

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μοριακή ανάλυση του μηχανισμού έκκρισης Τύπου ΙΙΙ στο
εντεροπαθογόνο *E.coli* (EPEC)**



Χρονάκη Δήμητρα

Υπεύθυνος καθηγητής

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2012

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον κύριο Αναστάσιο Οικονόμου ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να εργασθώ στο εργαστήριο του και μου χάρισε το εισιτήριο για τον υπέροχο κόσμο των πρωτεϊνών.

Έπειτα, χρωστάω ευγνωμοσύνη στην Αθηνά Πορτάλιου για την υπομονή της, την συνεχή υποστήριξη της και την απλόχερη παροχή γνώσεων. Ακόμη, ευχαριστώ τον Μιχάλη Αϊβαλιώτη και τον Νίκο Κουντουράκη για την εκμάθηση των τεχνικών της φασματομετρίας μάζας. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου που με υποστήριξαν και με βοήθησαν να αντιμετωπίσω τα καθημερινά εργαστηριακά προβλήματα.

Δεν θα βρισκόμουν εδώ αν δεν με βοηθούσαν η οικογένεια μου και οι φίλοι μου. Θα ήθελα να αφιερώσω την παρούσα εργασία στην μητέρα μου που δεν έπαψε στιγμή να με φροντίζει.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Εισαγωγή

- 1.1 Σκοπός διατριβής
- 1.2 Το εντεροπαθογόνο E.coli
- 1.3 Το σύστημα έκκρισης Τύπου III
- 1.4 Ο γενετικός τόπος εξάλειψης των εντεροκυττάρων
- 1.5 E.coli secreted proteins
- 1.6 Η σαπερόνη CesAB

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Αποτελέσματα

- 2.1) Καθαρισμός συμπλόκου CesAB-EspA
- 2.2) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την EspA
- 2.3) Καθαρισμός της HisMBPTEVEscN
- 2.4) Καθαρισμός πρωτεϊνών σε εγγενείς συνθήκες
- 2.5) Ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρήση αντισωμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Υλικά και μέθοδοι

- 4.1) Τεχνικές μοριακής βιολογίας
 - 4.1.1) Απομόνωση πλασμιδιακού DNA
 - 4.1.2) Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων
 - 4.1.3) Καθαρισμός αντισωμάτων έναντι διαλυτών πρωτεϊνών του T3SS
- 4.2) Θρεπτικά υλικά
 - 4.2.1) DMEM
 - 4.2.2) Luria Bertani
- 4.3) Διαχωρισμός πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων
 - 4.3.1) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
 - 4.3.2) Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
- 4.4) Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
 - 4.4.1) Χρώση Coomassie Blue
 - 4.4.2) Χρώση Blue Silver
 - 4.4.3) Χρώση με Νιτρικό Άργυρο

- 4.4.4) Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με αντισώματα
- 4.5) Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών
 - 4.5.1) Ο πλασμιδιακός φορέας pET
 - 4.5.2) Ο πλασμιδιακός φορέας pASK-IBA
 - 4.5.3) Καθαρισμός His-πρωτεϊνών σε Ni-NTA χρωματογραφία συγγένειας
 - 4.5.3.1) Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρήση αλατιού
 - 4.5.3.2) Καθαρισμός πρωτεϊνών σε εγγενείς συνθήκες
 - 4.5.4) Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής
 - 4.5.5) Απομόνωση πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τρυψινόλυση

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1) Σκοπός διατριβής

Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC) είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο το οποίο μολύνει το εντερικό επιθήλιο και του προκαλεί σοβαρές βλάβες. Το EPEC χρησιμοποιεί το εκκριτικό σύστημα Τύπου III (T3SS) για να εισάγει τοξίνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Η πολύπλοκη πρωτεϊνική μηχανή του T3SS αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το βασικό σωμάτιο, μια δομή βελόνης και τον πόρο μετατόπισης. Οι τοξίνες περνάνε από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα διαμέσου του T3SS και εκκρίνονται μέσα στον ξενιστή. Περισσότερες από είκοσι διαφορετικές πρωτεΐνες εμπλέκονται στον μηχανισμό έκκρισης του T3SS.

Στην παρούσα εργασία, προσπαθούμε να κατανοήσουμε το μονοπάτι έκκρισης των δραστικών πρωτεϊνών του T3SS, τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και τις αλληλεπιδράσεις σαπερονών με τα υποστρώματα τους.

Αρχικά, μελετήσαμε τον τρόπο που μια σαπερόνη αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα της, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την σαπερόνη CesAB και τον μεταθέτη EspA. Συγκεκριμένες δομικές αλλαγές σε μεταλλαγμένες μορφές της σαπερόνης επηρεάζουν την συγγένεια της για το υπόστρωμα.

Έπειτα, θέλοντας να μελετήσουμε τι συμβαίνει στο μονοπάτι έκκρισης της EspA πριν εξέλθει από το βακτήριο, απομονώσαμε μεγαλομοριακά σύμπλοκα του κυτταροπλάσματος. Τα σύμπλοκα αυτά αναλύονται με φασματομετρία μάζας και μας αποκαλύπτουν τους παράγοντες που τα αποτελούν.

Ακόμη, προσπαθούμε να συγκρίνουμε τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την σαπερόνη CesAB, σε σύγκριση με αυτές που αλληλεπιδρούν με την EspA μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου. Η σύγκριση αυτή επιτυγχάνεται με φασματομετρία μάζας. Τέλος, προσπαθούμε να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες σε σύμπλοκα του κυτταροπλάσματος, με χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή τη μελέτη ίσως βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση του μονοπατιού έκκρισης του T3SS.

1.2) Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC)

Το εντεροπαθογόνο βακτήριο *E. coli* (EPEC) μολύνει τον άνθρωπο και συνδέεται με την βρεφική διάρροια στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Αποτελεί την πρωταρχική αιτία ασθένειας νεογνών που είναι νεότερα των δυο ετών. Το παθογόνο έχει εξαιρετικό υγειονομικό ενδιαφέρον και γι' αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η κατανόηση της βάσης των παθογενετικών χαρακτηριστικών του. Το EPEC έχει την ικανότητα να επάγει τη χαρακτηριστική Attaching and Effacing Lesion, που μπορεί να παρατηρηθεί σε βιοψία εντέρου από δείγμα ασθενών ή προσβεβλημένων ζώων. Ο σχηματισμός της A/E κάκωσης είναι απαραίτητος για την πλήρη παθογένεια του EPEC και πραγματοποιείται σε τρία διακριτά βήματα. Αρχικά, το βακτήριο προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο. Έπειτα, προκαλεί μεταγωγή σήματος και μεταφορά πρωτεϊνών στον ξενιστή. Τέλος, συνδέεται στενά με το επιθήλιο και το εποικίζει. Το αποτέλεσμα της προσκόλλησης είναι η εξάλειψη του επιθηλίου και η τεράστια κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση. Μέσα στον ξενιστή συσσωρεύεται πολυμερισμένη F-ακτίνη, α-ακτινίνη και ταλίνη [3]. Η εκμετάλλευση των στοιχείων του κυτταροσκελετού του επιθηλίου του επιτρέπουν να προσβάλλει τον ξενιστή-στόχο. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί διάφορους βακτηριακούς παράγοντες όπως εκκρινόμενες πρωτεΐνες (Esp), το Εκκριτικό σύστημα Τύπου III (T3SS) και την πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (intimin) [2]. Το T3SS είναι ένα εξειδικευμένο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, απαραίτητο για την μεταφορά σημαντικών πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα απευθείας στον ξενιστή.

1.3) Το σύστημα έκκρισης Τύπου ΙΙΙ (T3SS)

Πολλά αρνητικά κατά Gram βακτηριακά παθογόνα, μοιράζονται την αξιοσημείωτη ικανότητα να εισάγουν μολυσματικούς παράγοντες απευθείας μέσα σε ευκαρυωτικά κύτταρα ξενιστές. Αυτές οι πρωτεΐνες (effectors) με τη σειρά τους, αλλάζουν κυτταρικές διαδικασίες του ευκαρυώτη με ποικίλους τρόπους και καθιστούν το παθογόνο ικανό να ρυθμίσει το περιβάλλον του ξενιστή, κάνοντας τον ευάλωτο στην εισβολή και μόλυνση. Το συστατικό-κλειδί που μεσολαβεί στην έκκριση των βακτηριακών παραγόντων μόλυνσης, μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, είναι το Type ΙΙΙ Secretion System (T3SS). Το σύστημα αυτό έχει βρεθεί σε πολλούς αρνητικούς κατά Gram οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella*, *EPEC* και είναι απαραίτητο για την μολυσματικότητά τους [4].

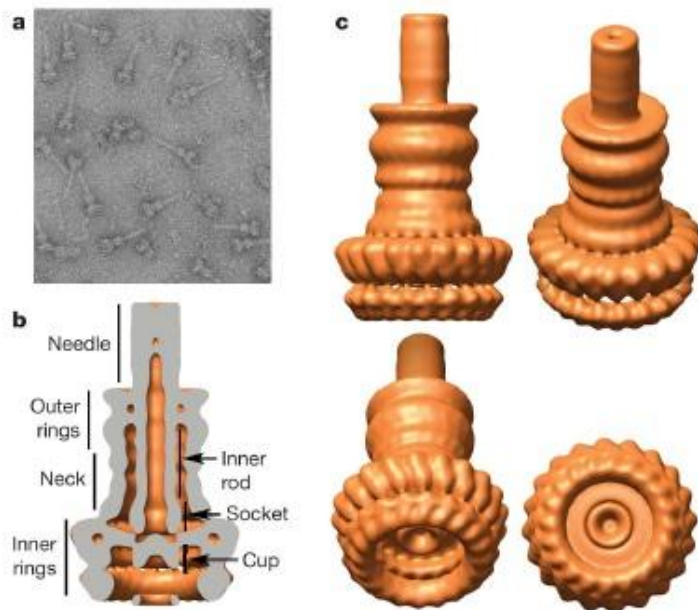
Το T3SS είναι μια δομικά και λειτουργικά συντηρημένη πολύπλοκη μεγαλομοριακή μηχανή, αποτελούμενη από περισσότερες των είκοσι διαφορετικών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες εμπλέκονται στην κατασκευή ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου που τρυπά την εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, τον περιπλασμικό χώρο, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης, την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, τον εξωκυττάριο χώρο και την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Αυτή η πρωτεϊνική κατασκευή συνιστά ένα ρυθμιζόμενο, συνεχόμενο μονοπάτι για τις effector πρωτεΐνες, από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα ως το εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή.

Το σύμπλοκο βελόνης

Το σύμπλοκο βελόνης είναι ένα κεντρικό κανάλι που επιτρέπει το πέρασμα ξεδίπλωτων πρωτεϊνών με ένα βήμα, από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα ως τον ξενιστή. Η χρήση της μεθόδου cryo- electron microscopy (cryo-EM), Marlovits *et al.*, παρείχε εξαιρετικές πληροφορίες για την αρχιτεκτονική του T3SS. Το σύμπλοκο βελόνης αποτελείται από ένα κυλινδρικό βασικό σωματίο και μια εκτεταμένη κούφια δομή που μοιάζει με βελόνα και ενσωματώνεται στη βάση κατά τον σχηματισμό όλου του συμπλόκου.

Το βασικό σωματίο

Το βασικό σωματίο του T3SS αποτελείται από τρία διακριτά τμήματα: α) το τμήμα της εσωτερικής μεμβράνης, β) το τμήμα της εξωτερικής μεμβράνης και γ) τα εξωκυττάρια συστατικά.



Εικόνα 1. Το σύμπλοκο βελόνης στο βακτήριο *Salmonella typhimurium*. α) Ηλεκτρονικές μικρογραφίες αρνητικά χρωματισμένων απομονωμένων συμπλόκων βελόνης. β) Διατομή δομής συμπλόκου βελόνης που υποδεικνύει τη θέση των διαφορετικών υπομονάδων του. γ) Επιφανειακή απόδοση της δομής του συμπλόκου βελόνης [5].

Οι μεμβρανικοί δακτύλιοι που τρυπούν την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του EPEC, αποτελούνται από τρεις πρωτεΐνες : την EscC, την EscD και την EscJ. Τα εξωκυττάρια χαρακτηριστικά που απαρτίζουν το βασικό σωματίο είναι: η βελόνη που είναι ένα ελικοειδές πολυμερές, κατασκευασμένο από εκατοντάδες υπομονάδες της πρωτεΐνης EspA και ο πόρος μετατόπισης όπου οι πρωτεΐνες EspB και EspD έτερο-ολιγομερίζονται για να δημιουργήσουν ένα κανάλι στην μεμβράνη του ξενιστή.

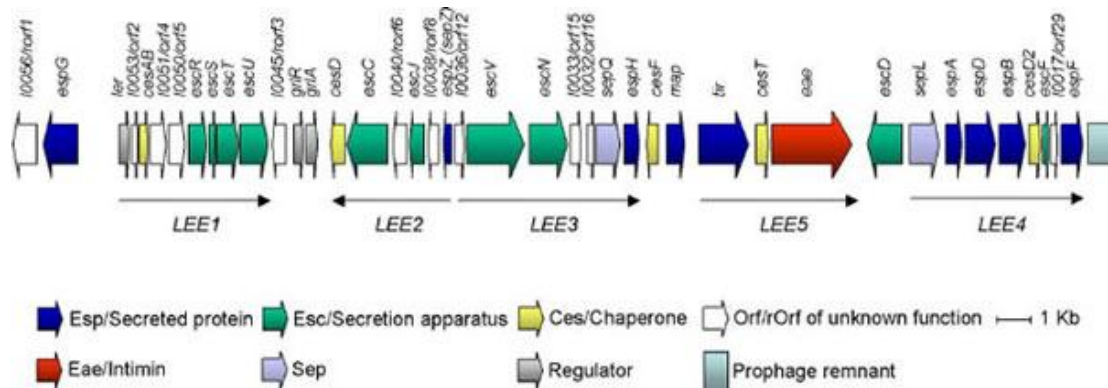
Η δομή συμπλόκου βελόνης διασχίζεται από ένα κανάλι διαμέτρου $\sim 28\text{\AA}$, που λειτουργεί ως αγωγός για πρωτεΐνες που μεταφέρονται με αυτό το μονοπάτι έκκρισης [5].

1.4) Ο γενετικός τόπος εξάλειψης των εντεροκυττάρων (Locus of Enterocyte Effacement)

Ο γενετικός τόπος εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE) είναι μια νησίδα παθογένειας που βρίσκεται στο γονιδίωμα του EPEC και κωδικοποιεί τη μοριακή μηχανή του EPEC που είναι απαραίτητη για την A/E κάκωση των επιθηλιακών κυττάρων. Η περιοχή LEE έχει μήκος 35kb και η αλληλούχηση της αποκάλυψε ότι έχει περιεχόμενο G+C ίσο με 38.4%, δηλαδή μικρότερο από το 50.8% που βρίσκεται μεταξύ του χρωμοσώματος της *E.coli* [2]. Το γεγονός αυτό, προτείνει ότι η νησίδα LEE έχει προκύψει από οριζόντια μεταφορά γονιδίων παθογένειας από άλλο είδος [1].

Τα γονίδια LEE χωρίζονται σε τρεις λειτουργικές επικράτειες [1,2]. Η ενδιάμεση επικράτεια περιέχει τα γονίδια *eae* που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Tir και intimin. Τα προϊόντα αυτής της επικράτειας εμπλέκονται στη στενή προσκόλληση του EPEC στο επιθηλιακό κύτταρο. Ανοδικά των *eae* γονιδίων, βρίσκεται η επικράτεια που κωδικοποιεί το εκκριτικό σύστημα Τύπου III (Elliott *et al.*, 1998). Εννέα από αυτά τα γονίδια είναι ομόλογα με *ycs* γονίδια, που κωδικοποιούν τα συστατικά του T3SS στα *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* και άλλα παθογόνα. Καθοδικά των *eae* γονιδίων βρίσκεται η επικράτεια που κωδικοποιεί αρκετές από τις πρωτεΐνες (Esp) που εκκρίνονται μέσω του T3SS και τις πιθανές σαπερόνες τους. Ορισμένες από αυτές τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται είναι οι EspA, EspB, EspD, EspF και η σαπερόνη CesD που βοηθά την έκκριση της EspD και την ολοκληρωμένη μεταφορά της EspB έξω από το κύτταρο.

Η νησίδα παθογένειας LEE περιέχει 41 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που το καθένα κωδικοποιεί το λιγότερο 50 αμινοξέα [1]. Μια τυπική T3S συσκευή περιέχει περίπου 20 πρωτεΐνες, από τις οποίες τουλάχιστον 13 παράγονται από τον τόπο LEE. Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από αυτό το σύστημα δεν τροποποιούνται στο αμινοτελικό άκρο τους κατά την έκκριση και δεν περιέχουν κάποιο συντηρημένο σήμα. Προτείνεται ότι το σήμα έκκρισης βρίσκεται στην 5' περιοχή του mRNA που τις κωδικοποιεί. Ο τόπος LEE περιγράφηκε πρώτη φορά στο EPEC από τον McDaniel *et al.* (1995) και βρίσκεται σε διάφορα παθογόνα όπως EHEC, *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium*.



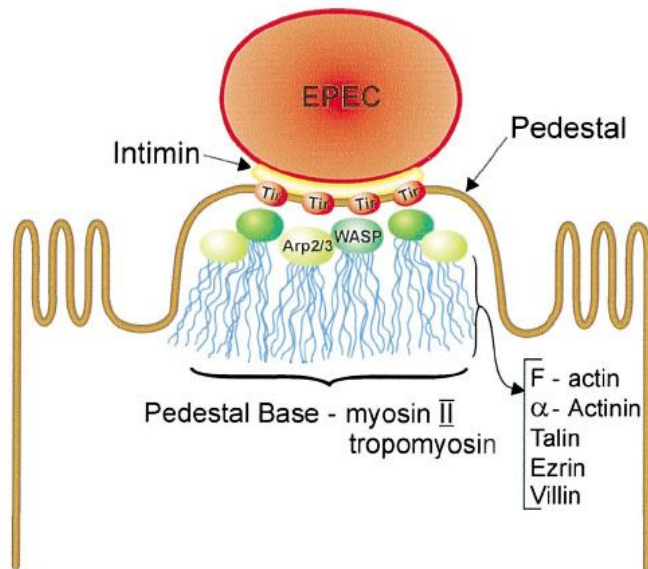
Εικόνα 2. Ο γενετικός τόπος εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE).

1.5) E.coli secreted proteins (EspS)

Ο γενετικός τόπος LEE κωδικοποιεί μια T3S συσκευή η οποία έχει ως ρόλο να εκκρίνει τις πρωτεΐνες EspS και παράγοντες απαραίτητους για στενή προσκόλληση στο κύτταρο του ξενιστή (Tir, intimin). Αρχικά, εκκρίνονται οι μεταθέτες EspA, EspB, EspD, που είναι πρωτεΐνες απαραίτητες για την ολοκλήρωση της δομής βελόνης. Ο μεταθέτης EspA οδηγείται στην μεμβράνη με την βοήθεια της σαπερόνης της CesAB, που την παγιδώνει σε μονομερή μορφή. Στο άκρο της πρωτεΐνης EscF, η EspA πολυμερίζεται δημιουργώντας εκτεταμένη ινώδη βελόνη που στο εσωτερικό είναι κενή. Αυτό οδηγεί σε έκκριση των μεταθετών EspB, EspD διαμέσου της βελόνης απευθείας στη μεμβράνη του επιθηλιακού κυττάρου. Εκεί δημιουργείται ο πόρος μετατόπισης από τον ολιγομερισμό των μεταθετών. Το βακτήριο είναι έτοιμο να εισάγει τις effector πρωτεΐνες μέσα στον ξενιστή.

Για τη δημιουργία A/E κάκωσης είναι απαραίτητη η έκφραση της ιντιμίνης. Η ιντιμίνη είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 94kDa που εισάγεται στην εξωτερική μεμβράνη του EPEC [6]. Ο υποδοχέας της ιντιμίνης, η Tir (Translocated intimin receptor) εκκρίνεται μέσα στον ξενιστή. Η Tir έχει δυο κύριους ρόλους: α) την πρόσδεση της ιντιμίνης και β) την μεταγωγή σήματος. Όταν η Tir προσδέσει την ιντιμίνη, επάγεται δραματική κυτταροσκελετική αναδιάταξη μέσα στον ξενιστή και σχηματίζονται προεκβολές πλούσιες σε ακτίνη κάτω από το προσκολλημένο EPEC. Αυτές οι προεκβολές κινούνται ως και 10μm πάνω από την επιφάνεια του επιθηλίου σχηματίζοντας ένα βάθρο πάνω στο οποίο έχει προσδεθεί το βακτήριο. Στο σημείο της πολυμερισμένης ακτίνης επιστρατεύονται και άλλοι παράγοντες όπως η α-

ακτινίνη, η εζρίνη, η ταλλίνη, η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης και η βιλίνη [6]. Έπειτα, η Tir φωσφορυλιώνεται σε δυο κατάλοιπα σερίνης από μια κινάση A, ενσωματώνεται στην μεμβράνη του ξενιστή και διμερίζεται. Ως διμερές είναι ενεργός υποδοχέας ιντιμίνης. Τα δυο μόρια Tir έρχονται σε επίπεδο παράλληλο με το επίπεδο της μεμβράνης του βακτηρίου και του ξενιστή, και η σύνδεση επιφέρει την πολύ στενή επαφή βακτηρίου με ξενιστή.

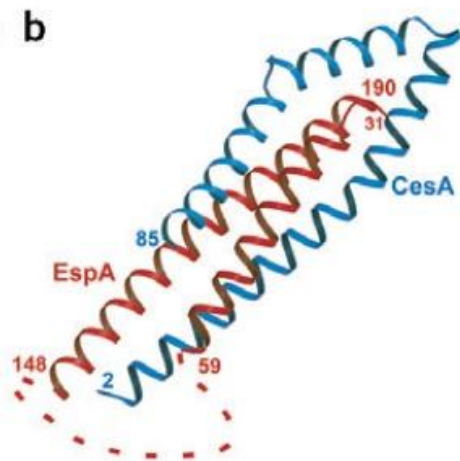


Εικόνα 3. Η προεκβολή της μεμβράνης του ξενιστή κατά την επίθεση του EPEC.

1.6) Η σαπερόνη CesAB

Οι σαπερόνες στο T3SS μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως μικρό μοριακό βάρος (<15kDa), όξινο ισοηλεκτρικό σημείο και μια αμφιπαθή έλικα κοντά στο κάρβοξυ-τελικό άκρο τους (Bernier et al., 1994). Η πρωτεΐνη CēsAB δρα ως σαπερόνη για τους μεταθέτες EspA και EspB, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην έκκριση τους έξω από το βακτήριο. Σε αντίθεση με τις τυπικές σαπερόνες, η CēsAB είναι ένα χαλαρά πακεταρισμένο ομοδιμερές όταν βρεθεί σε διάλυμα. Αποκτά μια αυτορυθμιζόμενη διαμόρφωση για να μην κάνει συσσωματώματα με τον εαυτό της και ανταλλάσει υπομονάδες για να δημιουργήσει σύμπλοκο με την EspA [8]. Επειδή,

η EspA έχει την τάση να ολιγομερίζεται για να δημιουργεί ινίδια, είναι απαραίτητο η CesAB να την παγιδεύσει σε μονομερή μορφή στο κυτταρόπλασμα. Η κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου CesaB-EspA έχει λυθεί και αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση των δυο μονομερών.



Εικόνα 4. Η δομή της CesaB σε σύμπλοκο με την EspA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Αποτελέσματα

2.1) Καθαρισμός συμπλόκου CesAB-EspA

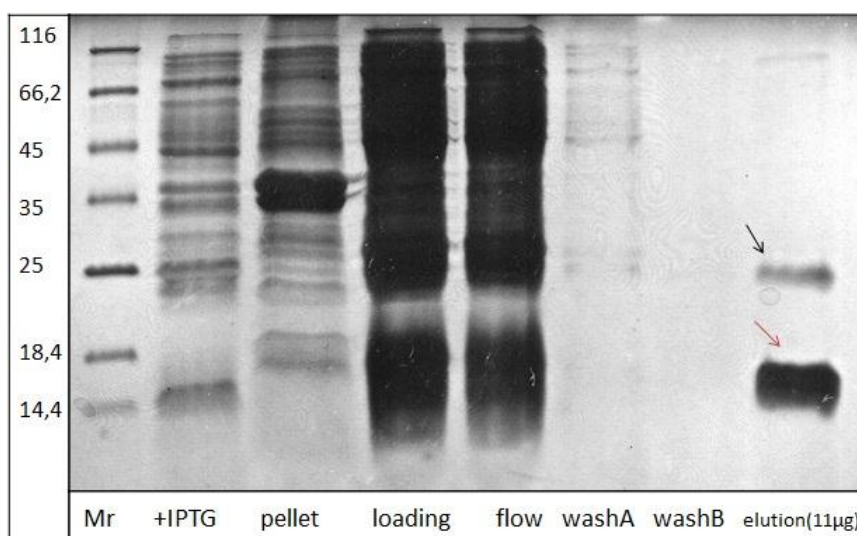
Η σαπερόνη CesAB είναι ένα ομοδιμερές το οποίο υφίσταται ανταλλαγή υπομονάδων για να αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά του την EspA. Η δομή του συμπλόκου CesAB-EspA έχει λυθεί με κρυσταλλογραφία και NMR, που αποκαλύπτουν ότι σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο σε στοιχειομετρία 1:1. Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλαγές δημιουργούνται στην CesAB και την EspA, οι οποίες επηρεάζουν τη δομή του ετεροδιμερούς και την έκκριση της EspA.

Στο μόριο της CesAB έγινε υποκατάσταση της Leu προς Glu στη θέση 20 (E20L), η οποία συνεισφέρει στην σταθεροποίηση της διπλωμένης διαμόρφωσης της σαπερόνης και την μειωμένη συγγένειά της για το υπόστρωμα. Η διπλή υποκατάσταση της Leu προς Glu στις θέσεις 20 και 30 (E20L/E30L) στην CesAB, προκαλεί αξιοσημείωτη σταθερότητα στο ομοδιμερές της σαπερόνης και την πολύ ασθενή πρόσδεση της EspA. Στο μόριο της EspA γίνονται οι υποκαταστάσεις Arg προς Leu στη θέση 174 (R174L) και Gln προς Leu στη θέση 181 (Q181L), οι οποίες αποτρέπουν την EspA από το να σχηματίσει κατάλληλες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη CesAB [8].

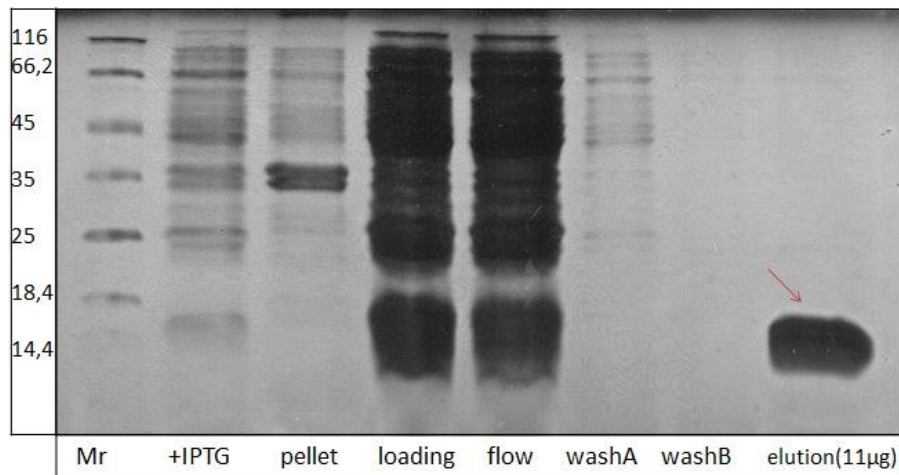
Προκειμένου να απομονώσουμε τα σύμπλοκα CesAB-EspA *in vitro*, μετασχηματίζουμε επιλεκτικά βακτήρια με τα αντίστοιχα πλασμίδια και προχωρούμε σε καλλιέργειες μεγάλου όγκου. Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών θα πραγματοποιηθεί με χρωματογραφία συγγένειας σε εγγενείς συνθήκες. Η πιστοποίηση του καθαρισμού της CesAB-EspA γίνεται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

Οι εικόνες των καθαρισμών των συμπλόκων επιβεβαιώνουν τις παραπάνω παρατηρήσεις. Κατά τον καθαρισμό του συμπλόκου HisCesAB (E20L) –EspA (Εικόνα 1) παρατηρούμε μειωμένη ποσότητα EspA συγκριτικά με την CesAB, λόγω της σταθερής διαμόρφωσης της CesAB. Στον καθαρισμό του συμπλόκου HisCesAB E20L/E30L- EspA (Εικόνα 2) δεν ανιχνεύουμε την EspA, λόγω της μη αλληλεπίδρασής της με την CesAB. Τέλος, μειωμένη ποσότητα της EspA έχουμε κατά τον καθαρισμό των συμπλόκων HisCesAB- EspA (R174A) (Εικόνα 3) και HisCesAB- EspA (R174A/Q181L) (Εικόνα 4), λόγω μη επιθυμητών αλληλεπιδράσεων στο ετεροδιμερές.

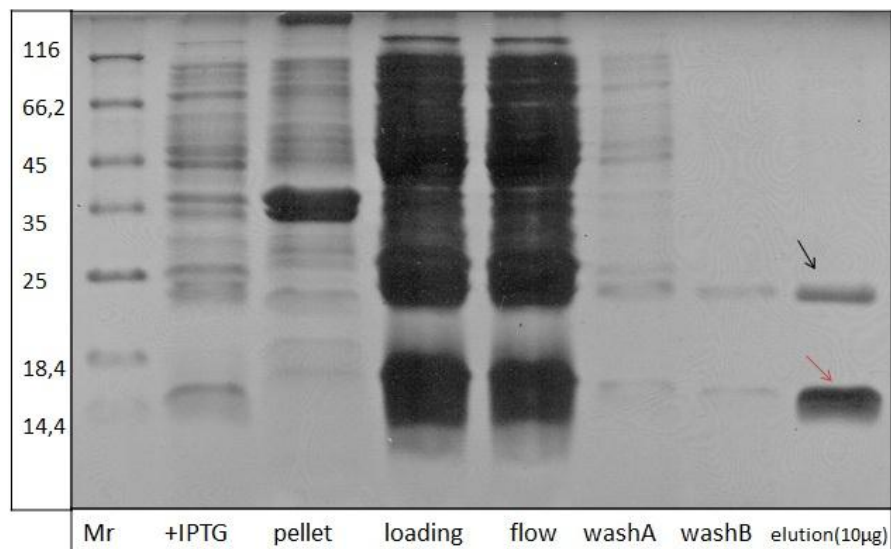
Με την απομόνωση των συμπλόκων της HisCesAB-EspA *in vitro*, μπορούμε να τα αναλύσουμε περαιτέρω με φασματομετρία μάζας. Το καθαρό σύμπλοκο HisCesAB-EspA θα χαρακτηριστεί με Intact Protein Analysis (“top-down” ή Native MS), όπου διατηρεί την τεταρτοταγή δομή του στην αέρια φάση. Με χρήση ενέργειας σπάμε το σύμπλοκο και παίρνουμε πληροφορίες για την δομή και τη σταθερότητά του. Επιπλέον, μπορούμε να μετρήσουμε το ακριβές μοριακό βάρος του συμπλόκου, καθώς και την στοιχειομετρία των υπομονάδων που το αποτελούν.



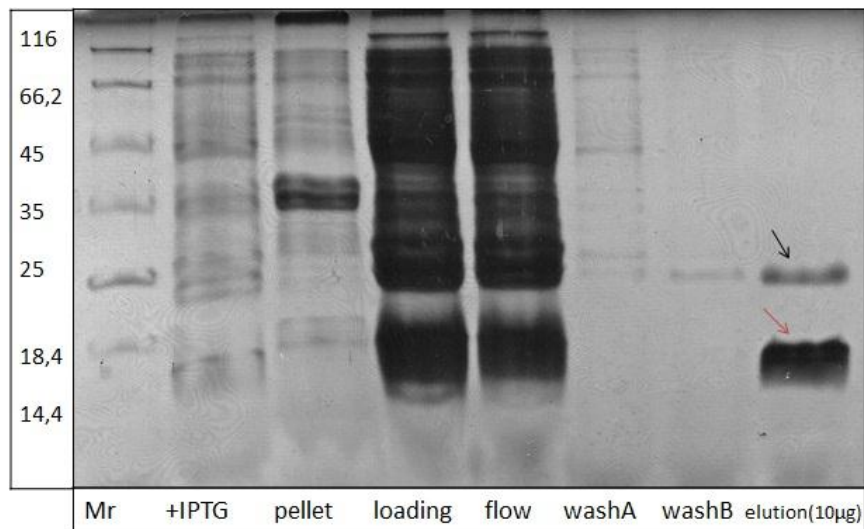
Εικόνα 1. Καθαρισμός της HisCesAB (E20L) –EspA σε κολώνα Ni^{2+} -NTA. 15% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). +IPTG: δείγμα μετά από προσθήκη IPTG στην καλλιέργεια. Pellet: άσπαστα κύτταρα και μεμβρανικά θραύσματα. Loading: υπερκείμενο φυγοκέντρωσης. Flow: πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στην κολώνα. WashA: πρώτο πλύσιμο. WashB: δεύτερο πλύσιμο. Elution: έκλυση πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν στην κολώνα. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται η EspA, ενώ με κόκκινο η HisCesAB (E20L).



Εικόνα 2. Καθαρισμός της HisCesAB E20L/E30L- EspA σε κολώνα Ni²⁺-NTA. 15% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). Με κόκκινο βέλος υποδεικνύεται η HisCesAB E20L/E30L, ενώ η EspA απουσιάζει.



Εικόνα 3. Καθαρισμός της HisCesAB- EspA (R174A) σε κολώνα Ni²⁺-NTA. 15% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). Με μύρο βέλος υποδεικνύεται η EspA (R174A), ενώ με κόκκινο η HisCesAB.



Εικόνα 4. Καθαρσιμός της HisCesAB- EspA (R174A/Q181L) σε κολώνα Ni²⁺-NTA. 15% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται η EspA (R174A/Q181L), ενώ με κόκκινο η HisCesAB.

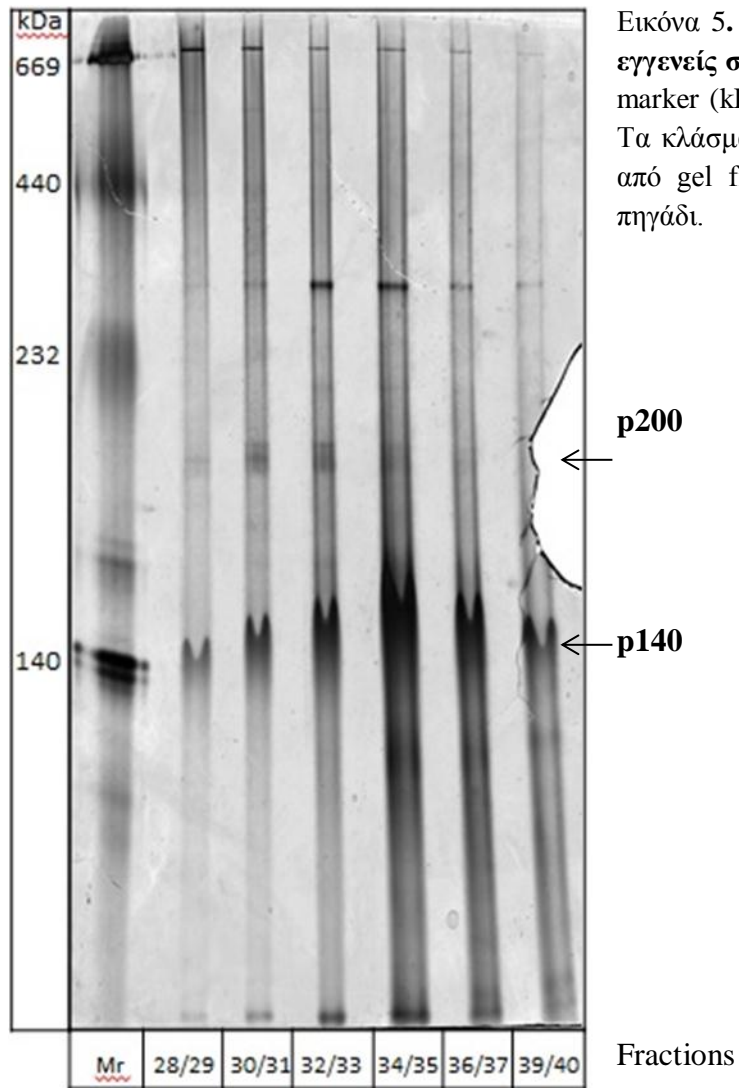
2.2) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την EspA

Προκειμένου να κατανοήσουμε καλύτερα την αλληλεπίδραση της EspA με την CesAB, προχωρήσαμε σε *in vivo* μελέτη του μηχανισμού στόχευσης της EspA στην μεμβράνη. Για να το καταφέρουμε, μετασχηματίσαμε EPECΔEspA κύτταρα με πλασμίδιο pASK-IBA7 plus- HisEspA και η επαγωγή της έκφρασης του πλασμιδίου έγινε με άνυδρη τετρακυκλίνη. Η πρωτεΐνη HisEspA περιέχει έναν εξαϊστιδινυλικό επίτοπο που θα την βοηθήσει να απομονωθεί με σφαιρίδια σεφαρόζης που περιέχουν νικέλιο. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, έσπασαν με ηχοβολισμό και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης τους αναλύθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε κολώνα Ni²⁺-NTA. Η HisEspA θα πιαστεί πάνω στα σφαιρίδια νικελίου και θα λειτουργήσει ως «δόλωμα» για να πιάσει πιθανές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτή. Το κλάσμα έκλουσης από την κολώνα νικελίου αναλύεται περαιτέρω με χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration), σε χαμηλή συγκέντρωση αλατιού για να μην επηρεαστούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συμπλόκων. Όταν τελειώσει η χρωματογραφία συλλέγουμε τα κλάσματα πρωτεϊνών και τα αναλύουμε με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Το πήκτωμα χρωματίζεται με Νιτρικό Άργυρο (Εικόνα 5).

Τα μεγαλομοριακά σύμπλοκα μπορούν να αναλυθούν με φασματομετρία μάζας η οποία ανιχνεύει κυρίως την CesAB και την EspA, αλλά και άλλες πρωτεΐνες του T3SS (πχ την EscN).

Σε αυτόν το πείραμα χρησιμοποιήσαμε την HisEspA ως δόλωμα για να απομονώσουμε πρωτεΐνες που πιθανώς αλληλεπιδρούν με αυτήν. Η EspA μαζί με την CesAB σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές με μοριακό βάρος ~35kDa. Το σύμπλοκο παρουσιάζει διαφορετικό τρέξιμο στο πήκτωμα και εμφανίζεται να έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Αυτό δικαιολογείται καθώς στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα οι πρωτεΐνες κινούνται βάση του εγγενούς φορτίου τους και της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες. Στην εικόνα (5), παρατηρούμε στο ύψος των 140kDa έντονες πρωτεϊνικές μπάντες που περιέχουν την EspA και την CesAB. Οι δυο αυτές πρωτεΐνες συνταξιδεύουν στο πήκτωμα στα 140kDa και αποτελούν σύμπλοκο που ονομάζεται p140. Επιπλέον, στο ύψος των 200kDa στο πήκτωμα εμφανίζεται μια μπάντα που περιέχει EspA και CesAB. Στο σύμπλοκο αυτό, δεν γνωρίζουμε την στοιχειομετρία με την οποία συμμετέχουν η σαπερόνη και το υπόστρωμα. Από τη

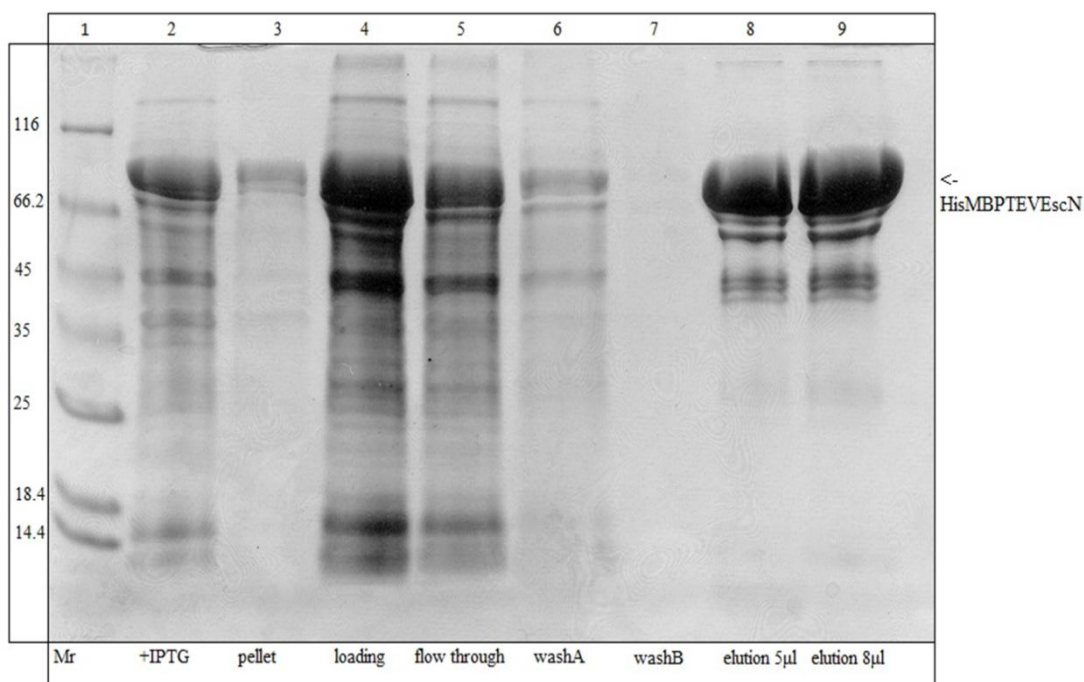
στιγμή που βρίσκονται στα 200kDa (p200) ίσως έχουν δημιουργήσει ένα σύμπλοκο με πολλές επαναλήψεις του ετεροδιμερούς CesAB-EspA, είτε θα αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας μεγαλομοριακά σύμπλοκα.



2.3)Καθαρισμός της HisMBPTEVEscN

Κατά την απομόνωση μεγαλομοριακών συμπλόκων από κύτταρα EPEC και ανάλυση τους με φασματομετρία μάζας, εντοπίστηκαν διάφορες πρωτεΐνες του εκκριτικού μονοπατιού Τύπου III. Μια από αυτές είναι η πρωτεΐνη EscN που φαίνεται να αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο CesAB-EspA κατά τη στόχευση της EspA στην μεμβράνη. Η EscN είναι μια καλά συντηρημένη ATPase που τροφοδοτεί ενεργειακά την λειτουργία της έκκρισης και βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη της T3S συσκευής [4]. Σχηματίζει έναν εξαμερή δακτύλιο στη μεμβράνη και βοηθά στην αποδιάταξη σαπερονών-υποστρωμάτων, για την στόχευση των τελευταίων μέσα στο σύμπλοκο βελόνης. Έτσι, κρίθηκε απαραίτητος ο καθαρισμός της EscN και η *in vitro* μελέτη των λειτουργιών της.

Για την απομόνωση της πρωτεΐνης EscN μετασηματίσαμε BL21-19(DE3) επιδεκτικά βακτήρια με πλασμίδιο *pet16b His-MBP-TEV-EscN*. Σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας επάγουμε την έκφραση της πρωτεΐνης με IPTG. Τα βακτήρια σπάνε με τη βοήθεια της French Press. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης φορτώνεται σε κολώνα Ni^{2+} -NTA και τα κλάσματα έκλυσης αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα (Εικόνα 6).

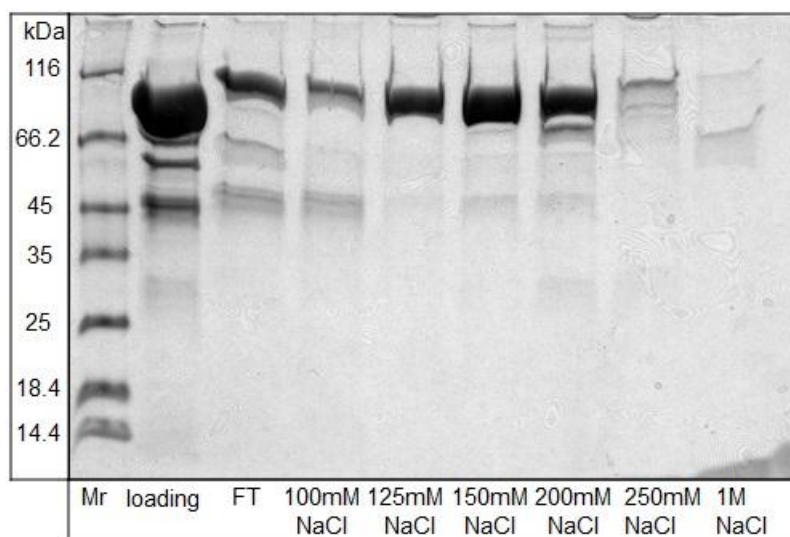


Εικόνα 6. Καθαρισμός της HisMBPTEVEscN σε κολώνα Ni^{2+} -NTA. 12% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). Διάφορα στάδια χρωματογραφίας απεικονίζονται. Το βέλος υποδεικνύει την θέση της HisMBPTEVEscN.

Κατά την έκλυση της HisMBPTEVEscN από την κολώνα νικελίου παρατηρούμε υπάρχουν διάφορες προσμίξεις μοριακού βάρους 45kDa. Οι προσμίξεις αυτές είναι πιθανόν να αποτελούν προϊόν αποικοδόμησης της HisMBPTEVEscN. Για να απαλλαγούμε από αυτές τις προσμίξεις μπορούμε να προχωρήσουμε σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (gel filtration). Όμως, προηγούμενα πειράματα έχουν αποδείξει ότι οι προσμίξεις εξακολουθούν να υφίστανται μετά τη χρωματογραφία.

Για το λόγο αυτό, εισάγουμε ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού του κλάσματος έκλυσης της χρωματογραφίας στήλης νικελίου, το οποίο είναι χρήση της χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής (Q purification). Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής εκμεταλλεύεται την ιδιότητα των πρωτεϊνών να φέρουν φορτισμένα αμινοξέα και να προσδένονται τελικώς στον ιοντοανταλλάκτη. Η προσροφημένη πρωτεΐνη εκλύεται από τη στήλη με αύξηση της ιοντικής ισχύος της υγρής φάσης.

Στην εικόνα (7) παρατηρούμε ότι στις πλύσεις με αλάτι απομακρύνουμε διάφορες προσμίξεις. Ειδικότερα στα 125mM και 150mM NaCl η HisMBPTEVEscN είναι καθαρή και απαλλαγμένη από προσμίξεις. Άρα, χρησιμοποιώντας αυτή τη συγκέντρωση άλατος μπορούμε να απομονώσουμε την πρωτεΐνη πολύ καθαρή και σε μεγάλη συγκέντρωση.

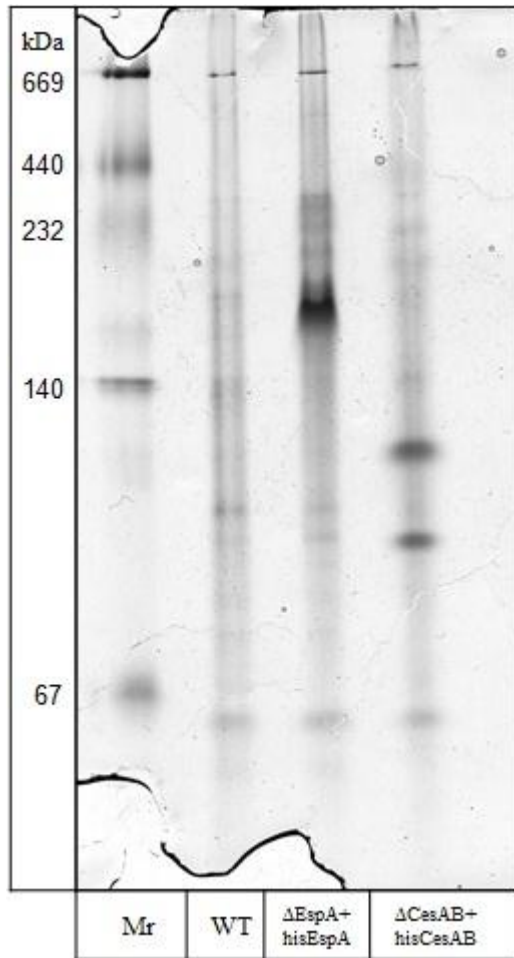


Εικόνα 7. Καθαρισμός HisMBPTEVEscN με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. 12% SDS gel, χρώση με Coomassie R-250, SDS molecular marker (kDa). Loading: υλικό που εκλύεται από την κολώνα νικελίου. FT: πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στην κολώνα Q. Αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl: σταδιακή απομάκρυνση πρωτεϊνών από τη στήλη ανάλογα με το φορτίο τους.

2.4) Καθαρισμός πρωτεϊνών σε εγγενείς συνθήκες

Ένας ακόμη τρόπος να παρατηρήσουμε την αλληλεπίδραση της CesAB με την EspA, είναι να απομονώσουμε ξεχωριστά μεγαλομοριακά σύμπλοκα στα οποία αυτές συμμετέχουν. Τα σύμπλοκα αυτά θα αναλυθούν με φασματομετρία μάζας, θα συγκριθούν και θα μας ίσως μας αποκαλύψουν νέες αλληλεπιδράσεις των δυο αυτών στενά συνδεδεμένων πρωτεϊνών.

Για το σκοπό αυτό, μετασχηματίζουμε ΔespA κύτταρα με πλασμίδιο pASK-IBA7 plus-HisEspA και ΔcesAB κύτταρα με πλασμίδιο pASK-IBA7plus-HisCesAB. Παράλληλα, μετασχηματίζουμε κύτταρα EPEC αγρίου τύπου με πλασμίδιο pASK-IBA7plus, που δεν περιέχει κάποιο his-tagged γονίδιο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες επάγουμε την έκφραση του κάθε πλασμιδίου με συγκεκριμένη ποσότητα άνυδρης τετρακυκλίνης. Στα Wt+pASK-IBA7plus κύτταρα δεν προσθέτουμε τετρακυκλίνη. Μετά από τρεις ώρες επαγωγής, συλλέγουμε τα κύτταρα τα οποία σπάνε με χρήση υπερήχων. Το κάθε υπερκείμενο φυγοκέντρωσης φορτώνεται σε μια κολώνα νικελίου. Ένα μέρος από το κλάσμα έκλουσης το επεξεργαζόμαστε σύμφωνα με πρωτόκολλο της φασματομετρίας μάζας (in solution digestion). Το υπόλοιπο πρωτεϊνικό μείγμα αναλύεται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα. Την επόμενη μέρα το πήκτωμα βάφεται με χρώση Blue Silver (Εικόνα 8). Το πήκτωμα θα εμφανίσει διάφορες μπάντες πρωτεϊνών που μπορούν να κοπούν και να αναλυθούν με φασματομετρία μάζας (πρωτόκολλο in gel digestion).



Εικόνα 8. Καθαρισμός HisEspA και HisCesAB με εγγενείς συνθήκες σε κολώνα Ni²⁺-NTA. 7% Native gel, χρώση Blue Silver, Native marker (kDa). Σε κάθε πηγάδι φορτώθηκε υλικό που εκλούσθηκε από κολώνα νικελίου. Wt: 30μg συνολική πρωτεΐνη στο πηγάδι, HisEspA: 32μg συνολική πρωτεΐνη στο πηγάδι, HisCesAB:37μg συνολική πρωτεΐνη φορτώθηκε στο πηγάδι.

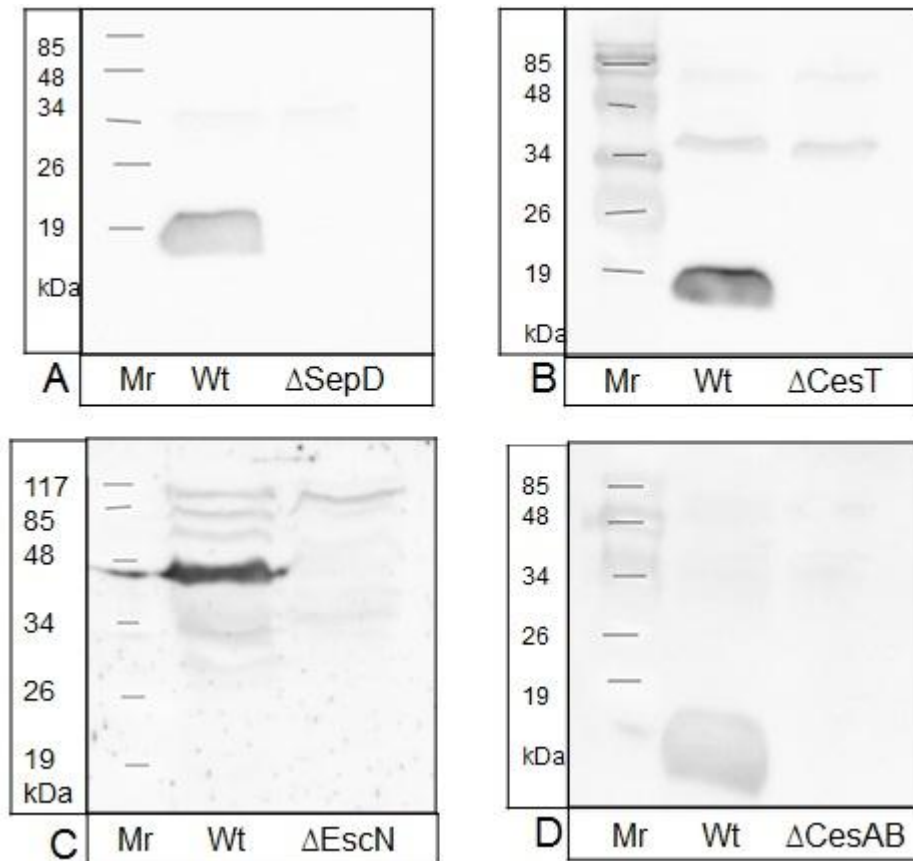
Σε αυτό το πείραμα, τα Δ CesAB+HisCesAB κύτταρα μετά από τρεις ώρες επαγωγή με άνυδρη τετρακυκλίνη ξεπέρασαν την εκθετική φάση ανάπτυξης. Τα κύτταρα αυτά δεν βρίσκονταν σε ίδια φάση ανάπτυξης με τα Wt και τα Δ EspA+HisEspA. Θα αναμέναμε το πρωτεϊνικό προφίλ της σαπερόνης HisCesAB να μοιάζει με αυτό του υποστρώματος, HisEspA. Όμως, παρατηρούμε τον σχηματισμό διαφορετικών συμπλόκων στα δυο στελέχη. Το αποτέλεσμα αυτό, τονίζει την ανάγκη για απόλυτο συγχρονισμό των κυττάρων για σύγκριση των συμπλόκων που παράγονται σε αυτά. Επιπλέον, συμπεραίνουμε ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών είναι δυναμικά και μεταβάλλονται ανάλογα με τη φάση ζωής του κυττάρου.

Το «δόλωμα» HisEspA δίνει ένα πρωτεϊνικό προφίλ στο οποίο υπάρχει το σύμπλοκο p200 γύρω στα 200kDa. Το σύμπλοκο αυτό περιέχει την HisEspA, την σαπερόνη της CesAB και ίσως κάποιον άλλο παράγοντα. Το σύμπλοκο p140 έχει εξαφανιστεί.

Τέλος, στην κολώνα νικελίου απ' όπου πέρασε το κυτταροπλασματικό υλικό του Wt EPEC, παρατηρούμε ότι προσδέθηκε πληθώρα πρωτεϊνών. Το wt στέλεχος θα χρησιμοποιηθεί σαν control και θα αποκαλύψει πόσες πρωτεΐνες δεσμεύονται στην κολώνα νικελίου λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αυτήν.

2.5) Ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρήση αντισωμάτων

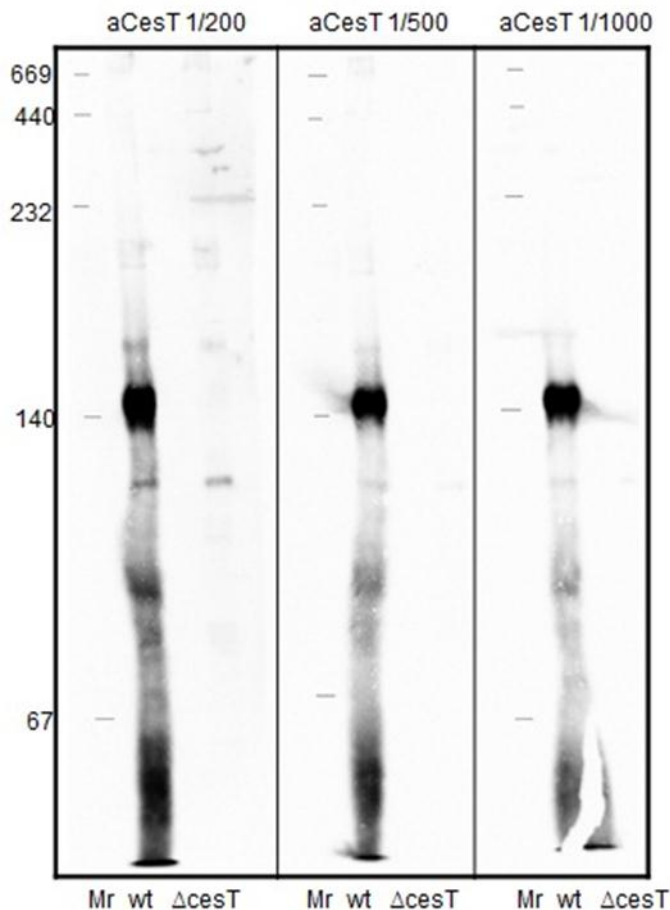
Αρχικά, για να ελέγξουμε την καθαρότητα των αντισωμάτων μας χρησιμοποιούμε αγρίου τύπου EPEC και EPEC στα οποία έχουμε διαγράψει ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Πραγματοποιούμε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και μεταφέρουμε τις πρωτεΐνες σε νιτροκυτταρίνη. Εκτελούμε ανοσοαποτύπωση με διαφορετικό αντίσωμα κάθε φορά. Τα αντισώματα έχουν καθαριστεί με αρνητική ανοσοαπορρόφηση σε μεμβράνες EPEC.



Εικόνα 8. Έλεγχος καθαρότητας αντισωμάτων σε SDS-PAGE με χρήση αντισώματος. SDS marker (kDa), A-B-D: 15% SDS gel, C: 12% SDS gel. A: χρήση αντισώματος aSepD (αραίωση 1/1000), B: χρήση αντισώματος aCesT (αραίωση 1/1000), C: χρήση αντισώματος aEscN (αραίωση 1/500), D: χρήση αντισώματος aCesAB (αραίωση 1/200).

Με αυτόν τον τρόπο παρατηρούμε πόσο καθαρό είναι το αντίσωμα που διαθέτουμε και πόσο ειδικό είναι για την πρωτεΐνη που ανιχνεύει. Τα συγκεκριμένα αντισώματα είναι αρκετά καθαρά και ειδικά (Εικόνα 8), γεγονός που μας βοηθάει να συνεχίσουμε το πείραμα.

Έπειτα, θα πρέπει να προσδιορίσουμε τη βέλτιστη αραίωση αντισώματος που θα χρησιμοποιήσουμε για την ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιούμε διαβάθμιση συγκέντρωσης αντισώματος aCesT σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που περιέχουν ίδια ποσότητα πρωτεΐνης (Εικόνα 9). Συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη αραίωση για το αντίσωμα aCesT είναι 1/1000 καθώς είναι αρκετά ειδικό κατά της CesT, μειώνοντας το θόρυβο από άλλες πρωτεΐνες (background).



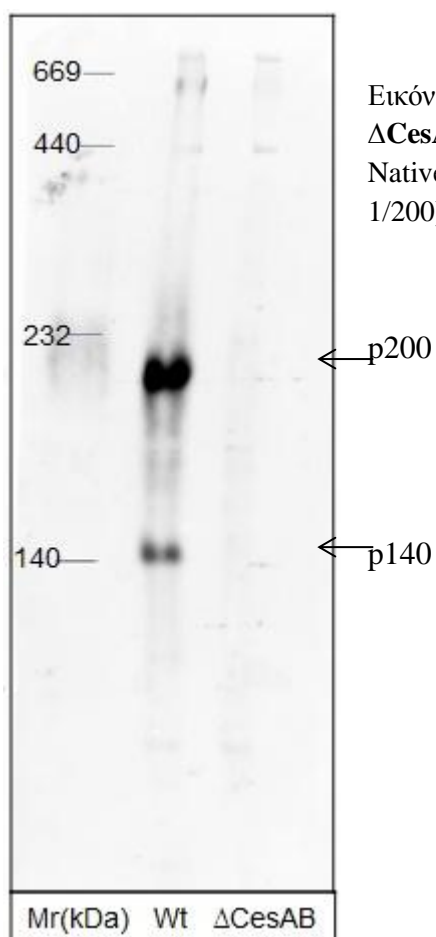
Εικόνα 9. Ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε Wt και Δ CesT κύτταρα σε διαβάθμιση αντισώματος, 7% Native gel, Native marker (kDa). Ανοσοαποτύπωση με aCesT σε τρεις αραιώσεις, 1/200, 1/500, 1/1000.

Έπειτα, θέλουμε να παρατηρήσουμε ποια τεταρτοταγή σύμπλοκα σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα του EPEC στα οποία συμμετέχει η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιούμε αγρίου τύπου EPEC και μεταλλάγματα EPEC (στερούνται ενός γονιδίου). Τα κύτταρα σπάνε με υπέρηχους και το υπερκείμενο φορτώνεται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εκτελείται ανοσοαποτύπωση. Κάθε μεμβράνη επωάζεται με ειδικό αντίσωμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

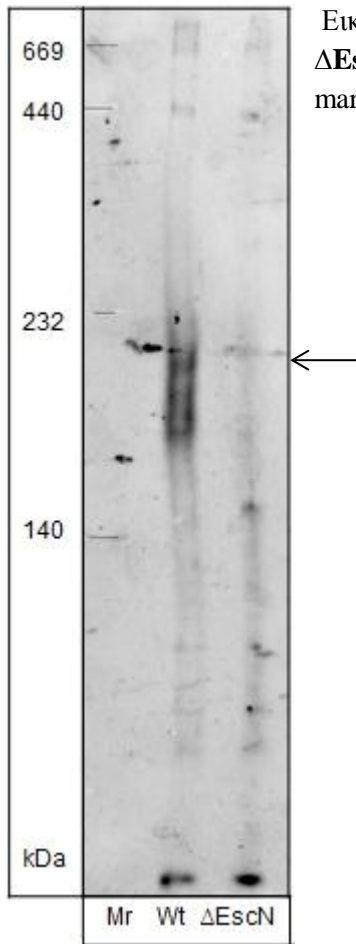
Εξετάζουμε την ύπαρξη συμπλόκων που συμμετέχει η σαπερόνη CesT στο κυτταρόπλασμα Wt και Δ CesT κυττάρων (Εικόνα 9). Η μπάντα που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, δείχνει την CesT να ταξιδεύει στο ύψος των 150kDa. Στα 150kDa μαζί με την CesT (17kDa) συν-ταξιδεύει η Tir (70kDa) που αποτελεί υπόστρωμά της. Οι δυο τους σχηματίζουν ένα σύμπλοκο μοριακού βάρους 87kDa. Άρα, θα μπορούσαν να βρίσκονται μαζί στα 150 kDa είτε με τη μορφή ετεροδιμερούς

είτε σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες. Αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας πιστοποιούν την ύπαρξη της Tir στο ύψος των 150kDa.

Εξετάζουμε την ύπαρξη συμπλόκων που να περιέχουν τη σαπερόνη CesAB στο κυτταρόπλασμα Wt και Δ CesAB κυττάρων. Όπως είναι αναμενόμενο, στο Δ CesAB κύτταρο δεν υπάρχει CesAB. Στο Wt EPEC η CesAB συμμετέχει σε διάφορα σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα, το ένα στο ύψος των 200kDa και το άλλο στο ύψος των 140kDa (p200 και p140 αντίστοιχα). Στο p200 βρίσκεται η CesAB με το υπόστρωμά της EspA, όπως και στο p140. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10. Ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε Wt και Δ CesAB κύτταρα με χρήση αντισώματος. 7% Native gel, Native marker (kDa). Ανοσοαποτύπωση με α CesAB (αραίωση 1/200).



Εικόνα 11. Ανίχνευση πρωτεϊνικών συμπλόκων σε Wt και ΔEscN κύτταρα με χρήση αντισώματος. 7% Native gel, Native marker (kDa). Ανοσοαποτύπωση με aEscN (αραίωση 1/500).

Εξετάζουμε την ύπαρξη συμπλόκων στα οποία μετέχει η πρωτεΐνη EscN στο κυτταρόπλασμα Wt και ΔEscN κυττάρων. Στο ύψος των 170kDa εμφανίζεται μια έντονη μάντα όπου βρίσκεται η EscN (Εικόνα 11). Η EscN έχει μοριακό βάρος 47kDa και από τη στιγμή που ανιχνεύεται στα 170kDa είναι πιθανό να κάνει ολιγομερή με τον εαυτό της. Άρα, στα 170 kDa βρίσκεται ένα ομοτετραμερές ή ομοτριμερές της EscN, είτε η EscN σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες. Δεδομένα από την φασματομετρία μάζας πιστοποιούν ότι σε αυτό το ύψος κινείται η EscN.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Συζήτηση

Η πρωτεΐνη CesAB δρα ως σαπερόνη για τους μεταθέτες EspA και EspB, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην έκκριση τους έξω από το βακτήριο. Σε αντίθεση με τις τυπικές σαπερόνες, η CesAB είναι ένα χαλαρά πακεταρισμένο ομοδιμερές όταν βρεθεί σε διάλυμα. Αποκτά μια αυτορυθμιζόμενη διαμόρφωση για να μην κάνει συσσωματώματα με τον εαυτό της και ανταλλάσει υπομονάδες για να δημιουργήσει ένα στοιχειομετρικό σύμπλοκο με την EspA [8]. Επειδή, η EspA έχει την τάση να ολιγομερίζεται για να δημιουργεί ινίδια, είναι απαραίτητο η CesAB να την παγιώσει σε μονομερή μορφή στο κυτταρόπλασμα. Η κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου CesAB-EspA έχει λυθεί και αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση των δυο μονομερών.

Η δομή της CesAB περιλαμβάνει κάποια φυσικά ελαττώματα στο πακετάρισμα, τα οποία εκθέτει και αλληλεπιδρά με την EspA. Αν διορθωθεί αυτό το πακετάρισμα η CesAB γίνεται ασταθής και δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την EspA, οδηγώντας σε ένα μη λειτουργικό T3SS. Η EspA από την πλευρά της, χρησιμοποιεί μια δομική μίμηση για να αντισταθμίσει τα ασταθή σημεία της CesAB για να δημιουργηθεί το ετεροδιμερές. Συγκεκριμένες σημειακές μεταλλαγές στο μόριο της CesAB και της EspA επηρεάζουν το σχηματισμό του ετεροδιμερούς και παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών.

Στο μόριο της CesAB έγινε υποκατάσταση της λευκίνης στη θέση 20 προς γλουταμινικό (E20L), η οποία αυξάνει το περιεχόμενο σε α-έλικες και συνεισφέρει σε αξιοσημείωτη σταθεροποίηση της CesAB. Η διπλή υποκατάσταση της λευκίνης προς γλουταμινικό στις θέσεις 20 και 30 (E20L/E30L) στο μόριο της CesAB προκαλεί σταθερότητα στο ομοδιμερές με αποτέλεσμα την πολύ ασθενή πρόσδεση της EspA. Στο μόριο της EspA έγινε υποκατάσταση της αργινίνης 174 προς λευκίνη (R174A) και της γλουταμίνης στη θέση 181 προς λευκίνη (Q181L). Τα κατάλοιπα που υποκαθίστανται από ουδέτερα κατάλοιπα, δεν μπορούν να σχηματίσουν επιθυμητές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη CesAB.

Στην παρούσα εργασία, προσπαθήσαμε να απομονώσουμε αυτά τα σύμπλοκα *in vitro* και να παρατηρήσουμε τη συμπεριφορά τους. Τα σύμπλοκα απομονώνονται με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου και αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα. Πράγματι, η μονή υποκατάσταση στο μόριο της CesAB (E20L) μειώνει τη

συγγένεια της για την EspA, καθώς κατά τον καθαρισμό τους η EspA βρίσκεται σε μειωμένη ποσότητα συγκριτικά με την CesAB. Στον καθαρισμό του συμπλόκου HisCesAB E20L/E30L- EspA δεν παρατηρείται καθόλου EspA, κάτι που πιθανώς δηλώνει τη συσσωμάτωση της. Τα σύμπλοκα HisCesAB- EspA (R174A) και HisCesAB- EspA (R174A/Q181L) όταν απομονωθούν, δείχνουν ελαττωμένη ποσότητα της EspA. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα (λόγω φορτίου ή θέσης) στα μόρια της CesAB και EspA, είναι απαραίτητα για την αναγνώριση και αλληλεπίδραση των δυο μορίων προς δημιουργία του ετεροδιμερούς. Τα αποτελέσματα μας ενθαρρύνουν να εξετάσουμε περαιτέρω αυτά τα σύμπλοκα με φασματομετρία μάζας για να ανιχνεύσουμε τη σταθερότητα τους.

Στο επόμενο βήμα, θέλαμε να μελετήσουμε τα τεταρτοταγή σύμπλοκα που δημιουργεί η EspA στο κύτταρο πριν εκκριθεί. Η απομόνωση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου και το κλάσμα της έκλουσης αναλύθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Σημειώνεται, ότι χρησιμοποιήθηκε χαμηλή συγκέντρωση αλατιού κατά τον καθαρισμό για να μην σπάσουν τα σύμπλοκα. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό αναλύθηκαν με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Στο πείραμα η HisEspA λειτουργεί σαν «δόλωμα» για την απομόνωση μεγαλομοριακών συμπλόκων. Η ανάλυση των πρωτεϊνικών κλασμάτων αποκαλύπτει δυο μεγαλομοριακά σύμπλοκα : το p200 (200kDa) και το p140 (140kDa). Τα σύμπλοκα p140 και p200 περιέχουν την CesAB και την EspA, όπως έχει αποδειχθεί με φασματομετρία μάζας και με χρήση αντισωμάτων. Τα σύμπλοκα αυτά είναι πιθανό να σχηματίζονται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα λίγο πριν την έκκριση της EspA και να περιέχουν διάφορους παράγοντες με μέχρι τώρα άγνωστη λειτουργία. Το σύμπλοκο p200, εκτός από την CesAB και την EspA ίσως περιλαμβάνει κάποιον τρίτο παράγοντα. Η ανίχνευση αυτού του επιπλέον παράγοντα με φασματομετρία μάζας, θα μπορούσε να αποκαλύψει κρίσιμες αλληλεπιδράσεις της EspA λίγο πριν εκκριθεί από το βακτήριο.

Σε αυτού του είδους τα πειράματα, όπου το πρωτεϊνικό δείγμα περνά από δυο χρωματογραφικές στήλες, έχουμε καταπόνηση ορισμένων ασταθών συμπλόκων πρωτεϊνών. Τα σύμπλοκα σπάνε και το αποτέλεσμα του πειράματος δεν είναι σταθερό σε κάθε επανάληψη. Ένα τρόπος βελτίωσης του αποτελέσματος, είναι η

χρήση όσο το δυνατόν πιο ήπιων συνθηκών κατά τον καθαρισμό του δείγματος ώστε να κρατηθούν ακέραια ασταθή σύμπλοκα.

Το επόμενο πείραμα, περιελάμβανε την απομόνωση μεγαλομοριακών συμπλόκων που σχηματίζουν η EspA και η CesAB στο κυτταρόπλασμα του EPEC. Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη νικελίου και το κλάσμα της έκλουσης αναλύεται με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Το προφίλ πρωτεϊνών της HisCesAB και της HisEspA διαφέρει δραματικά, ενώ θα περιμέναμε να εμφανίζουν αρκετές κοινές μπάντες. Στον καθαρισμό της HisEspA εμφανίζεται το σύμπλοκο p200, το οποίο απουσιάζει από τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν με την HisCesAB. Το σύμπλοκο p140 εξαφανίζεται και στους δυο καθαρισμούς. Το πείραμα αυτό δημιουργεί κάποιους προβληματισμούς σχετικά με την αυστηρότητα των συνθηκών που έπρεπε να ακολουθηθούν. Για να είμαστε σε θέση να συγκρίνουμε πρωτεΐνες που παράγονται στο κυτταρόπλασμα δυο διαφορετικών κυττάρων, θα πρέπει αυτά να βρίσκονται στην ίδια φάση ανάπτυξης. Τα κύτταρα ΔCesAB+HisCesAB, έχοντας ξεπεράσει την εκθετική φάση ανάπτυξης, δίνουν ένα διαφορετικό πρωτεϊνικό προφίλ. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα, ότι κατά την φάση ανάπτυξης του βακτηρίου δημιουργούνται διάφορα σύμπλοκα τα οποία μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου. Το Wt EPEC χρησιμοποιείται για έλεγχο των πρωτεϊνών που προσδένονται στην κολώνα, ακόμα και όταν εκεί δεν υπάρχει πρωτεΐνη-«δόλωμα». Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν θόρυβο κατά την πρωτεωμική ανάλυση του δείγματος και αφαιρούνται από τη βάση δεδομένων της φασματομετρίας μάζας.

Τέλος, προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα με την βοήθεια αντισωμάτων. Τα αντισώματα έπρεπε να ελεγχθούν ως προς την καθαρότητα τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα που περιείχε κυτταροπλασματικό υλικό από Wt και ΔEPEC στελέχη. Έπειτα, προσδιορίστηκε η κατάλληλη αραίωση αντισώματος για την εκάστοτε πρωτεΐνη. Για παράδειγμα για το αντίσωμα aCesT η κατάλληλη αραίωση είναι 1/1000, ενώ για το aCesAB είναι 1/200. Επιπλέον, υποκυτταρικά κλάσματα Wt και ΔEPEC στελεχών αναλύονται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα και ελέγχονται με αντίσωμα. Τα αντισώματα ανιχνεύουν πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε τεταρτοταγή σύμπλοκα και παρέχουν πληροφορίες για το φαινομενικό μοριακό τους βάρος ή την στοιχειομετρία τους. Το aCesT αντίσωμα αποκάλυψε ένα σύμπλοκο μοριακού βάρους ~150kDa που περιέχει την

πρωτεΐνη Tir μαζί με τη σαπερόνη της CesT. Το aCesAB αντίσωμα αποκάλυψε τα σύμπλοκα p200 και p140 που περιέχουν την EspA μαζί με τη σαπερόνη της CesAB. Το aEscN αντίσωμα ανιχνεύει ένα μεγαλομοριακό σύμπλοκο ~170kDa το οποίο περιέχει EscN. Η EscN υπάρχει πιθανότητα να ολιγομερίζεται και να δημιουργεί σύμπλοκο με τον εαυτό της.

Η χρήση αντισωμάτων για την ανίχνευση συμπλόκων που διαχωρίστηκαν με εγγενή ηλεκτροφόρηση είναι πολύ ειδική και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε συνδυασμό με πληροφορίες που λαμβάνουμε με χρωματογραφικές μεθόδους.

Στην παρούσα εργασία εστίασαμε σε τεταρτοταγή σύμπλοκα που δημιουργούνται στο κυτταρόπλασμα του EPEC κατά το μονοπάτι έκκρισης του T3SS. Τα σύμπλοκα αυτά απομονώθηκαν με διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας. Με χρήση αντισωμάτων ανιχνεύσαμε συγκεκριμένες πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Τέλος, ανιχνεύσαμε διαφορετική ποσότητα της EspA λόγω σημειακών μεταλλαγών στο σύμπλοκο CesAB-EspA.

Η καλύτερη κατανόηση των πρωτεϊνών που αποτελούν το T3SS και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων, ίσως οδηγήσει στη χαρτογράφηση του μονοπατιού έκκρισης και στόχευσης των δραστικών πρωτεϊνών στον ξενιστή. Ελπίζουμε, πως η αποκρυπτογράφηση της κρυσταλλικής δομής σημαντικών σαπερονών του T3SS, θα βοηθήσει την κατασκευή αναστολέων που θα λειτουργούν ως πιθανά φάρμακα κατά του T3SS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

4.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιείται το πρωτόκολλο Plasmid DNA purification της Macherey-Nagel. Το πρωτόκολλο βασίζεται στην τεχνολογία silica membrane για την πρόσδεση του πλασμιδιακού DNA κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Τα βακτήρια που περιέχουν το επιθυμητό πλασμίδιο επαναδιαλυτοποιούνται σε BufferA1 και το πλασμίδιο απελευθερώνεται μέσω SDS/αλκαλικής λύσης (BufferA2). Το BufferA3 εξισορροπεί τα σπασμένα κύτταρα και προετοιμάζει το πλασμίδιο για πρόσδεση στη μεμβράνη της κολώνας. Ένα ενδιάμεσο βήμα φυγοκέντρησης κατακρημνίζει πρωτεΐνες, γενωμικό DNA και θραύσματα κυττάρων. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης φορτώνεται στην κολώνα όπου προσδέεται το πλασμίδιο. Ακολουθεί έκλουση του πλασμιδίου από την κολώνα σε συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος. Το πλασμίδιο είναι καθαρό χωρίς προσμίξεις από άλατα, μεταβολίτες και RNA.

4.1.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων

Επιδεκτικά *E. coli* κύτταρα αφαιρούνται από τους -80°C και τοποθετούνται στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν ομαλά. Σε 100μl δεκτικών κυττάρων εισάγονται 10-50 ng πλασμιδίου και αφήνονται για 30 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα και αφήνονται στον πάγο για 2 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 900μl στείρου υγρού θρεπτικού LB και τα κύτταρα επωάζονται στην κατάλληλη θερμοκρασία για 1 ώρα υπό ανάδευση. Μέρος της καλλιέργειας που προκύπτει απλώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB και αντιβιοτικό και επωάζεται για 12-16 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία.

4.1.3 Καθαρισμός αντισωμάτων έναντι διαλυτών πρωτεϊνών του T3SS

Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού αποκτήθηκαν ενάντια σε καθαρές πρωτεΐνες CesAB, EspA, EscN, CesT, SepD (David's Biotechnologie). Ο τίτλος του κάθε

αντισώματος ήταν ικανοποιητικός, αλλά πολλές φορές μη ειδικός. Οι οροί καθαρίστηκαν μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αρνητικής ανοσοπροσρόφησης σε μεμβράνες που προέρχονται από στελέχη EPEC και στερούνται των παραπάνω πρωτεϊνών. Οι μεμβράνες ανανεώνονται κάθε 4 ώρες και η διαδικασία καθαρισμού διαρκεί 3 μέρες στους 4°C. Ο ορός του κουνελιού καθαρίζει αρκετά ώστε να απομακρυνθούν πληθυσμοί αντισωμάτων που είναι μη ειδικοί, αλλά υπάρχει πιθανότητα μείωσης του τίτλου του.

4.2 Θρεπτικά υλικά

4.2.1 DMEM

Το θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media), είναι ένα βασικό μέσο που αποτελείται από βιταμίνες, αμινοξέα, άλατα, γλυκόζη και έναν δείκτη pH. Δεν περιέχει πρωτεΐνες ή αυξητικούς παράγοντες. Συνήθως συμπληρώνεται με 5-10% Fetal Bovine Serum (FBS).

Στην παρούσα εργασία το βακτήριο EPEC καλλιεργείται σε DMEM για καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών μόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων. Το DMEM που χρησιμοποιήθηκε είχε υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη (4,5g/l). Κατά την κατασκευή του αποστειρώνεται με ειδικά φίλτρα και αποθηκεύεται στους 2-8°C μακριά από το φως. Ανάλογα το strain που καλλιεργείται, προστίθεται στο DMEM το κατάλληλο αντιβιοτικό για την αποφυγή μολύνσεων.

4.2.2 Luria Bertani (LB)

Συνταγή για 1 λίτρο υγρό LB

- 10g Tryptone
- 5g Yeast Extract
- 10g NaCl

Τα παραπάνω υλικά διαλύονται με ανάδευση σε απιονισμένο νερό και το pH ρυθμίζεται με HCl στο 7-7,5. Συμπληρώνοντας απιονισμένο νερό ο όγκος του LB θα φτάσει το 1 λίτρο. Το LB τοποθετείται σε φλάσκα όγκου 2 λίτρων, κλείνεται καλά με

αλουμινόχαρτο και αποστειρώνεται σε χύτρα στους 121°C για 20 λεπτά. Αφήνεται στον πάγκο να κρυώσει και προστίθεται σε αυτό το κατάλληλο αντιβιοτικό για βακτηριακή καλλιέργεια.

Για την κατασκευή 1 λίτρου στερεού θρεπτικού LB ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία, προσθέτοντας στην φλάσκα 15g άγαρ. Η φλάσκα αποστειρώνεται για 20 λεπτά στους 121°C και αφήνεται στον πάγκο ή μέσα σε ένα υδατόλουτρο για να κρυώσει. Όταν κρυώσει αρκετά προστίθεται το κατάλληλο αντιβιοτικό (50-55°C είναι μια καλή θερμοκρασία για τα αντιβιοτικά) και αναδεύεται γρήγορα. Το LB χύνεται προσεκτικά σε τρυβλία υπό φλόγα, καλύπτοντας το 1/3 του όγκου τους. Όταν κρυώσουν τα πιάτα αποθηκεύονται στους 4°C.

4.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων

4.3.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Η μέθοδος SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, δηλαδή έναν συνδυασμό μήκους και φορτίου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το SDS είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο, όταν εφαρμόζεται σε πρωτεϊνικό δείγμα, αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία 1 μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό αρνητικό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Επιπλέον, στο δείγμα προστίθεται β-μερκαπτοαιθανόλη ή DTT που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δυο ομάδες -SH κυστεϊνών της ίδιας ή δύο διαφορετικών αλυσίδων. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών του δείγματος ολοκληρώνεται με θέρμανση σε 60-100°C, που βοηθά την περεταιίρω πρόσδεση του SDS. Έτσι, οι πρωτεΐνες γίνονται γραμμικές και τρέχουν μέσα στο πήκτωμα ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης.

4.3.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Native-PAGE)

Η μέθοδος Native-PAGE (Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) αποτελεί έναν τυπικό ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό πρωτεϊνών, που χρησιμοποιείται ευρύτατα στα Proteomics. Κατά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών δεν χρησιμοποιούνται αποδιατακτικές συνθήκες (πχ θέρμανση), ούτε φορτισμένοι παράγοντες (πχ SDS) και έτσι τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών παραμένουν αναδιπλωμένα όπως ήταν μέσα στο κύτταρο. Τα σύμπλοκα τρέχουν μέσα στο πήκτωμα με βάση το υδροδυναμικό μέγεθός τους, αλλά και το εγγενές φορτίο τους, σε αντίθεση με την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση όπου οι πρωτεΐνες τρέχουν με βάση τη μοριακή μάζα τους. Επιπλέον, το συνολικό σχήμα της δομής των συμπλόκων επηρεάζει την κινητικότητά τους, καθώς συμπαγή σύμπλοκα έχουν αυξημένη κινητικότητα, ενώ εκτεταμένα σύμπλοκα μειωμένη.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης λαμβάνει χώρα στο cold room στους 4-7°C, διότι η θερμοκρασία επιδρά στα πρωτεϊνικά σύμπλοκα αποδιατάσσοντας τα. Το pH της ηλεκτροφόρησης είναι ουδέτερο για να μην επηρεάσει τα σύμπλοκα. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης και η μετέπειτα χρώση των πρωτεϊνών ποικίλουν ανάλογα τα σύμπλοκα του ενδιαφέροντος μας.

4.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

4.4.1 Χρώση Coomassie Blue

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (R-250) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE gel). Είναι μια εύκολη και αξιόπιστη τεχνική χρώσης πρωτεϊνών και παρέχει πληροφορίες για την σχετική αφθονία των πρωτεϊνών πάνω στο τζελ. Η χρωστική χρωματίζει τις πρωτεΐνες με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Η ευαισθησία της χρωστικής φτάνει το 0,5 μg πρωτεΐνης.

4.4.2 Χρώση Blue Silver

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 colloidal χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρωματίζει τις πρωτεΐνες με το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Η ευαισθησία του Blue Silver staining κυμαίνεται στο 0,1μg πρωτεΐνης. Αυτή η τεχνική χρώσης είναι συμβατή με τα πρωτόκολλα της φασματομετρίας μάζας, όπου μπορεί να πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση των πρωτεϊνών του πηκτώματος.

4.4.3 Χρώση με Νιτρικό Άργυρο

Η χρώση με Νιτρικό Άργυρο (Silver Nitrate) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρωματίζει τις πρωτεΐνες σε αποχρώσεις του μαύρου χρώματος. Αυτή η τεχνική χρώσης είναι συμβατή με τα πρωτόκολλα της φασματομετρίας μάζας και είναι ικανή να ανιχνεύσει 0,01μg πρωτεΐνης.

4.4.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με αντισώματα

Ακολουθείται το πρωτόκολλο της BioRad. Χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά αντισώματα που παράγονται από κουνέλια και καθαρίζονται με αρνητική ανοσοπροσρόφηση σε μεμβράνες EPEC. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι anti-rabbit IgGs και είναι συζευγμένα με το ένζυμο της HRP (Horseradish peroxidase) το οποίο οξειδώνει το peracid salt (παρουσία λουμινόλης), γεγονός που οδηγεί σε μια ανώτερη οξειδωτική κατάσταση της ομάδας αίμης του HRP ενζύμου. Καθώς το μόριο επιστρέφει στην κατώτερη ενεργειακά κατάσταση, παράγονται ρίζες λουμινόλης, εκλύεται φως (χημειοφωταύγεια), η μεμβράνη μαυρίζει και ανιχνεύονται μόνο οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από το πρώτο αντίσωμα. Στη διαδικασία χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ECL (Enhanced Chemiluminescence) της Pierce.

4.5 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών

4.5.1 Ο πλασμιδιακός φορέας pET

Τα συστήματα έκφρασης σχεδιάζονται έτσι ώστε να παράγουν πολλά αντίγραφα της επιθυμητής πρωτεΐνης μέσα στον ξενιστή. Για να επιτευχθεί αυτό, το πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο εισάγεται στον ξενιστή. Ο pET φορέας είναι ένα βακτηριακό πλασμίδιο σχεδιασμένο να παράγει τεράστιες ποσότητες της επιθυμητής πρωτεΐνης, όταν ενεργοποιηθεί. Το πλασμίδιο περιέχει διάφορα σημαντικά στοιχεία: το γονίδιο *lacI* που κωδικοποιεί για τον lac καταστολέα, τον T7 υποκινητή που είναι ειδικός μόνο για την T7 RNA πολυμεράση (δεν είναι βακτηριακή), τον lac χειριστή που μπορεί να μπλοκάρει τη μεταγραφή, έναν πολυσυνδέτη, την fl θέση έναρξης αντιγραφής και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Για να αρχίσει η διαδικασία, το επιθυμητό γονίδιο κλωνοποιείται στον pET φορέα στη θέση του πολυσυνδέτη. Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο lac χειριστής δεν βρίσκεται σε καταστολή, η μεταγραφή του γονιδίου προχωρά με πολύ γρήγορο ρυθμό. Από τη στιγμή που ο T7 είναι ιικός υποκινητής, μπορεί να μεταγράψει γρήγορα και ανεξέλεγκτα για όσο η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα. Η έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης αυξάνει καθώς αυξάνουν και τα επίπεδα του μεταγραφόμενου mRNA. Σε λίγες ώρες η επιθυμητή πρωτεΐνη θα είναι το κύριο συστατικό του κυττάρου. Ο pET φορέας θα πρέπει να εισαχθεί σε βακτηριακό ξενιστή, ο οποίος φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης του φάγου στο γένωμα του (λDE3) το οποίο θα πρέπει να βρίσκεται υπό τον έλεγχο lac υποκινητή και χειριστή.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται το στέλεχος JM109 (DE3). Όταν προστεθεί IPTG απομακρύνεται ο καταστολέας του lac χειριστή και εκφράζεται η T7 RNA πολυμεράση η οποία μεταγράφει το επιθυμητό γονίδιο. Για να υπάρχει αυστηρότερος έλεγχος του συστήματος έκφρασης pET, στο βακτηριακό στέλεχος εισάγεται ένα επιπλέον πλασμίδιο, το pLySS. Το πλασμίδιο αυτό κωδικοποιεί την λυσοζύμη που αναστέλλει την T7 RNA πολυμεράση, αποτρέποντας τη μεταγραφική διαρροή του επιθυμητού πλασμιδίου.

4.5.2 Ο πλασμιδιακός φορέας pASK-IBA

Οι πλασμιδιακοί φορείς pASK-IBA χρησιμοποιούνται για την επαγωγή πρωτεϊνών κάτω από αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης παρουσία του tet υποκινητή. Το πλασμίδιο pASK εκφράζει συνεχώς τον tet καταστολέα, ο οποίος δεν επιτρέπει την έκφραση του επιθυμητού γονιδίου. Όταν προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα άνυδρης τετρακυκλίνης στο διάλυμα, επάγεται η έκφραση της πρωτεΐνης (Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation). Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της τετρακυκλίνης στην καλλιέργεια, αυξάνεται η ποσότητα της επαγόμενης πρωτεΐνης. Με αυτό τον τρόπο, ρυθμίζουμε την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Οι πλασμιδιακοί φορείς pASK-IBA χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σε πειράματα γενετικής συμπληρωματικότητας κυττάρων EPEC όπου η πρωτεΐνη θέλαμε να εκφράζεται σε συγκεκριμένες ποσότητες και σε καθορισμένες χρονικές στιγμές.

4.5.3 Καθαρισμός His-πρωτεϊνών με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή, φέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους μια ειδική μικρή αμινοξική αλληλουχία που ονομάζεται απόληξη αναγνώρισης (tag) και είναι το ολιγοαμινοξύ His₆ ή polyHis. Η ουρά αυτή δίνει το τεράστιο πλεονέκτημα της εύκολης και επιλεκτικής απομόνωσης της πρωτεΐνης με χρήση της χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA. Η ρητίνη που χρησιμοποιείται στον καθαρισμό, περιέχει αγαρόζη ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το νικέλιο μέσω του νιτριλο-τριοξικού οξέως (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης υποκαταστάτη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος Ni²⁺, αφήνοντας δυο θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με τον εξαϊστιδυλικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών. Έτσι, τρία ιόντα Ni²⁺ αντιστοιχούν σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 6 ιστιδίνες σε ένα από τα άκρα του. Η ρητίνη χρωματογραφίας θα κρατήσει μόνο την πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο, η οποία μπορεί να απομονωθεί με πλύση της ρητίνης με ιμιδαζόλιο.

4.5.3.1 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρήση αλατιού

Επιδεκτικά JM109 (DE-3) pLys S κύτταρα μετασχηματίζονται με πλασμιδιακούς φορείς, που περιέχουν το γονίδιο της επιθυμητής πρωτεΐνης συζευγμένο με μια ετικέτα 6 ιστιδινών. Επιλέγονται μερικές αποικίες για εμβολιασμό 50ml LB (συν το κατάλληλο αντιβιοτικό) και αυτή η προκαλλιέργεια μεγαλώνει στους 37°C όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα, εμβολιάζουμε 15-30 λίτρα LB (συν αντιβιοτικό) με προκαλλιέργεια, σε αραιώση 1:50, και η καλλιέργεια αφήνεται στους 30°C να μεγαλώσει. Όταν, η $OD_{600} = 0,5$ γίνεται επαγωγή πρωτεΐνης με IPTG για τρεις ώρες. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (5,500rpm, 15min, 4°C) και αποθηκεύονται στους -20°C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται στο cold room σε Buffer A (50mM Tris-HCl pH 8.0, 1M NaCl, 10% glycerol) υπό ανάδευση. Όταν διαλυθεί καλά προστίθεται 2mM PMSF, 5μg/ml DNase, 5mM $MgCl_2$. Παράλληλα, γίνεται εξισορρόπηση της κολώνας νικελίου με Buffer A συν 40mM ιμιδαζόλιο. Η διαλυμένη κυτταρική πάστα υποβάλλεται σε υπερήχους για 30 λεπτά με τη βοήθεια λουτρού αιθανόλης- ξηρού πάγου ώστε να διατηρηθούν χαμηλές θερμοκρασίες. Το δείγμα φυγοκεντρείται (100,000g, 30min, 4°C) για το διαχωρισμό υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών από άσπαστα κύτταρα και μεμβρανικά υπολείμματα. Η απομόνωση της πρωτεΐνης θα λάβει χώρα στο cold room. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης φορτώνεται στην κολώνα νικελίου με 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη και τρέχει αργά με τη χρήση ειδικής βελόνας. Συλλέγουμε το δείγμα που πέρασε από την κολώνα (flow through) και ξεπλένουμε την κολώνα με Buffer A (συν 40 mM ιμιδαζόλιο) και με Buffer B (50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10% glycerol, 40mM imidazol). Η έκλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με Buffer B (συν 600mM ιμιδαζόλιο) σε κλάσματα μισού όγκου κολώνας το καθένα. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που περιέχουν πρωτεΐνη ενώνονται και συμπυκνώνονται (3000g, 4°C) σε falcon (MW cut off 3000Da) . Ο όγκος του δείγματος μειώνεται στα 5ml και η συγκέντρωση πρωτεΐνης ποσοτικοποιείται με Bradford. Πριν προχωρήσουμε, ελέγχουμε το αποτέλεσμα του καθαρισμού με SDS-PAGE, όπου φορτώνονται δείγματα από κάθε στάδιο του καθαρισμού. Εφόσον, υπάρχει πρωτεΐνη προχωράμε σε διαπίδυση του δείγματος ενάντια στο Buffer B (χωρίς ιμιδαζόλιο) όλη τη νύχτα, υπό ανάδευση. Μετά τη διαπίδυση το δείγμα φυγοκεντρείται (13.000rpm, 35min, 4°C) για να φύγουν τυχόν συσσωματώματα πρωτεΐνης και άλατα. Η περίσσεια της

πρωτεΐνης παραμένει διαλυτή και καθαρή. Τέλος η πρωτεΐνη αποθηκεύεται σε 50% γλυκερόλη μετά από διαπίδυση και φυλάσσεται στους -20°C .

4.5.3.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών σε εγγενείς συνθήκες

Επιδεκτικά κύτταρα EPEC που στερούνται ενός γονιδίου μετασηματίζονται με πλασμιδιακούς φορείς pASK IBA που περιέχουν το γονίδιο αυτό μαζί με ετικέτα 6 ιστιδινών. Καλλιέργεια βακτηρίων εμβολιάζεται και επώάζεται στους 37°C μέχρι η $\text{OD}_{600}=0.3$. Τότε προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα άνυδρης τετρακυκλίνης στην καλλιέργεια και η σύνθεση της πρωτεΐνης ξεκινά. Μετά από τρεις ώρες επαγωγής, τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση ($4.500\text{g}/15\text{min}/4^{\circ}\text{C}$) και επαναδιαλυτοποιούνται σε BufferA (50mM Tris/HCl pH 8.0, 20mM KCl). Στο κυτταρικό διάλυμα προστίθεται 5mM PMSF που είναι αναστολέας πρωτεασών. Τα κύτταρα σπάνε με ηχοβολισμό (sonication) με τη βοήθεια λουτρού αιθανόλης-ξηρού πάγου. Το δείγμα φυγοκεντρείται (250.000g , 60min, 4°C) για την απομάκρυνση μεμβρανικών θραυσμάτων και άσπαστων κυττάρων. Το υπερκείμενο φορτώνεται σε κολώνα Ni^{2+} -NTA, η οποία έχει εξισορροπηθεί με 10 όγκους BufferB (50mM Tris/HCl pH 8.0, 20mM KCl). Συλλέγουμε το υλικό που περνά από την κολώνα (flow through) και ξεπλένουμε την κολώνα με 20 όγκους BufferB. Τελικά, η πρωτεΐνη εκλύεται με 3 όγκους BufferB στο οποίο προστέθηκε 600mM ιμιδαζόλιο. Το κλάσμα της έκλυσης συγκεντρώνεται και φορτώνεται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα για ανάλυση των πρωτεϊνών που περιέχει.

4.5.4 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Για τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης που περιέχει διάφορες προσμίξεις εφαρμόζεται χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Η πρωτεΐνη φορτώνεται σε μια στήλη που περιέχει ισχυρό ανιοντοανταλλάκτη (Q column) και αλληλεπιδρά με αυτόν σύμφωνα με το φορτίο της. Η κολώνα έχει εξισορροπηθεί με BufferA (100mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol). Η πρωτεΐνη φορτώνεται στην κολώνα και αφήνεται να περάσει αργά με τη βοήθεια βελόνας. Συλλέγουμε το υλικό που διέρχεται από την κολώνα (flow through). Ακολουθεί ξέπλυμα της κολώνας με 20 όγκους BufferA (100mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol) και συλλογή του διαλύματος που περνά την κολώνα.

Έπειτα, η κολώνα ξεπλένεται με BufferB (125mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol) και συλλέγεται το wash. Ακολουθούν ξεπλύματα της κολώνας με διαλύματα αυξανόμενης ιοντικής ισχύος και συλλογή κάθε φορά των διαλυμάτων (washes). Συγκεκριμένα, ξεπλύματα γίνονται με BufferC (150mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol), BufferD (200mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol), BufferE (250mM NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol) και BufferG (1M NaCl, 50mM Tris, 10% glycerol). Τα διαλύματα που πέρασαν από την κολώνα (flow through, washes) συγκεντρώνονται και ελέγχονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

4.5.5 Απομόνωση πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τρυψινόλυση

Οι μάντες που περιέχουν πρωτεΐνες ενδιαφέροντος κόβονται και στη συνέχεια τεμαχίζονται σε μικρότερα κομμάτια. Τα κομμάτια αυτά μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 1.5ml. Έπειτα, τα κομμάτια του πηκτώματος ξεπλένονται με 50% acetonitril για 15 λεπτά και με 50mM ammonium bicarbonate (ABS) για ακόμα 15 λεπτά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές μέχρι να ξεβάψουν καλά όλα τα κομμάτια του πηκτώματος. Στη συνέχεια, προστίθεται 10mM DTT, για 45λεπτά, στους 56°C για να επιτευχθεί αναγωγή των κυστεϊνών. Ακολούθως, προστίθεται 55mM Iodacetamide, για 45 λεπτά, με ανακίνηση στο σκοτάδι προκειμένου να αλκυλιωθούν οι ελεύθερες κυστεΐνες. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των κομματιών του πηκτώματος με 50mM ammonium bicarbonate (ABS) και 50% acetonitril για 15 λεπτά η καθεμιά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Οι πρωτεΐνες επιάζονται με συγκεκριμένη ποσότητα τρυψίνης, για 12-15 ώρες στους 37°C. Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρούς σωλήνες LoBind Eppendorf. Τα κομμάτια του πηκτώματος ξεπλένονται με Nanopure H₂O για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στους σωλήνες LoBind Eppendorf. Ακολουθούν δυο ξεπλύματα των κομματιών με 50% acetonitril και 0.1% TFA/50% acetonitrile για 20 λεπτά το καθένα υπό ανάδευση. Το υπερκείμενο από κάθε βήμα μεταφέρεται στους σωλήνες LoBind Eppendorf, όπου εκεί μαζεύονται όλα τα κομμένα πεπτίδια. Το δείγμα λυοφιλοποιείται σε Speed Vac και φυλάσσεται στους -20°C.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Frankel, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30, 911-21 (1998)
- 2) DeVinney, R. Enteropathogenic *Escherichia coli*: cellular harassment. *Microbiol* 1999, 2: 83-88
- 3) Nataro, P.J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiol* 1998, 142-201
- 4) Moraes, F.T. Piecing together the Type III injectisome of bacterial pathogens. *Structural Biology* 2008, 18:258-266
- 5) Galan, E.J. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. 2006 nature05272
- 6) De Vinney, R. Enteropathogenic *E. coli*: A pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Lif Scien* 55, 961-76 (1999)
- 7) Abe, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Biotech lab* 1999
- 8) Chen, L. Structural instability as a regulatory mechanism in protein- protein interactions. *Mol Cell* 44, 734-744, 2011
- 9) Yip, C. Structural characterization of a t3ss filament protein in complex with its chaperone, *Nature structural ad molecular biology*, 12, 2005
- 10) Cornelis, G.R. Type III Secretion: More systems than you think. *Int Physiol* 2005
- 11) Izore, T. Biogenesis, Regulation and Targeting of the Type III Secretion System. *Struct* 19, May 2011
- 12) Thomas, N.A. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor for required for the efficient type III secretion of both LEE and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *E.coli*. *Mol Micr* (2005) 57(6), 1762-1779
- 13) Knutton, S. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *E.coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO Journal* Vol 17 1998
- 14) Fujji, T. Structure of a type III secretion needle at 7-Å resolution provides insights into its assembly and signaling mechanisms. *PNAS* Vol 109 4461-4466
- 15) Cornelis, G.R. The type III secretion system tip complex and translocon. *Molecular Microbiology* (2008) 68, 1085-1095