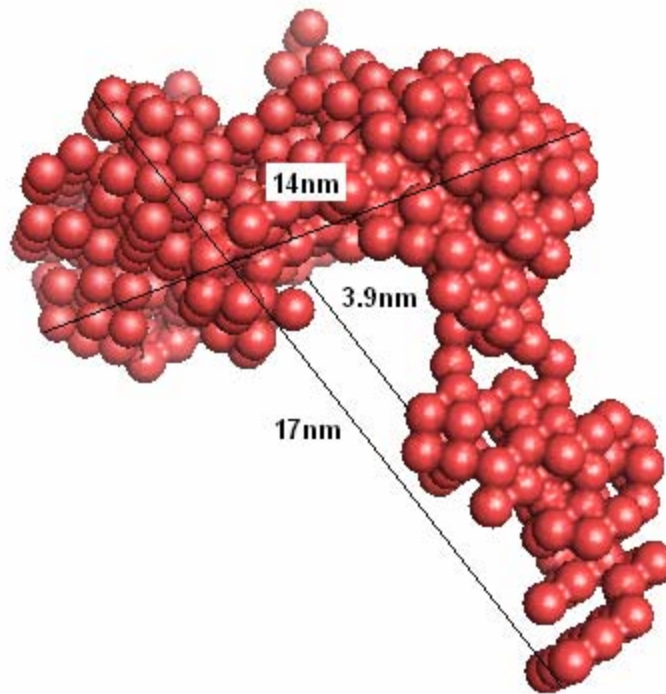


Εικόνα 3.35 Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $p(r)$, όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier

3Γ.1.2 *Ab initio* καθορισμός σχήματος

Ο καθορισμός του σχήματος με βάση την καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X από το μονοδιάσπαρτο διάλυμα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω

προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN-slow mode) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας [Εικόνα 3.36].



Εικόνα 3.36 Το μοντέλο που προέκυψε με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN-slow mode) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας. Παρατηρείται σχήμα ημικυκλικό

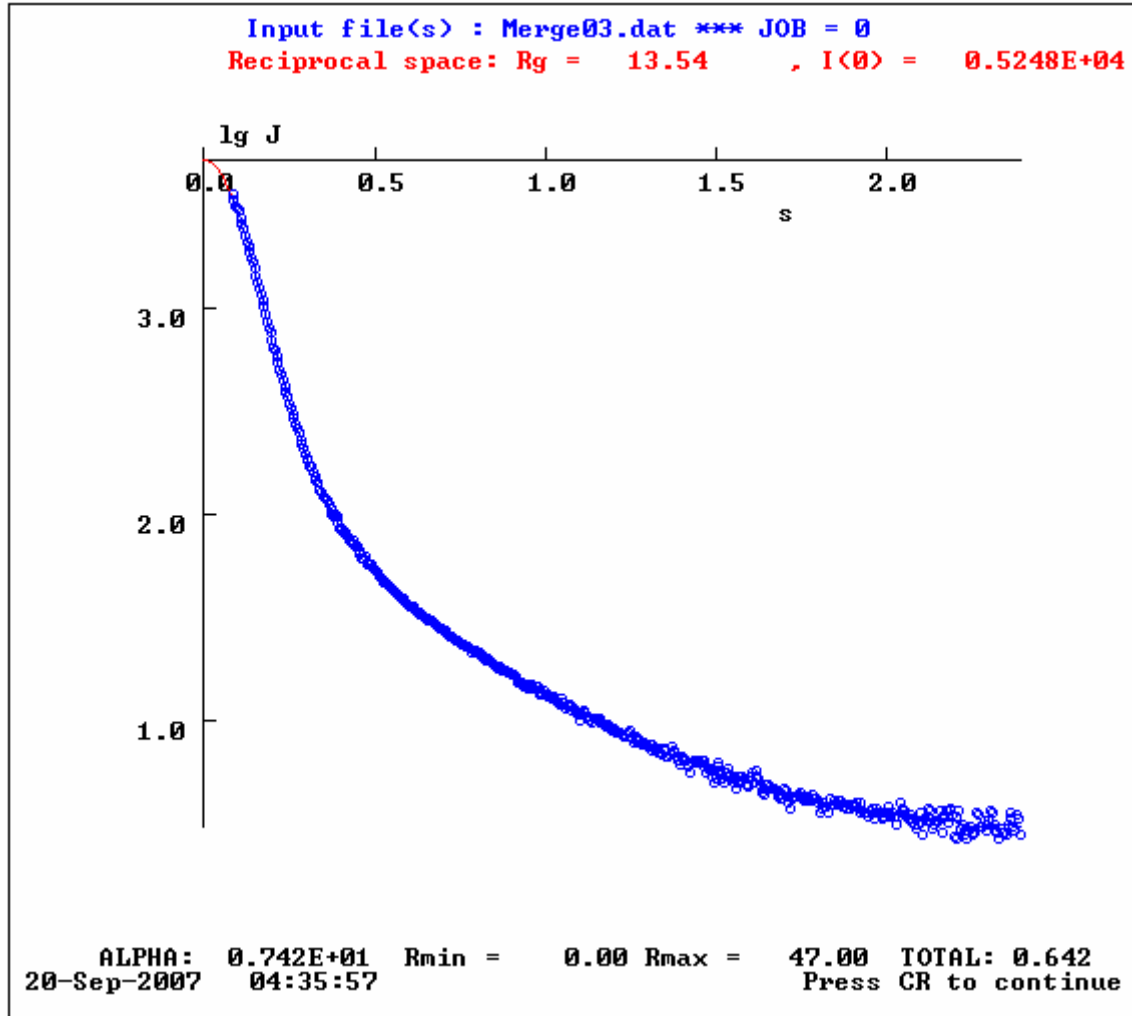
3Γ.2 Ο δεύτερος πληθυσμός

3Γ.2.1 Μετρήσεις και ανάλυση των δεδομένων

Μετρήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του συμπλόκου (2.8mg/ml, 1.8mg/ml, 0.82mg/ml, και 0.6mg/ml) όπως εκτιμήθηκε από την απορρόφηση του δείγματος στα 280 nm) σε διάλυμα 20mM Tris/HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 0.5mM EDTA, 2mM DTT. Η έκθεση στις ακτίνες - X ήταν συνεχόμενη με εναλλαγή δείγματος/διαλύματος και διαρκούσε 3 λεπτά.

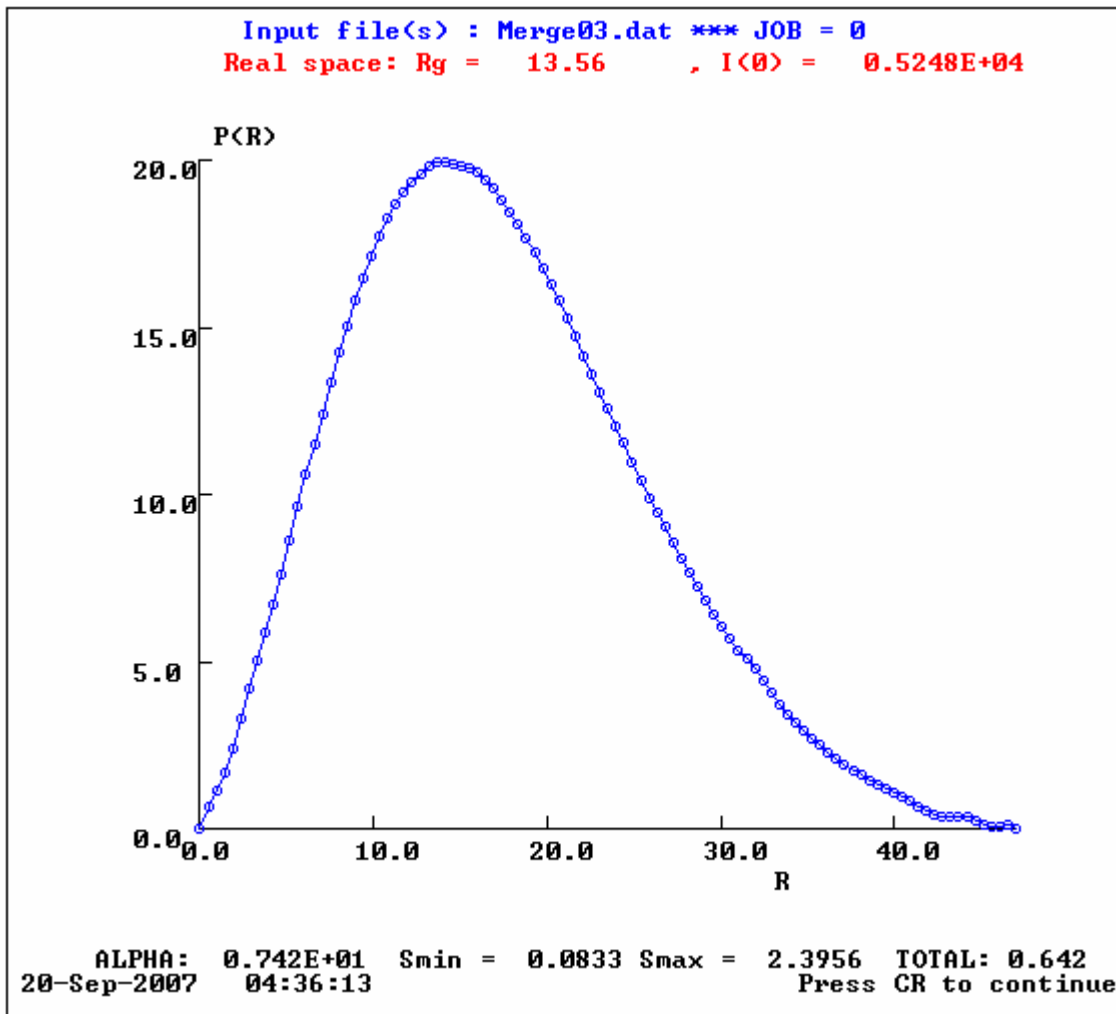
Στην εικόνα 3.37 παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα δεδομένα των μετρήσεων των διαλυμάτων 2.8mg/ml και 0.6mg/ml, και μόνο το 1/2 της καμπύλης που προέκυψε από τη συγχώνευσή τους. Στο

διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης της σκέδασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å].



Εικόνα 3.37 Η τελική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα για τον πρώτο πληθυσμό

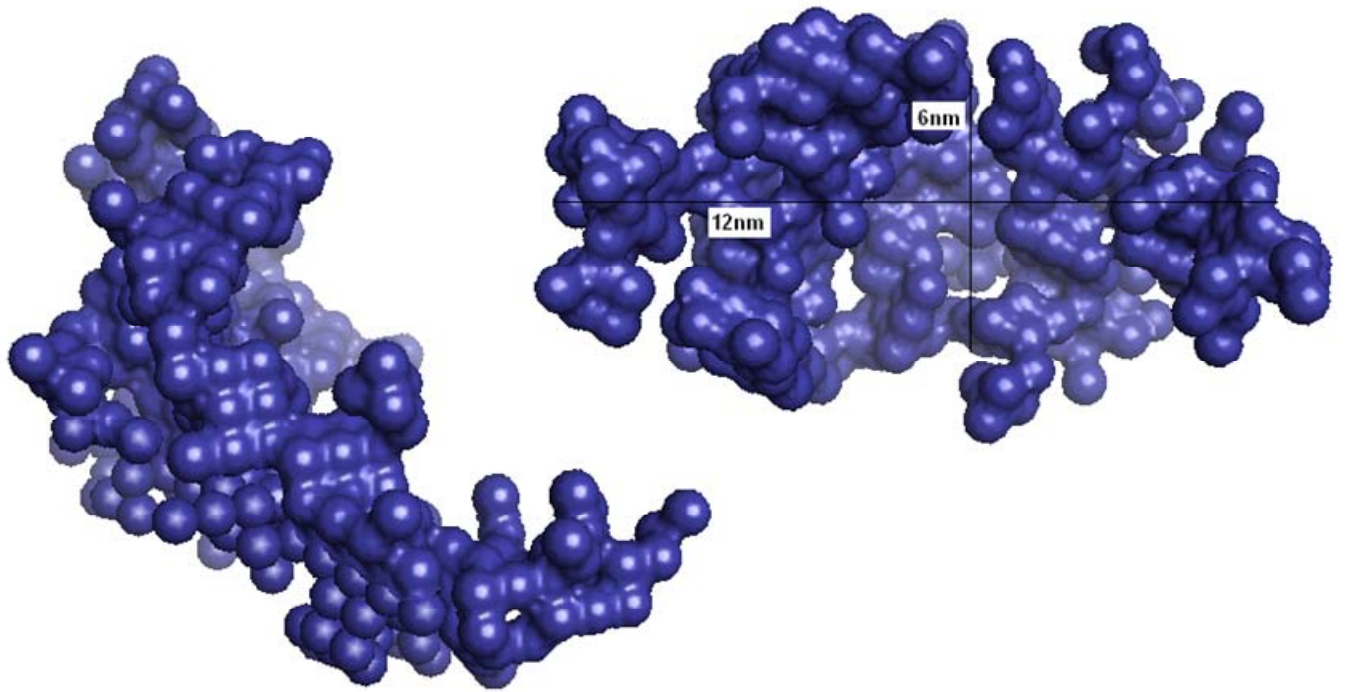
Στην εικόνα 3.38 παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $p(r)$ όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier για μέγιστη διάμετρο σωματιδίου 47nm. Η μέγιστη τιμή της $p(r)$ εμφανίζεται περίπου στην απόσταση των 13.56nm (± 0.096 nm) και αντιπροσωπεύει την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου ενώ η τιμή $I(0)$ είναι 5,248 (± 52.4). Η μοριακή μάζα εκτιμάται (έμμεσα, και χωρίς ακρίβεια) από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα (BSA) σε ~1028kDa.



Εικόνα 3.38 Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $\rho(r)$, όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier

3Γ.1.2 *Ab initio* καθορισμός σχήματος

Ο καθορισμός του σχήματος με βάση την καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X από το μονοδιάσπαρτο διάλυμα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN-slow mode) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας [Εικόνα 3.39].



Εικόνα 3.39 Το μοντέλο που προέκυψε με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN-slow mode) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας. Παρατηρείται επίσης σχήμα ημικυκλικό. Δυο διαφορετικές όψεις του μοντέλου

Κεφάλαιο 4

Συμπεράσματα – προοπτικές

Τα συμπεράσματα της ακολουθίας των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, παρότι δεν είναι πολλά, δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την *in vitro* συμπεριφορά του συμπλόκου των πρωτεϊνών HrcQa-HrcQb και διεγείρουν το ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνησή του στο μέλλον.

Αρχικά, έγινε εντοπισμός της υδρόφοβης περιοχής της HrcQa, η οποία πιθανόν διατηρεί χαλαρή επαφή με την εσωτερική μεμβράνη. Η αμινοτελική αυτή περιοχή (1-80 αα) αποκλίσθηκε μέσω μοριακών τεχνικών από το σύμπλοκο που αρχικά σχεδιάστηκε (HrcQa^{Nter}-HrcQb-His). Το σύμπλοκο απομονώθηκε ως διαλυτό προϊόν με χρωματογραφία συγγένειας Ni-NTA με τη βοήθεια ουράς ιστιδινών που έφερε η HrcQb στο καρβοξυτελικό της άκρο. Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών οδήγησε στον συνκαθαρισμό τους (pull down assay). Η περίσσεια της HrcQa^{Nter}, η οποία δε λαμβάνει μέρος στο σύμπλοκο απομονώνεται σε ένα βήμα έκλουσης πριν την έκλυση του συμπλόκου. Το σύμπλοκο παρουσιάζει στοιχειομετρία που πιθανόν είναι ανάλογη αυτής που παρατηρείται για το ομόλογο σύμπλοκο FliM-FliN του μαστιγίου (1:3 – 1:4) (βλ. Κεφ. 1).

Το σύμπλοκο σχηματίζει μια μεγαλομοριακή δομή, της οποίας το ακριβές μοριακό βάρος δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης αποδίδει συστηματικά δύο πληθυσμούς οι οποίοι διατηρούν μια ισορροπία η οποία με κινείται προς τον πληθυσμό με το μικρότερο μοριακό βάρος, και με την πάροδο του χρόνου καταλήγει όλη η ποσότητα του συμπλόκου να αποτελείται από μοριακές δομές αυτού του μοριακού βάρους. Ωστόσο στον μεγαλύτερης κλίμακας καθαρισμό που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της εργασίας,

ανακτήθηκε ακόμη ένας πληθυσμός μεγαλύτερου μοριακού βάρους ο οποίος δεν επαναλήφθηκε σε κανέναν άλλον καθαρισμό. Αυτό ίσως οφείλεται σε παράγοντες που έχουν να κάνουν με τη συγκέντρωση.

Σε μετρήσεις σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες υποβλήθηκαν οι πληθυσμοί που αναφέρονται παραπάνω. Οι μετρήσεις δεν απέδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα και συνεπώς οφείλουν να επαναληφθούν.

Η μορφή αυτή του συμπλόκου παρουσίασε πρόβλημα πρωτεόλυσης μετά το πέρας μερικών ημερών από την απομόνωσή του. Η πρωτεόλυση συνέβη στην πρωτεΐνη HrcQa^{-Nter}, με ειδικό τρόπο, ώστε να προκύπτει μια ελλειμματική μορφή της ~14 kDa. Η ελλειμματική αυτή μορφή της HrcQa όχι μόνο είναι ιδιαίτερα σταθερή αλλά διατηρεί την ικανότητα για αλληλεπίδραση με τη HrcQb προς σχηματισμό συμπλόκου. Η ταυτοποίηση της περιοχής αυτής πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας η οποία υπέδειξε την περιοχή των αμινοξέων 129-238 στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, επιβεβαιώνοντας προηγούμενα αποτελέσματα τα οποία ανέφεραν την καρβοξυτελική περιοχή της HrcQa ως αναγκαία και επαρκή για την αλληλεπίδραση με τη HrcQb. Βελτιστοποίηση του πρωτοκόλου απομόνωσης συνέβαλε ώστε το πρόβλημα σχεδόν να εξαλειφθεί.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον σημείο είναι η σταθεροποίηση της HrcQb παρουσία της HrcQa. Σε παλαιότερα πειράματα όπου η HrcQb απομονωνόταν απουσία της HrcQa, είχε παρουσιάσει ευαισθησία στην πρωτεόλυση με αποτέλεσμα τον κατακερματισμό της. Ο σχηματισμός συμπλόκου προστατεύει τη HrcQb η οποία παραμένει σταθερή ακόμη κι όταν χρησιμοποιείται το μη βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού.

Η κρυσταλλογραφική δομή της HrcQb-C (αλλά και η χρωματογραφία μοριακής διήθησης υποδεικνύουν μία διαμόρφωση η οποία αποτελείται από 4 υπομονάδες του μονομερούς της HrcQb-C. Η HrcQa, και βάσει της ομολογίας που παρουσιάζει με τη HrcQb σε περιοχή η οποία χαρακτηρίζεται ότι μπορεί να λάβει μέρος σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, πιθανόν να αντικαθιστά μία υπομονάδα της HrcQb στο τετραμερές οδηγώντας σε ένα σύμπλοκο σταθερότερο, και με στοιχειομετρία 1:3 όπως αυτή ακριβώς που έχει καταγραφεί για τις FliM-FliN *in vivo* (βλ. Κεφ.1). Εφόσον συμβαίνει κάτι τέτοιο, τότε αυτή η δομή αποτελεί την υπομονάδα η επανάληψη της οποίας οδηγεί στο σχηματισμό του κυτταροπλασματικού δακτυλίου.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η περίσσεια της HrcQa^{-Nter} ανακτάται σε ένα πρώιμο βήμα έκλουσης από την κλώνα Ni-NTA κατά τον καθαρισμό του συμπλόκου. Υφίσταται ισχυρότερη πρωτεόλυση από όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη HrcQb η οποία όμως δεν παρουσιάζεται όταν εφαρμόζεται το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού. Για τη HrcQa^{-Nter} προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος και η υδροδυναμική ακτίνα των δύο πληθυσμών που διαχωρίζονται κατά τη

χρωματογραφία μοριακής διήθησης και οι οποίοι αντιστοιχούν (βάσει θεωρητικών υπολογισμών) σε 10μερές και 5μερές με μεγαλύτερη αφθονία να παρουσιάζει ο πληθυσμός που αντιστοιχεί σε 10μερές. Ο πληθυσμός αυτός βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε πρώιμο στάδιο σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης οι οποίες έχουν υποδείξει το MPD ως πιθανό κατακρημιστή (δεν αναφέρεται στα αποτελέσματα καθώς έχουν γίνει πολύ περιορισμένοι έλεγχοι οι οποίοι φαίνεται πως αποδίδουν κρυσταλλικές δομές, όχι καλοσχηματισμένες).

Προσπάθειες απομόνωσης της His-TEV/HrcQa^{-Nter} απέτυχαν καθώς οι παράγοντες 6His και rTEV cleavage site, βρισκόμενοι στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης πιθανόν να εμποδίζουν τη σωστή αναδίπλωσή της κάνοντας τη να καταλήγει στα μη διαλυτά σωματίδια. Ένας δεύτερος λόγος για τον οποίο πιθανόν να μην είναι δυνατή η απομόνωσή της ως διαλυτό προϊόν είναι η μη κάλυψη κάποιων υδρόφοβων περιοχών οι οποίες ίσως να λαμβάνουν μέρος στην αλληλεπίδραση με τη HrcQb και έτσι όταν η HrcQa^{-Nter} εκφράζεται μόνη, να μην μπορούν αυτές οι περιοχές να προστατευτούν και να οδηγούν σε δημιουργία συσσωματωμάτων.

Μία ακόμη κατασκευή που επιχειρήθηκε κατέληξε στη μη λήψη του επιθυμητού προϊόντος. Αυτή ήταν η His-TEV/HrcQa-Nter-HrcQb η οποία έφερε το ακροφύσιο των ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της HrcQa^{-Nter}. Η μορφή αυτή δεν οδηγήθηκε στο σχηματισμό συμπλόκου, πιθανόν λόγω των παρεμποδιστικών παραγόντων στο αμινοτελικό άκρο της HrcQa^{-Nter}.

Ύστερα από τον εντοπισμό της σταθερής περιοχής της HrcQa, σχεδιάστηκαν μορφές του συμπλόκου οι οποίες έφεραν το σταθερό καρβοξυτελικό τμήμα της HrcQa, και είτε την πλήρους μήκους HrcQb είτε το σταθερό, συντηρημένο τμήμα της (HrcQb-C). Οι γονιδιακές αυτές κατασκευές έδωσαν είτε προϊόντα τα οποία ήταν αδύνατον να ταυτοποιηθούν για τους λόγους που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3, είτε δεν απέδωσαν καν προϊόντα. Σε κάθε περίπτωση μένει να διερευνηθούν περαιτέρω.

Μελλοντικά, τα σημεία τα οποία έχουν μείνει αδιευκρίνιστα στη μέχρι τώρα μελέτη οφείλουν να διευκρινιστούν. Συγκεκριμένα, πρέπει να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος των πληθυσμών που διαχωρίζονται για το σύμπλοκο από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Για να γίνει αυτό, πρέπει να βρεθεί πρώτα τρόπος να γίνει βαθμονόμηση της κολώνας S-400 και να συνδυαστεί με κάποια ακόμη μέθοδο όπως multi-angle light scattering.

Επίσης, για τον προσδιορισμό της στοιχειομετρίας η τεχνική της αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης δίνει ξεκάθαρα και ασφαλή αποτελέσματα και θεωρείται αναγκαία στην παρούσα φάση.

Μερικές ακόμη σκέψεις που έχουν να κάνουν με το ήδη υπάρχον σύμπλοκο είναι η σταθεροποίηση μέσω ομοιοπολικών δεσμών σε διαφορετικά στάδια της απομόνωσης και μέτρηση του μοριακού βάρους που αντιπροσωπεύει την κατάσταση στην οποία έχει 'παγώσει' το προϊόν.

Επίσης, η *in vitro* αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών (από καθαρισμένα-απομονωμένα προϊόντα) πρέπει να διερευνηθεί. Οι HrcQb και HrcQb-C έχουν επιτυχώς καθαριστεί στο παρελθόν και τα πρωτόκολα είναι διαθέσιμα, καθώς επίσης, απομόνωση της περίσσειας HrcQa^{Nter} προκύπτει από τον καθαρισμό του συμπλόκου HrcQa^{Nter}-HrcQb-His.

Επίσης, τα πειράματα SAXS πρέπει να επαναληφθούν και να γίνει προσεκτική ανάλυση των δεδομένων ώστε τα μοντέλα που θα προκύψουν να μπορούν να αποτελέσουν πρώτες ενδείξεις για το σχήμα του συμπλόκου στο διάλυμα.

Για την εφαρμογή όλων των παραπάνω, και δεδομένου ότι η ποσότητα του συμπλόκου που ανακτάται είναι κατά την απομόνωση είναι πολύ μικρή, απαιτείται να γίνουν δραστικά βήματα για τη βελτίωση της απόδοσης. Έτσι, πρέπει να γίνει είτε αλλαγή συστήματος κλωνοποίησης και έκφρασης, είτε αλλαγή θρεπτικού μέσου.

Εφόσον η ποσότητα του συμπλόκου το επιτρέπει, ο βασικότερος μελλοντικός στόχος είναι η σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης.

Όσον αφορά τις υπόλοιπες γονιδιακές κατασκευές που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι οποίες αποσκοπούν σε σταθερότερα προϊόντα (με τα σταθερά τμήματα των HrcQa και HrcQb), πρέπει να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα τους το συντομότερο και να ληφθούν προϊόντα όπου δεν έχουν ακόμη ληφθεί.

Κάτι που επιχειρήθηκε αλλά δεν επέτυχε ήταν η απομόνωση της HrcQa-Nter. Η κατασκευή έφερε ουρά ιστιδινών και rTEV cleavage site στο N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αυτό πιθανόν να εμπόδιζαν τη σωστή αναδίπλωσή της οδηγώντας τη στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Αυτό που πρέπει να γίνει άμεσα είναι να κλωνοποιηθεί η πρωτεΐνη στο φορέα pET26b(+) καθότι, όπως αναφέρθηκε, έχει βρεθεί η συνθήκη γύρω από την οποία η πρωτεΐνη πιθανόν κρυσταλλώνει.

Μία ακόμη φιλόδοξη ιδέα για το μέλλον είναι η έκφραση των πλήρους μήκους πρωτεϊνών μαζί, τα οποία όπως αναφέρθηκε στο κεφ. 3 δίνουν μη διαλυτό προϊόν. Με τη μέθοδο της απομόνωσης και κρυστάλλωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών με χρήση ήπιων απορρυπαντικών έχουν προσδιοριστεί αρκετές δομές, ανάμεσα τους αντλίες και κανάλια. Αυτό θα αποτελούσε μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση για το σύμπλοκο το οποίο πιθανόν διατηρεί επαφές με την εσωτερική μεμβράνη.

Τέλος, και εφόσον η δομή που σχηματίζει το σύμπλοκο φαίνεται να είναι μία μεγαλομοριακή δομή, δεν έχει αποκλειστεί η πιθανότητα μελέτης του με ηλεκτρονική μικροσκοπία αρνητικής χρώσης.

Όλα αυτά δεν κατέστη δυνατόν να γίνουν στα μικρά χρονικά πλαίσια της παρούσας εργασίας αλλά η ενασχόληση με το σύμπλοκο των πρωτεϊνών HrcQa-HrcQb συνεχίζεται στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Βιβλιογραφία

1. Aldridge, P. & Hughes, K. T. How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* 9, 209-14 (2001).
2. Agarwal R.C. & Isaacs N.W. Method for obtaining a high resolution protein map starting from a low resolution map. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 2835, (1977).
3. Alfano, J. R. & Collmer, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 179, 5655-62 (1997).
4. Anderson, D. M., Fouts, D. E., Collmer, A. & Schneewind, O. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12839-43 (1999).
5. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-33 (1997).
6. Berg, H. C. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem* 72, 19-54 (2003).
7. Blair, D. F. Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett* 545, 86-95 (2003).
8. Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3027-30 (2003).
9. Brown, P. N., Mathews, M. A., Joss, L. A., Hill, C. P. & Blair, D. F. Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* 187, 2890-902 (2005).

10. Buttner, D. & Bonas, U. Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J* 21, 5313-22 (2002).
11. Buttner, D. & Bonas, U. Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol* 10, 186-92 (2002).
12. Buttner, D. & Bonas, U. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 6, 312-9 (2003).
13. Chacón, P., F. Morán, J. F. Díaz, E. Pantos, and J. M. Andreu. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.* 74,2760, (1998).
14. Charkowski, A. O., Huang, H. C. & Collmer, A. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 179, 3866-74 (1997).
15. Charova S., master thesis, Univ. of Crete, (2004).
16. Collmer, A. et al. *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8770-7 (2000).
17. Cornelis, G. R. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 681-93 (2000).
18. Cornelis, G. R. The *Yersinia Ysc-Yop* 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 742-52 (2002).
19. Cornelis, G. R. & Van Gijsegem, F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* 54, 735-74 (2000).
20. Economou, A. Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 7, 315-20 (1999).
21. Fadouloglou, V. E. et al. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 70-5 (2004).
22. Fadouloglou V.E., PhD dissertation, Univ. Of Crete, (2004).
23. Francis, N. R., Irikura, V. M., Yamaguchi, S., DeRosier, D. J. & Macnab, R. M. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6304-8 (1992).
24. Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. & DeRosier, D. J. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J Mol Biol* 235, 1261-70 (1994).
25. Galan, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* 20, 263-71 (1996).
26. Gazi A.D., PhD dissertation, Univ. of Crete, (2007).
27. Gel Filtration, Principles & Methods, Amersham Biosciences Handbook.

28. Glatter O. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. *J. Appl. Cryst.* 10, 415, (1977).
29. Glatter O. *Small-Angle X-ray Scattering*, edited by O. Glatter & O. Kratky, pp. 119-196. London: Academic Press, (1982).
30. Gonzalez-Pedrajo, B., Minamino, T., Kihara, M. & Namba, K. Interactions between C ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol Microbiol* 60, 984-98 (2006).
31. Grunenfelder, B., Gehrig, S. & Jenal, U. Role of the cytoplasmic C terminus of the FliF motor protein in flagellar assembly and rotation. *J Bacteriol* 185, 1624-33 (2003).
32. He, S. Y. Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol* 5, 489-95 (1997).
33. Hienonen, E., Roine, E., Romantschuk, M. & Taira, S. mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*. *Mol Genet Genomics* 266, 973-8 (2002).
34. Hueck, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 379-433 (1998).
35. Irikura, V. M., Kihara, M., Yamaguchi, S., Sockett, H. & Macnab, R. M. *Salmonella typhimurium* fliG and fliN mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J Bacteriol* 175, 802-10 (1993).
36. Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. & He, S. Y. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Microbes Infect* 5, 301-10 (2003).
37. Jones, C. J., Macnab, R. M., Okino, H. & Aizawa, S. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 212, 377-87 (1990).
38. Khan, I. H., Reese, T. S. & Khan, S. The cytoplasmic component of the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5956-60 (1992).
39. Khan, S., Zhao, R. & Reese, T. S. Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings. *J Struct Biol* 122, 311-9 (1998).
40. Kihara, M., Miller, G. U. & Macnab, R. M. Deletion analysis of the flagellar switch protein FliG of *Salmonella*. *J Bacteriol* 182, 3022-8 (2000).
41. Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11008-13 (2000).
42. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J. & Svergun D.I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 36, 1277, (2003).
43. Konarev P.V., Petoukhov M.V., Volkov V.V. & Svergun D.I. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis *J. Appl. Cryst.* 39, 277, (2006).

44. Kozin & Svergun D.I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Cryst* 34, 33, (2000).
45. Kubori, T. et al. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* 280, 602-5 (1998).
46. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S. I. & Galan, J. E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10225-30 (2000).
47. Larsen, S. H., Adler, J., Gargus, J. J. & Hogg, R. W. Chemomechanical coupling without ATP: the source of energy for motility and chemotaxis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1239-43 (1974).
48. Lindgren, P. B., Peet, R. C. & Panopoulos, N. J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* 168, 512-22 (1986).
49. Lloyd, S. A. & Blair, D. F. Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 266, 733-44 (1997).
50. Lloyd, S. A., Tang, H., Wang, X., Billings, S. & Blair, D. F. Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not for FliM or FliN. *J Bacteriol* 178, 223-31 (1996).
51. Lloyd, S. A., Whitby, F. G., Blair, D. F. & Hill, C. P. Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* 400, 472-5 (1999).
52. Macnab, R. M. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57, 77-100 (2003).
53. Macnab, R. M. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* 1694, 207-17 (2004).
54. Magariyama, Y., Yamaguchi, S. & Aizawa, S. Genetic and behavioral analysis of flagellar switch mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172, 4359-69 (1990).
55. Marykwas, D. L. & Berg, H. C. A mutational analysis of the interaction between FliG and FliM, two components of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178, 1289-94 (1996).
56. Marykwas, D. L., Schmidt, S. A. & Berg, H. C. Interacting components of the flagellar motor of *Escherichia coli* revealed by the two-hybrid system in yeast. *J Mol Biol* 256, 564-76 (1996).
57. Mathews, M. A., Tang, H. L. & Blair, D. F. Domain analysis of the FliM protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 5580-90 (1998).
58. Minamino, T. & Namba, K. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7, 5-17 (2004).
59. Mudgett, M. B. et al. Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13324-9 (2000).

60. Oosawa, K., Ueno, T. & Aizawa, S. Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J Bacteriol* 176, 3683-91 (1994).
61. Park, S. Y., Lowder, B., Bilwes, A. M., Blair, D. F. & Crane, B. R. Structure of FliM provides insight into assembly of the switch complex in the bacterial flagella motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11886-91 (2006).
62. Paul, K. & Blair, D. F. Organization of FliN subunits in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 2502-11 (2006).
63. Plano, G. V., Barve, S. S. & Straley, S. C. LcrD, a membrane-bound regulator of the *Yersinia pestis* low-calcium response. *J Bacteriol* 173, 7293-303 (1991).
64. QiaExpressionist, Qiagen, (2003).
65. QiaExpress Detection & Assay Handbook, Qiagen, (2002).
66. Ramakrishnan, G., Zhao, J. L. & Newton, A. The cell cycle-regulated flagellar gene flbF of *Caulobacter crescentus* is homologous to a virulence locus (lcrD) of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* 173, 7283-92 (1991).
67. Rosqvist, R., Magnusson, K. E. & Wolf-Watz, H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia YopE* cytotoxin into mammalian cells. *Embo J* 13, 964-72 (1994).
68. Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. & Bonas, U. The *Xanthomonas Hrp* type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9368-73 (1999).
69. Sathasivan, "Molecular Biology Protocols", Univ. of Texas, (2001).
70. Scopes R., "Protein Purification", Principles & Practice, Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, (1984).
71. Semenyuk A.V. & Svergun D.I. GNOM - a program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Cryst.* 24, 537, (1991).
72. Sockett, H., Yamaguchi, S., Kihara, M., Irikura, V. M. & Macnab, R. M. Molecular analysis of the flagellar switch protein FliM of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 174, 793-806 (1992).
73. Sosinsky, G. E. et al. Mass determination and estimation of subunit stoichiometry of the bacterial hook-basal body flagellar complex of *Salmonella typhimurium* by scanning transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4801-5 (1992).
74. Suzuki, H., Yonekura, K. & Namba, K. Structure of the rotor of the bacterial flagellar motor revealed by electron cryomicroscopy and single-particle image analysis. *J Mol Biol* 337, 105-13 (2004).
75. Svergun D.I. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria *J Appl Cryst.* 25, 495, (1992).

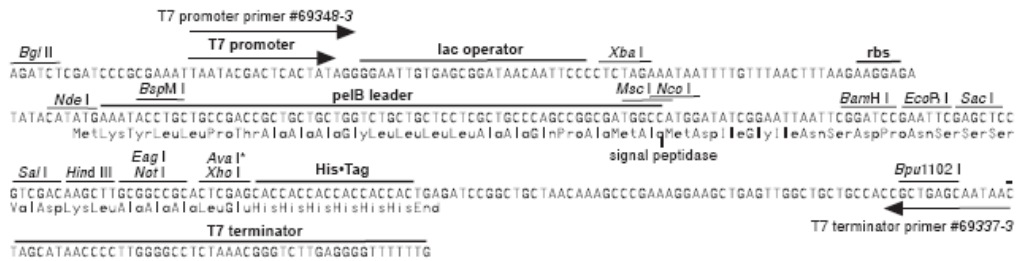
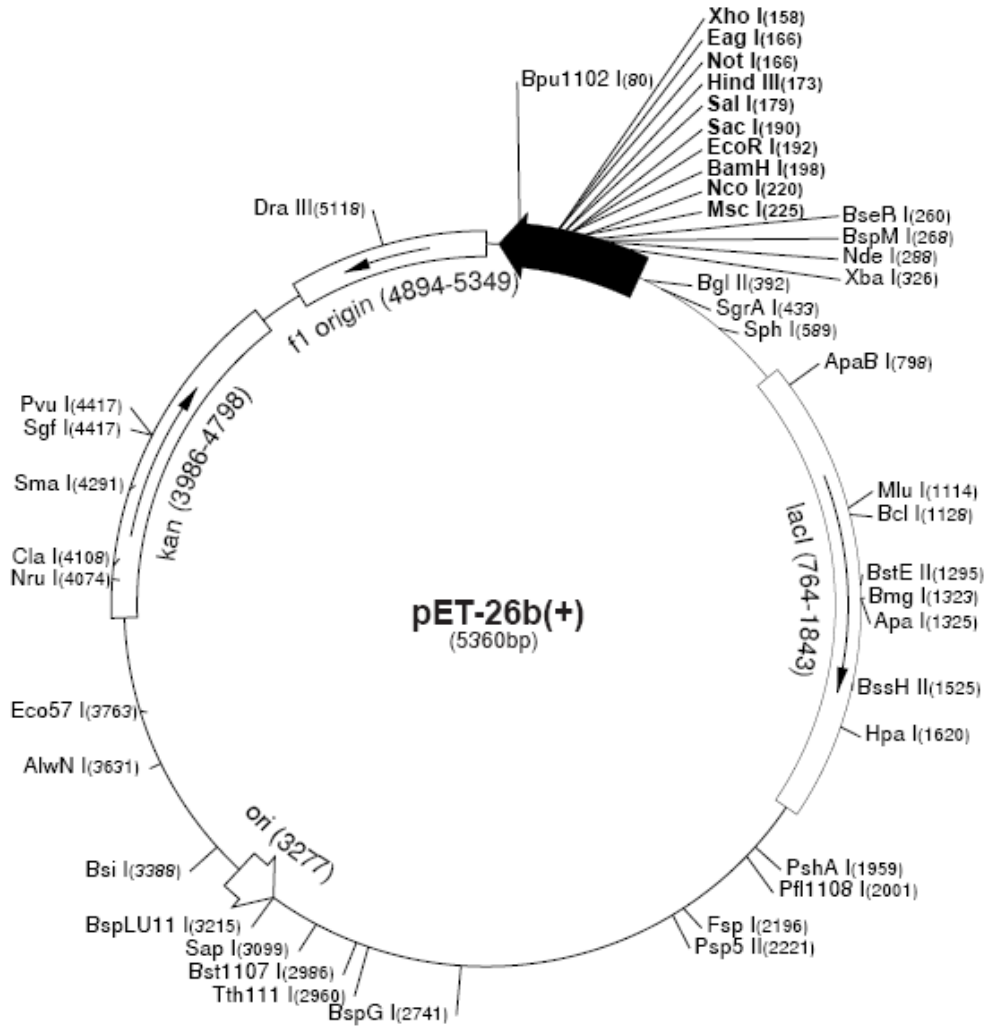
76. Svergun. D.I & Koch M.H. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep.Prog.Phys.* 66:1735-1782, (2003).
77. Svergun D.I. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing *Biophys J.* 76, 2879, (1999).
78. Svergun D.I. A direct indirect method of small-angle scattering data treatment. *J Appl. Cryst* 26, 258, (1993).
79. Tamano, K. et al. Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* 19, 3876-87 (2000).
80. Tampakaki, A. P., Fadoulglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. & Kokkinidis, M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* 6, 805-16 (2004).
81. Tang, H., Billings, S., Wang, X., Sharp, L. & Blair, D. F. Regulated underexpression and overexpression of the FliN protein of Escherichia coli and evidence for an interaction between FliN and FliM in the flagellar motor. *J Bacteriol* 177, 3496-503 (1995).
82. Tang, H. & Blair, D. F. Regulated underexpression of the FliM protein of Escherichia coli and evidence for a location in the flagellar motor distinct from the MotA/MotB torque generators. *J Bacteriol* 177, 3485-95 (1995).
83. Tang, H., Braun, T. F. & Blair, D. F. Motility protein complexes in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol* 261, 209-21 (1996).
84. Thomas, D., Morgan, D. G. & DeRosier, D. J. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J Bacteriol* 183, 6404-12 (2001).
85. Thomas, D. R., Francis, N. R., Xu, C. & DeRosier, D. J. The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 188, 7039-48 (2006).
86. Thomas, D. R., Morgan, D. G. & DeRosier, D. J. Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotary motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10134-9 (1999).
87. van Dijk, K. et al. The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from Pseudomonas syringae pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J Bacteriol* 181, 4790-7 (1999).
88. Vogler, A. P., Homma, M., Irikura, V. M. & Macnab, R. M. Salmonella typhimurium mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to Fof1, vacuolar, and archaeobacterial ATPase subunits. *J Bacteriol* 173, 3564-72 (1991).
89. Wei, W. et al. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in Pseudomonas syringae pv. tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2247-52 (2000).
90. Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S. & Eisenbach, M. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8787-91 (1993).

91. Winstanley, C. & Hart, C. A. Type III secretion systems and pathogenicity islands. *J Med Microbiol* 50, 116-26 (2001).
92. Yamaguchi, S. et al. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 168, 1172-9 (1986).
93. Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S. & Macnab, R. M. Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation, and switching. *J Bacteriol* 166, 187-93 (1986).
94. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* 424, 643-50 (2003).
95. Young, H. S., Dang, H., Lai, Y., DeRosier, D. J. & Khan, S. Variable symmetry in *Salmonella typhimurium* flagellar motors. *Biophys J* 84, 571-7 (2003).
96. Zhao, R., Amsler, C. D., Matsumura, P. & Khan, S. FliG and FliM distribution in the *Salmonella typhimurium* cell and flagellar basal bodies. *J Bacteriol* 178, 258-65 (1996).
97. Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T. S. & Khan, S. FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J Mol Biol* 261, 195-208 (1996).

Παράρτημα Α

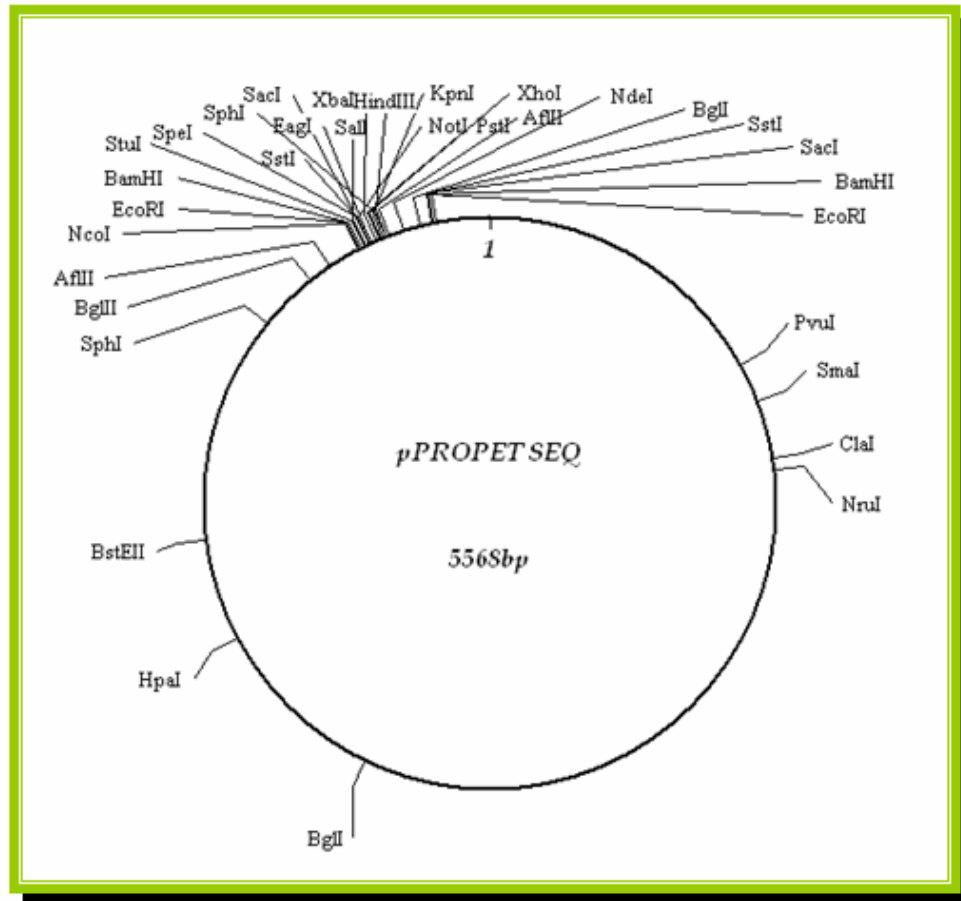
Στο παρόν παράρτημα παρατίθενται οι χάρτες των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία καθώς και οι περιοχές κλωνοποίησης-έκφρασης.

I) pET26b(+) [Novagen]



pET-26b(+) cloning/expression region

II) pPROpET [Plant Biotechnology Lab, Univ. of Crete]



```

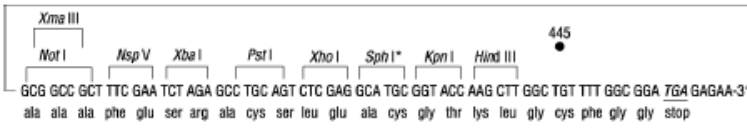
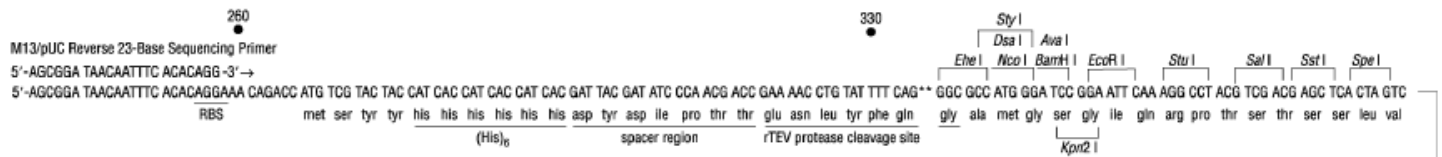
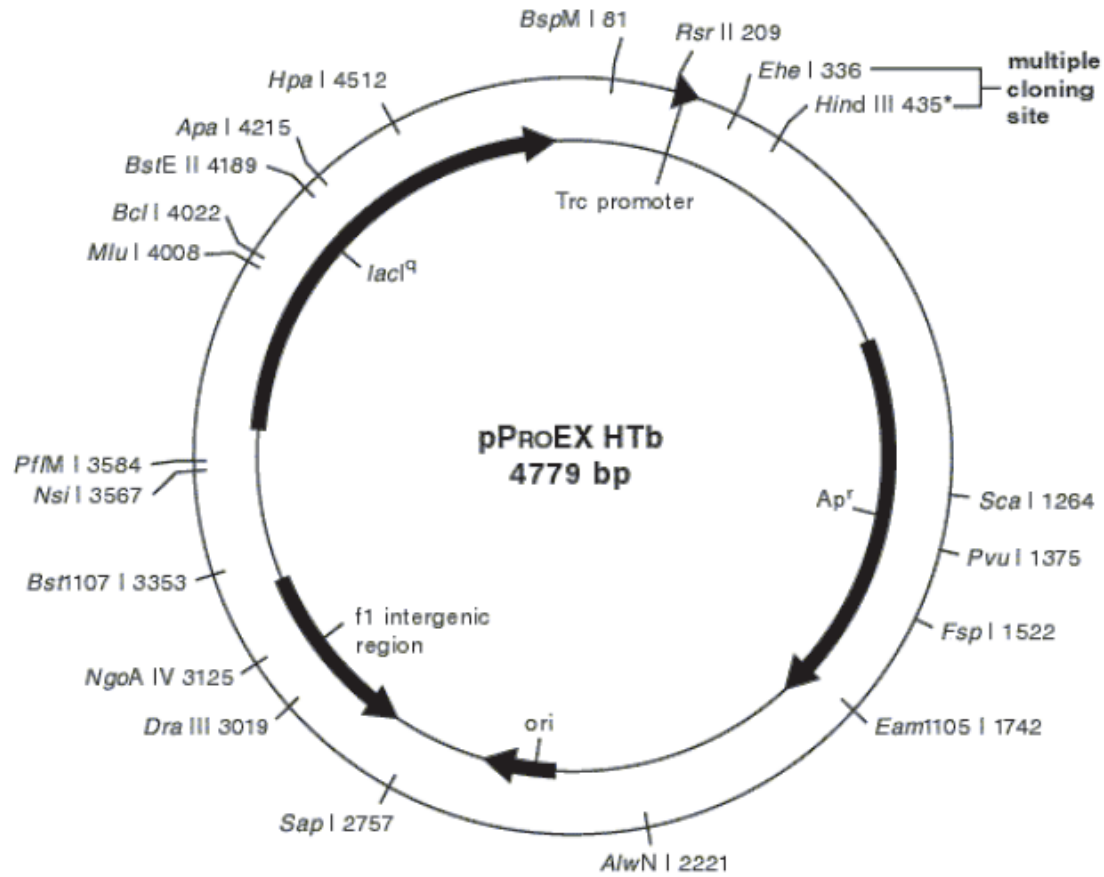
    AflIII        Rbs1                                rTEV cleavage site
CAATTCCCCTC TAGGCC CTTAAGCAATTTCACAA AGGAGACAGACC ATGTCGTACTAC CATCACCATCCCATCACGATTACGATATCCCAACGACC AAAAAACTGTAATTTCAA GGCGCC
Met Ser Tyr Tyr His His His His His Asp Tyr Asp Ile Pro Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala

NcoI        EcoRI        StuI        Sall        SstI        SpeI        NotI        XbaI        PstI        XhoI        SphI        KpnI        HindIII        AflIII
ATCGATCC CGGAATTCCAAA AGCCTACGTCC AGCAGCTCAA ACTAGTCCCGCCGCTTTTCGAAT CTAGAGCCTGCACTCTCGAGCCATGC CGTACCAA AGCTTGGCT CTTAAGCCGCTAGAAATA
BamHI

    Rbs2        NdeI
ATTTTGTTAACTTTAAG AGGAGATATA CATAATCAAAATACCTGC TCCGACCCTGC TGCTGGTCTGCTGC TCTCCTGCTGCC CCGCCAGCCGGCGATGCC CATGGATATCGGAATTAATT CGG
Met

BamHI EcoRI SstI
ATCCGAATTCGAGCTCCGTCCGATCGAG CACCCACC CCACCACCTTCAGATCCGGCTGCTAACAAAAGCCCGAAAGGAGCTGAG
His His His His His His His stop
    
```

III) pPROEX-HTb [Invitrogen]



*Sph I has 2 recognition sites in pPROEX HT.