ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$ ΑΠΟ ΤΟ ΤΥΠΟΥ ΙΙΙ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ *Pseudomonas syringae*

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Ε. ΦΑΔΟΥΛΟΓΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών,
Τμήμα Βιολογίας

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας,
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας

Φεβρουάριος 2004

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΔΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$ ΑΠΟ ΤΟ ΤΥΠΟΥ ΙΙΙ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΗΣ *Pseudomonas syringae*

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής είναι η δομική μελέτη της πρωτεΐνης $HrcQ_B$ από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Έμφαση δόθηκε στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (79 κατάλοιπα) στο οποίο εντοπίζεται υψηλή αμινοξική συντήρηση με ομόλογες από άλλα φύτο- και ζωοπαθογόνα. Η πρωτεΐνη αποτελεί συντηρημένο μέλος της τύπου ΙΙΙ εκκριτικής μηχανής των Gram-αρνητικών βακτηρίων ενώ ομόλογες πρωτεΐνες συμμετέχουν επίσης στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου. Για τον προσδιορισμό της δομής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

Αρχικά, η πλήρους μήκους $HrcQ_B$ απομονώθηκε από κύτταρα *Escherichia coli* που την υπερέκφραζαν. Γρήγορα διαπιστώθηκε ότι είναι ένα μόριο ιδιαίτερα ευαίσθητο σε πρωτεόλυση. Προσπάθειες για τη βελτιστοποίηση της πορείας απομόνωσης κατέληξαν σε ένα σχήμα καθαρισμού που απέδιδε σχετικά σταθερό και καθαρό προϊόν. Παρόλα αυτά, όλες οι προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης απέβησαν άκαρπες.

Στη συνέχεια, η προσοχή μας εστιάστηκε στα 79 κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου ($HrcQ_B$-C) στα οποία συγκεντρώνονται υψηλές ομοιότητες με τις άλλες ομόλογες πρωτεΐνες. Η $HrcQ_B$-C που είναι

ιδιαίτερα σταθερό μόριο, κρυστάλλωσε με τη μέθοδο διάχυσης ατμών από MPD και $Mg(AcO)_2$. Οι κρύσταλλοι είχαν σχήμα λεπτής πλάκας και οι περισσότεροι από αυτούς παρουσίαζαν ανωμαλίες στο κρυσταλλικό τους πλέγμα όπως έγινε αντιληπτό από τα προβληματικά διαγράμματα περίθλασης που παρήγαγαν. Προσπάθειες να βελτιωθεί η ποιότητα αυτών των κρυστάλλων ή να βρεθούν άλλες συνθήκες κρυστάλλωσης ήταν ανεπιτυχείς.

Οι κακής ποιότητας κρύσταλλοι δυσχέρηναν την επίλυση του προβλήματος των φάσεων. Η εύρεση χρήσιμου παραγώγου βαρέως μετάλλου στάθηκε αδύνατη ενώ η τεχνική Multiple Anomalous Diffraction (MAD) κατέληξε σε επιτυχία μόνο μετά τη μετάλλαξη μιας λευκίνης στο εσωτερικό της δομής σε μεθειονίνη και την εν συνεχεία υποκατάσταση της μεθειονίνης από σεληνομεθειονίνη. Το υποκατεστημένο μετάλλαγμα απομονώθηκε και κρυστάλλωσε χωρίς σημαντικές αποκλίσεις από το φυσικό μόριο. Η δομή προσδιορίστηκε από ένα σύνολο δεδομένων που συλλέχτηκε σε τρία μήκη κύματος, στην περιοχή του μεγίστου απορρόφησης του σεληνίου και βελτιστοποιήθηκε μέχρι τη διακριτικότητα των 2.3 Å.

Η κρυσταλλική δομή της $HrcQ_B$-C είναι ένα επίμηκες, ελαφρά κυρτωμένο ομοτετραμερές με κύριο στοιχείο δευτεροταγούς δομής την β-πτυχωτή επιφάνεια. Τα τέσσερα μονομερή συναθροίζονται σε δύο διμερή που πακετάρονται μαζί και σχηματίζουν ένα διμερές διμερών. Το τετραμερές σταθεροποιείται με αρκετούς δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, το σχετικά μεγάλο εμβαδό της μεσεπιφάνειας μεταξύ των διμερών (~1200 $Å^2$) και η συμφωνία της υδροδυναμικής ακτίνας της $HrcQ_B$-C σε διάλυμα -όπως εκτιμήθηκε από χρωματογραφία μοριακής διήθησης- με την υδροδυναμική ακτίνα που υπολογίζεται για το τετραμερές, φαίνεται να υποστηρίζουν την άποψη ότι το τετραμερές είναι το βιολογικά ενεργό μόριο. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η κατανομή των συντηρημένων

αμινοξέων στην επιφάνεια της δομής είναι πολωμένη με την πλειοψηφία τους να συγκεντρώνεται στην κοίλη πλευρά του τετραμερούς.

Τέλος, οι αναλογίες ανάμεσα στην $HrcQ_B$-C και την πρωτεΐνη FliN του μαστιγίου φαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η $HrcQ_B$-C συμμετέχει σε μια υπερμοριακή δομή σχήματος δακτυλίου ανάλογη του κυτταροπλασματικού δακτυλίου στον οποίο έχει δειχτεί ότι συμμετέχει η FliN. Στο πλαίσιο αυτό διερευνούμε πιθανούς τρόπους διευθέτησης των μορίων της $HrcQ_B$-C που να οδηγούν σε μια τέτοια δομή.

SUMMARY

STRUCTURAL STUDIES OF THE $HrcQ_B$ PROTEIN FROM THE TYPE III SECRETION SYSTEM OF *Pseudomonas syringae*

The subject of this work is the structural study of the $HrcQ_B$ protein from the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. Interestingly, high sequence conservations between the $HrcQ_B$ and homologues from plant and animal pathogens are concentrated at the carboxy-terminal part (79 residues) where our crystallographic study focused. $HrcQ_B$ is a conserved component of the type III secretion apparatus in Gram-negative bacteria with homologous proteins participating in the export mechanism for the flagellum assembly. The method of X-ray crystallography was used for structure determination.

Initially, the full length $HrcQ_B$ protein, overexressed in *Escherichia coli* cells, was purified by chromatography. The molecule was very sensitive to proteolysis even in the presence of protein inhibitors at low temperatures. After the optimization of the purification scheme, stable and pure protein was produced. However, all the crystallization attempts were unsuccessful.

Subsequently, we focused on the 79 residues of the C-terminal region ($HrcQ_B$-C) where significant similarities with the homologous proteins are observed. The $HrcQ_B$-C is a stable molecule and was crystallized with the vapour diffusion method from MPD and $Mg(AcO)_2$. The crystals

were thin plates and most of them exhibited crystal lattice defects that were reflected in the diffraction patterns. All attempts for optimizing the crystals' quality or finding another crystal form remained unsuccessful.

The bad quality of the majority of the crystals made the solution of the phase problem difficult. We did not find any useful isomorphous heavy atom derivative while the Multiple Anomalous Diffraction technique (MAD) was successful only after the mutation of a leucine in the protein interior to a methionine and then substitution of this methionine by selenomethionine. The substituted mutant was isolated and crystallized without significant deviations from the corresponding conditions of the native protein. The structure was determined from three data sets which were collected at three wavelengths around the absorption edge of selenium and was refined to 2.3 Å resolution.

$HrcQ_B$-C is an elongated, gently curved homotetramer which can be characterized as an overwhelmingly beta structure. The four monomers assemble into two tightly bound homodimers which are packed together to form a dimer of dimers. There are three indications which support that the tetramer is the biologically relevant molecule: (i) A relatively large, total surface area (~1200 $Å^2$) is buried upon tetramer formation via dimer-association. (ii) The tetramer is stabilized by several hydrogen bonds. (iii) The Stokes radius of the protein in solution which was estimated by size exclusion chromatography is in excellent agreement with the value calculated from the crystal structure of the whole tetramer. It is worth noting that the distribution of the conserved residues on the molecular surface is markedly asymmetric, with the majority of them being concentrated on the concave side of the tetramer

The striking analogies between $HrcQ_B$ and its flagellum homologous FliN protein may support the hypothesis that $HrcQ_B$ participates in the formation of a C-ring like assembly.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **I**

SUMMARY **IV**

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ **VII**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ **X**

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ **XIII**

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ **1**

1.1 Το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα στα βακτήρια 1
1.1.1 Μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης στα Gram-αρνητικά βακτήρια 1
1.1.2 Εισαγωγή στο τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα 2
1.1.3 Περιγραφή του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος 4
1.2 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$ – Το αντικείμενο της διατριβής 11
1.2.1 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$ 11
1.2.2 Το αντικείμενο της διατριβής 14
1.3 Από τον κρύσταλλο στη δομή: κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ 15
1.3.1 Κρύσταλλος 15
1.3.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών 16
1.3.3 Περίθλαση ακτίνων Χ 18
1.3.4 Από τη σταγόνα κρυστάλλωσης στις ακτίνες Χ 19

Κεφάλαιο 2

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ

ΤΗΣ ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$ **22**

2.1 Εισαγωγή 22
2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης $HrcQ_B$ 23
2.2.1 Παραγωγή πρωτεΐνης 23
2.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου 23
2.2.3 Αρχικό σχήμα καθαρισμού της 10His-$HrcQ_B$: προβλήματα πρωτεόλυσης 24
2.2.4 Βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού: παραγωγή σταθερής πρωτεΐνης 25
2.2.5 Απομάκρυνση της αλληλουχίας των ιστιδινών από το δείγμα 30
2.3 Προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης $HrcQ_B$ 35
2.3.1 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης 35
2.3.2 Αποτελέσματα των πειραμάτων κρυστάλλωσης 36
2.4 Σχεδιασμός ενός νέου μορίου 38

Κεφάλαιο 3

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$-C 41

3.1 Υπερέκφραση και παραγωγή της $HrcQ_B$-C 41
3.2 Ισχύς πρόσδεσης της $HrcQ_B$-C σε στήλη Ni-NTA 49
3.3 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών απομάκρυνσης της ουράς ιστιδινών 51
3.4 Καθαρισμός και ταυτοποίηση της $HrcQ_B$-C 57
3.4.1 Σχήμα καθαρισμού 57
3.4.2 Ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος 59
3.5 Κρυστάλλωση της $HrcQ_B$-C 64
3.6 Προσπάθειες βελτίωσης των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C 71

Κεφάλαιο 4

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ 74

4.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ από κρύσταλλο της φυσικής $HrcQ_B$-C 74
4.1.1 Αρχικά πειράματα 74
4.1.2 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων 78
4.2 Υπολογισμός της συνάρτηση Patterson με τα δεδομένα της φυσικής $HrcQ_B$-C 83
4.3 Υπολογισμός της συνάρτηση αυτοπεριστροφής με τα δεδομένα της φυσικής $HrcQ_B$-C 86
4.4 Δεδομένα από βιοφυσικές μεθόδους 89
4.4.1 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός με κυκλικό διχρωισμό (CD) 89
4.4.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός με FTIR 91

Κεφάλαιο 5

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C ΜΕ ΣΕΛΗΝΟ-ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ 95

5.1 Εισαγωγή 95
5.1.1 Το πρόβλημα των φάσεων και η επίλυση του 95
5.1.2 Προσδιορισμός φάσεων με την τεχνική της ανώμαλης σκέδασης σε πολλαπλά μήκη κύματος (MAD) 96
5.2 Προσπάθειες δημιουργίας παράγωγων κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C με βαριά μέταλλα 98
5.3 Δημιουργία παραγώγου σεληνο-μεθειονίνης της $HrcQ_B$-C 106
5.3.1 Κλωνοποίηση της $HrcQ_B$-C σε met^- κύτταρα 107
5.3.2 Παραγωγή, καθαρισμός και κρυστάλλωση της SeMet-$HrcQ_B$-C 109
5.3.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης 115
5.4 Το μετάλλαγμα L28M της $HrcQ_B$-C. Δημιουργία παραγώγου σεληνο-μεθειονίνης αυτού του μεταλλάγματος 121
5.4.1 Το μετάλλαγμα L28M της $HrcQ_B$-C 122
5.4.2 Παραγωγή, καθαρισμός και κρυστάλλωση της SeMet-L28M 123

Κεφάλαιο 6

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ

ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C **125**

6.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης ... 125
6.2 Προσδιορισμός της θέσης των σεληνίων ... 129
6.3 Υπολογισμός αρχικών φάσεων και βελτιστοποίηση τους ... 137
6.3.1 Τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας ... 137
6.3.2 Συνδυασμός φάσεων ... 139
6.3.3 Υπολογισμός και βελτιστοποίηση φάσεων για τη δομή της $HrcQ_B$-C ... 139
6.4 Κατασκευή αρχικού ατομικού μοντέλου και βελτιστοποίηση του ... 140
6.4.1 Κατασκευή και βελτιστοποίηση του ατομικού μοντέλου της $HrcQ_B$-C ... 143
6.5 Έλεγχος της ποιότητας του τελικού ατομικού μοντέλου ... 145

Κεφάλαιο 7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C **150**

7.1 Σύντομη παρουσίαση της δομής της πρωτεΐνης $HrcQ_B$-C ... 150
7.2 Περιγραφή και ανάλυση της δομής ... 153
7.3 Σύγκριση της δομής με προβλέψεις ... 160
7.4 Πακετάρισμα των μορίων στον κρύσταλλο και πώς η δομή ερμηνεύει τη συνάρτηση αυτοπεριστροφής ... 162

Κεφάλαιο 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ **166**

8.1 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$, συστατικό του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού ... 166
8.2 Εντοπισμός πιθανών λειτουργικών περιοχών της $HrcQ_B$-C ... 168
8.3 Μοντέλα για το σχηματισμό υπερμοριακών δομών της $HrcQ_B$-C ... 171
8.4 Η κρυσταλλική δομή της FliN ... 177
8.5 Συμπεράσματα και προοπτικές ... 178

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α **181**

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β **192**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **195**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μακρομοριακών Δομών του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) υπό την επίβλεψη του καθηγητή Μ. Κοκκινίδη με την οικονομική υποστήριξη του IMBB. Η εκμάθηση της τεχνικής MAD και ένα μικρό μέρος των πειραμάτων έγιναν στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου του Leeds και του Astbury Centre for Structural Molecular Biology υπό την επίβλεψη του καθηγητή S. E. V. Phillips με την υποστήριξη του ευρωπαϊκού προγράμματος υποτροφιών Marie Curie. Τέλος, στο επιτυχές αποτέλεσμα της εργασίας συνετέλεσε η συνεργασία και συνεχής αλληλεπίδραση με το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό τον καθηγητή Ν. Πανόπουλο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Μ. Κοκκίνιδη για τη συνεχή επιστημονική του παρουσία, τη διαρκή υποστήριξη της διατριβής μου και τις καθοριστικές και εύστοχες παρεμβάσεις του στο σχεδιασμό των πειραμάτων. Τον ευχαριστώ επίσης για τη φροντίδα που έδειξε στην εκπαίδευση και κατάρτιση μου και για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχε απουσία της οποίας θα ήταν ιδιαίτερα επίπονη η ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ευχαριστώ επίσης:

Την Dr. A. Ashcroft που κατέγραψε τα φάσματα μάζας από δείγματα της πρωτεΐνης $HrcQ_B$-C και SeMet-$HrcQ_B$-C.

Τον Dr A. Berry για τη βοήθεια του στην καταγραφή και ανάλυση των φασμάτων FTIR των $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C.

Τον Dr. N. Γλυκό για την αδιάκοπη επιστημονική καθοδήγηση και το ενδιαφέρον του στην εκπαίδευση και κατάρτιση μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συνεχή ενθάρρυνση, την κατανόηση και την αμέριστη ηθική του υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας.

Τον Dr. J. Hadden που μου έμαθε την τεχνική MAD και με συνόδευσε στο συγχροτρόνιο του ESRF για την πρώτη μου συλλογή MAD δεδομένων περίθλασης.

Τον Dr. J. Keen για την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του N- και C-τελικού άκρου της $HrcQ_B$-C.

Την κ. Κοτσιφάκη που πρόθυμα προσέφερε τη βοήθεια της κάθε φορά που της ζητήθηκε. Ιδιαίτερα την ευχαριστώ για τη βοήθεια της με τους καθαρισμούς και τις κρυσταλλώσεις της $HrcQ_B$-C και της SeMet-$HrcQ_B$-C.

Την κ. Μ. Μπαστάκη για τη πλασμιδιακή κατασκευή της L28M-$HrcQ_B$-C.

Τον καθηγητή Ν. Πανόπουλο για το συνεχές ενδιαφέρον του στο θέμα της διατριβής μου. Τον ευχαριστώ επίσης για τις αρχικές διορθώσεις του στο εισαγωγικό κεφάλαιο αυτού του κειμένου πριν υποβληθεί για διόρθωση στην υπόλοιπη επταμελή.

Τον Prof. S.E.V. Phillips που με την προσωπική του παρέμβαση μου έδωσε πρόσβαση σε όλες τις εγκαταστάσεις του Πανεπιστημίου του Leeds και του Astbury Centre και έτσι η ολιγόχρονη παραμονή μου εκεί έγινε αποδοτική.

Τον ερευνητή του IMBB Dr. K. Πετράτο για τα σχόλια, τις παρατηρήσεις και τις διορθώσεις του στο κείμενο της διατριβής.

Την Prof. S. Radford για τη βοήθεια της στην καταγραφή και ανάλυση των CD φασμάτων της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C.

Τη Δρ. Α. Ταμπακάκη για τις πλασμιδιακές κατασκευές της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C.

Τον Dr. C. Trinh για τη βοήθεια του στη συλλογή δεδομένων περίθλασης από την SeMet-$HrcQ_B$-C στο συγχροτρόνιο του ESRF.

Τον Dr. P. Tucker για την καθοριστικής σημασίας βοήθεια του στη συλλογή των δεδομένων περίθλασης στο συγχροτρόνιο του DESY, από τα οποία επιλύθηκε το πρόβλημα των φάσεων.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής: τον επίκουρο καθηγητή Β. Γαλανόπουλο, τον καθηγητή Η. Ηλιόπουλο, τον καθηγητή Β. Μπουριώτη, τον επίκουρο καθηγητή Α. Οικονόμου και τον καθηγητή Ι. Παπαματθαιάκη για τα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους στο κείμενο της διατριβής.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μακρομοριακών δομών για το φιλικό περιβάλλον και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την κατανόηση, τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AS .....Ammonium sulfate
Bis-tris .....[Bis-(2-hydroxyethyl)imino]-tris-[(hydroxymethyl)methane]
DMSO .....Dimethylsulphoxide
DTT .....Dithiothreitol
E. coli.....*Escherichia coli*
ECEP .....Escherichia coli enterohemorrhagic
HR .....Hypersensitive Response
IEF.....Isoelectric focusing
IPTG .....IsoPropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
LB .....Luria Broth
MAD .....Multiwavelength Anomalous Dispersion
MES.....2-(N-morpholino) ethanesulphonic acid
MIR .....Multiple Isomorphous Replacement
MPD.....2-methyl 2,4-pentanediol
Ni-NTA .....Nickel-Nitrilotriacetic acid
OD.....Optical Density
PAGE .....Poly-Acrylamide Gel Electrophoreis
PEG.....Polyethylene glycol
PMSF .....Phenylmethylsulfonyl fluoride
SDS-PAGE.....Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Se.....Σελήνιο
SeMet.....Σεληνο-μεθειονίνη
Tris.....Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

Κ ε φ ά λ α ι ο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μοῦσαι Πιερίηθεν, ἀοιδῆσι κλείουσαι,
δεῦτε, Δί' ἐννέπετε σφέτερον πατέρ' ὑμνείουσαι.

Ησίοδος, ' Έργα και Ημέρες'

Το κεφάλαιο της εισαγωγής διαρθρώνεται σε τρεις ενότητες. Στην πρώτη, περιγράφεται το βιολογικό σύστημα στο οποίο ανήκει η πρωτεΐνη που αποτέλεσε αντικείμενο αυτής της εργασίας. Στη δεύτερη, δίνονται πληροφορίες για την ίδια την πρωτεΐνη και οριοθετούνται τα πλαίσια της διατριβής. Στην τελευταία ενότητα που είναι θεματικά ανεξάρτητη από τις προηγούμενες, παρουσιάζεται μια σύνοψη των βασικών αρχών της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την προσέγγιση του θέματος, δηλαδή της κρυστάλλωσης βιολογικών μακρομορίων και της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

1.1 Το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα στα βακτήρια

1.1.1 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 ΙΙ 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 (Economou 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 Ι και ΙΙΙ μονοπάτια η έκκριση είναι μια συνεχόμενη πορεία χωρίς διακριτό περιπλασμικό ενδιάμεσο. Το τύπου Ι εκκριτικό μονοπάτι είναι ιδιαίτερα απλό αφού περιλαμβάνει μόνο τρεις πρωτεΐνες. Αντίθετα, το τύπου ΙΙΙ είναι ένας πολύπλοκος μηχανισμός για τη λειτουργία του οποίου απαιτείται η ενορχηστρωμένη δράση μιας πλειάδας πρωτεϊνών (Alfano & Collmer 1997, Baker 1997, He 1997, Hueck 1998, Cornelis & Gijsegem 2000, Büttner & Bonas 2002, Cornelis 2002).

1.1.2 Εισαγωγή στο τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα

Το τύπου ΙΙΙ 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 ΙΙΙ 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 συντήρησης τους σε όλα τα

παθογόνα βακτήρια που διαθέτουν τύπου ΙΙΙ 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 συντήρηση τους υποδηλώνει παρόμοιους μηχανισμούς μεταξύ της τύπου ΙΙΙ-εξαρτώμενης πρωτεϊνικής έκκρισης και της πορείας βιογένεσης του μαστιγίου. Όπως θα αναφερθεί αναλυτικά στη συνέχεια, η αρχική αυτή υπόθεση επιβεβαιώνεται από πρόσφατα πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται ότι η τύπου ΙΙΙ εκκριτική μηχανή των ζωοπαθογόνων έχει αξιοσημείωτες μορφολογικές ομοιότητες με το βασικό σώμα του μαστιγίου.

Στις υψηλές ομοιότητες, σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, ανάμεσα στα συστατικά του πυρήνα της εκκριτικής μηχανής όλων των τύπου ΙΙΙ 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).

Σχετικά πρόσφατα αναφέρθηκε ότι εκτός από τα παθογόνα βακτήρια ορισμένοι συμβιωτικοί οργανισμοί διαθέτουν γονίδια που σε επίπεδο αλληλουχίας εμφανίζουν υψηλές ομοιότητες με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του τύπου ΙΙΙ μηχανισμού. Τα προϊόντα αυτών των γονιδίων πιθανολογείται ότι διευκολύνουν την αποίκιση του ξενιστή (Marie *et al.* 2001, Dale *et al.* 2002).

Μερικές από τις ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τον τύπου ΙΙΙ εκκριτικό μηχανισμό είναι: (i) Η πλήρης ενεργοποίηση του μηχανισμού έκκρισης γίνεται μέσω επαφής του βακτηρίου με το 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. Τα σημεία (i) και (ii) συζητούνται στη συνέχεια ενώ το (iii) θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο.

Τουλάχιστον για τη *Yersinia* και τη *Shigella flexneri* έχει δειχτεί ότι ο τύπου ΙΙΙ-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 ΙΙΙ 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 ΙΙΙ 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). Σύμφωνα με το λεγόμενο ενοποιημένο μοντέλο οι παράγοντες αυτοί δρουν μόνοι τους ή σε συνδυασμούς ανάλογα με την περίπτωση. Στο πλαίσιο αυτό έχει προταθεί ότι πιθανόν να υπάρχει σχέση ανάμεσα στο ποιό είναι το εκκριτικό σήμα που ελέγχει την έκκριση κάποιου παράγοντα και του πότε είναι απαραίτητη η έκκριση αυτού του παράγοντα. Έτσι, πρωτεΐνες των οποίων η έκκριση είναι απαραίτητη στα πρώτα στάδια ενεργοποίησης του μηχανισμού παθογένειας πιθανό να βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός εκκριτικού σήματος που εδρεύει στην αμινοξική αλληλουχία τους ή/και στην αλληλεπίδρασης τους με την κατάλληλη βοηθητική πρωτεΐνη. Αντίθετα, η δομή του mRNA και η συγχρονισμένη μετάφραση/έκκριση μπορεί να σηματοδοτεί την έκκριση παραγόντων που εκκρίνονται σε μετέπειτα στάδια της πορείας (Lloyd *et al.* 2001).

1.1.3 Περιγραφή του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος

Το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει μια πλειάδα πρωτεϊνών που μπορούν να διακριθούν σε δομικές, εκκρινόμενες και βοηθητικές. Οι δομικές σχηματίζουν: (i) Το βασικό σώμα της εκκριτικής μηχανής που είναι μια υπερμοριακή δομή που διαπερνά τις 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 επίμηκης, 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.

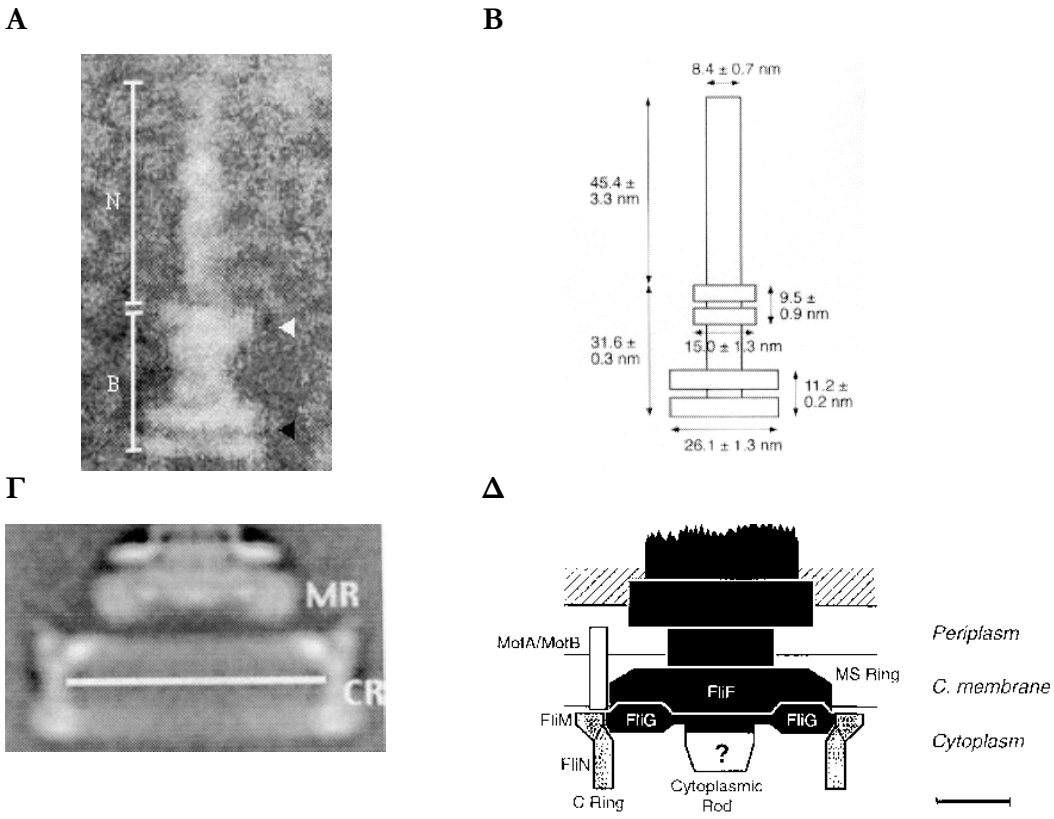
Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος αφού έχει δειχτεί ότι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση άλλων παραγόντων του συστήματος (π.χ. HrpA, Wei *et al.* 2000) ενώ σε ορισμένες πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς έχει αποδοθεί και τοξική δράση (π.χ. IpaB, SipB, Cornelis 2000). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες που δομούν την εξωκυττάρια προέκταση του βασικού σώματος αποτελούν και υποστρώματα του εκκριτικού μηχανισμού.

Εκκριτική μηχανή. 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. 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) και 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). Πρόκειται για μια κυλινδρική δομή (εικόνα 1.1Α και Β) 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 (εικόνα 1.1Γ και Δ) που ονομάζεται κυτταροπλασματικός δακτύλιος (Cytoplasmic ή C-ring, περισσότερες λεπτομέρειες για τη δομή αυτή αναφέρονται στη συνέχεια). Αντίστοιχα πειράματα που να αποκαλύπτουν τη δομή του βασικού σώματος φυτικών παθογόνων δεν έχουν αναφερθεί. Από τις πρωτεΐνες του βασικού σώματος είναι γνωστή σε υψηλή διακριτικότητα μόνο η δομή της καρβοξυτελικής υπομονάδας της πρωτεΐνης FliG του μαστιγίου (Lloyd *et al.* 1999, Brown *et al.* 2002).

Η προέκταση του βασικού σώματος της εκκριτικής συσκευής στον εξωκυττάριο χώρο είναι μια επίμηκης, 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 (flagellum,

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).



Εικόνα 1.1 Η εκκριτική μηχανή του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος. **(Α)** Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της τύπου ΙΙΙ 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. **(Γ)** Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μέρους του βασικού σώματος της μηχανής βιογένεσης του μαστιγίου. Με 'MR' σημειώνεται το ζεύγος δακτυλίων της εσωτερικής μεμβράνης και με 'CR' ο κυτταροπλασματικός δακτύλιος (C-ring). Η γραμμή αντιπροσωπεύει μήκος ίσο με 100 Å. **(Δ)** Σχηματικό μοντέλο του βασικού σώματος της μηχανής βιογένεσης του μαστιγίου. Οι

εικόνες (Α) και (Β) αναπαράχθηκαν από το άρθρο των Tamano *et al.* 2000. Η εικόνα (Γ) αναπαράχθηκε από το άρθρο των Thomas *et al.* 1999. Η εικόνα (Δ) αναπαράχθηκε από το άρθρο των Zhao *et al.* 1996.

Η εξακρίβωση του ρόλου του needle/pilus ως απλό εργαλείο προσκόλλησης στην επιφάνεια του ξενιστή ή ουσιαστικό 'εξάρτημα' της εκκριτικής συσκευής αποτέλεσε για χρόνια αντικείμενο διαμάχης και έρευνας. Έχει δειχτεί ότι οι δομές αυτές είναι απαραίτητες για την εκδήλωση παθογένειας και ότι η τύπου ΙΙΙ-ελεγχόμενη έκκριση γίνεται μόνο από ορισμένα σημεία του βακτηρίου που συμπίπτουν με την παρουσία τους στην επιφάνεια του βακτηρίου (He & Jin 2003). Πρόσφατα πειράματα δείχνουν ότι –τουλάχιστον το pilus- λειτουργεί ως αγωγός μεταφοράς των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και όχι ως απλός μηχανισμός ιχνηλάτισης του δρόμου προς τον ξενιστή (Jin *et al.* 2001, Jin & He 2001). Επιπλέον η έκκριση φαίνεται να γίνεται μόνο από το απομακρυσμένο –από τη βακτηριακή επιφάνεια- άκρο του που είναι και το σημείο από το οποίο επιμηκύνεται με την διαδοχική προσθήκη υπομονάδων (Li *et al.* 2002).

Μηχανισμός μεταφοράς στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Για να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή οι παράγοντες παθογένειας απαιτείται η καταστροφή της μεμβράνης του ξενιστή και η δημιουργία ενός πόρου μεταφοράς (translocon). Η διάνοιξη του πόρου αποδίδεται στις λεγόμενες πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς (translocators). Δύο τουλάχιστον από αυτές πιστεύεται ότι συναθροίζονται ως ολιγομερή και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο ικανό να καταστρέψει τη μεμβράνη του ξενιστή και να δημιουργήσει μια πύλη εισόδου για τους μολυσματικούς παράγοντες. Στα φυτοπαθογόνα η HrpF της *Xanthomonas* είναι η μόνη υποψήφια πρωτεΐνη-translocator (Büttner & Bonas 2002). Έτσι, ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου διάνοιξης/μεταφοράς αφορά προς το παρόν τα παθογόνα ζωικών κυττάρων με πιθανές υποψήφιες πρωτεΐνες τις YpoB/YopD (*Yersinia*), IpaB/IpaC (*Shigella*), EspB/EspD (*Escherichia coli*) και PopB/PopD (*P. Aeruginosa*). Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν υποστρώματα του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού, ότι έχουν προβλεπόμενες διαμεμβρανικές περιοχές, έχουν την ιδιότητα να ολιγομερίζονται, να αναγνωρίζουν μεμβράνες, να προσδένονται σε αυτές και να τις καταστρέφουν δημιουργώντας πόρους (Büttner & Bonas 2002, Schoehn *et al.* 2003).

Σαπερόνες. Η αποτελεσματική τύπου ΙΙΙ έκκριση εξαρτάται από την παρουσία και δράση μιας ομάδας κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που ονομάζονται βοηθητικές (chaperones,

σαπερόνες, Galán & Collmer 1999, Feldman & Cornelis 2003). Οι πρωτεΐνες αυτές που έχουν σχετικά μικρό μέγεθος και μικρή τιμή ισοηλεκτρικού σημείου, αναγνωρίζουν με μεγάλη ειδικότητα το υπόστρωμα τους που είναι οι παθογόνοι παράγοντες και οι πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς. Συχνά το γονίδιο που τις εκφράζει βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο του υποστρώματος τους. Πρόσφατα προτάθηκε ο διαχωρισμός τους σε δύο κύριες ομάδες ανάλογα με το αν είναι σαπερόνες παθογόνων παραγόντων ή πρωτεϊνών διάνοιξης/μεταφοράς (Pallen *et al.* 2003). Ο διαχωρισμός αυτός βασίστηκε στην παρατήρηση ότι η πρώτη κατηγορία φαίνεται να μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με ευκαρυωτικές σαπερόνες ενώ η δεύτερη όχι. Επιπλέον οι σαπερόνες μολυσματικών παραγόντων προβλέπεται να έχουν μικτή άλφα-βήτα δομή ενώ για τις σαπερόνες των πρωτεϊνών διάνοιξης/μεταφοράς προβλέπεται μια πλήρως άλφα-δομή. Μέχρι τώρα έχουν προσδιοριστεί δομές σαπερονών του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού από ζωικά παθογόνα που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία π.χ. CesT από την εντεροαιμορραγική (enterohemorrhagic) *E. coli* και SigE από τη *S. enterica* (Luo *et al.* 2001), SycE από τη *Y. pestis* (Birtalan 2001, Evdokimov 2002). Όλες αυτές οι σαπερόνες έχουν μικτή άλφα-βήτα δομή ενώ είναι αξιοσημείωτη η τρισδιάστατη ομοιότητα τους που γίνεται πιο ενδιαφέρουσα λόγω της απουσίας ομολογιών σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Έχει επίσης προσδιοριστεί η δομή της FliS του βακτηριακού μαστιγίου (Evdokimov *et al.* 2003). Η FliS που είναι σαπερόνη της πρωτεΐνης που δομεί το μαστίγιο (flagellin) είναι ένα α-ελικοειδές δεμάτι. Αν και δεν εμπίπτει σε καμιά από τις κατηγορίες που αναφέρονται παραπάνω η δομή της φαίνεται να την κατατάσσει στη δεύτερη ομάδα.

Ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών αποδίδεται στις σαπερόνες (Hueck 1998): (i) Θεωρείται ότι σταθεροποιούν το υπόστρωμα τους εμποδίζοντας πρώιμες αλληλεπιδράσεις που θα οδηγούσαν σε συναθροίσεις και κατακρήμνιση. Ο ρόλος αυτός επιτυγχάνεται με το να καλύπτουν περιοχές του υποστρώματος που μπορούν να συμμετέχουν σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον πιστεύεται ότι δρουν στην προ-εκκριτική σταθεροποίηση των υποστρωμάτων τους εμποδίζοντας την πρωτεόλυση τους. (ii) Πιθανολογείται ότι στη δομή σαπερόνης-υποστρώματος εδρεύει ένα είδος τρισδιάστατου σήματος έκκρισης που αναγνωρίζεται από την εκκριτική μηχανή. Η υπόθεση αυτή διατυπώθηκε μετά την επίλυση της τρισδιάστατης δομής δύο συμπλόκων σαπερόνης-υποστρώματος, του Sic-Spt από τη *Salmonella* (Stebbins & Galán 2001) και του SycE-YopE από τη *Yersinia* (Birtalan *et al.* 2002). Οι δομές αυτές έχουν αναπάντεχες ομοιότητες που δεν προέρχονται από ομοιότητες στην αμινοξική αλληλουχία. Επιπλέον στις δομές αυτές το υπόστρωμα διατηρείται σε μια ημι-διπλωμένη κατάσταση που μάλλον φαίνεται απαραίτητη για τη διέλευση του μέσα από το μικρής διαμέτρου

βασικό σώμα και την εξωκυτταρική, κυλινδρική προέκταση. (iii) Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι σαπερόνες δίνουν ένα είδος προτεραιότητας στην έκκριση των υποστρωμάτων τους. (iv) Τέλος, έχει δειχτεί ότι πολλές από τις σαπερόνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων του συστήματος.

Μολυσματικοί παράγοντες και παθογένεια. Η οργάνωση του πολύπλοκου τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού έχει κυρίως ένα στόχο, τη μεταφορά και εναπόθεση τοξικών παραγόντων (effectors) στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Cornelis 2000, Collmer *et al.* 2002). Πρόκειται για πρωτεΐνες που δεν παρουσιάζουν αμινοξική ομολογία ανάμεσα στα διάφορα τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα αλλά εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και σε πολλές περιπτώσεις τους αποδίδεται ενζυμική ενεργότητα φωσφατάσης, κινάσης, τρανσφεράσης, κυκλάσης ή λιπάσης (Huek 1998, Sato *et al.* 2003). Οι κύριοι στόχοι αυτών των παραγόντων φαίνεται να είναι ο κυτταροσκελετός του ξενιστή και τα κυτταρικά σήματα με τελικό αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της άμυνας του. Για ορισμένους από αυτούς έχει δειχτεί ότι φτάνουν μέχρι τον πυρήνα του ξενιστή όπου πιθανόν εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του (Büttner & Bonas 2003). Στα πλαίσια της έρευνας για τη διευκρίνιση του ακριβούς ρόλου αυτών των παραγόντων προσδιορίστηκαν οι τρισδιάστατες δομές πολλών από αυτούς (Evdokimov *et al.* 2001, (YopM), Evdokimov *et al.* 2001 (N-τελικό άκρο της YopH), Smith *et al.* 2001, Evdokimov *et al.* 2002, Khandelwal *et al.* 2002, Tengel *et al.* 2002). Η πληροφορία που αντλήθηκε όμως δεν ήταν ανάλογη των προσδοκιών και πολλά από τα ερωτήματα που αφορούν το πώς αναγνωρίζονται από την εκκριτική μηχανή, με ποιά διαμόρφωση ταξιδεύουν προς το κύτταρο-δέκτη και πώς αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τους στόχους τους στο ξενιστή παραμένουν αναπάντητα. Στη συνέχεια αναφέρονται μερικά από τα γνωστότερα παθογόνα που χρησιμοποιούν το τύπου ΙΙΙ σύστημα για μόλυνση των ξενιστών τους, σκιαγραφείται ο τρόπος δράσης των αντίστοιχων μολυσματικών παραγόντων και τα συμπτώματα της μόλυνσης.

Μερικά από τα ζωο-παθογόνα που χρησιμοποιούν το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα για μόλυνση των ξενιστών τους ανήκουν στα γένη *Yersinia*, *Shigella* και *Salmonella* (Collazo & Galán 1997). Η *Y. pestis* προκαλεί πανούκλα (bubonic plague) με συμπτώματα βακτηριαιμία και νεκρωτικές και αιμορραγικές βλάβες σε πολλά όργανα που οδηγούν στο θάνατο εντός 2-3 ημερών από τη μόλυνση. Ανάλογα συμπτώματα προκαλούν οι *Y. enterocolitica* και *Y. pseudotuberculosis*. Η παθογένεια της *Yersinia* εντοπίζεται στην ικανότητα της να αντιστέκεται στην ανοσοάμυνα του ξενιστή κυρίως αναστέλλοντας τη λύση της από τα φαγοκύτταρα και στην τοξικότητα της για τα επιθηλιακά κύτταρα. Και οι δύο αυτές δράσεις οφείλονται σε

μολυσματικές πρωτεΐνες που εγχύνονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή μέσω του τύπου ΙΙΙ και είτε αποφωσφοριλιώνουν φωσφοριλιωμένες τυροσίνες πρωτεϊνών των μακροφάγων είτε καταστρέφουν τον κυτταροσκελετό των επιθηλιακών κυττάρων κατακερματίζοντας τα ινίδια ακτίνης. Η *S. flexneri* είναι ένα εντεροπαθογόνο που εισέρχεται στα κύτταρα του ξενιστή. Προκαλεί διάφορες μορφές διάρροιας με πιο σοβαρή την αιμορραγική δυσεντερία (bacillary dysentery). Αποφεύγει τη λύση της από τα μακροφάγα με το να προκαλεί την απόπτωση τους και διεισδύει σε επιθηλιακά κύτταρα επάγοντας τη δημιουργία μεμβρανικών πτυχώσεων που καταλήγουν στην εγκόλπωση της. Η *S. typhimurium* εγκαθίσταται ενδοκυττάρια του ξενιστή και προκαλεί γαστρεντερίτιδες, βακτηριαιμία και εντερικό πυρετό, ασθένειες που ξεκινούν από εντερική μόλυνση. Είναι το μόνο βακτήριο στο οποίο έχουν βρεθεί δύο τύπου ΙΙΙ συστήματα που κωδικοποιούνται από διαφορετικές ομάδες γονιδίων και εμπλέκονται σε διαφορετικά στάδια στην πορεία της μόλυνσης.

Φυτοπαθογόνα που χρησιμοποιούν τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα για προσβολή ανήκουν στα γένη *Pseudomonas syringae, Ralstonia solanacearum, Xanthomonas* και *Erwinia*. Εκτός από την εκδήλωση παθογένειας, όπως ήδη έχει αναφερθεί, το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα εμπλέκεται στην εκδήλωση μιας αμυντικής αντίδρασης που ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) και χαρακτηρίζεται από τη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή που έρχονται σε άμεση φυσική επαφή με το παθογόνο. Η νέκρωση αυτή έχει χαρακτηριστικά προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) και συνοδεύεται από την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών και πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Η εκδήλωση της HR (ασύμβατη σχέση ξενιστή-παθογόνου) ή η εμφάνιση ασθένειας (συμβατή σχέση ξενιστή-παθογόνου) εξαρτάται από την ύπαρξη ή απουσία αντίστοιχα ενός συμπληρωματικού ζεύγους γονιδίων: του γονιδίου ανθεκτικότητας στο ξενιστή (R) και του ονομαζόμενου γονιδίου 'αμολυσματικότητας' (*avr*, avirulence) στο παθογόνο (Baker *et al.* 1997). Το γονίδιο R κωδικοποιεί έναν υποδοχέα της πρωτεΐνης Avr και η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων πυροδοτεί σειρά αντιδράσεων με τελικό αποτέλεσμα την εκδήλωση της HR. Στην περίπτωση που η Avr εισέλθει σε κύτταρο που δεν εκφράζει την αντίστοιχη πρωτεΐνη αναγνώρισης ακολουθεί η εκδήλωση ασθένειας. Εκτός από τις Avr πρωτεΐνες που εισέρχονται στο φυτικό κύτταρο, το Hrp σύστημα χρησιμοποιείται και για την έκκριση μικρών, θερμοσταθερών πρωτεϊνών με υψηλό ποσοστό γλυκινών και αδιευκρίνιστο ρόλο. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται Harpins και φαίνεται ότι δρουν εξωκυττάρια είτε συμμετέχοντας στη δημιουργία του συμπλόκου διάνοιξης/μεταφοράς είτε καταστρέφοντας τη μεμβράνη του ξενιστή με σκοπό την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών στο θρεπτικά φτωχό

αποπλάστη όπου πολλαπλασιάζονται τα φυτοπαθογόνα βακτήρια. Ποιές διεργασίες ή ποιές δομές του φυτικού κυττάρου γίνονται στόχοι των τοξικών παραγόντων και με ποιό τρόπο δρουν για να προκαλέσουν ασθένεια δεν έχει διευκρινιστεί. Μια υπόθεση είναι ότι ο παράγοντας 'αμολυσματικότητας' καταστέλλει την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την εκδήλωση μηχανισμών άμυνας που σχετίζονται με την παραγωγή αντιμικροβιακών μεταβολιτών ή την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος (Hauck *et al.* 2003).

1.2 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$ – Το αντικείμενο της διατριβής

1.2.1 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$

Η $HrcQ_B$ από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. phaseolicola είναι μια μικρή (14 kDa), υδρόφιλη πρωτεΐνη με ομόλογες σε όλα τα παθογόνα που εκφράζουν τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα. Ομόλογες με την $HrcQ_B$ πρωτεΐνες συμμετέχουν επίσης στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου. Είναι χαρακτηριστικό ότι η ομολογία εντοπίζεται στα 80 περίπου κατάλοιπα του καρβοξυτελικού της άκρου (Hueck 1998). Η πρωτεΐνη εκφράζεται από το γονίδιο *$hrcQ_B$* που βρίσκεται δίπλα στο γονίδιο *$hrcQ_A$* στο οπερόνιο *hrpU*. Σε αντίθεση με την *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 $HrcQ_A$ και το καρβοξυτελικό με την $HrcQ_B$ (Charkowski *et al.* 1997).

Στα μοντέλα που σκιαγραφούν την εκκριτική συσκευή, η $HrcQ_B$ θεωρείται μέρος του πυρήνα του βασικού σώματος λόγω της υψηλής της συντήρησης που είναι χαρακτηριστικό των δομικών πρωτεϊνών του συστήματος (Winstanley & Hart 2001). Επιπλέον ταξινομείται με τις πρωτεΐνες του συστήματος που συναθροίζονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου λόγω της έκφρασης της από το οπερόνιο *hrpU* που συσχετίζεται με αυτές τις πρωτεΐνες (Charkowski *et al.* 1997, Collmer *et al.* 2000). Τέλος, λόγω της υδροφιλικότητας της τοποθετείται στην κυτταροπλασματική μεριά της μεμβράνης. Πειράματα κλασμάτωσης (Ταμπακάκη 1999) εντοπίζουν την πρωτεΐνη του παθογόνου *P. syringae* pv. phaseolicola στο κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό κλάσμα και όχι στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο. Τα δεδομένα αυτά που κατ' αρχήν δικαιώνουν τις αρχικές υποθέσεις, μπορούν να ερμηνευτούν θεωρώντας ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με μεμβρανικούς παράγοντες. Παράλληλα φαίνεται να τη διαφοροποιούν από τις ομόλογες της πρωτεΐνες SpaO από τη *Salmonella* και Spa33 από τη *Shigella* για τις οποίες έχει δειχτεί (Li *et al.* 1995, Schuch & Maurell 2001) ότι εκκρίνονται μέσω

του τύπου ΙΙΙ μηχανισμού και είτε ελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα (SpaO) είτε προσδένονται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (Spa33).

Με πειράματα γενετικής (yeast two-hybrid system) και βιοχημική ανάλυση (far western και ανοσοκατακρήμνιση) έχει δειχτεί (Ταμπακάκη 1999) ότι: (i) η $HrcQ_B$ αλληλεπιδρά με την $HrcQ_A$. Στην αλληλεπίδραση αυτή εμπλέκεται μόνο το καρβοξυτελικό άκρο της $HrcQ_A$. (ii) Η $HrcQ_B$-C (τα 79 κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της $HrcQ_B$) διατηρεί την ιδιότητα της ολόκληρης πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την $HrcQ_A$.

Η $HrcQ_B$ είναι ομόλογη (Alfano & Collmer 1997, Hueck 1998) με τις HrcQ πρωτεΐνες των φυτοπαθογόνων βακτηρίων *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, με την YscQ από τη *Yersinia*, με τη SpaO από τη *Salmonella*, με τη Spa33 από τη *Shigella*, με τη BscQ από τη *Bordetella* (Winstanley *et al.* 2000) και με τις FliN/Y πρωτεΐνες του μαστιγίου (Plano *et al.* 2001). Ακολουθεί μια σύνοψη των πειραματικών δεδομένων που αφορούν μερικές από τις ομόλογες πρωτεΐνες και που σε γενικές γραμμές συγκλίνουν προς την υπόθεση ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες αποτελούν μέρος –ή κινητό μέρος- του πυρήνα της εκκριτικής συσκευής (Πίνακας 1.1).

Η HrcQ της *Xanthomonas* είναι απαραίτητη για την εκδήλωση ασθένειας σε φυτά-ξενιστές ή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά (Huguet *et al.* 1998). Επίσης είναι απαραίτητη για την έκκριση του παράγοντα AvrBs3 και για την ετερόλογη έκκριση της μολυσματικής πρωτεΐνης YopE της *Yersinia* (Rossier *et al.* 2000).

Η YscQ προβλέπεται να είναι κυτταροπλασματική ή περιφερειακή πρωτεΐνη της μεμβράνης αν και ακόμα δεν έχουν αναφερθεί πειράματα που να εντοπίζουν τον 'τόπο' της (Winstanley & Hart 2001). Σε πειράματα βασισμένα στο σύστημα δύο-υβριδίων της ζύμης (yeast two-hybrid system) η YscQ αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες YscK και YscL. Με το σύστημα τριών-υβδριδίων της ζύμης (yeast three-hybrid system) δείχτηκε επίσης ότι η YscQ αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με τις πρωτεΐνες αυτές γεγονός που υποδηλώνει ότι διαφορετικές περιοχές της εμπλέκονται στις παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις (Jackson & Plano 2000).

Σε πειράματα κλασμάτωσης η SpaO εντοπίζεται στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο και η έκκριση της βρέθηκε ότι γίνεται μέσω του τύπου ΙΙΙ συστήματος (Li *et al.* 1995). Παράλληλα η παρουσία λειτουργικής SpaO είναι απαραίτητη για την έκκριση άλλων πρωτεϊνών του συστήματος (Galán 1996) και απαραίτητη για την ικανότητα του παθογόνου να εισέρχεται στους ξενιστές του (Collazo & Galán 1996).

Η Spa33 είναι απαραίτητη για την έκκριση παθογόνων παραγόντων που μεταφέρονται μέσω του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού της *Shigella*. Η ίδια η πρωτεΐνη εκκρίνεται με έναν τύπου ΙΙΙ-εξαρτώμενο τρόπο και εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου αλλά όχι

στο υπερκείμενο μέσο. Πιστεύεται ότι είναι ένα κινητό συστατικό της εκκριτικής συσκευής και ότι η έκκριση της οδηγεί την έκκριση άλλων παραγόντων του συστήματος (Schuch & Maurelli 2001).

Απουσία της πρωτεΐνης FliN δε σχηματίζονται μαστίγια, ενώ όταν υποεκφράζεται σχηματίζονται λίγα και δυσλειτουργούν. Επιπλέον, μόνο το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης απαιτείται για τη δημιουργία και κίνηση του μαστιγίου (Tang *et al.* 1995, Minamino & Macnab 1999). Η FliN αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της FliM (Mathews *et al.* 1998) που θεωρείται ανάλογη της $HrcQ_A$ και μαζί συνθέτουν μια δομή σχήματος δακτυλίου, του κυτταροπλασματικού δακτυλίου (C-ring, εικόνα 1.1Γ και Δ). Το όνομα δηλώνει τη θέση της δομής που βρίσκεται προσκολλημένη στην κυτταροπλασματική πλευρά του βασικού σώματος της μηχανής βιογένεσης του μαστιγίου (Francis *et al.* 1994, Khan *et al.* 1998, Thomas *et al.* 1999, Lux *et al.* 2000, Aldridge & Hughes 2002). Οι κατά προσέγγιση διαστάσεις του δακτυλίου είναι 170 Å πάχος και 450 Å εξωτερική διάμετρο ενώ υπολογίζεται ότι συμμετέχουν 110 αντίγραφα της FliN και 35 αντίγραφα της FliM (Francis *et al.* 1994, Zhao *et al.* 1996). Η σύνδεση του κυτταροπλασματικού δακτυλίου με την υπόλοιπη μηχανή γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης με την FliG (Thomas *et al.* 2001). Όπως ήδη αναφέρθηκε, από τις πρωτεΐνες του βασικού σώματος της τύπου ΙΙΙ εκκριτικής μηχανής έχει προσδιοριστεί η δομή μόνο του καρβοξυτελικού άκρου της FliG.

Πίνακας 1.1 Σύνοψη πειραματικών δεδομένων για πρωτεΐνες ομόλογες της $HrcQ_B$.

Πρωτεΐνες ομόλογες της $HrcQ_B$	**Οργανισμός**	**Λειτουργεία/αλληλεπιδράσεις/υποκυτταρικός εντοπισμός**
HrcQ	*Xanthomonas*	Απαραίτητη για την εκδήλωση ασθένειας σε ξενιστές και της HR σε ανθεκτικά φυτά. Απαραίτητη για την ετερόλογη έκκριση του μολυσματικού παράγοντα YopE της *Yersinia*.
YscQ	*Yersinia*	Αλληλεπιδρά μέσω διαφορετικών περιοχών της με τις πρωτεΐνες YscK και YscL.
SpaO	*Salmonella*	Απαραίτητη για την έκκριση υποστρωμάτων του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού και την ικανότητα του παθογόνου να εισέρχεται στους ξενιστές. Εκκρίνεται και η ίδια μέσω του τύπου ΙΙΙ μηχανισμού και εντοπίζεται στο υπερκείμενο μέσο.
Spa33	*Shigella*	Απαραίτητη για την έκκριση υποστρωμάτων του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού. Εκκρίνεται και η ίδια μέσω του τύπου ΙΙΙ μηχανισμού και εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου.
FliN (βακτηριακό μαστίγιο)		Απαραίτητη για το σχηματισμό μαστιγίων. Όταν υποεκφράζεται παράγονται λίγα μαστίγια και δυσλειτουργούν. Συμμετέχει στη δημιουργία μιας υπερμοριακής δομής σχήματος δακτυλίου που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεριά της εσωτερικής μεμβράνης.

1.2.2 Το αντικείμενο της διατριβής

Ο προσδιορισμός της δομής της $HrcQ_B$ με έμφαση στο καρβοξυτελικό τμήμα που προσελκύει το ενδιαφέρον λόγω της υψηλής και ευρείας του συντήρησης, είναι το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

Η πρωτεΐνη αποτελεί ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης γιατί λόγω της θέσης της θα μπορούσε να συγκεντρώνει πολλαπλούς και σημαντικούς ρόλους στην πορεία της έκκρισης μέσω του τύπου ΙΙΙ συστήματος. Έτσι, εκτός από δομικός λίθος, ως συστατικό του συντηρημένου πυρήνα της εκκριτικής μηχανής φαίνεται να έχει και λειτουργικό ρόλο στην έκκριση των υποστρωμάτων του συστήματος. Είναι πιθανό να εμπλέκεται στην αναγνώριση του σήματος έκκρισης (Blocker *et al.* 2003) και να συμβάλλει στον μη-ειδικό χαρακτήρα της έκκρισης (Anderson *et al.* 1999).

Η επίλυση της δομής είναι από μόνη της σημαντική αφού η ευρεία συντήρηση της πρωτεΐνης και ιδιαίτερα του καρβοξυτελικού τμήματος θα μπορούσε να δικαιολογήσει τον ισχυρισμό ότι η δομή της $HrcQ_B$ αντιπροσωπεύει τη δομή όλων των ομόλογων πρωτεϊνών του συστήματος. Επιπλέον, θα μπορούσε να φωτίσει ερωτήματα σχετικά με την ικανότητα της πρωτεΐνης να οργανώνεται σε ομο-πρωτεϊνικά σύμπλοκα με μορφολογία ανάλογη του κυτταροπλασματικού δακτυλίου του μαστιγίου και να μας κατευθύνει για τη σωστή διευθέτηση των μορίων στο χώρο κρίνοντας από τον τρόπο που τα συντηρημένα αμινοξέα κατανέμονται στην επιφάνεια του μορίου. Τέλος, με δεδομένη την αλληλεπίδραση της $HrcQ_B$ με την $HrcQ_A$ η δομή θα μπορούσε πιθανό να μας κατευθύνει προς περιοχές της επιφάνειας του μορίου που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Για τον προσδιορισμό της δομής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ που αποτελεί μια από τις ισχυρότερες μεθόδους που διαθέτουμε για την επίλυση της τρισδιάστατης διαμόρφωσης βιολογικών μακρομορίων σε υψηλή διακριτικότητα. Η επόμενη παράγραφος αποτελεί μια εισαγωγή στις αρχές της μεθόδου και σε βασικές έννοιες που θα συναντήσει ο αναγνώστης στα επόμενα κεφάλαια της εργασίας.

1.3 Από τον κρύσταλλο στη δομή: κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Κρυσταλλογραφία είναι η μέθοδος προσδιορισμού της τρισδιάστατης δομής χημικών μορίων που βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους του δείγματος. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της στην επίλυση της δομής βιολογικών μακρομορίων - πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων – λόγω της πολυπλοκότητας, του μεγέθους και της σημασίας των μορίων αυτών. Η επιτυχής εφαρμογή της στον προσδιορισμό της δομής των καψιδίων ιών και στον σχετικά πρόσφατο προσδιορισμό της δομής του ριβοσώματος αποδεικνύει ότι είναι η ισχυρότερη μέθοδος που διαθέτουμε σήμερα για το σκοπό αυτό (Ban *et al.* 2000, Lucas *et al.* 2002, Nandhagopal *et al.* 2002). Από τις πρώτες εφαρμογές της κρυσταλλογραφίας το ερώτημα που ανέκυψε ήταν αν η δομή στον κρύσταλλο είναι ίδια με τη δομή στο διάλυμα. Σήμερα η κρυσταλλική δομή χρησιμοποιείται συστηματικά για την εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν τη λειτουργία των βιολογικών μακρομορίων καθώς έχει επαληθευτεί με πολλούς τρόπους η αξιοπιστία της (Rhodes 1993): (i) Έχει δειχτεί επανειλημμένα ότι τα δεδομένα της κρυσταλλογραφίας είναι συμβατά με δεδομένα που προέρχονται από βιοχημικές μεθόδους και NMR. (ii) Στην περίπτωση ενζύμων έχει δειχτεί ότι εξακολουθούν να είναι ενεργά στην κρυσταλλική κατάσταση. (iii) Η διατήρηση της δομής στον κρύσταλλο είναι συμβατή με το γεγονός ότι οι κρύσταλλοι των βιολογικών μακρομορίων περιέχουν υψηλά ποσοστά διαλύτη (30-70%, Matthews 1968), με αποτέλεσμα τα μόρια να διατηρούν πολλαπλές σφαίρες ενυδάτωσης που είναι καθοριστικός παράγοντας στην διαμόρφωση της τρισδιάστατης δομής.

1.3.1 Κρύσταλλος

Η κρυσταλλική είναι μια κατάσταση της στερεάς φάσης της ύλης που χαρακτηρίζεται από υψηλή τάξη και συμμετρία στο πακετάρισμα των μορίων. Οι κρύσταλλοι σχηματίζονται από την περιοδικά επαναλαμβανόμενη διευθέτηση μιας δομικής μονάδας (μοτίβο) στις τρεις διαστάσεις. Το επαναλαμβανόμενο μοτίβο μπορεί να είναι ένα μόριο ή μια συνάθροιση μορίων. Η αντικατάσταση κάθε μοτίβου από ένα σημείο οδηγεί σε μια τρισδιάστατη γεωμετρική αφαίρεση, το κρυσταλλικό πλέγμα, που χρησιμοποιείται για να οριστεί η γεωμετρική σχέση μεταξύ των μοτίβων και να γίνει εμφανής η συμμετρία της τρισδιάστατης διευθέτησης τους. Η συμμετρία αυτή (κρυσταλλογραφική) γίνεται αντιληπτή από το σχήμα της λεγόμενης στοιχειώδους κυψελίδας που είναι ένα παραλληλεπίπεδο που ορίζεται από γειτονικά σημεία του πλέγματος. Το περιεχόμενο της στοιχειώδους κυψελίδας μπορεί να αναπαραχθεί από την

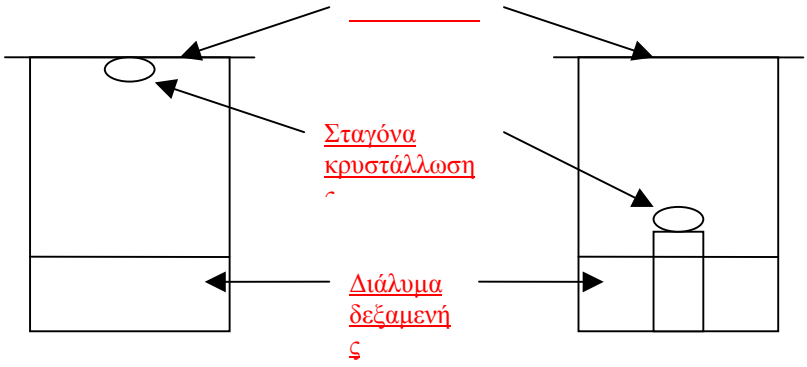
εφαρμογή κατάλληλης ομάδας πράξεων συμμετρίας σε ένα μόνο μοτίβο. Αυτή η ομάδα πράξεων συμμετρίας είναι η ομάδα χώρου του κρυστάλλου.

1.3.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Συχνά η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι το καθοριστικό βήμα στον προσδιορισμό της δομής της με κρυσταλλογραφία. Επειδή επηρεάζεται από μια πληθώρα παραμέτρων παραμένει κυρίως μια εμπειρική διαδικασία και αναφέρεται χαρακτηριστικά ως 'τέχνη παρά επιστήμη'. Μερικές από τις πιο συνηθισμένες παραμέτρους που εμπλέκονται στη διαδικασία της κρυστάλλωσης είναι η θερμοκρασία, η ιονική ισχύς και η καθαρότητα των χημικών, η επίδραση ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων. Ιδιαίτερα σημαντικές είναι παράμετροι που σχετίζονται με τη φύση των πρωτεϊνικών μορίων και έχουν να κάνουν με την ευελιξία της διαμόρφωσης, την ύπαρξη κινητικών υπομονάδων, την ευαισθησία σε διακυμάνσεις του pH, της ιονικής ισχύος και των διαλυτών, τη πρωτεολυτική σταθερότητα, την τάση για δημιουργία συναθροίσεων, την υδροφοβικότητα ή υδροφιλικότητα. Επίσης σημαντικό ρόλο έχουν και παράμετροι που σχετίζονται με την καθαρότητα, τις συνθήκες αποθήκευσης του δείγματος και την παλαιότητα του (McPherson 1982, Giegé *et al.* 1994, McPherson *et al.* 1995).

Η πορεία της κρυστάλλωσης διακρίνεται χρονικά σε τρία στάδια: (i) Την πυρήνωση (nucleation) κατά την οποία σχηματίζονται οι πρώτες τακτικά διευθετημένες συναθροίσεις μοτίβων (πυρήνες κρυστάλλωσης), (ii) την αύξηση του κρυστάλλου (crystal growth) και (iii) την παύση της αύξησης (cessation of growth). Η πυρήνωση συμβαίνει μόνο σε υπέρκορα – ως προς την πρωτεΐνη – διαλύματα. Ο υπερκορεσμός, που είναι μια θερμοδυναμικά ασταθής κατάσταση, διακρίνεται σε μια μετασταθερή περιοχή όπου δεν μπορούν να σχηματιστούν πυρήνες αλλά μπορούν να μεγαλώσουν αν βρεθούν με κάποιο τρόπο σε αυτήν, σε μια περιοχή πυρήνωσης όπου πυρήνες μπορούν να σχηματιστούν και να μεγαλώσουν και στην περιοχή κατακρήμνισης όπου ο υπερκορεσμός είναι τόσο υψηλός που η περίσσεια πρωτεΐνης κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα (Feher & Kam 1985, Durbin & Feher 1996, Chernov 2003).

Όλες οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την κρυστάλλωση πρωτεϊνών αποσκοπούν στο να φέρουν το διάλυμα του μακρομορίου σε υπερκορεσμό. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη είναι η μέθοδος της διάχυσης ατμών που εφαρμόζεται μεταξύ άλλων με τις τεχνικές της κρεμαστής και της καθιστής σταγόνας. Για να την επίτευξη της κρυστάλλωσης το υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καθιζητή που είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενογλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει ακολουθώντας την πορεία που περιγράφεται αναλυτικά στην εικόνα 1.2 (Chayen 1998).



Εικόνα 1.2 Σχηματική παρουσίαση της μεθόδου διάχυσης ατμών όπως εφαρμόζεται με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας (αριστερά) και της καθιστής σταγόνας (δεξιά). **(Αριστερά)** Μικρή ποσότητα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος (συνήθως 2-5 μl) και διαλύματος καθιζητή αφήνεται στο μέσο υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από σχετικά μεγάλο όγκο (συνήθως 700-1000 μl) διαλύματος καθιζητή (δεξαμενή) και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς. Η συγκέντρωση του καθιζητή είναι μεγαλύτερη στη δεξαμενή από ότι στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Έτσι, κατά την εξισορρόπηση της τάσης ατμών συνήθως νερό εξατμίζεται από τη σταγόνα και η συγκέντρωση των συστατικών της -και μαζί της πρωτεΐνης- αυξάνει. **(Δεξιά)** Το μίγμα πρωτεΐνης-καθιζητή τοποθετείται στην κορυφή ειδικής γέφυρας που βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια του διαλύματος του καθιζητή. Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς. Η πορεία είναι ανάλογη με αυτήν που περιγράφτηκε για την κρεμαστή σταγόνα.

Προβλήματα στην πορεία της κρυστάλλωσης προέρχονται συχνά από τις διαφορετικές απαιτήσεις της πυρήνωσης και της αύξησης. Έτσι, ενώ για το σχηματισμό πυρήνων απαιτείται υψηλός βαθμός υπερκορεσμού, για ομαλή αύξηση απαιτούνται χαμηλά επίπεδα υπερκορεσμού που να εξασφαλίζουν χαμηλούς ρυθμούς ανάπτυξης ώστε να αποφεύγεται η συγχώνευση στο πλέγμα ξένων ουσιών ή κενών. Για την αποφυγή αυτής της ασυμβατότητας έχει αναπτυχθεί η τεχνική της ενπυρήνωσης (seeding) που αποσκοπεί στην αποσύνδεση της πυρήνωσης από την αύξηση των κρυστάλλων (Bergfors 2003). Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιούνται μεγάλοι κρύσταλλοι ως πηγή μικροσκοπικών ή μακροσκοπικών πυρήνων σε καινούριες σταγόνες κρυστάλλωσης. Η συνήθης πορεία περιλαμβάνει προ-εξισορρόπηση του διαλύματος πρωτεΐνης-

καθιζητή σε συνθήκες χαμηλού υπερκορεσμού και στη συνέχεια προσθήκη μικροσκοπικών πυρήνων (microseeding) ή μεγάλων τμημάτων κρυστάλλου (macroseeding).

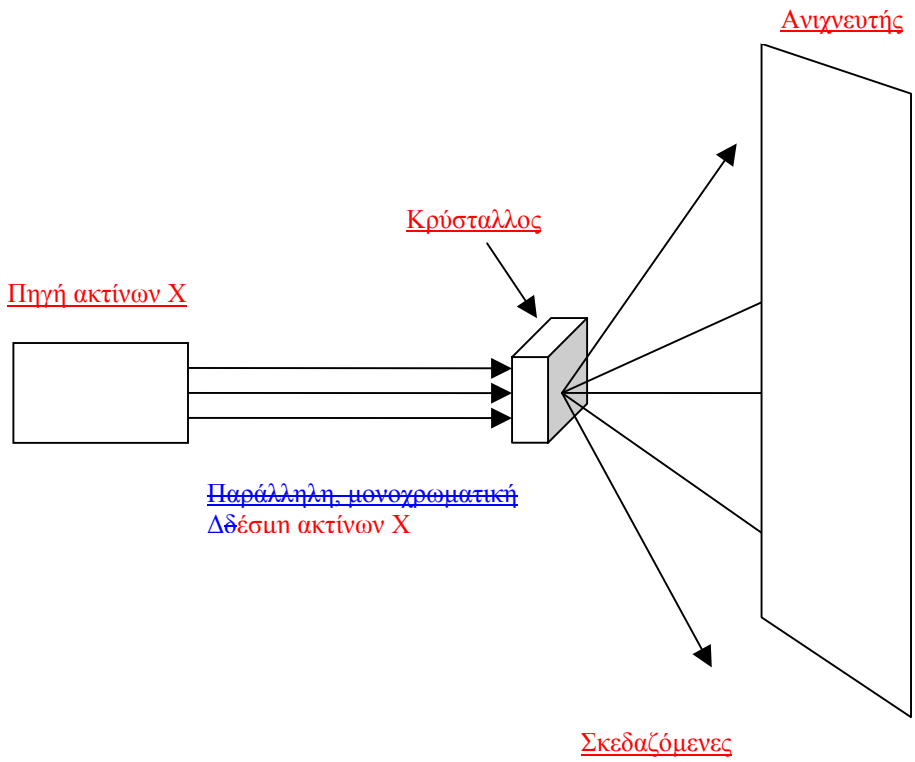
1.3.3 Περίθλαση ακτίνων Χ

Όταν μια δέσμη ακτίνων Χ προσπέσει σε ένα αντικείμενο οι ακτίνες σκεδάζονται από τα ηλεκτρόνια του αντικειμένου προς όλες τις κατευθύνσεις και το φαινόμενο ονομάζεται σκέδαση.

Ένα πρωτεϊνικό μόριο αποτελεί έναν αδύναμο σκεδαστή των ακτίνων Χ. Πολλά πρωτεϊνικά μόρια σε τυχαίες θέσεις (διάλυμα ή άμορφο στερεό) σκεδάζουν τις ακτίνες κατά τρόπο συνεχή, δηλαδή ακτινοβολία σκεδάζεται σε όλες τις διευθύνσεις (διαχέεται).

Ένας κρύσταλλος αποτελεί μια περιοδικά επαναλαμβανόμενη διευθέτηση μορίων στο χώρο. Η ιδιότητα αυτή κάνει τα μόρια να σκεδάζουν με όμοιο τρόπο τις ακτίνες έτσι ώστε σε ορισμένες διευθύνσεις η σκέδαση από όλα τα μόρια να συμβάλλει εποικοδομητικά και να προκύπτουν ισχυρές περιθλώμενες ακτίνες σε αυτές τις διευθύνσεις. Η ένταση αυτών των ακτίνων μπορεί να μετρηθεί και η διαδικασία αναφέρεται ως συλλογή δεδομένων περίθλασης. Οι περιθλώμενες ακτίνες καταγράφονται σε έναν ανιχνευτή με τη μορφή σημειακών αμαυρώσεων (ανακλάσεις). Η διάταξη ενός τέτοιου πειράματος φαίνεται στην εικόνα 1.3.

Αν οι σκεδαζόμενες ακτίνες ανασυνδυαστούν προκύπτει μια μεγενθυμένη εικόνα του αντικειμένου που προκάλεσε την περίθλαση. Επειδή δεν υπάρχει όργανο (π.χ φακός) που να μπορεί να ανασυνδυάσει τις ακτίνες Χ για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται μια μαθηματική συνάρτηση που ονομάζεται σύνθεση Fourier. Στην εξίσωση αυτή κάθε σκεδαζόμενο κύμα –που αναφέρεται ως παράγοντας δομής- περιγράφεται από το πλάτος, τη διεύθυνση διάδοσης και τη φάση του. Το αποτέλεσμα της σύνθεσης Fourier είναι ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας των μορίων στον κρύσταλλο.



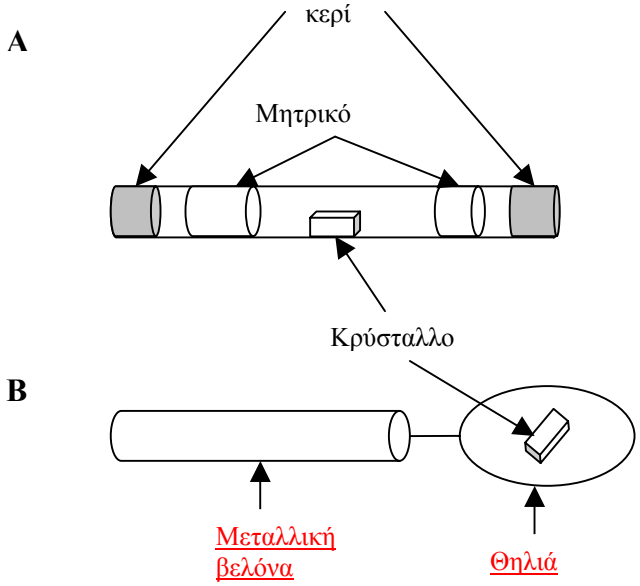
Εικόνα 1.3 Η γεωμετρική διάταξη ενός πειράματος περίθλασης ακτίνων Χ από κρύσταλλο.

1.3.4 Από τη σταγόνα κρυστάλλωσης στις ακτίνες Χ

Η υψηλή περιεκτικότητα σε διαλύτη κάνει τους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους μηχανικά εύθραυστους και ιδιαίτερα ευαίσθητους όταν εκτεθούν στην ατμόσφαιρα ή σε μεταβολές της θερμοκρασίας, της ιονικής ισχύος και του pH. Για να εκτεθεί ο κρύσταλλος στις ακτίνες Χ είναι αναγκαίο να απομακρυνθεί από τη σταγόνα κρυστάλλωσης. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η διατήρηση των ισορροπιών που έχουν αναπτυχθεί στο διάλυμα της κρυστάλλωσης κατά τη μεταφορά του στις ακτίνες ακολουθείται μια συγκεκριμένη πορεία (γνωστή ως crystal mounting, Sawyer & Turner 1992). Η πορεία αυτή περιλαμβάνει μεταφορά από τη σταγόνα σε ένα γυάλινο τριχοειδή σωλήνα με λεπτά τοιχώματα (capillary) του οποίου τα δύο άκρα κλείνονται στεγανά με κερί. Ένα μικρό σιφώνιο προσαρμοσμένο στο ένα άκρο του σωλήνα χρησιμεύει για να ρουφήξει τον κρύσταλλο στο εσωτερικό ενώ η παρουσία μιας μικρής ποσότητας μητρικού υγρού εξασφαλίζει τον κορεσμό του χώρου με ατμούς για την αποφυγή αφυδάτωσης του κρυστάλλου (εικόνα 1.4Α).

Η συλλογή μιας πλήρους σειράς δεδομένων περίθλασης σε θερμοκρασία δωματίου από έναν μόνο κρύσταλλο είναι συνήθως αδύνατη λόγω της σχετικά γρήγορης αποδιοργάνωσης

της κρυσταλλικής τάξης και της σταδιακής απώλειας της ικανότητας για περίθλαση. Το φαινόμενο είναι γνωστό ως καταστροφή από ακτινοβόληση (radiation damage) και εν μέρει οφείλεται στη δράση ελεύθερων ριζών που παράγονται από την αλληλεπίδραση των ακτίνων Χ με μόρια νερού του κρυστάλλου. Η ταχύτητα με την οποία οι ελεύθερες ρίζες διαδίδονται στον κρύσταλλο και αντιδρούν εξαρτάται από τη θερμοκρασία και ελαττώνεται με αυτήν. Σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τους -150 ºC (κρυο-συνθήκες) το φαινόμενο επιβραδύνεται σημαντικά και ο κρύσταλλος παραμένει πρακτικά ανέπαφος για μακρόχρονη έκθεση στις ακτίνες. Η επιτυχία ενός πειράματος σε κρυο-συνθήκες εξαρτάται κυρίως από τον τρόπο με τον οποίο ο κρύσταλλος ψύχεται (Garman & Schneider 1997). Σταδιακή ελάττωση της θερμοκρασίας οδηγεί στο σχηματισμό κρυσταλλικού πάγου από το νερό που βρίσκεται μέσα και γύρω από τον κρύσταλλο. Η δημιουργία πάγου είναι ανεπιθύμητη γιατί αφενός συνεισφέρει στην περίθλαση αφετέρου η διαστολή που συνοδεύει το σχηματισμό του καταστρέφει το πλέγμα. Αντίθετα απότομη ελάττωση της θερμοκρασίας (flash cooling) κάνει το υδατικό διάλυμα να παγώσει άμορφα με μια πορεία γνωστή ως υαλοποίηση. Συνήθως για βέλτιστα αποτελέσματα είναι απαραίτητη η προσθήκη στο μητρικό υγρό κάποιου πρόσθετου κρυο-προστατευτή (cryo-protectant) που αυξάνει το ιξώδες του διαλύματος και έτσι επιβραδύνει την ενπυρήνωση του πάγου και τη διάδοση του σχηματισμού του. Ευρέως χρησιμοποιούμενοι κρυο-προστάτες είναι πολυαλκοόλες -γλυκερόλη, αιθυλενογλυκόλη, μικρομοριακά PEGs και MPD- και έλαια (Petsko 1975). Πρόσφατα οι Rubinson *et al.* (2000) ανέφεραν την επιτυχή χρήση αλάτων υψηλής διαλυτότητας (κυρίως άλατα του Li) για τον ίδιο σκοπό. Η μεταφορά του κρυστάλλου στις ακτίνες για ένα πείραμα σε χαμηλή θερμοκρασία διαφέρει από τη διαδικασία που περιγράφτηκε νωρίτερα. Μια θηλιά στερεωμένη σε μια μεταλλική βελόνα χρησιμεύει για το 'ψάρεμα' του κρυστάλλου από τη σταγόνα (εικόνα 1.4B). Ο κρύσταλλος συγκρατείται στη θηλιά λόγω της επιφανειακής τάσης και μεταφέρεται με μια γρήγορη κίνηση στο σημείο που η δέσμη των ακτίνων τέμνει ρεύμα ψυχρού αζώτου που διατηρεί τον κρύσταλλο σε χαμηλή θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια της συλλογής δεδομένων.



Εικόνα 1.4 Τρόποι μεταφοράς πρωτεϊνικών κρυστάλλων στις ακτίνες X για συλλογή δεδομένων σε **(A)** θερμοκρασία δωματίου, **(B)** κρυο-συνθήκες.

Κ ε φ ά λ α ι ο 2

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΠΑΘΕΙΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ ΤΗΣ ΠΛΗΡΟΥΣ ΜΗΚΟΥΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$

...ὀνόμηνε δε τήνδε γυναῖκα
Πανδώρην, ὅτι πάντες Ὀλύμπια δώματα ἔχοντες
δῶρον ἐδώρησαν, πῆμ' ἀνδράσιν ἀλφηστῆσιν...

Ησίοδος, ' Έργα και Ημέρες'

2.1 Εισαγωγή

Η $HrcQ_B$ εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη (εικόνα 2.1) με μια αλληλουχία δέκα ιστιδινών και μια ενδιάμεση αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση Factor Xa (Factor Xa protease, Amersham Pharmacia Biotech Inc). Η προσθήκη της αλληλουχίας των ιστιδινών αποσκοπεί στη διευκόλυνση του καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (δες 2.2.2) ενώ η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση των ιστιδινών από την πρωτεΐνη μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού (δες 2.2.5). Η πλασμιδιακή κατασκευή και η κλωνοποίηση σε κύτταρα ήταν εργασία της Δρ. Α. Ταμπακάκη που μας προσφέρθηκε από τους Ταμπακάκη και Πανόπουλο για δομική μελέτη.

M*HHHHHHHHHH*SSEHIEG↓RH**MSTEDLYQEDVEMLDDYEDPSTEQHWSE EDGEPSGYATAEPDDHAAQEEQDEPPALDSLALDLTLRCGELRLTLAELRRL DAGTILEVTGISPGHATLCHGEQVVAEGELVDVEGRLGLQITRLVTRS**

Εικόνα 2.1 Με έντονα τυπογραφικά παρουσιάζεται η πρωτοταγής δομή της $HrcQ_B$, με πλάγια τυπογραφικά η αλληλουχία των δέκα ιστιδινών και με υπογράμμιση η αλληλουχία που αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση Factor Xa. Το βέλος δηλώνει τη θέση της πρωτεόλυσης.

2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης $HrcQ_B$

2.2.1 Παραγωγή πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη εκφράζεται από κύτταρα *Escherichia coli* της σειράς DH5a που μεγαλώνουν παρουσία αμπικιλίνης σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (LB θρεπτικό μέσο, Lech & Brent 1987). 20 ml από καλλιέργεια μεγαλωμένη για ~16 ώρες στους 37 ºC, προστίθενται σε 1 lt θρεπτικού μέσου που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη και επωάζονται εκ νέου στους 37 ºC. Όταν η οπτική πυκνότητα στα 600 nm (OD_{600}) είναι 0.7-0.9 (περίπου 2-3 ώρες αργότερα) επάγεται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης με την προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και η επώαση συνεχίζεται για άλλες 4 ώρες στους 30 ºC. Η κυτταρική πάστα συλλέγεται με φυγοκέντρηση στα 6000 rpm (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας JA-20) για 30 λεπτά και λύεται αμέσως ή φυλάσσεται στους -70 ºC.

2.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Η χρωματογραφία συγγένειας υγρής-στερεής φάσης περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές μεθόδους καθαρισμού που όλες βασίζονται στην ειδική συγγένεια της προς απομόνωση πρωτεΐνης για μια χημική ομάδα (προσδέτη) που είναι ακινητοποιημένη σε μια αδρανή ρητίνη (υπόστρωμα). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις το υπόστρωμα και ο προσδέτης αποτελούν τη στερεή φάση (στρώμα) την οποία διαπερνά διάλυμα της πρωτεΐνης (υγρή φάση). Η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον προσδέτη και παραμένει στη στερεή φάση ενώ οι συνοδεύουσες πρωτεΐνες απομακρύνονται από το στρώμα. Η έκλουση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται εκπλένοντας το στρώμα με διάλυμα ουσίας που έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τον προσδέτη απ' ότι η πρωτεΐνη (Bollag *et al.* 1996).

Στη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Imobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) το ρόλο του προσδέτη αναλαμβάνουν ιόντα μετάλλων. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων αμινοξέων να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και να προσδένουν κατιόντα (Hochuli 1988, Petty 1996, Lehr *et al.* 2000). Ένα τέτοιο αμινοξύ είναι η ιστιδίνη που σε pH > 6 μπορεί να προσδένει δισθενή μεταλλικά ιόντα όπως Ni^{2+} και Cu^{2+}. Η αύξηση της συγγένειας μιας πρωτεΐνης για ιόντα μετάλλου επιτυγχάνεται με την προσθήκη μιας ουράς συνήθως έξι, διαδοχικών ιστιδινών στο άμινο- ή καρβοξυτελικό άκρο της. Η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται με μείωση του pH ή με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (Janknecht *et al.* 1991).

Οι πρωτεΐνες που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας ήταν χίμαιρες με έξι ή δέκα διαδοχικές ιστιδίνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Ως στερεή φάση για τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου χρησιμοποιήθηκε Ni-NTA agarose ή superflow (Qiagen), δηλαδή Ni^{2+} προσδεδεμένα σε αδρανή ρητίνη sepharose ή superflow αντίστοιχα, μέσω της ομάδας νιτριλοτριοξικό οξύ (nitrilotriacetic acid, NTA).

2.2.3 Αρχικό σχήμα καθαρισμού της 10His-HrcQ_B: προβλήματα πρωτεόλυσης

Για έναν τυπικό καθαρισμό 8 g κυτταρικής πάστας (από 2 lt καλλιέργειας) ομογενοποιούνται με 40 ml 10 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH=8.0 (διάλυμα Α). Προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml και το μίγμα επωάζεται στους 4 ºC για 30 λεπτά. Η διάρρηξη των κυττάρων ολοκληρώνεται με υπέρηχους. Τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση (14000g, για 40 λεπτά) και το υπερκείμενο φορτώνεται με ταχύτητα ~60 ml/h σε κολώνα Ni-NTA agarose (όγκος κολώνας ~8 ml) εξισορροπημένη με διάλυμα Α. Ακολουθούν εκπλύσεις με διαλύματα σταδιακά αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: (i) 10 όγκοι κολώνας διαλύματος Α, (ii) 10 όγκοι κολώνας 20 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (διάλυμα Β), (iii) 1 όγκος κολώνας 50 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (διάλυμα Γ) και (iv) 1 όγκος κολώνας 100 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (διάλυμα Δ). Η πρωτεΐνη εκλούεται με 300 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, (διάλυμα Ε) και υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 200 mM NaCl. Εναλλακτικά, το δείγμα υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλυμάτων: (i) 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 20 mM NaCl και (ii) 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl. Το πρωτεϊνικό διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι τελικής

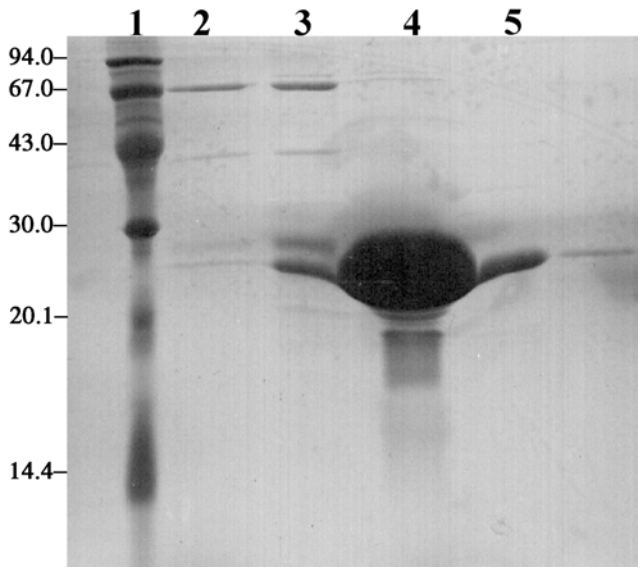
συγκέντρωσης 10-15 mg/ml και φυλάσσεται στους 4 ºC. Η εκτίμηση της ποσότητας της παραγόμενης πρωτεΐνης γίνεται με τη μέθοδο Bradford (Bradford 1976, Spector 1978). Από 1 lt κυτταρικής καλλιέργειας παράγονται ~4 g υγρής κυτταρικής πάστας και ~16 mg πρωτεΐνης.

Η 10His-HrcQ$_B$ που παράγεται με αυτό το σχήμα συνοδεύεται από αρκετές ακόμα πρωτεΐνες κυρίως μικρότερου μοριακού βάρους (εικόνα 2.2). Η συγκέντρωση αυτών των πρωτεϊνών αυξάνει με την πάροδο του χρόνου εις βάρος της 10His-HrcQ$_B$ μέχρι την πλήρη πρωτεόλυση του δείγματος (εικόνα 2.3). Η χαμηλή θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα ο καθαρισμός και η παρουσία αναστολέων πρωτεασών (1 mM PMSF, 150μg/ml benzamidine, 20 μg/ml leupeptin) δεν είναι παράγοντες ικανοί να αποτρέψουν την πρωτεόλυση.

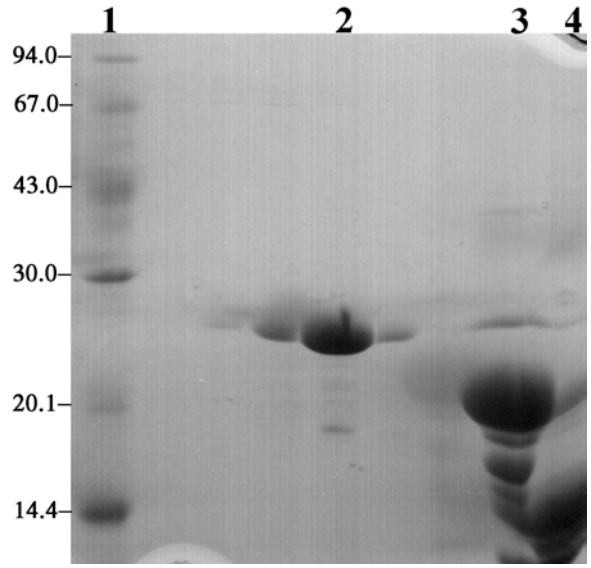
2.2.4 Βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού: παραγωγή σταθερής πρωτεΐνης

Η πρωτεόλυση αποτελεί σοβαρό και σχετικά συχνό πρόβλημα στην απομόνωση υπερεκφραζόμενων πρωτεϊνών που παράγονται για δομικές μελέτες (Saijo-Hamano *et al.* 2000).

Για την αύξηση της σταθερότητας της 10His-HrcQ$_B$ επιχειρήθηκε αρχικά η βελτίωση του καθαρισμού με συνδυασμό χρωματογραφίας συγγένειας, ιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης. Έτσι, το έκλουσμα από τη Ni-NTA που περιείχε την πρωτεΐνη αραιώθηκε μέχρι οι συγκεντρώσεις των συστατικών του να είναι 30 mM ιμιδαζόλιο, 30 mM NaCl, 5 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, 20 mM Tris/HCl pH 8.0 και φορτώθηκε σε ανιοανταλλακτική στήλη Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech) εξισορροπημένη με το ίδιο διάλυμα. Η κολώνα εκπλύθηκε με 250 ml 30 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8.0 και στη συνέχεια εφαρμόστηκε κλίση NaCl από 30 mM έως 1 M. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε στα 500 mM άλατος (εικόνα 2.4 Α και Β). στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώθηκε και φορτώθηκε σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Pharmacia Biotech). Η πορεία αυτή δεν οδήγησε στην παραγωγή καθαρότερης ή σταθερότερης πρωτεΐνης.

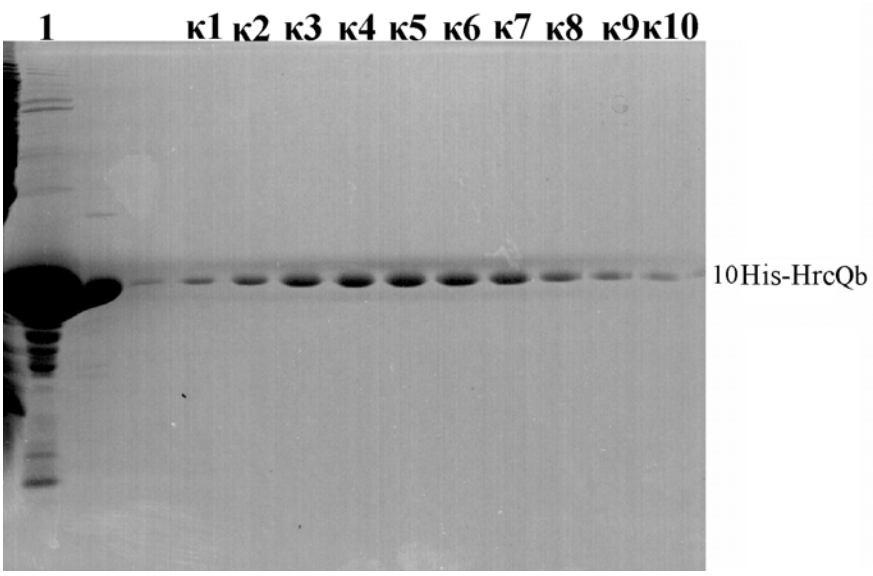


Εικόνα 2.2 Ανάλυση δειγμάτων από έναν τυπικό καθαρισμό της 10His-HrcQ$_B$ σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. **2** Έκπλυμα της κολώνας με διάλυμα Γ. **3** Έκπλυμα της κολώνας με διάλυμα Δ. **4**, **5** Πρώτο και δεύτερο κλάσμα αντίστοιχα από την έκλουση της πρωτεΐνης με διάλυμα Ε (η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων αναφέρεται στο κείμενο).

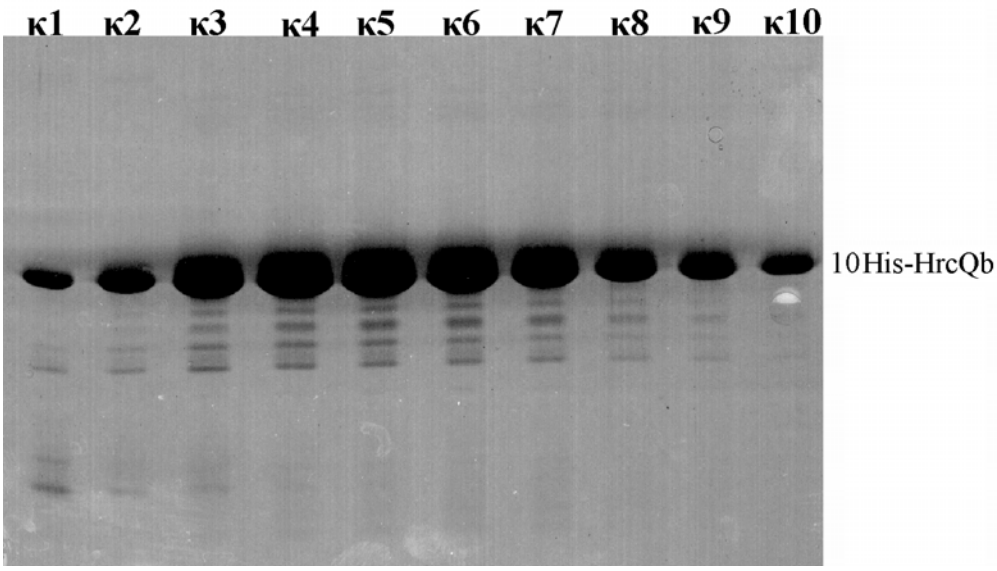


Εικόνα 2.3 Δείγματα της 10His-HrcQ$_B$ από διαφορετικά στάδια πρωτεόλυσης. Η ανάλυση έγινε σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. **2** Δείγμα της HrcQ$_B$ αμέσως μετά τον καθαρισμό της. **3**, **4** Δείγματα της πρωτεΐνης 25 και 40 μέρες αντίστοιχα μετά τον καθαρισμό τους.

A



B

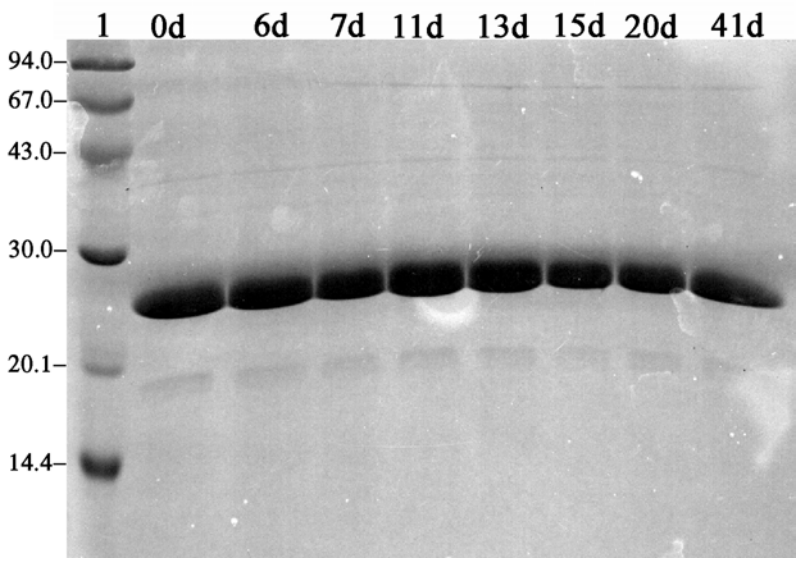


Εικόνα 2.4 Ανάλυση κλασμάτων της 10His-HrcQ$_B$ από τη στήλη Q Sepharose, σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **(A) 1** Το δείγμα που φορτώθηκε στη Q Sepharose. Οι γραμμές ***κ*1-*κ*10** αντιστοιχούν σε διαδοχικά κλάσματα της στήλης που αντιπροσωπεύουν την κορυφή έκλουσης της πρωτεΐνης. **(B) *κ*1-*κ*10** Τα ίδια κλάσματα που παρουσιάζονται στο (A) 10 φορές συγκεντρωμένα (κατακρήμνιση με ακετόνη).

Αντίθετα με την προηγούμενη προσπάθεια, στην παραγωγή σταθερού δείγματος οδήγησε η χρήση μιας δεύτερης στήλης Ni-NTA και η σημαντική αύξηση των όγκων των διαλυμάτων έκπλυσης. Το νέο σχήμα διαφοροποιείται από το αρχικό (που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.3) στα εξής σημεία: Στο διάλυμα ομογενοποίησης αυξάνεται η συγκέντρωση ιμιδαζολίου από 10 σε 20 mM για την επιτάχυνση του διαχωρισμού της 10His-$HrcQ_B$ από τις άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου. Επιπλέον για τον καλύτερο διαχωρισμό της πρωτεΐνης από άλλες μη ειδικά δεσμευόμενες στο υπόστρωμα οι όγκοι των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για τις εκπλύσεις σχεδόν εικοσαπλασιάζονται. Στη συνέχεια τα κλάσματα της πρωτεΐνης που εκλούονται από την πρώτη κολώνα ενώνονται, αραιώνονται ώστε η σύσταση του διαλύματος να είναι 50 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 και φορτώνονται σε δεύτερη κολώνα Ni-NTA. Η κολώνα εκπλένεται με 10 όγκους κολώνας διάλυμα Γ και 10 όγκους κολώνας διάλυμα Δ. Η πρωτεΐνη εκλούεται με διάλυμα Ε.

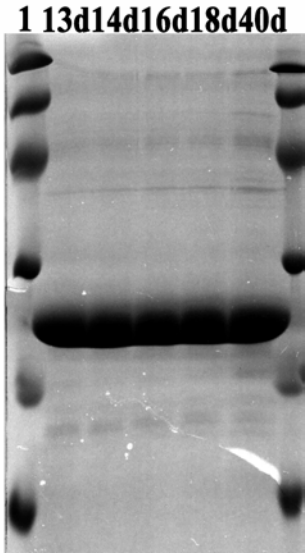
Η πρωτεΐνη που παράγεται με το τροποποιημένο σχήμα είναι πιο καθαρή σε σύγκριση με αυτή που παραγόταν από το αρχικό πρωτόκολο και επιπλέον είναι σταθερή τόσο στους 4 όσο και στους 18 ºC για τουλάχιστον 40 μέρες από τον καθαρισμό της (εικόνα 2.5Α και Β). Σημάδια πρωτεόλυσης δεν είναι εμφανή ούτε μετά από επώαση της πρωτεΐνης στους 37 ºC για περίπου δυο μέρες (εικόνα 2.6).

A

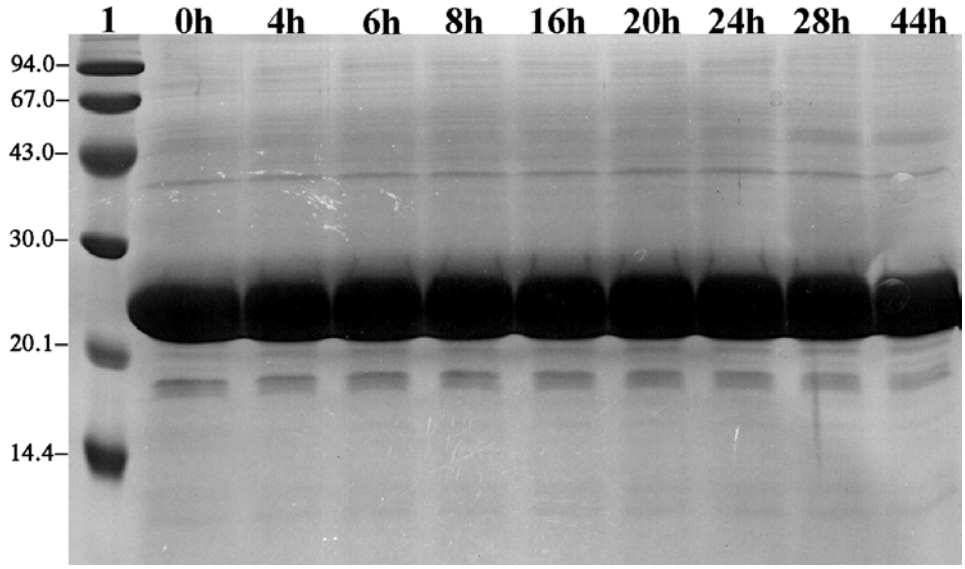


Εικόνα 2.5 (συνεχίζεται)

B



Εικόνα 2.5 Ανάλυση δειγμάτων της 10His-HrcQ$_B$ σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). Η πρωτεΐνη που παράγεται με το βελτιωμένο σχήμα καθαρισμού είναι σταθερή τουλάχιστον για 40 μέρες μετά τον καθαρισμό της**. 1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. **(A) 0d-41d** και **(B) 13d-40d** Διαφορετικής ηλικίας δείγματα της 10His-HrcQ$_B$ όπως διατηρήθηκαν στους 4 και τους 18 ºC αντίστοιχα.



Εικόνα 2.6 Η 10His-HrcQ$_B$ που παράγεται με το βελτιωμένο σχήμα είναι σταθερή ακόμα και μετά από επώαση στους 37 ºC. Ανάλυση δειγμάτων σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). Ο χρόνος επώασης κάθε δείγματος στους 37 ºC δίνεται στο πάνω μέρος της εικόνας σε ώρες. **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών.

2.2.5 Απομάκρυνση της αλληλουχίας των ιστιδινών από το δείγμα

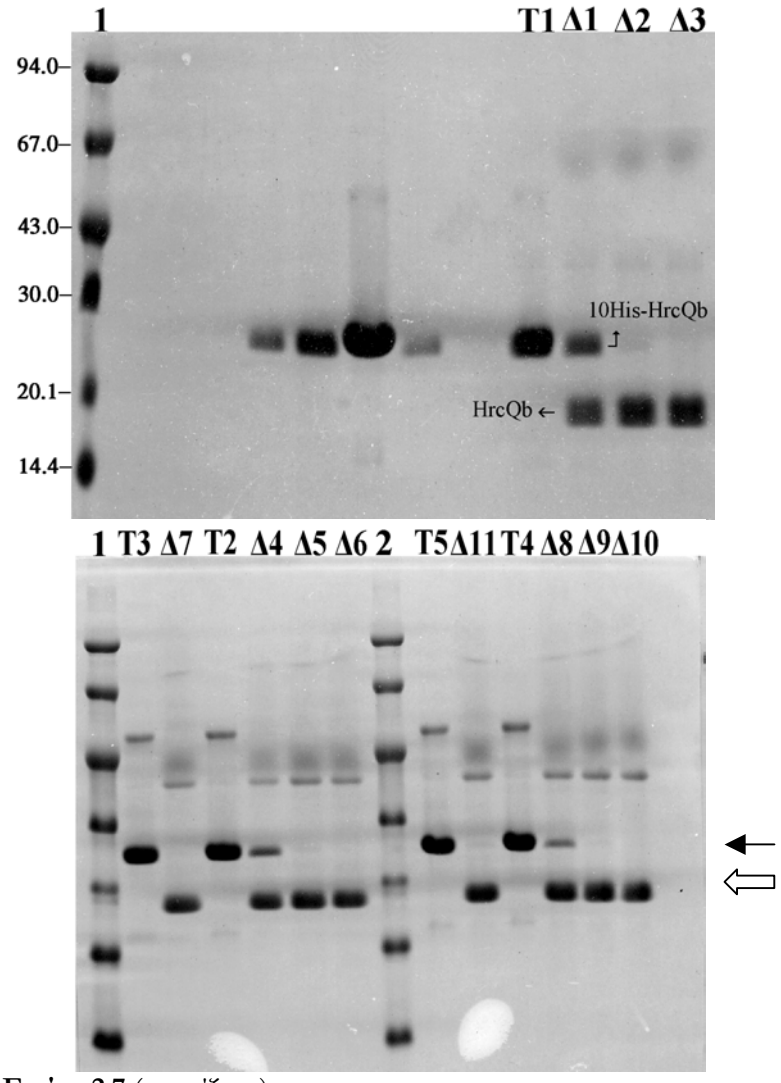
Η εισαγωγή της αλληλουχίας των ιστιδινών διευκολύνει και επιταχύνει σημαντικά την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τις συνοδεύουσες κυτταρικές πρωτεΐνες (Anthony *et al.* 2000, Sanchez 2001) αντικαθιστώντας τα πολλαπλά και χρονοβόρα στάδια ενός κλασικού χρωματογραφικού καθαρισμού από σχήματα που συνήθως περιλαμβάνουν μία ή δύο στήλες όπως ήδη δείχθηκε για την περίπτωση της $HrcQ_B$. Εντούτοις, η επίδραση της χίμαιρας των διαδοχικών ιστιδινών στην κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης είναι αμφιλεγόμενη (Bucher *et al.*, 2002). Συχνά η παρουσία της δεν εμποδίζει την κρυστάλλωση (Zhang *et al.* 1993, Tebbe *et al.* 2000, O' Neill *et al.* 2001, Desveaux *et al.* 2002) ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που έχει θετικό ρόλο είτε παράγοντας κρυστάλλους καλύτερης ποιότητας από αυτούς της φυσικής πρωτεΐνης είτε ευννοώντας την κρυστάλλωση όταν η φυσική πρωτεΐνη κατακρημνίζεται (Hakansson *et al.* 2000, Hofmann *et al.* 2000). Αντίθετα, τις περισσότερες φορές θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας στο σχηματισμό κρυστάλλων επειδή στερείται δομής και είναι συνήθως ευκίνητη ή επειδή εισάγει ετερογένειες στο δείγμα λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που μπορεί να υποστεί (Lamani *et al.* 2000, Kim *et al.* 2001).

Η αποτυχία κρυστάλλωσης της 10His-$HrcQ_B$ (τα πειράματα κρυστάλλωσης συζητούνται στην παράγραφο 2.3) έστρεψε τη προσοχή μας στην παρουσία των 10 ιστιδινών που θεωρήθηκαν πιθανή αιτία αυτής της αποτυχίας. Οι ιστιδίνες απομακρύνθηκαν και τα πειράματα κρυστάλλωσης επαναλήφθηκαν. Για την απομάκρυνση των ιστιδινών χρησιμοποιήθηκε η πρωτεάση Factor Xa (δες εικόνα 2.1). Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών απομάκρυνσης της αλληλουχίας των ιστιδινών πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων με μεταβλητές τη συγκέντρωση της πρωτεάσης (Factor Xa), τη θερμοκρασία και το χρόνο της αντίδρασης πρωτεόλυσης (LaVallie *et al.* 1994). Ελέγχθηκε επίσης η επίδραση της παρουσίας αναγωγικού παράγοντα (DTT) στην ενεργότητα της πρωτεάσης. Στον πίνακα 2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνθήκες που εξετάστηκαν. Το προϊόν κάθε αντίδρασης ελέγχθηκε με αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (εικόνα 2.7).

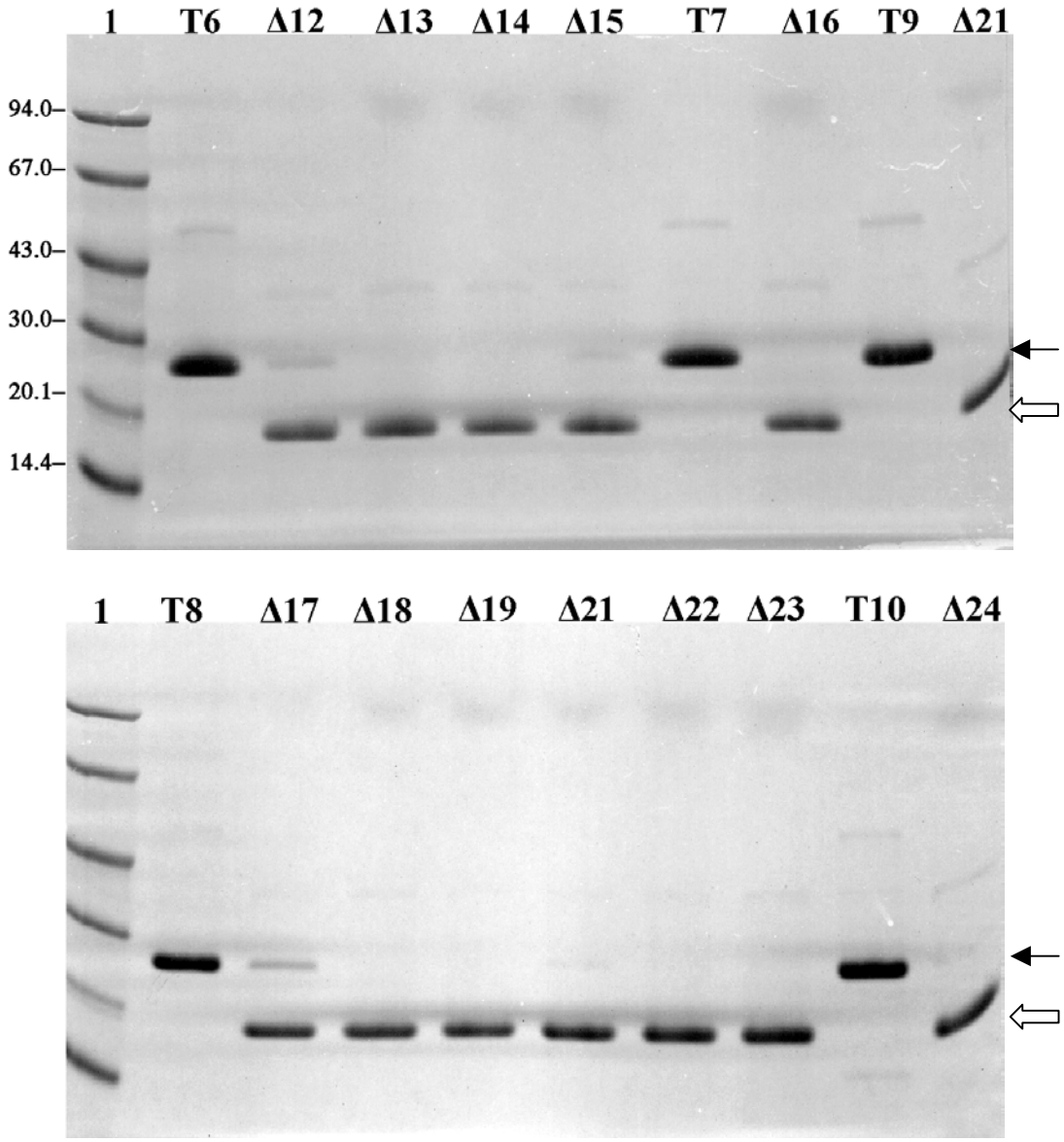
Πίνακας 2.1 Συνθήκες που διερευνήθηκαν για αποτελεσματική απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών.

Θερμοκρασία (ºC)	Factor Xa (units†/mg υποστρώματος)	DDT (mM)	Χρόνος αντίδρασης (ώρες)						
			4	8	16	32	48	72	144
18	0	-	T1	T2	T4	T6	T8	-	-
	2.5	-	Δ1	Δ4	Δ8	Δ12	Δ17	-	-
	5	-	Δ2	Δ5	Δ9	Δ13	Δ18	-	-
	10	-	Δ3	Δ6	Δ10	Δ14	Δ19	-	-
		20	-	-	-	Δ15	Δ20	Δ22	Δ23
4	0	-	-	T3	T5	T7	T9	T10	-
	10	-	-	Δ7	Δ11	Δ16	Δ21	Δ24	-

†Units: 1 unit είναι ποσότητα ενζύμου που παρουσιάζει ενζυμική ενεργότητα ικανή να καταλύσει τη μετατροπή 1 μmole υποστρώματος σε 1 min, στις πρότυπες για το ένζυμο συνθήκες αντίδρασης (International Union of Biochemistry, 1964).



Εικόνα 2.7 (συνεχίζεται)

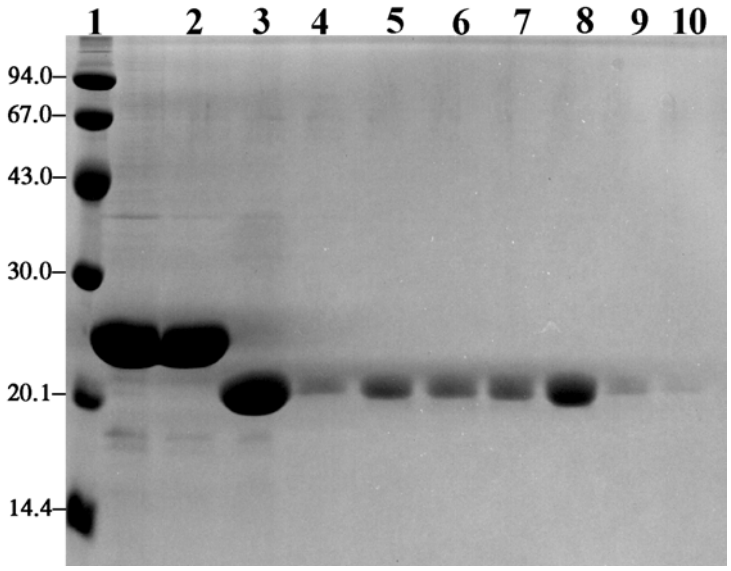


Εικόνα 2.7 Ανάλυση δειγμάτων (Δ1-Δ24, T1-T10) από το πείραμα που περιγράφεται στον πίνακα 2.1. Για να γίνει εμφανής η διαφορά μεγέθους ανάμεσα στην 10His-HrcQ$_B$ και την HrcQ$_B$ τα δείγματα αναλύθηκαν σε 10%T, 3%C SDS-PAGE με το σύστημα Tris-Tricine όπως περιγράφεται από τους Schägger & von Jagow (1987). Οι θέσεις των 10His-HrcQ$_B$ και HrcQ$_B$ σημειώνονται στην εικόνα με μαύρο και άσπρο βέλος αντίστοιχα. **1, 2** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa.

Λόγω της μικρής σταθερότητας και υψηλής ευαισθησίας της πρωτεΐνης προτιμήθηκε η αντίδραση με τον Factor Xa να λάβει χώρα στους 4 °C. Η πορεία που υιοθετήθηκε είναι η εξής: Η πρωτεΐνη που εκλούεται από την πρώτη κολώνα επωάζεται σε διάλυμα της πρωτεάσης που

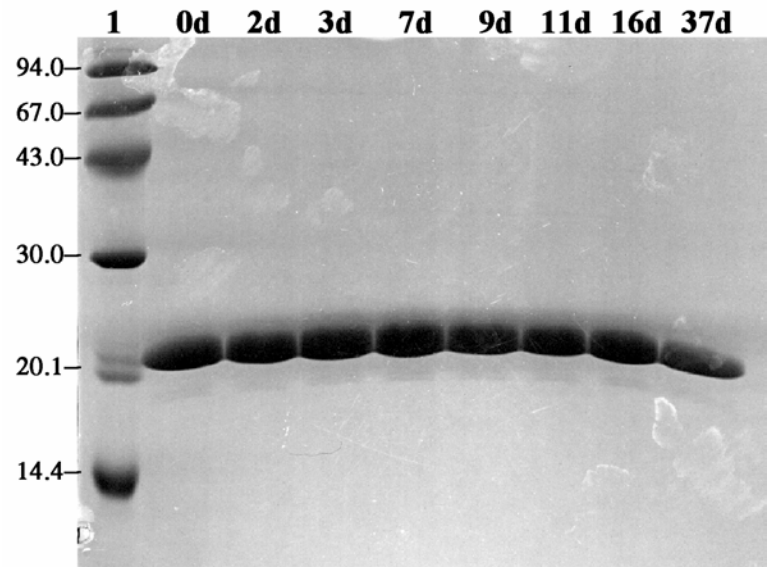
περιέχει 3.5 units Factor Xa/mg υποστρώματος, για 26 ώρες στους 4 ºC. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης φορτώνεται αργά στη δεύτερη κολώνα και ακολουθούν εκπλύσεις με διαλύματα που περιέχουν 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 και διαδοχικά αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (5, 10, 20, 50 και 300 mM). Τα μόρια της πρωτεΐνης από τα οποία έχει κοπεί η αλληλουχία των ιστιδινών δε δεσμεύονται στην κολώνα και εκλούονται κατά το φόρτωμα και την έκπλυση με το πρώτο διάλυμα (εικόνα 2.8).

Η πρωτεΐνη που παράγεται με αυτό το σχήμα είναι σταθερή στους 4 και τους 18 ºC για τουλάχιστον 40 μέρες (εικόνα 2.9 Α και Β)

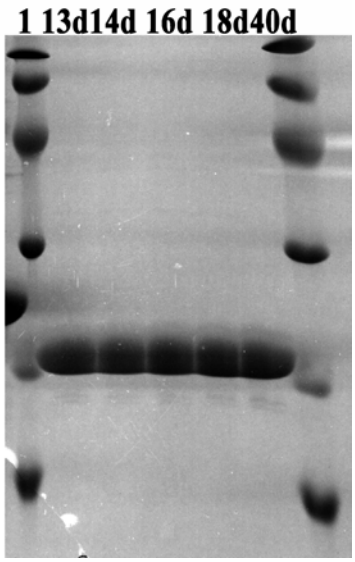


Εικόνα 2.8 Κλάσματα από τη δεύτερη στήλη Ni-NTA με την οποία η $HrcQ_B$ διαχωρίζεται από τυχόν μόρια της 10His-$HrcQ_B$ που δεν πρωτεολύθηκαν. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται σε kDa. **2** 10His-$HrcQ_B$. **3** Μίγμα από την αντίδραση πρωτεόλυσης που περιέχει κυρίως $HrcQ_B$ και μικρές ποσότητες πρωτεάσης και 10His-$HrcQ_B$. Το δείγμα αυτό φορτώνεται στη δεύτερη στήλη Ni-NTA. **4** Δείγμα που εκλούεται από την κολώνα κατά το φόρτωμα. **5, 6** Έκπλυση με 5 mM ιμιδαζόλιο. **7, 8** Έκπλυση με 10 mM ιμιδαζόλιο. **9, 10** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο.

A



B



Εικόνα 2.9 Η $HrcQ_B$ (χωρίς την ουρά ιστιδινών) είναι σταθερή τόσο στους 4 όσο και στους 18 ºC. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. **(A) 0d-37d** και **(B) 13d-40d** Διαφορετικής ηλικίας δείγματα της $HrcQ_B$ όπως διατηρήθηκαν στους 4 και τους 18 ºC αντίστοιχα. Η ηλικία των δειγμάτων αναγράφεται πάνω στην εικόνα σε μέρες.

2.3 Προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης $HrcQ_B$

2.3.1 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης

Περισσότερα από 300 mg καθαρής πρωτεΐνης –προερχόμενα από δεκατρείς καθαρισμούς- χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθούν περίπου 6000 συνθήκες κρυστάλλωσης. Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν αρχικά με δείγμα της 10His-$HrcQ_B$ και στη συνέχεια με δείγμα πρωτεΐνης χωρίς την ουρά ιστιδινών ($HrcQ_B$). Μεταξύ άλλων ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (8-15 mg/ml), του διαλύτη του πρωτεϊνικού διαλύματος (20, 200 και 300 mM NaCl σε 20 mM Tris/HCl pH 7.5) και της θερμοκρασίας (18 και 7 ºC, Luft *et al.* 2003). Οι συνθήκες που εξετάστηκαν περισσότερο διεξοδικά παρουσιάζονται αναλυτικά στους πίνακες του παραρτήματος Α. Περιληπτικά περιλαμβάνουν:

(i) Τα εμπορικώς διαθέσιμα από τη Hampton Research Grid screens PEG_{6000}, MPD, AS, NaCl, PEG/LiCl, και τα Crystal screen I και II, PEG/Ion, Cystal screen cryo, Natrix.

(ii) Διερεύνηση του συνδυασμού μεταβλητών [AS]/pH, [NaCl]/pH, [PEG]/pH, [MPD]/pH.

(iii) Διερεύνηση των διπλών συστημάτων [PEG]/[NaCl], [PEG]/[AS], [PEG]/[LiCl], [MPD]/[NaCl], [MPD]/[AS] (Papanikolau & Kokkinidis 1997).

(iv) Διερεύνηση της επίδρασης των πτητικών οργανικών διαλυτών ακετόνη, διοξάνη, 1-προπανόλη, 2-προπανόλη, μεθανόλη, 1-βουτανόλη, 2-βουτανόλη, αιθανόλη, DMSO (McPherson 1992).

(v) Διερεύνηση της επίδρασης των σακχάρων γλυκόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη, δεξτρόζη (Jeruzalmi & Steitz 1997).

(vi) Διερεύνηση της επίδρασης των πολυμερών polyvinylpyrrolidone και carboxymethylcellulose sodium salt (Patel *et al.* 1995).

(vii) Διερεύνηση της επίδρασης δισθενών κατιόντων (Ba^{2+}, Cd^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}) και χαοτροπικών παραγόντων (detergents, Hampton Research) σε ημικρυσταλλικές μορφές πρωτεΐνης (σφαιρουλίτες) που εμφανίστηκαν σε κάποιες συνθήκες.

(viii) Επειδή η εμφάνιση ιζήματος στα πειράματα κρυστάλλωσης ήταν πολύ συχνή ακόμα και με πρωτεϊνικά διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης, δοκιμάστηκε ένας συνδυασμός των τεχνικών ανάμιξης (batch, Chayen 1998) και κρεμαστής σταγόνας. Το πρωτεϊνικό διάλυμα και το διάλυμα του καθιζητή αναμιγνύονται από την αρχή στις τελικές τους συγκεντρώσεις μέσα σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα. Το μίγμα επωάζεται για ~2 ώρες στους 18 ºC και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση της περίσσειας πρωτεΐνης που έχει κατακρημνιστεί με τη

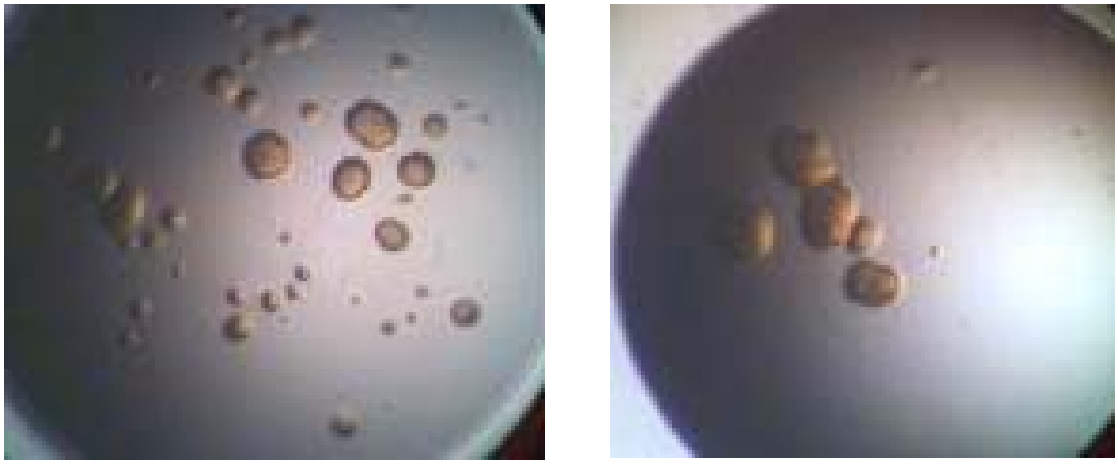
μορφή άμορφου ιζήματος. Μέρος του υπερκείμενου τοποθετείται ως κρεμαστή σταγόνα πάνω από διάλυμα κατακρημνιστή ίδιας συγκέντρωσης με το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην ανάμιξη. Περισσότερες λεπτομέρειες αναφέρονται στον πίνακα Α.3 που παρουσιάζεται στο παράρτημα Α.

(ix) Διερεύνηση συνθηκών σε χαμηλή ιονική ισχύ (παράρτημα Α, πίνακας Α.4).

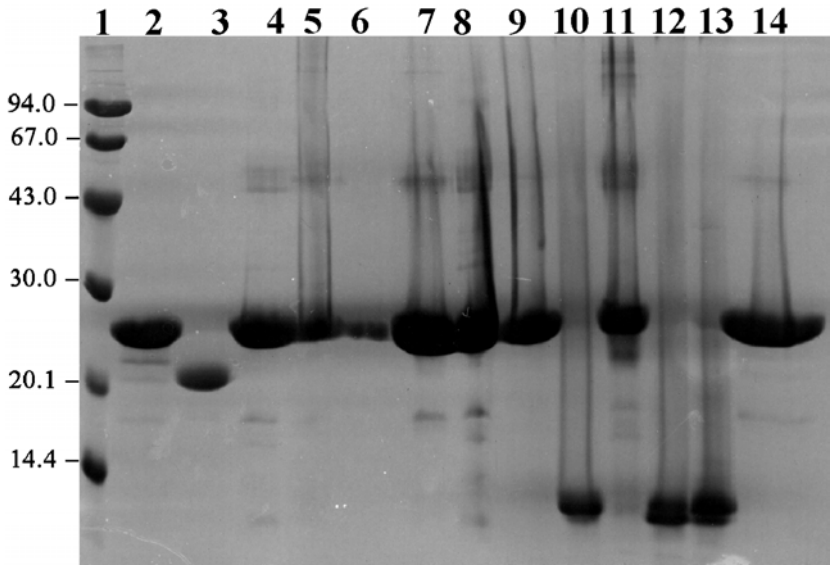
2.3.2 Αποτελέσματα των πειραμάτων κρυστάλλωσης

Σε καμιά από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν μεγάλωσαν κρύσταλλοι της πλήρους μήκους πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, μικροί κρύσταλλοι εμφανίστηκαν σε ορισμένες συνθήκες MPD/NaCl ενώ, σφαιρουλίτες που είναι μια ημικρυσταλλική κατάσταση (Coleman *et al.* 1960), σχηματίζονταν σχεδόν συστηματικά σε PEG/NaCl (εικόνα 2.10). Τέλος, μικροί βελονοειδείς κρύσταλλοι εμφανίστηκαν και σε συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος. Οι κρύσταλλοι αυτοί ήταν ασταθείς και μετατρέπονταν στη διάρκεια λίγων ωρών ή ημερών σε ίζημα ή σφαιρουλίτες. Με SDS-PAGE δείχτηκε ότι οι κρύσταλλοι που εμφανίστηκαν και στις δύο περιπτώσεις καθώς και οι σφαιρουλίτες προέρχονταν από πρωτεολυμένο δείγμα, γεγονός που δικαιολογεί γιατί όλες οι προσπάθειες για τη βελτίωση τους -σε χρήσιμους, για πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ, κρυστάλλους- απέβησαν άκαρπες (εικόνα 2.11).

A **B**



Εικόνα 2.10 Σφαιρουλίτες από πειράματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης $HrcQ_B$.



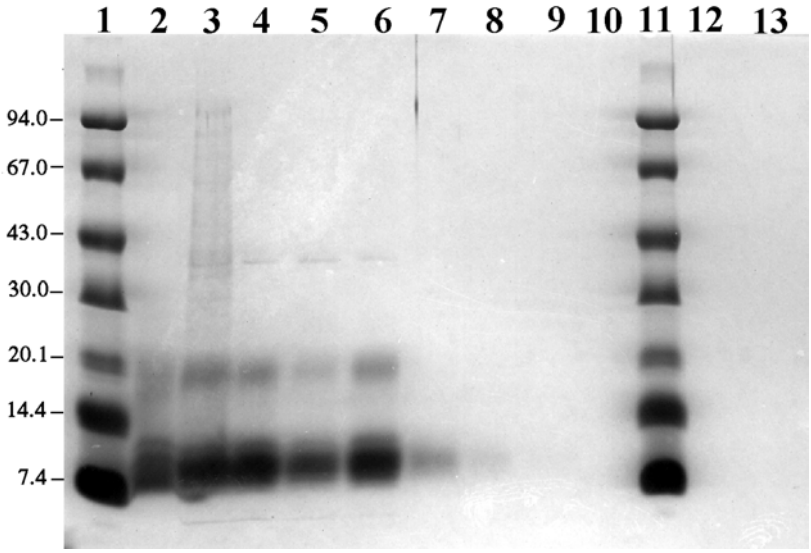
Εικόνα 2.11 Σύγκριση πρωτεϊνικών δειγμάτων από σταγόνες πειραμάτων κρυστάλλωσης. Όσες φορές εμφανίστηκαν κρύσταλλοι το δείγμα είχε πρωτεολυθεί. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρες μοριακών βαρών. Στα αριστερά δίνονται τα μοριακά βάρη σε kDa. **2, 3** Δείγματα της πρωτεΐνης με και χωρίς την ουρά των ιστιδινών αντίστοιχα. **4-9, 11, 14** Πρωτεϊνικά δείγματα από σταγόνες κρυστάλλωσης που δεν απέδωσαν κρυστάλλους. **10, 12, 13** Πρωτεϊνικά δείγματα από σταγόνες κρυστάλλωσης όπου εμφανίστηκαν κρύσταλλοι.

2.4 Σχεδιασμός ενός νέου μορίου

Η αποτυχία εύρεσης συνθηκών κρυστάλλωσης για την ολόκληρη (πλήρους μήκους) πρωτεΐνη είναι πιθανό να οφείλεται στον πεπερασμένο χαρακτήρα που έχει μια τέτοιου είδους διερεύνηση και επομένως στο ενδεχόμενο οι κατάλληλες συνθήκες να μην εξετάστηκαν. Είναι επίσης πιθανό να οφείλεται σε δομική ιδιαιτερότητα του μορίου όπως στην ύπαρξη ευέλικτων περιοχών που λόγω της κινητικότητας τους εμποδίζουν τη δημιουργία κρυσταλλικών επαφών. Από την άλλη, η εμφάνιση κρυστάλλων από μικρότερα πρωτεϊνικά τμήματα αποτέλεσε σαφή ένδειξη ότι κάποιο κομμάτι της πρωτεΐνης μπορεί να κρυσταλλωθεί σε συνηθισμένες συνθήκες. Για να βρεθεί ποιό τμήμα της πρωτεΐνης είναι κρυσταλλώσιμο και να ελεχθεί η πιθανότητα να αποτελεί λειτουργική υπομονάδα του ολόκληρου μορίου ελήφθησαν υπόψη τρεις παρατηρήσεις:

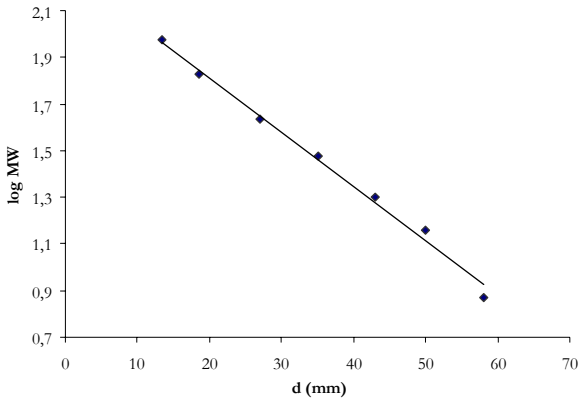
(i) **Οι κρυσταλλικές μορφές που ανακτώνται προέρχονται από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης**. Ένα αυθόρμητα πρωτεολυμένο δείγμα της $HrcQ_B$ χρησιμοποιήθηκε για να διευκρινιστεί αν τα πρωτεολυτικά κομμάτια που παραμένουν στο διάλυμα είναι τυχαίο μίγμα θραυσμάτων ή προέρχονται από το άμινο- ή το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό το δείγμα φορτώθηκε σε Ni-NTA στήλη (όγκου 700 μl) εξισορροπημένη με 10 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl και 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 και εκπλύθηκε διαδοχικά με διαλύματα περιεκτικότητας 10, 20 και 300 mM ιμιδαζολίου. Τα στάδια της πορείας αναλύθηκαν με πήκτωμα ακρυλαμίδης (εικόνα 2.12). Το γεγονός ότι όλο το δείγμα εκλούεται κατά το φόρτωμα και τα πρώτα στάδια των εκπλύσεων φανερώνει ότι τα πρωτεολυτικά θραύσματα δεν φέρουν την ουρά των ιστιδινών και επομένως προέρχονται από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (με την προϋπόθεση ότι η βασική αντίδραση πρωτεόλυσης συμβαίνει σε ένα και όχι σε δύο ή περισσότερα σημεία του ίδιου μορίου). Επειδή σταγόνες κρυστάλλωσης που περιέχουν σφαιρουλίτες και αυθόρμητα πρωτεολυμένο δείγμα πρωτεΐνης, εμφανίζουν ανάλογη ηλεκτροφορητική συμπεριφορά σε SDS-PAGE (εικόνα 2.12 γραμμές 2-4) τα συμπεράσματα από το προηγούμενο πείραμα γενικεύονται και για τους σφαιρουλίτες.

(ii) **Η πρωτεόλυση συμβαίνει περίπου στο μέσο του μορίου.** Το μέσο εκτιμώμενο (από SDS-PAGE, Hames 1994) μοριακό βάρος των πρωεολυτικών θραυσμάτων είναι ~9.4 kDa που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βασική αντίδραση πρωτεόλυσης συμβαίνει περίπου στο μέσο του μορίου (και πάλι με την προϋπόθεση ότι η πρωτεΐνη κόβεται σε ένα σημείο). Η εκτίμηση του μοριακού βάρους έγινε από το πήκτωμα ακρυλαμίδης της εικόνας 2.12 και η πορεία περιγράφεται αναλυτικά στην εικόνα 2.13.



Εικόνα 2.12 Τα πρωτεϊνικά θραύσματα που αποδίδουν μικρούς κρυστάλλους και σφαιρουλίτες δεν φέρουν την ουρά ιστιδινών. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε 10%T, 3%C SDS-PAGE με το σύστημα Tris-Tricine (Schägger & von Jagow 1987, βαμμένο με Coomassie Blue). Στα αριστερά δίνονται τα πρότυπα μοριακών βαρών σε kDa. **1, 11** Μάρτυρες μοριακών βαρών. **2** Διάλυμα σφαιρουλιτών. **3, 4** Πρωτεολυμένο δείγμα που φορτώθηκε σε στήλη Ni-NTA. **5** Δείγμα που δεν δεσμεύεται στην κολώνα. **6-8** Δείγμα που εκλούεται από την κολώνα κατά την έκπλυση με 10 mM ιμιδαζόλιο. **9, 10** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο. **12, 13** Έκπλυση με 300 mM ιμιδαζόλιο.

d (mm)	$\log_{10}$MW
13.5	1.973
18.5	1.826
27.0	1.633
35.0	1.477
43.0	1.301
50	1.158
58	0.869



Εικόνα 2.13 Καμπύλη αναφοράς του δεκαδικού λογάριθμου των μοριακών βαρών των μαρτύρων (logMW, τα μοριακά βάρη σε kDa) του πηκτώματος της εικόνας 2.12 συναρτήσει της απόστασης (d) που διάνυσαν από την κορυφή του πηκτώματος. Για το συγκεκριμένο τύπο πηκτώματος και τα μοριακά βάρη 7.5 – 94 kDa η σχέση είναι γραμμική (Schägger & von Jagow 1987). Το μέσο μοριακό βάρος των θραυσμάτων πρωτεολυμένου δείγματος εκτιμάται στα 9.4 kDa.

(iii) **Το καρβοξυτελικό ήμισυ της $HrcQ_B$ είναι υψηλά συντηρημένο.** Η παρατηρήσεις (i) και (ii) εντοπίζουν το σταθερό και κρυσταλλώσιμο τμήμα της $HrcQ_B$ στο καρβοξυτελικό της ήμισυ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η συντήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας ανάμεσα στην $HrcQ_B$ και τις ομόλογες πρωτεΐνες περιορίζεται στο καρβοξυτελικό τους τμήμα και είναι ιδιαίτερα υψηλή. Η πολλαπλή στοίχιση ομόλογων αμινοξικών αλληλουχιών που παρατίθεται στη συνέχεια (εικόνα 2.14) επιβεβαιώνει αυτό το χαρακτηριστικό και επιπλέον εντοπίζει το συντηρημένο τμήμα στα περίπου 80 τελευταία κατάλοιπα της $HrcQ_B$.

Η αμινοξική αλληλουχία που σημειώνεται με έντονα τυπογραφικά (εικόνα 2.14) κλωνοποιήθηκε και υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *E. coli* (για λεπτομέρειες δες στη συνέχεια, παράγραφος 3.1). Το τμήμα αυτό διατηρεί την ιδιότητα της ολόκληρης πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την $HrcQ_A$ (Ταμπακάκη 1999).

Εικόνα 2.14 Αμινοξική στοίχιση της $HrcQ_B$ με ομόλογες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες που στοιχίζονται είναι οι: $HrcQ_B$ από τη *P. syringae* pv phaseolicola (HrcQb_Psph), $HrcQ_B$ από τη *P. syringae* pv. tomato (HrcQb_Psto, κωδικός στην SWall Q9F0H3), HrcQ από την *E. amylovora* (HrcQ_Erwi, Q46646), FliN από την *E. coli* (FliN_Ecol, P15070), FliN από την *Y. pestis* (FliN_Yers, Q8ZF94), FliN από το *Bradyrhizobium japonicum* (FliN_Brad, BAC52267). Η πολλαπλή στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994). Οι ταυτότητες/ομοιότητες συσσωρεύονται εμφανώς στο καρβοξυτελικό τμήμα. Η αλληλουχία από την *Erwinia* (HrcQ_Erwi) είναι πολύ μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες. Για το λόγο αυτό, στην παρακάτω στοίχιση δεν έχει περιληφθεί το αμινοτελικό της άκρο.

```
CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

HrcQb_Psph      -------MSTEDLYQEDVEMLDDYEDPS-------------TEQHWSEEDGEPSGYATAE  40
HrcQb_Psto      -------MSTEDLYQDDVESLEDYDDETAEQE-----HEHEHEQQWAEPDDE-SEYAEAE  47
HrcQ_Erwi       CTEQLQALTAGDLLIPPVSYFTPDGQGSLTVAGQRLYGELQLPHHFLLNHLESTALNSAD 240
FliN_Ecol       ---------MSDMNNPADDNNGAMDDLWAEAL--------------SEQKSTSS-KSAAE  36
FliN_Yers       ---------MSDPKFPSADGKESVDDLWAYAF--------------NEQQATEKPTATTE  37
FliN_Brad       ---------MSDT-----DGQVPLPDLNG-------------------PMPPTGTDVGYNE  28
                             *      .      :                          .     :

HrcQb_Psph      PDD--HAAQEEQD---EPPALDSLALDLTLRCGELRLTLAELRRLDAGTILEVTGISPGH  95
HrcQb_Psto      PDDDEQEEQEEQQ---APSGLDSLALDLTLRCGELRLTLAELRRLDAGTILEVGGVAPGY 104
HrcQ_Erwi       DDALTEGSLPEYTGCEDNPQLASLPLSLEVRCDRTALTLGELQRLQAGSVVTLDNVTPGE 300
FliN_Ecol       TVFQQFGGGDVSGTLQDIDLIMDIPVKLTVELGRTRMTIKELLRLTQGSVVALDGLAGEP  96
FliN_Yers       GVFKSLEAPEGLGNLQDIDLILDIPVKLSVELGRTKMTIKELLRLSQGSVVSLDGLAGEP  97
FliN_Brad       DEYAAR-------AAADLEAVFDVPVQVSAVLGRSKMDVGELLKLGPGTVLELDRRVGEA  81
                                      : .:.:.:    ..  : : ** :*  *::: :

HrcQb_Psph      ATLCHGEQVVAEGELVDVEGRLGLQITRLVTRS-------- 128
HrcQb_Psto      ATLCHGERVVAEGELVDVDGRLGLQITRLAAQP-------- 137
HrcQ_Erwi       AGLYHGDTLIARGELVDVEGHLGLQLTQLLLTSCQEVG--- 338
FliN_Ecol       LDILINGYLIAQGEVVVVADKYGVRITDIITPSERMRRLSR 137
FliN_Yers       LDILINGYLIAQGEVVVVADKYGVRITDIITSSERMRRLSR 138
FliN_Brad       IDIYVNNKLVARGEVVLVEDKLGVTMTEIIKTERT------ 116
                  :  .  ::*.**:* * .: *: :* :
```

Κ ε φ ά λ α ι ο 3

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ $HrcQ_B$-C

…νήπιοι, οὐδέ ἴσασιν ὅσῳ πλέον ἥμισυ παντός...

Ησίοδος, ‘ Έργα και Ημέρες’

3.1 Υπερέκφραση και παραγωγή της $HrcQ_B$-C

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί το υψηλά συντηρημένο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης $HrcQ_B$ (στο εξής θα αναφέρεται ως $HrcQ_B$-C, εικόνα 3.1) κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pPROEX HTa (Life Technologies Inc.). Η κλωνοποίηση έγινε στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο του καθηγητή Ν. Πανόπουλου από την Δρ. Α. Ταμπακάκη. Ο φορέας pPROEX HTa (Polayes 1996) αποτελείται από τον υποκινητή *Trc* για υψηλά επίπεδα έκφρασης σε *E. coli* και τον καταστολέα *lac*I για ρύθμιση της έκφρασης με IPTG. Επιλέχτηκε γιατί φέρει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που εκφράζεται στο αμινοτελικό άκρο της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης ως έξι διαδοχικές ιστιδίνες. Επιπλέον, μεταξύ των ιστιδινών και της πρωτεΐνης μεσολαβεί το επταπεπτίδιο ENLYFQG το οποίο αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση rTEV που το πρωτεολύει στη θέση QG (εικόνα 3.1, δες επίσης σελ.51). Τα πλεονεκτήματα από την παρουσία των ιστιδινών και της ενδιάμεσης αλληλουχίας πρωτεόλυσης συζητήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (δες 2.1). Το προϊόν εκφράζεται σε κύτταρα *E. coli* της σειράς DH5α.

MSYY*HHHHHH*DYYDIPTTENLYFQ↓GAMDP**QDEPPALDSLALDLTLRCG ELRLTLAELRRLDAGTILEVTGISPGHATLCHGEQVVAEGELVDVEGRL GLQITRLVTRS**

Εικόνα 3.1 Η αμινοξική αλληλουχία της $HrcQ_B$-C (έντονα τυπογραφικά) όπως εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pPROEX HTa με μια ουρά ιστιδινών (πλάγια τυπογραφικά) και την αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση rTEV (υπογραμμισμένα αμινοξέα). Το βέλος δηλώνει τη θέση πρωτεόλυσης.

Τα αρχικά πειράματα παραγωγής της $HrcQ_B$-C δεν απέδωσαν ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό διερευνήσαμε διεξοδικά -όπως αναφερέται στη συνέχεια- την υπόθεση σχηματισμού inclusion bodies. Η ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συνοδεύεται συχνά από συσσώρευση μέρους της υπερεκφραζόμενης πρωτεΐνης με τη μορφή αδιάλυτων, πολυμοριακών συναθροίσεων που στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ως inclusion bodies (Kopito 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι στις γενετικά τροποποιημένες *E. coli* αυτά τα αδιάλυτα πρωτεϊνικά συσσωματώματα σχηματίζονται πολύ γρήγορα μετά την πρωτεϊνοσύνθεση από μερικώς διπλωμένα, δομικά ενδιάμεσα της πρωτεΐνης (Hartley & Kane 1987, King & Haase-Pettingell 1987, Haase-Pettingel & King 1988). Πιθανές αιτίες στις οποίες αποδίδεται ο σχηματισμός τους είναι η αστάθεια των δομικών ενδιαμέσων στο περιβάλλον του ξενιστή λόγω έλλειψης των κατάλληλων παραγόντων και μηχανισμών σταθεροποίησης (Kopito 2000) ή ο κινητικός ανταγωνισμός μεταξύ αναδίπλωσης και συνάθροισης λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης (Goldberg *et al.* 1991). Για την επανάκτηση του εγκλωβισμένου σε inclusion bodies προϊόντος απαιτείται αρχικά επαναδιάλυση των συσσωματωμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις χαοτροπικών παραγόντων και επομένως αποδιάταξη της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, αλλαγή των συνθηκών π.χ. με διαπίδυση μπορεί να οδηγήσει στην ανάκτηση ενός σωστά διπλωμένου, βιολογικά ενεργού πρωτεϊνικού μορίου (Fish & Hoare 1987, Nagai *et al.* 1987, Marston *et al.* 1987, Gao *et al.* 1998, Patra *et al.* 2000, García-Sáez & Plasterk 2000). Η διαδικασία αυτή έχει σχετικά μικρές αποδόσεις, συνοδεύεται από αμφιβολίες για το αν η πρωτεΐνη υιοθέτησε τη φυσική της διαμόρφωση ενώ συχνά αποδεικνύεται ότι ο σχηματισμός των συναθροίσεων δεν είναι αντιστρέψιμη πορεία. Για τους λόγους αυτούς η προσπάθεια στρέφεται στην αποτροπή ή τον περιορισμό της δημιουργίας τους. Έχει δειχτεί ότι ο σχηματισμός των

inclusion bodies επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το χρόνο, τα θρεπτικά μέσα, τις συνθήκες επαγωγής και την παρουσία μιας ευρείας λίστας ουσιών (Klein & Dhurjati 1995, Lindwall *et al.* 2000, Bondos & Bicknell 2003). Ο τρόπος με τον οποίο οι παράγοντες αυτοί επιδρούν στις διάφορες περιπτώσεις ποικίλει και πρέπει κάθε φορά να διευρευνάται για την επίτευξη των βέλτιστων αποτελεσμάτων.

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα πειράματα με τα οποία διερευνήθηκε η επίδραση που έχουν στην παραγωγή διαλυτής πρωτεΐνης ($HrcQ_B$-C) οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων και συγκεκριμένα: (i) η θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων πριν και μετά την επαγωγή, (ii) η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στην οποία ξεκινά η επαγωγή της υπερέκφρασης, (iii) η συγκέντρωση του παράγοντα που επάγει την υπερέκφραση (IPTG) και (iv) ο χρόνος επαγωγής.

Πίνακας 3.1 Συνθήκες που διερευνήθηκαν προκειμένου να βρεθούν εκείνες που αποδίδουν τη μέγιστη ποσότητα διαλυτής πρωτεΐνης.

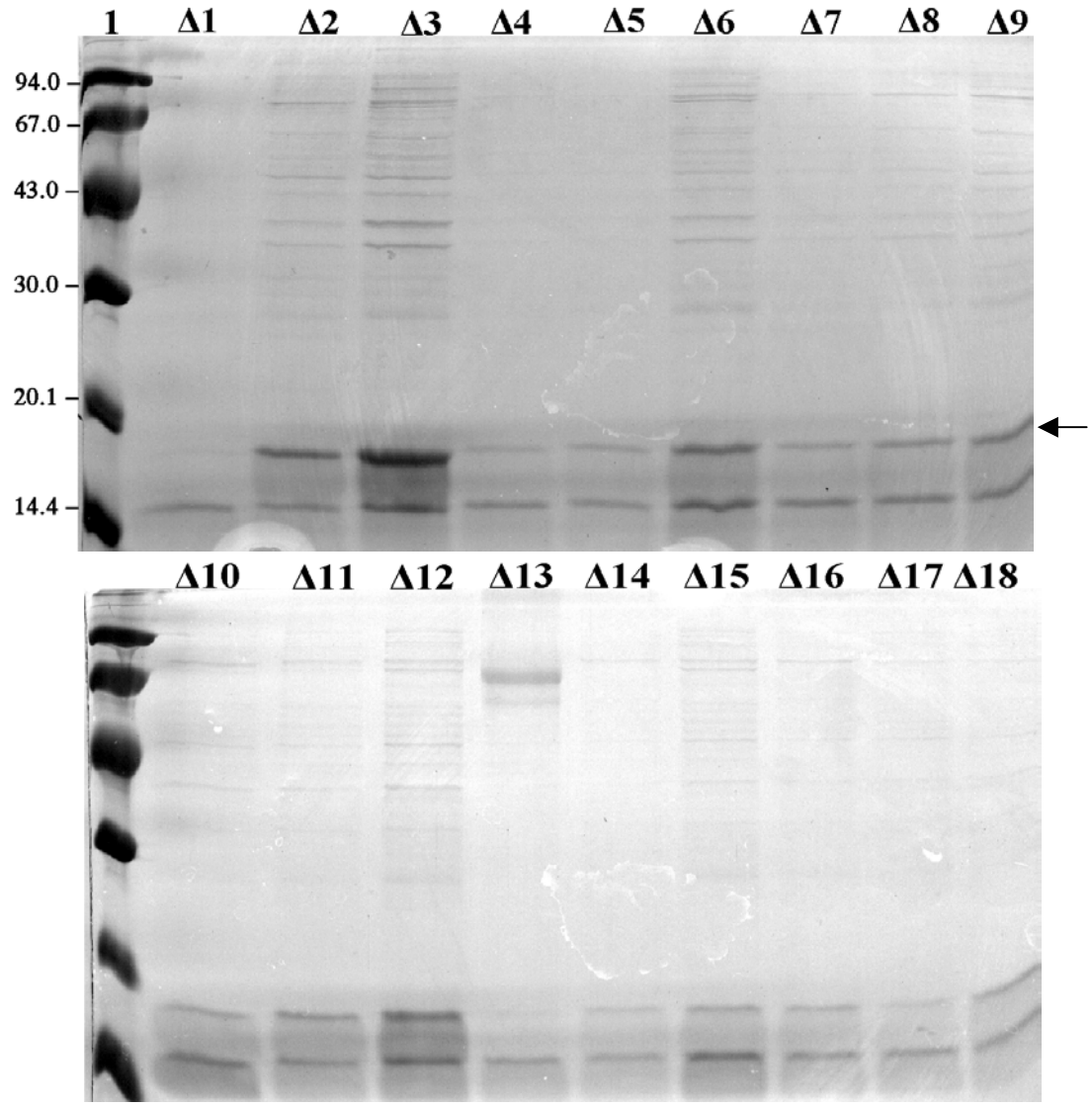
Θερμοκρασία μεγαλώματος καλλιέργειας πριν την επαγωγή (ºC)	**OD_{600} επαγωγής**	**C_{IPTG} (mM)**	**Θερμοκρασία μεγαλώματος καλλιέργειας μετά την επαγωγή (ºC)**	**Χρόνος επαγωγής (ώρες)**	**Αριθμός δείγματος**
37	0.61	0.5	30	2	Δ1
				5	Δ2
				21	Δ3
			25	2	Δ4
				5	Δ5
				21	Δ6
			18	2	Δ7
				5	Δ8
				21	Δ9
		1.0	30	2	Δ10
				5	Δ11
				21	Δ12
			25	2	Δ13
				5	Δ14
				21	Δ15
			18	2	Δ16
				5	Δ17
				21	Δ18
	1.07	Χωρίς επαγωγή			Δ19
		0.5	30	2	Δ20
				5	Δ21
				20	Δ22
			25	2	Δ23
				5	Δ24
				20	Δ25

Θερμοκρασία μεγαλώματος καλλιέργειας πριν την επαγωγή (ºC)	**OD_{600} επαγωγής**	**C_{IPTG} (mM)**	**Θερμοκρασία μεγαλώματος καλλιέργειας μετά την επαγωγή (ºC)**	**Χρόνος επαγωγής (ώρες)**	**Αριθμός δείγματος**
			18	2	Δ26
				5	Δ27
				20	Δ28
		1.0	30	2	Δ29
				5	Δ30
				20	Δ31
			25	2	Δ32
				5	Δ33
				20	Δ34
			18	2	Δ35
				5	Δ36
				20	Δ37
	2.08	Χωρίς επαγωγή			Δ38
	24 h*	Χωρίς επαγωγή			Δ39
30	1.24	Χωρίς επαγωγή			Δ40
		0.5	30	4	Δ41
				18	Δ42
			25	4	Δ43
				18	Δ44
			18	4	Δ45
				18	Δ46
		1.0	30	4	Δ47
				18	Δ48
			25	4	Δ49
				18	Δ50
			18	4	Δ51
				18	Δ52
	1.94	Χωρίς επαγωγή			Δ53
	24 h*	Χωρίς επαγωγή			Δ54
25	0.61	Χωρίς επαγωγή			Δ55
		0.5	25	16	Δ56
		1.0	25	16	Δ57
	0.92	Χωρίς επαγωγή			Δ58
		0.5	25	16	Δ59
		1.0	25	16	Δ60
	24 h*	Χωρίς επαγωγή			Δ61
18	2.10	Χωρίς επαγωγή			Δ62

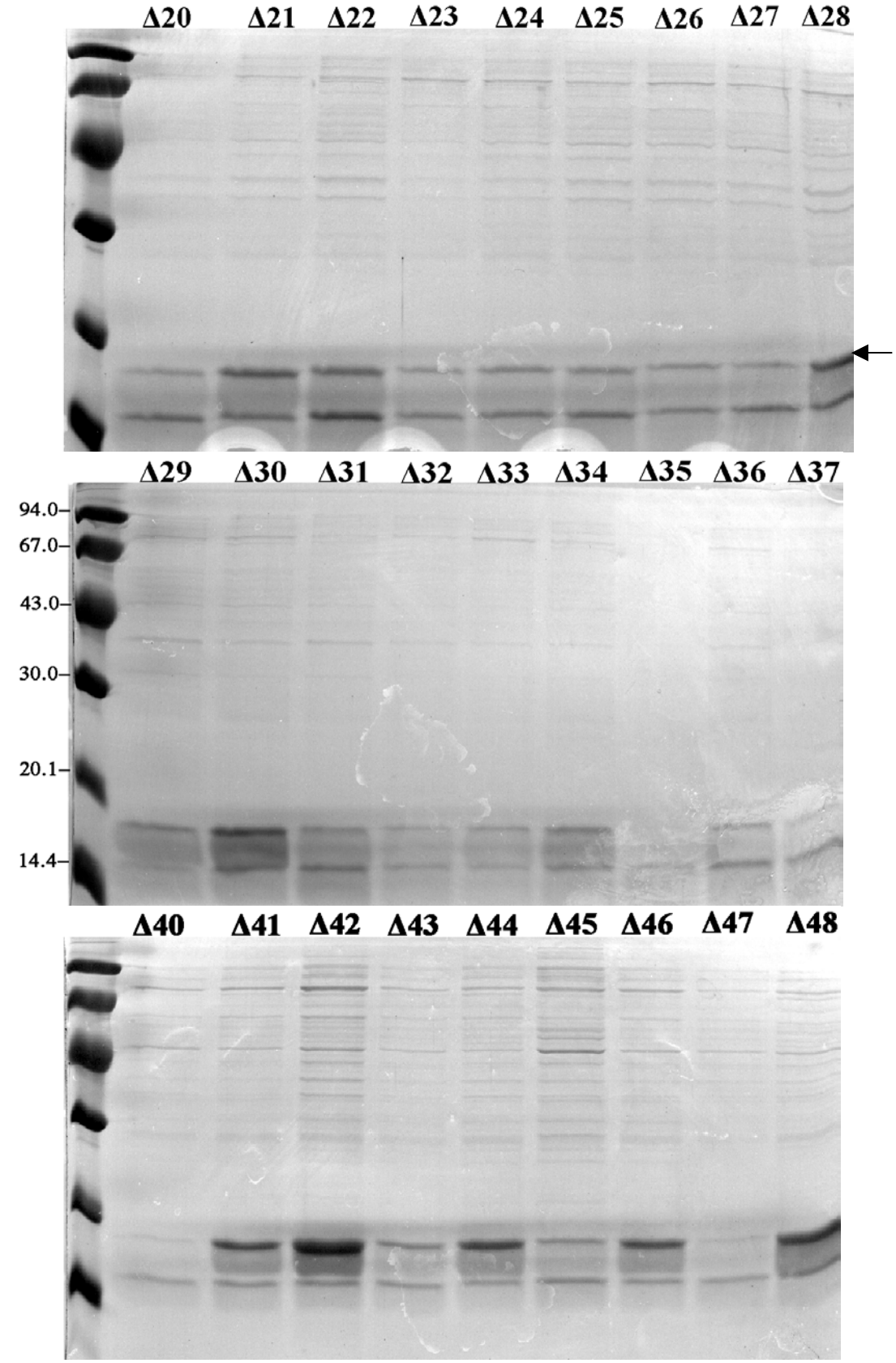
* Η καλλιέργεια επωάστηκε στη θερμοκρασία που αναφέρεται στην πρώτη στήλη του πίνακα και το δείγμα συλλέχθηκε 24 ώρες αργότερα χωρίς να μετρηθεί η οπτική του πυκνότητα.

Από την κάθε συνθήκη (δείγματα Δ1-Δ62) συλλέγονται και φυγοκεντρούνται 3 ml καλλιέργειας. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα αφού εκπλυθούν από το θρεπτικό μέσο διαρρηγνύονται με λυσοζύμη και υπέρηχους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση από την οποία συλλέγεται το υπεκείμενο και αναμιγνύεται με 40 μl αιωρήματος Ni-NTA. Το μίγμα αναδεύεται

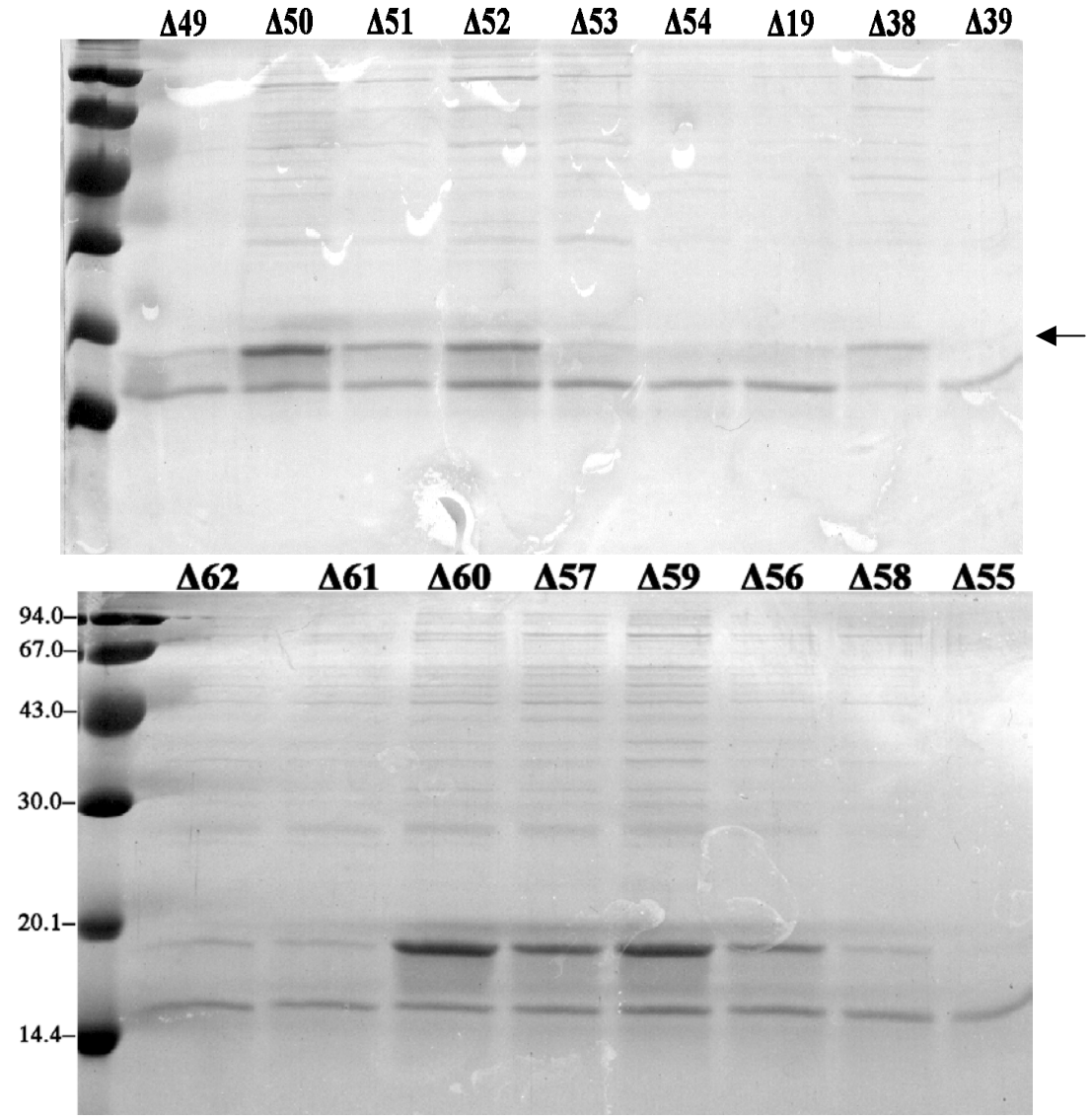
για 30 min στους 4 ºC. Η ρητίνη διαχωρίζεται από την υγρή φάση με φυγοκέντρηση, εκπλένεται δύο φορές με 40 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. Οι προσδεδεμένες σε αυτήν πρωτεΐνες εκλούονται με διάλυμα 300 mM ιμιδαζολίου και διαχωρίζονται από τη ρητίνη με φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο αναλύθηκε σε SDS-PAGE, (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 (συνεχίζεται)



Εικόνα 3.2 (συνεχίζεται)



Εικόνα 3.2 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένα με Coomassie Blue). Ανάλυση των δειγμάτων από το πείραμα που περιγράφεται στον πίνακα 3.1. Αριστερά (γραμμή **1**) αναπτύσσονται οι μάρτυρες μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται σε kDa. Το βέλος υποδεικνύει τη θέση της 6His-HrcQ$_B$-C που τρέχει λίγο πιο κάτω από το μάρτυρα των 20 kDa. Στα Δ3, Δ42 και Δ48 η ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης υπερτερεί έναντι των άλλων συνθηκών.

Η μεγαλύτερη απόδοση διαλυτής πρωτεΐνης φαίνεται να επιτυγχάνεται όταν η καλλιέργεια μεγαλώνει στους 30 ºC, η επαγωγή γίνεται σε OD_{600} ~1.0 με 0.5 mM IPTG και η επώαση συνεχίζεται για ~18 ώρες στους 30 ºC (Δ42, δες πίνακα 3.1). Εναλλακτικά, ικανοποιητικά αποτελέσματα λαμβάνονται και όταν η καλλιέργεια μεγαλώνει στους 37 ºC, η επαγωγή γίνεται σε OD_{600} ~0.6 με 0.5 mM IPTG και η επώαση συνεχίζεται για άλλες 20 ώρες

στους 30 ºC (Δ3). Για σύγκριση αναφέρουμε ότι τα αρχικά πειράματα παραγωγής της $HrcQ_B$-C έγιναν στις συνθήκες που αντιστοιχούν στο Δ30.

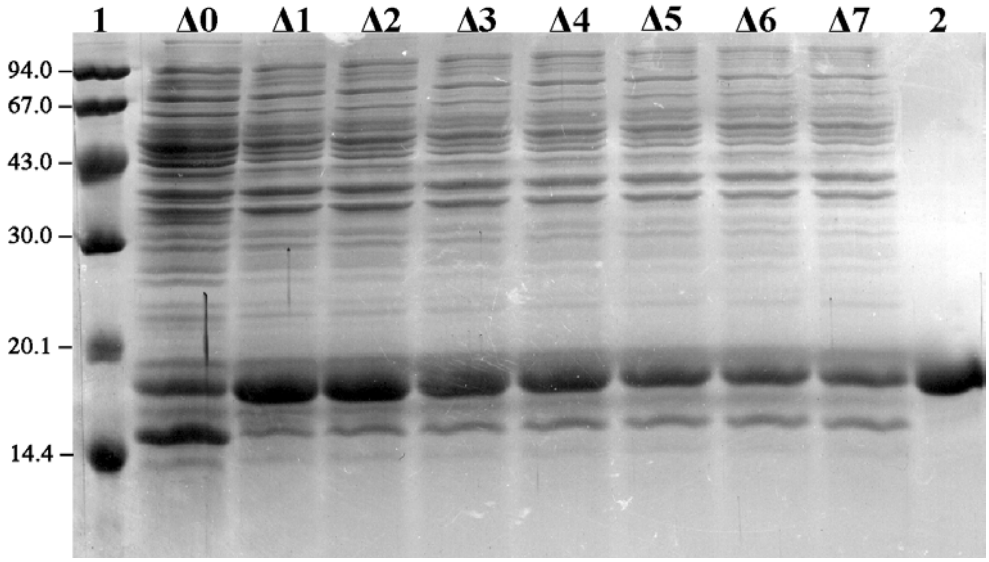
Ακόμα και με τις βελτιστοποιημένες συνθήκες μεγαλώματος, μετά την ομογενοποίηση και διάρρηξη των κυττάρων σε 20 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 μέρος της πρωτεΐνης κατακρημνίζεται με το κλάσμα των κυτταρικών υπολειμμάτων. Επειδή είναι γνωστό ότι η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης επηρεάζει τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης (Lindwall *et al.* 2000) κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στην επαναφορά της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Περίπου 2 g ιζήματος (ίζημα κυτταρικών υπολειμμάτων που προήλθε από τη φυγοκέντρηση μετά τη λύση των κυττάρων) ομογενοποιήθηκαν με 20 ml 20 mM ιμιδαζόλιο, 500 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. Σε επτά μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε από 1.5 ml του ομογενοποιήματος και ακολούθησε φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου (Δ0, εικόνα 3.3). Καθένα από τα επτά ιζήματα ομογενοποιήθηκε με 1.5 ml ενός από τα διαλύματα που αναφέρονται στον πίνακα 3.2. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και 10 μl από κάθε υπερκείμενο αναλύθηκαν σε SDS-PAGE (εικόνα 3.3). Συγκρίνοντας την ποσότητα της πρωτεΐνης που επανήλθε στο διάλυμα στα δείγματα Δ1-Δ7 γίνεται φανερό ότι η επαναφορά της πρωτεΐνης στο διάλυμα ευνοείται από μικρές συγκεντρώσεις NaCl.

Ανάπτυξη 1 lt κυτταρικής καλλιέργειας με τις συνθήκες που αντιστοιχούν στο Δ42 (δες πίνακα 3.1) και ομογενοποίηση/διάρρηξη των κυττάρων σε διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης NaCl (50 mM) αποδίδει περισσότερα από 10-15 mg πρωτεΐνης.

Πίνακας 3.2 Οι συγκεντρώσεις NaCl που εξετάστηκαν προκειμένου να βρεθούν εκείνες που ευνοούν την επαναφορά της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Καθένα από τα δείγματα Δ1-Δ7 διαλυτοποιείται σε διάλυμα που περιέχει 20 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 και τη συγκέντρωση NaCl που αναφέρεται στον πίνακα.

Συγκέντρωση NaCl (mM)	0	50	100	150	200	250	300
Αριθμός δείγματος	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4	Δ5	Δ6	Δ7



Εικόνα 3.3 Ανάλυση των δειγμάτων Δ1-Δ7 από το πείραμα που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. **2** Καθαρό δείγμα της 6His-HrcQ$_B$-C.

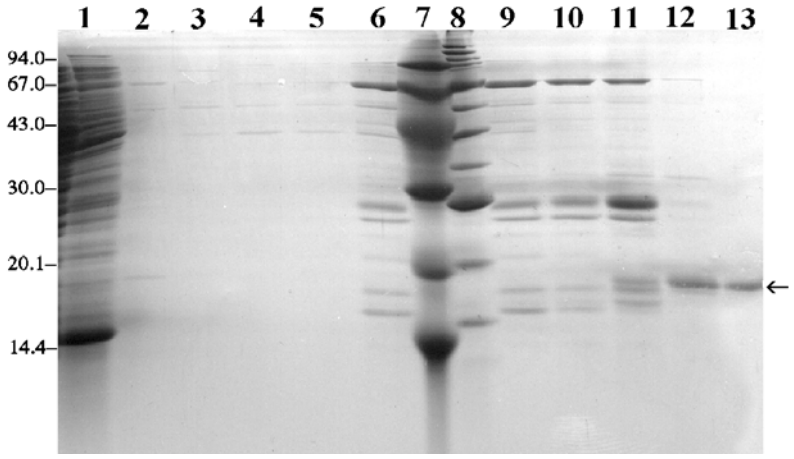
3.2 Ισχύς πρόσδεσης της HrcQ$_B$-C σε στήλη Ni-NTA

Για να σχεδιαστεί ένας αποτελεσματικός καθαρισμός που να απαλλάσσει την 6His-HrcQ$_B$-C το συντομότερο από όσο το δυνατό περισσότερες συνοδεύουσες πρωτεΐνες ελέγχθηκε η ισχύς πρόσδεσης της σε στήλη Ni-NTA.

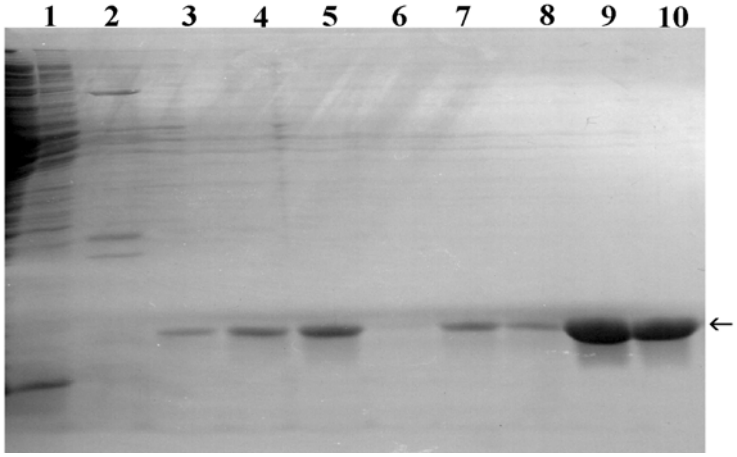
13 g κυτταρικής πάστας, που προήλθαν από 2 lt καλλιέργειας ομογενοποιήθηκαν με 70 ml διαλύματος ιμιδαζολίου 10 mM (όλα τα διαλύματα που αναφέρονται σε αυτή τη παράγραφο περιέχουν επίσης 300 mM NaCl και 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0). Ακολούθησε διάρρηξη των κυττάρων και φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο φορτώθηκε σε στήλη Ni-NTA (όγκου V_x=8 ml) η οποία στη συνέχεια εκπλύθηκε διαδοχικά με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου: 10 (12xV_x), 20 (12xV_x), 40 (1xV_x) και 100 mM (6xV_x). Σε παρένθεση δίνονται οι όγκοι των αντίστοιχων διαλυμάτων (σε όγκους κολώνας, V_x). Τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE (εικόνα 3.4). Μικρές ποσότητες πρωτεΐνης αποδεσμεύονται από την κολώνα κατά τις εκπλύσεις με 100 mM ιμιδαζόλιο.

Το πείραμα επαναλήφθηκε και η στήλη εκπλύθηκε διαδοχικά με διαλύματα ιμιδαζολίου 20 (12xV_x), 40 (12xV_x), 80 (12xV_x), 100 (1V_x) και 300 mM (3xV_x, εικόνα 3.5).

Όμοια με προηγουμένως σε παρένθεση δίνονται οι όγκοι των διαλυμάτων. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη προσδένεται ισχυρά στη στήλη αφού η έκλουση του κύριου μέρους της γίνεται στα 300 mM.



Εικόνα 3.4 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1, 2** Αρχή και τέλος αντίστοιχα έκπλυσης με 10 mM ιμιδαζόλιο. **3, 4** Αρχή και τέλος αντίστοιχα έκπλυσης με 20 mM ιμιδαζόλιο. **5, 6, 9** Αρχή, μέση και τέλος έκπλυσης με 40 mM ιμιδαζόλιο. **7, 8** Μάρτυρες μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. **10-13** Διαδοχικές εκπλύσεις με 100 mM ιμιδαζόλιο. Το βέλος στα δεξιά της εικόνας υποδηλώνει τη θέση της 6His-HrcQ$_B$-C.



Εικόνα 3.5 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο. **2** Έκπλυση με 40 mM ιμιδαζόλιο. **3-7** Διαδοχικές εκπλύσεις με 80 mM ιμιδαζόλιο. **8** Έκπλυση με 100 mM Ιμιδαζόλιο. **9, 10** Εκπλύσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. Το βέλος στα δεξιά της εικόνας υποδηλώνει τη θέση της 6His-HrcQ$_B$-C.

3.3 Εύρεση βέλτιστων συνθηκών απομάκρυνσης της ουράς ιστιδινών

Η πρωτεάση rTEV προέρχεται από ανασυνδυασμό της TEV (πρωτεάση του tobacco etch virus, Polayes *et al.*, 1994) με μια αλληλουχία ιστιδινών που προστίθεται στο αμινοτελικό της άκρο (Parks *et al.*, 1994). Η πρωτεάση αυτή αναγνωρίζει την αλληλουχία ENLYFQG και πρωτεολύει μεταξύ QG (δες επίσης εικόνα 3.1). Χρησιμοποιείται ευρέως για την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες γιατί συνδυάζει πλεονεκτήματα όπως υψηλό βαθμό ειδικότητας, έλλειψη ευαισθησίας στους αναστολείς πρωτεασών που συνήθως χρησιμοποιούνται στους καθαρισμούς πρωτεϊνών και εύκολο διαχωρισμό από το μίγμα της αντίδρασης πρωτεόλυσης λόγω της ουράς ιστιδινών. Η ποσότητα της πρωτεάσης που απαιτείται για την πλήρη πρωτεόλυση του υποστρώματος ποικίλει και εξαρτάται από το πόσο η δομή της πρωτεΐνης αφήνει εκτεθειμένη την αλληλουχία που αναγνωρίζει και υδρολύει η πρωτεάση.

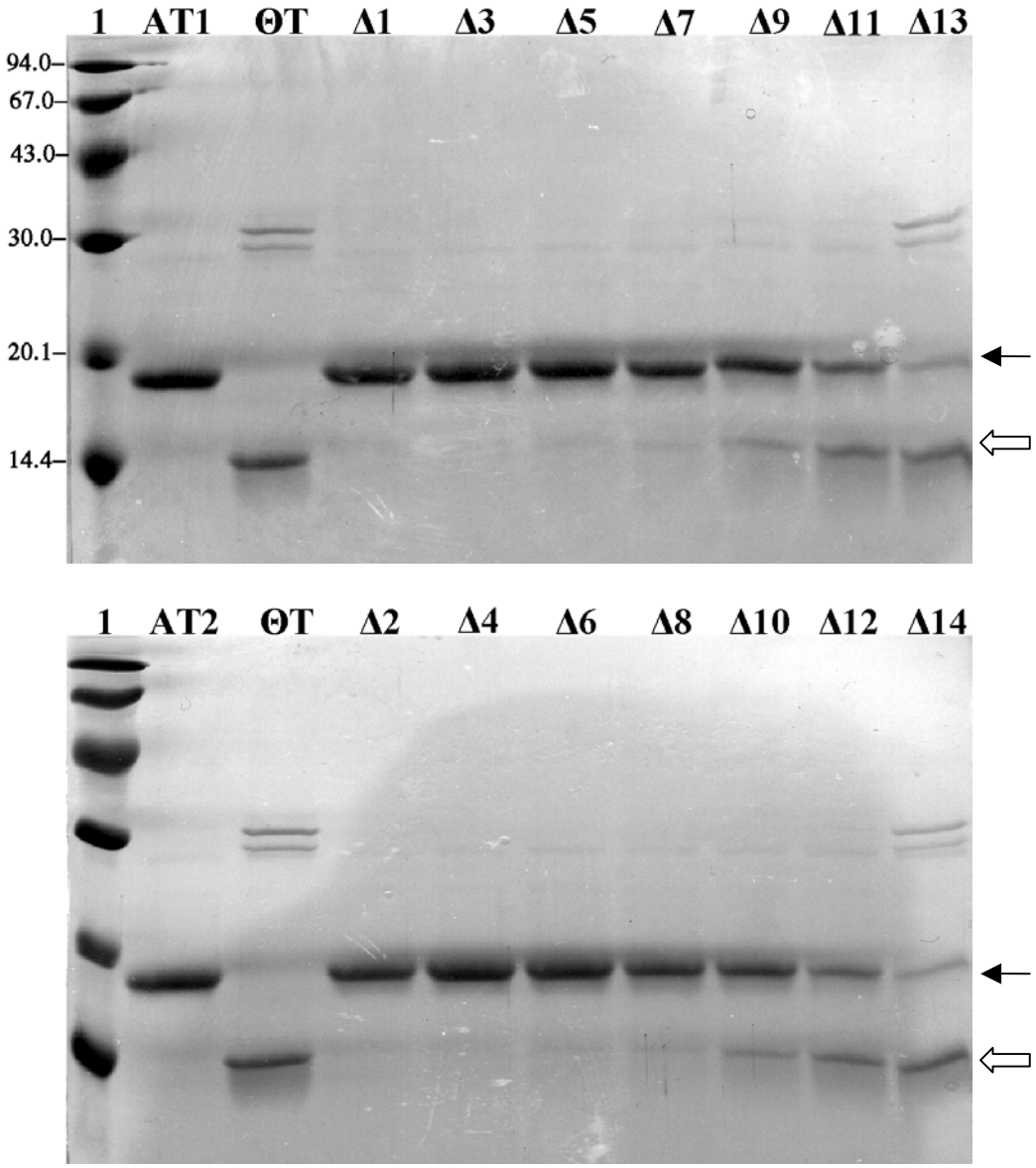
Στη συνέχεια περιγράφονται τέσσερις σειρές πειραμάτων, που έγιναν με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επώασης της 6His-HrcQ_B-C με την rTEV για την πλήρη απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από την πρωτεΐνη. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων (Πίνακας 3.3, εικόνα 3.6) ελέγχθησαν διαφορετικές αναλογίες μαζών πρωτεάσης:πρωτεΐνης για δύο διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης. Όπως φαίνεται από την εικόνα 3.6 καμιά από τις συνθήκες αυτές δεν οδήγησε σε πλήρη πρωτεόλυση του δείγματος. Στη συνέχεια εξετάστηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι αντίδρασης σε δύο θερμοκρασίες για τρεις αναλογίες μαζών πρωτεάσης:πρωτεΐνης (Πίνακας 3.4). Από την εικόνα 3.7 γίνεται φανερό ότι για πλήρη πρωτεόλυση απαιτούνται σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεάσης και υψηλές θερμοκρασίες. Στα πειράματα που ακολούθησαν (Πίνακας 3.5) η προσοχή εστιάστηκε στην αναλογία μαζών πρωτεάσης:πρωτεΐνης με σκοπό την εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης πρωτεάσης που απαιτείται για πλήρη πρωτεόλυση. 10 μέρη πρωτεάσης προς 100 μέρη πρωτεΐνης φαίνεται να αρκούν για πλήρη πρωτεόλυση στους 30 ºC (εικόνα 3.8). Τέλος, επιχειρείται η εύρεση του ελάχιστου απαιτούμενου χρόνου αντίδρασης για πλήρη πρωτεόλυση στους 30 ºC με αναλογία πρωτεάσης:πρωτεΐνης 10:100 (Πίνακας 3.6 και εικόνα 3.9). Αν και η διακριτικότητα της εικόνας δεν είναι επαρκής ώστε να είναι εμφανές, μόνο στο Δ40 δεν υπήρχε κανένα ίχνος μη-πρωτεολυμένης πρωτεΐνης.

Πίνακας 3.3 Πρώτη σειρά πειραμάτων: εξετάζεται η απαιτούμενη αναλογία μαζών πρωτεάσης:υποστρώματος (mg/mg) και ο χρόνος αντίδρασης για τη πλήρη υδρόλυση της πρωτεΐνης. Η ανάλυση των δειγμάτων με SDS-PAGE φαίνεται στην εικόνα 3.6.

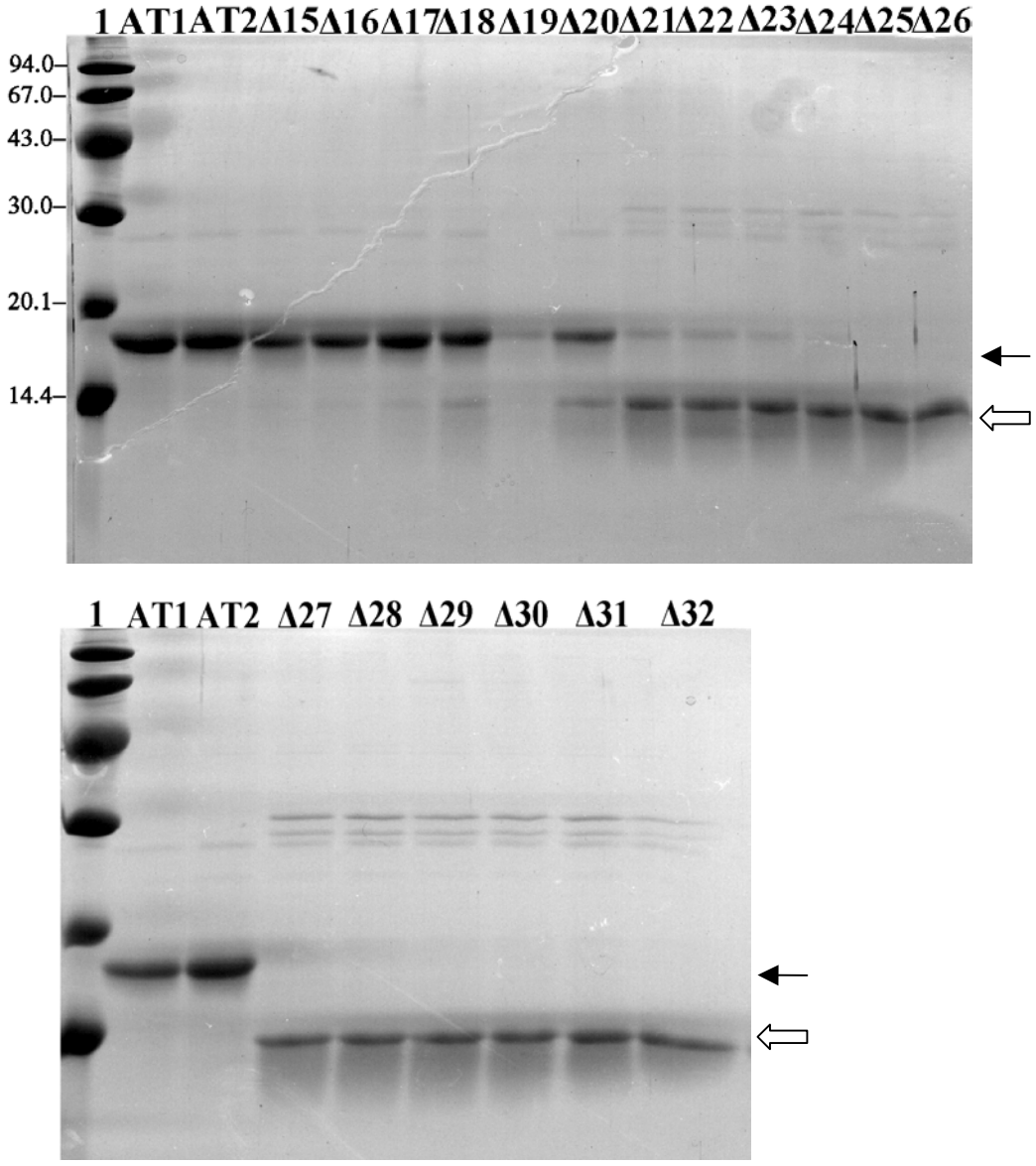
Θερμοκρασία αντίδρασης: 4 ºC		
Πρωτεάση/πρωτεΐνη	**Χρόνος (h)**	
	3.5	**17**
0.5:100	Δ1	Δ2
1:100	Δ3	Δ4
5:100	Δ5	Δ6
10:100	Δ7	Δ8
25:100	Δ9	Δ10
50:100	Δ11	Δ12
100:100	Δ13	Δ14
Αρνητικό τυφλό Θερμοκρασία αντίδρασης 4 ºC		
0:100	ΑΤ1	ΑΤ2
Θετικό τυφλό Θερμοκρασία αντίδρασης 25 ºC		
100:100	-	ΘΤ

Πίνακας 3.4 Δεύτερη σειρά πειραμάτων: Εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου επώασης στην απόδοση της αντίδρασης πρωτεόλυσης για τρεις διαφορετικές αναλογίες μαζών πρωτεάσης:πρωτεΐνης. Η ανάλυση των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 3.7.

Πρωτεάση/πρωτεΐνη	**Θερμοκρασία (ºC)**	**Χρόνος (h)**		
		2	**4**	**17**
5:100	18	Δ15	Δ16	Δ17
	25	Δ18	Δ19	Δ20
25:100	18	Δ21	Δ22	Δ23
	25	Δ24	Δ25	Δ26
50:100	18	Δ27	Δ28	Δ29
	25	Δ30	Δ31	Δ32
Αρνητικό τυφλό				
0:100	18			ΑΤ1
	25			ΑΤ2



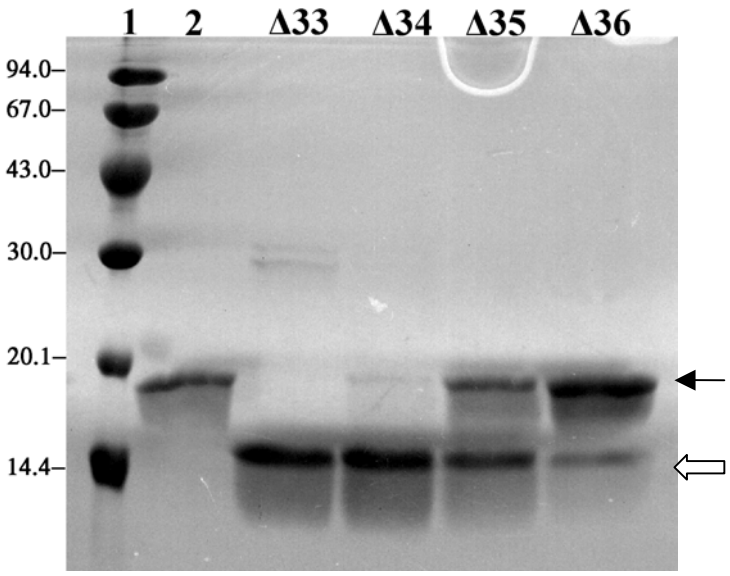
Εικόνα 3.6 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. Τα δείγματα που αναλύονται (Δ1-Δ14, ΑΤ1, ΑΤ2 και ΘΤ) είναι αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 3.3. Το μαύρο βέλος δηλώνει τη θέση της 6His-$HrcQ_B$-C και το άσπρο τη θέση της $HrcQ_B$-C.



Εικόνα 3.7 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. Τα δείγματα που αναλύονται (Δ15-Δ32, ΔT1 και ΔT2) είναι αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 3.4. Το μαύρο βέλος δηλώνει τη θέση της 6His-$HrcQ_B$-C και το άσπρο τη θέση της $HrcQ_B$-C.

Πίνακας 3.5 Τρίτη σειρά πειραμάτων: επιχειρείται η εύρεση της ελάχιστης απαιτούμενης ποσότητας πρωτεάσης για πλήρη πρωτεόλυση στους 30 ºC για 15 ώρες. Η ανάλυση των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 3.8.

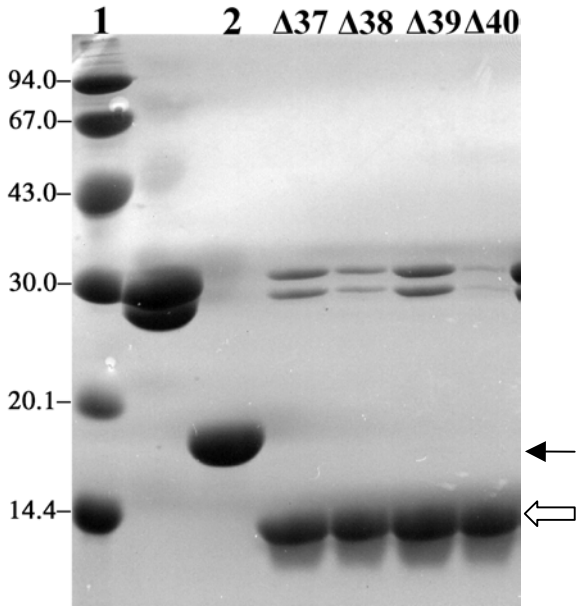
Θερμοκρασία: 30 ºC **Χρόνος: 15 h**	
Πρωτεάση/πρωτεΐνη	**Αριθμός δείγματος**
10:100	Δ33
3.5:100	Δ34
2:100	Δ35
1:100	Δ36



Εικόνα 3.8 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρες μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. **2** Ακατέργαστο πρωτεϊνικό δείγμα. Τα δείγματα που αναλύονται (Δ33-Δ36) είναι αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 3.5. Το μαύρο βέλος δηλώνει τη θέση της 6His-HrcQ$_B$-C και το άσπρο τη θέση της HrcQ$_B$-C.

Πίνακας 3.6 Τέταρτη σειρά πειραμάτων: βελτιστοποίηση του χρόνου της αντίδρασης. Η ανάλυση των δειγμάτων φαίνεται στην εικόνα 3.9.

Θερμοκρασία: 30 °C **Πρωτεάση:πρωτεΐνη 10:100**	
Χρόνος αντίδρασης (h)	**Αριθμός δείγματος**
0.25	Δ37
1	Δ38
4	Δ39
6	Δ40



Εικόνα 3.9 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρες μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. **2** Άκοπο δείγμα πρωτεΐνης. Τα δείγματα που αναλύονται (Δ37-Δ40) είναι αυτά που αναφέρονται στον πίνακα 3.6. Το μαύρο βέλος δηλώνει τη θέση της 6His-HrcQ$_B$-C και το άσπρο τη θέση της HrcQ$_B$-C. Η διπλή ζώνη στα 30 kDa είναι η πρωτεάση.

3.4 Καθαρισμός και ταυτοποίηση της $HrcQ_B$-C

3.4.1 Σχήμα καθαρισμού

Οι συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων και το σχήμα καθαρισμού για την απομόνωση της $HrcQ_B$-C διαμορφώθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των προηγούμενων παραγράφων.

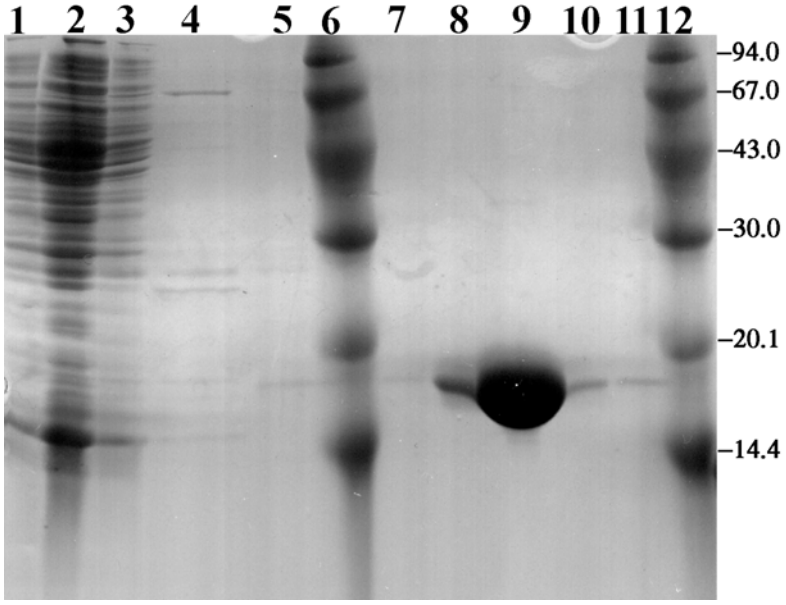
Τα κύτταρα μεγαλώνουν στους 30 ºC σε 4 lt θρεπτικό μέσο που περιέχει 100 μg/ml αμπικιλίνη μέχρι OD_{600} ~1.0. Η υπερέκφραση επάγεται με 0.5 mM IPTG και η επώαση των κυττάρων συνεχίζεται στους 30 ºC για ακόμη 18 ώρες (δες επίσης την παράγραφο 3.1). Τα κύτταρα διαχωρίζονται από το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση στα 6000 rpm (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας JA-20) για 20 min στους 4 ºC. Παράγονται ~20 g κυττάρων που ομογενοποιούνται με 180 ml 20 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH=8.0 (διάλυμα Α). Προστίθενται αναστολείς πρωτεασών σε τελικές συγκεντρώσεις 1 mM PMSF, 20 μg/ml leupeptin, 150 μg/ml benzamidine και τα κύτταρα διαρρηγνύονται με λυσοζύμη (1 mg/ml, 30 min στους 4 ºC) και υπέρηχους. Το κυτταρικό περιεχόμενο διαχωρίζεται από τα κυτταρικά υπολείμματα με φυγοκέντρηση (14000g, 60 min, 4 ºC). Το υπερκείμενο φορτώνεται με ταχύτητα 60 ml/h, σε στήλη Ni-NTA (όγκος κολώνας 12 ml), εξισορροπημένη με 10 όγκους κολώνας διαλύματος Α. Ακολουθούν εκπλύσεις με: (i) 50 όγκους κολώνας διαλύματος Α, (ii) 10 όγκους κολώνας 20 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0, (iii) 15 όγκους κολώνας 40 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (iv) 35 όγκους κολώνας 40 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. Η πρωτεΐνη εκλούεται σε κλάσματα των 12 ml, με 300 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (διάλυμα Β). Τα βήματα του καθαρισμού ελέγχονται με SDS-PAGE (εικόνα 3.10). Η απόδοση στο τέλος αυτού του σταδίου είναι κατά μέσο όρο 50 mg πρωτεΐνης όπως εκτιμάται με Bradford (Bradford 1976).

Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενώνονται και υποβάλλονται σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA. Στο δείγμα προστίθεται rTEV σε αναλογία μαζών πρωτεάση:πρωτεΐνη 1:10. Η αντίδραση πρωτεόλυσης λαμβάνει χώρα για 6 ώρες στους 30ºC υπό συνεχή ανάδευση (δες επίσης την παράγραφο 3.3). Στη συνέχεια το μίγμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM ιμιδαζολίου, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0 (διάλυμα Γ) στους 4 ºC.

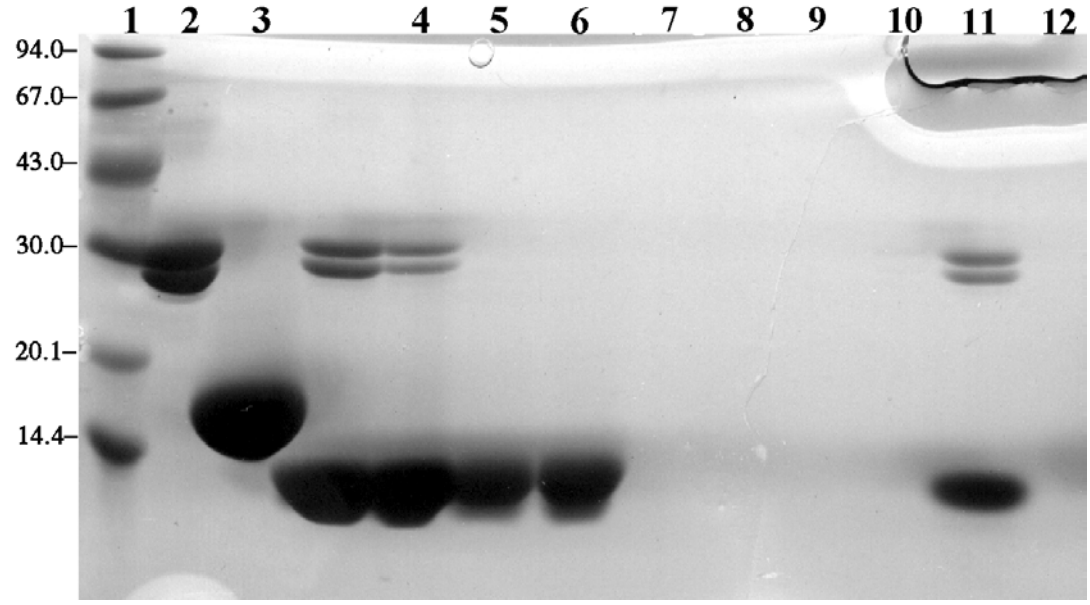
Ακολουθεί η απομάκρυνση της πρωτεάσης από το διάλυμα της $HrcQ_B$-C. Το δείγμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων (κατακρημνισμένες πρωτεΐνες)

που σχηματίζονται κατά την αντίδραση πρωτεόλυσης και φορτώνεται με ταχύτητα 50 ml/h σε δεύτερη στήλη Ni-NTA (όγκου 10 ml), εξισορροπημένη με διάλυμα Γ. Η κολώνα εκπλένεται με: (i) 30 ml διάλυμα Γ, (ii) 30 ml διάλυμα Α, (iii) 50 ml διάλυμα Β. Στην εικόνα 3.11 φαίνεται ότι η πρωτεΐνη εκλούεται κατά το φόρτωμα και την αρχή της έκπλυσης με το διάλυμα Γ όπως αναμένεται για δείγμα χωρίς ουρά ιστιδινών. Η απόδοση πρωτεΐνης στο τέλος αυτού του σταδίου είναι 20-25 mg. Η υπολογιζόμενη απώλεια μετά την πρωτεόλυση με την rTEV είναι της τάξης του 50%.

Αρχικά θεωρήθηκε σκόπιμο μετά τη δεύτερη στήλη Ni-NTA να ακολουθήσει μια κολώνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 για το διαχωρισμό μορίων πρωτεάσης που πιθανόν να εξακολουθούν να συνοδεύουν το δείγμα λόγω της μεγάλης της συγκέντρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης πρωτεόλυσης. Όπως δείχνεται στην επόμενη παράγραφο (3.4.2) αυτό το στάδιο δεν είναι απαραίτητο.



Εικόνα 3.10 Δείγματα από την πρώτη στήλη Ni-NTA που αναλύονται σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Δείγμα που φορτώθηκε στην πρώτη στήλη Ni-NTA. **2** Δείγμα που εκλούεται κατά το φόρτωμα. **3** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. **4** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. **5** Έκπλυση με 40 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. **6, 12** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται δεξιά της εικόνας σε kDa. **7** Έκπλυση με 40 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0. **8-11** Διαδοχικά κλάσματα έκλουσης με 300 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 8.0.



Εικόνα 3.11 Δείγματα από τη δεύτερη στήλη Ni-NTA που αναλύονται σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). **1** Μάρτυρας μοριακών βαρών. Τα μοριακά βάρη δίνονται αριστερά της εικόνας σε kDa. **2** Πρωτεάση. **3** 6His-HrcQ$_B$-C. **4** Το μίγμα πρωτεΐνης/πρωτεάσης που φορτώνεται στη δεύτερη στήλη Ni-NTA. **5** Το δείγμα που εκλούεται κατά το φόρτωμα της στήλης. **6-8** Διαδοχικές εκπλύσεις με 10 mM ιμιδαζόλιο. **9** Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο. **10-12** Διαδοχικά κλάσματα έκλουσης με 300 mM ιμιδαζόλιο.

Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενώνονται και υποβάλλονται σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5. Το δείγμα που χρησιμοποιείται για κρυσταλλώσεις συγκεντρώνεται με Centriprep 3 (MW cutoff 3 kDa, Millipore corporation, Bedford, USA) μέχρι τα 7-8 mg/ml (Bradford). Αποθηκεύεται στους 4 ºC ή ψύχεται απότομα σε υγρό άζωτο (flash cooling) και φυλάσσεται στους -70 ºC. Αξίζει να σημειωθεί ότι η HrcQ$_B$-C ήταν ιδιαίτερα σταθερή και σε καμιά περίπτωση δεν παρατηρήθηκε πρωτεόλυση του δείγματος.

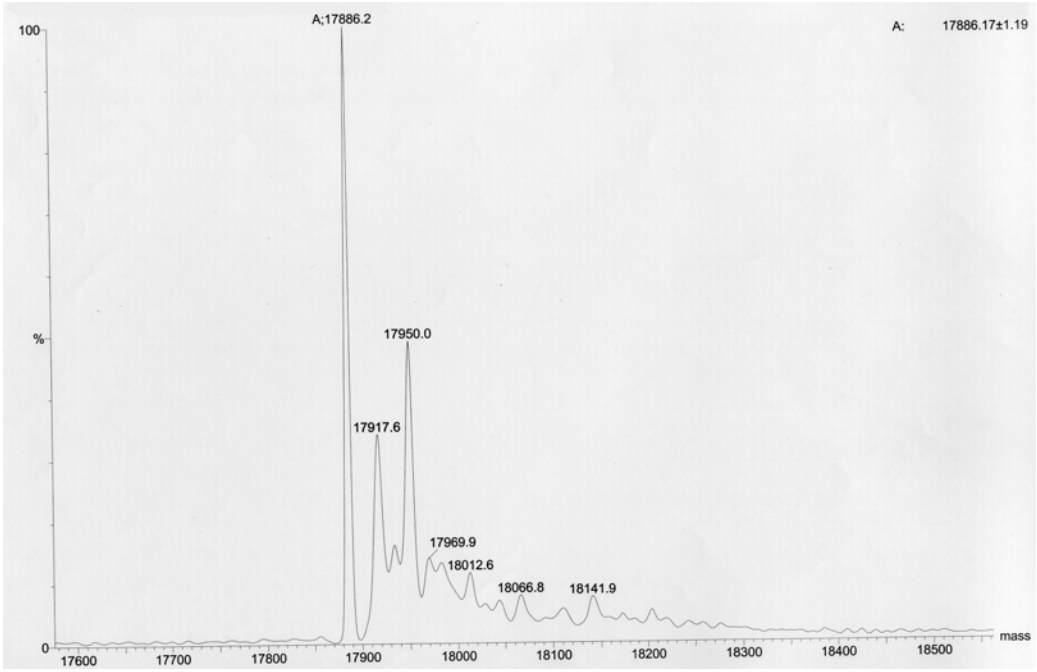
3.4.2 Ταυτοποίηση του τελικού προϊόντος

Το τελικό προϊόν ταυτοποιήθηκε με ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του N- και C-τελικού άκρου, φασματοσκοπία μάζας και πήκτωμα ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF). Με τις μεθόδους αυτές επιβεβαιώθηκε παράλληλα η ομοιογένεια και το υψηλό ποσοστό καθαρότητας.

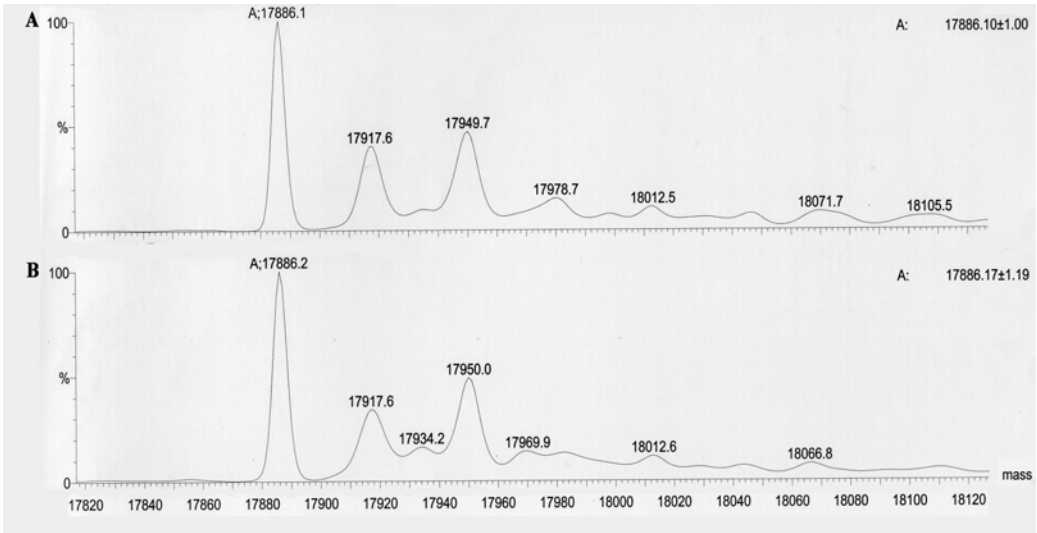
Η ολιγομερική κατάσταση της πρωτεΐνης σε διάλυμα διερευνήθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Για την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας, δείγμα από το πρωτεϊνικό διάλυμα όπως προκύπτει με το παραπάνω σχήμα καθαρισμού υπέστει διαπίδυση έναντι 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 pH 7.5 και συγκεντρώθηκε μέχρι τα ~3 mg/ml. Με την ανάλυση (sequencing) ταυτοποιήθηκε ότι το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης αντιστοιχεί στην αναμενόμενη αρχή (από τη θέση που υδρολύει η πρωτεάση) και τέλος της $HrcQ_B$-C. Η N-τελική ανάλυση των επτά πρώτων αμινοξέων απέδωσε στην αλληλουχία GAMDPQD (σύγκρινε με την εικόνα 3.1) την υψηλότερη πιθανότητα με μέσο ποσοστό επαναληψιμότητας 83.3%. Όμοια, η C-τελική ανάλυση επιβεβαίωσε το αναμενόμενο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Έτσι επιβεβαιώνεται επίσης η ακεραιότητα του παραγόμενου προϊόντος και απορρίπτεται η πιθανότητα το δείγμα να υφίσταται με τη μορφή μίγματος αποτελούμενου από πρωτεολυτικά κομμάτια. Με την ανάλυση αυτή εκτιμήθηκε ότι η καθαρότητα του δείγματος που προέρχεται από τη δεύτερη στήλη Ni-NTA, είναι υψηλότερη από 95% (η ανάλυση του N- και C-τελικού άκρου της πρωτεΐνης έγινε στο Πανεπιστήμιο του Leeds από τον Dr. J. Keen).

Με φασματοσκοπία μάζας προσδιορίστηκε το μοριακό βάρος της $HrcQ_B$-C στα 17886 Da (εικόνα 3.12, όλα τα φάσματα μάζας καταγράφηκαν στο φασματογράφο μάζας του Πανεπιστημίου του Leeds και του Astbury Centre for Structural Molecular Biology από την Dr. A. Ashcroft). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε διμερές αφού το θεωρητικό βάρος του μονομερούς είναι 8945 Da. Το διμερές διατηρείται και όταν η ανάλυση γίνεται σε πρωτεϊνικό δείγμα που βρίσκεται σε όξινο διάλυμα (pH 3), γεγονός που υποδηλώνει ότι σχηματίζεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Επιπλέον καταγράφηκαν και συγκρίθηκαν δύο φάσματα από το πρωτεϊνικό δείγμα πριν και μετά τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (εικόνα 3.13). Τα φάσματα δεν έχουν σημαντικές διαφορές κι έτσι κρίθηκε περιττή η στήλη μοριακής διήθησης.

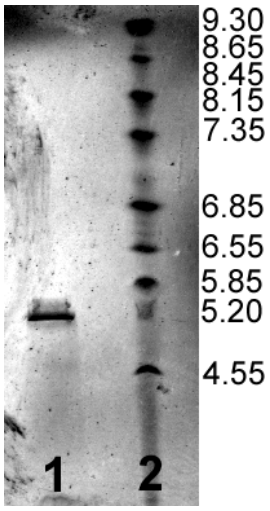


Εικόνα 3.12 Φασματοσκοπία μάζας από δείγμα της $HrcQ_B$-C (κορυφή A). Οι υπόλοιπες κορυφές που συνοδεύουν το φάσμα διαφέρουν μεταξύ τους κατά ~32Da και προέρχονται πιθανόν από μόρια της πρωτεΐνης στα οποία έχουν δεσμευτεί ιόντα ή ιοντικές ομάδες από το διαλύτη (NH_4HCO_3). Παρόλα αυτά, δεν μπορούμε να προτείνουμε μια ικανοποιητική απάντηση για την ταυτότητα αυτών των ομάδων.



Εικόνα 3.13 Φασματοσκοπία μάζας από δείγμα της $HrcQ_B$-C **(A)** πριν και **(B)** μετά τη στήλη μοριακής διήθησης. Δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα γι' αυτό η στήλη μοριακής διήθησης κρίθηκε περιττή.

Δείγμα της πρωτεΐνης που έτρεξε σε πήκτωμα ισοηλεκτρικής εστίασης (IEF) δεν αναλύθηκε σε περισσότερες από μία ζώνες (εικόνα 3.14) επιβεβαιώνοντας ότι το διάλυμα της πρωτεΐνης είναι ομοιογενές. Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε να είναι ~5.2. Η θεωρητικά προβλεπόμενη τιμή είναι 4.7.



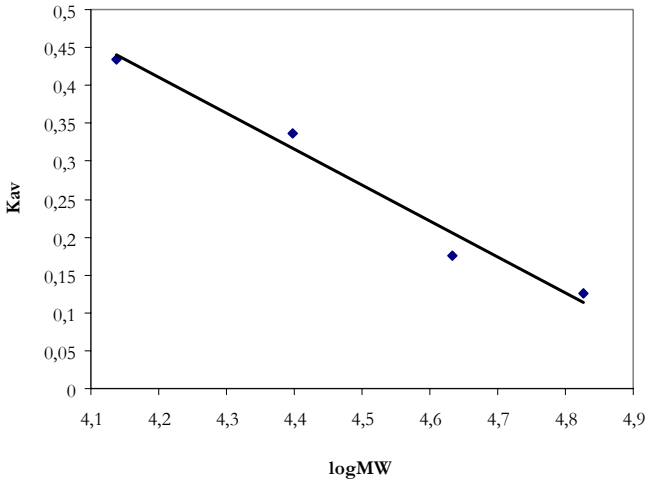
Εικόνα 3.14 Πήκτωμα ισοηλεκτρικής εστίασης (PhastGel IEF 3-9, Pharmacia). **1** Ανάλυση της πρωτεΐνης $HrcQ_B$-C. **2** Μάρτυρας ισοηλεκτρικών σημείων (Pharmacia Broad pI calibration kit). Οι τιμές των ισοηλεκτρικών σημείων για τους μάρτυρες δίνονται στα δεξιά της εικόνας.

Το μοριακό βάρος και η υδροδυναμική ακτίνα[1] της πρωτεΐνης σε διάλυμα εκτιμήθηκαν πειραματικά χρησιμοποιώντας βαθμονομημένη στήλη μοριακής διήθησης (Sephacryl S-100). Η πρωτεΐνη εκλούσθηκε σε όγκο που από την πρότυπη καμπύλη της εικόνας 3.15A αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 44 kDa. Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος του μονομερούς είναι ~9 kDa μπορούμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεΐνη σε διάλυμα σχηματίζει ομο-πενταμερή (αν έχει σφαιρικό σχήμα) ή ομο-τετραμερή (αν δεν είναι σφαιρική). Με βάση την πρότυπη καμπύλη της εικόνας 3.15B η υδροδυναμική ακτίνα του μορίου είναι 28.5 Å.

[1] Η υδροδυναμική ακτίνα ενός σώματος ορίζεται ως η ακτίνα υποθετικής σφαίρας που έχει την ίδια ταχύτητα διάχυσης με το υπό εξέταση σώμα.

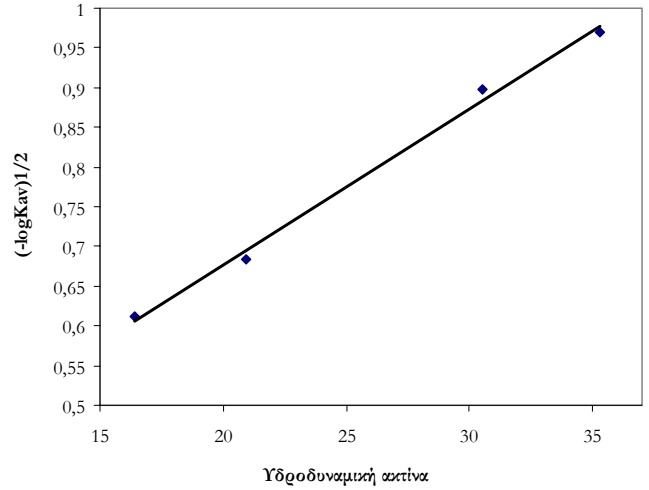
A

LogMW	Kav
Πρότυπα	
4.826	0.125
4.633	0.176
4.398	0.337
4.137	0.435
Δείγμα	
4.652	0.195



B

Υδρ.ακτίνα	$(-\log Kav)^{1/2}$
Πρότυπα	
35.3	0.969
30.5	0.898
20.9	0.684
16.4	0.611
Δείγμα	
28.5	0.843



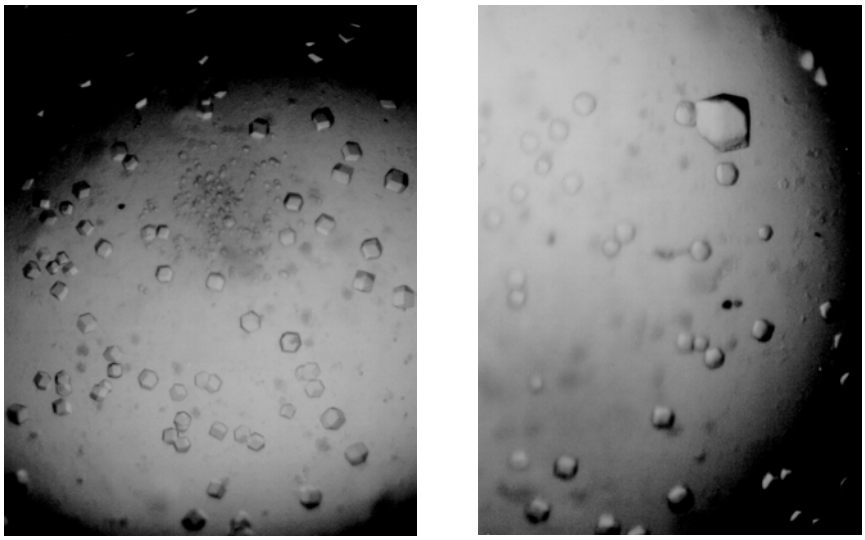
Εικόνα 3.15 Πρότυπες καμπύλες για την εκτίμηση του μοριακού βάρους και της υδροδυναμικής ακτίνας της HrcQ$_B$-C σε διάλυμα, από βαθμονομημένη στήλη μοριακής διήθησης. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι πρωτεΐνες αλβουμίνη, οβαλβουμίνη, χυμοθρυψινογόνο και ριβονουκλεάση Α που περιλαμβάνονται στο Low Molecular Weight Calibration Kit της Pharmacia. **(A)** K_{av} σε συνάρτηση με το logMW των προτύπων. **(B)** $(-\log K_{av})^{1/2}$ σε συνάρτηση με την υδροδυναμική ακτίνα των προτύπων. $K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t-V_o)$ όπου V_e=όγκος έκλουσης, V_o=νεκρός όγκος της στήλης, V_t=συνολικός όγκος του στρώματος της στήλης. Η υδροδυναμική ακτίνα δίνεται σε Å.

3.5 Κρυστάλλωση της $HrcQ_B$-C

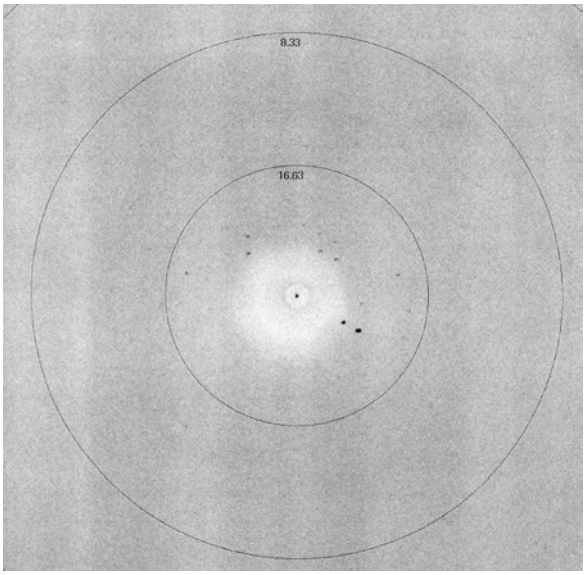
Για την εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν εμπορικώς διαθέσιμα screens (Hampton Research, California, USA). Τα πειράματα κρυσταλλώσεων έγιναν με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας και τη μέθοδο της διάχυσης ατμών. Αναμείχτηκαν ίσοι όγκοι του πρωτεϊνικού διαλύματος και του διαλύματος δεξαμενής σε καλυπτρίδα επεξεργασμένη με σιλικόνη που τοποθετήθηκε πάνω από 1 ml διαλύματος δεξαμενής.

Δύο διαφορετικές μορφολογίες κρυστάλλων εμφανίστηκαν σε δύο διαφορετικές συνθήκες:

(i) Μικροί κυβικοί κρύσταλλοι (εικόνα 3.16) σχηματίστηκαν σε 10% PEG_{6000} pH 6.0 και 12% PEG_{20000}, 0.1 M MES pH 6.5. Μεγαλύτεροι κρύσταλλοι (~0.1x0.1x0.1 mm^3) ανακτήθηκαν στη συνέχεια στις συνθήκες 10-15% PEG_{3350}, 50-200 mM NaCl, 50 mM bis-tris pH 6.5. Οι κρύσταλλοι αυτοί παρά τις καλοσχηματισμένες επιφάνειες, τις οξείες ακμές και το σχετικά μεγάλο όγκο περιθλούσαν τις ακτίνες X μόνο σε χαμηλή διακριτικότητα (εικόνα 3.17). Εκτεταμένες προσπάθειες για τη βελτίωση τους δεν είχαν αποτέλεσμα.



Εικόνα 3.16 Φωτογραφίες από τους κυβικού σχήματος κρυστάλλους της $HrcQ_B$-C.



Εικόνα 3.17 Διάγραμμα περίθλασης από κρύσταλλο κυβικού σχήματος της $HrcQ_B$-C. Στην εικόνα σημειώνονται οι δακτύλιοι που αντιστοιχούν στη διακριτικότητα των 16.6 και 8.3 Å. Λίγες ανακλάσεις υπάρχουν σε διακριτικότητα ~16 Å ή χαμηλότερη.

(ii) Λεπτοί, βελονοειδείς κρύσταλλοι, διευθετημένοι σε σφαιρικές συναθροίσεις (αχινοί) εμφανίστηκαν στις συνθήκες 20% MPD, 0.1 M $Mg(OAc)_2$ (magnesium acetate), 0.05 M MES pH 5.5 και 30% MPD, 0.04 M $Mg(OAc)_2$, 0.05 M cacodylate pH 6.0. Προκειμένου να βρεθούν συνθήκες στις οποίες οι κρύσταλλοι να μεγαλώνουν αρκετά ώστε να είναι χρήσιμοι για πειράματα περίθλασης ακτίνων X διερευνήθηκαν συστηματικά η συγκέντρωση του MPD, του $Mg(OAc)_2$ και οι τιμές pH (πίνακας 3.6) όπως συνηθίζεται σε ανάλογες περιπτώσεις (Qian 2000, Kadirvelraj *et al.* 2002). Κρύσταλλοι πολύ μικρού πάχους με μέσες διαστάσεις 0.1 x 0.2 x 0.015 mm^3, που συναθροίζονται συνήθως σε σφαιρικές διατάξεις με κοινό σημείο έναρξης (μαργαρίτες) εμφανίστηκαν στις συνθήκες 12-16% MPD, 70-90 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM bis-tris pH 6.3-6.8 (αντιστοιχούν στις περιοχές που σημειώνονται με κόκκινο/σκούρο κόκκινο στον πίνακα 3.6). Φωτογραφίες αυτών των κρυστάλλων παρουσιάζονται στην εικόνα 3.18.

Πίνακας 3.6 Παρουσιάζονται οι συνθήκες που εξετάστηκαν ώστε να παραχθούν κρύσταλλοι μεγέθους κατάλληλου για πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ. Οι αρχικές συνθήκες περιγράφονται παραπάνω, στην παράγραφο (ii). Τα αποτελέσματα αξιολογούνται με χρωματικό κώδικα του οποίου η εξήγηση δίνεται στο τέλος του πίνακα.

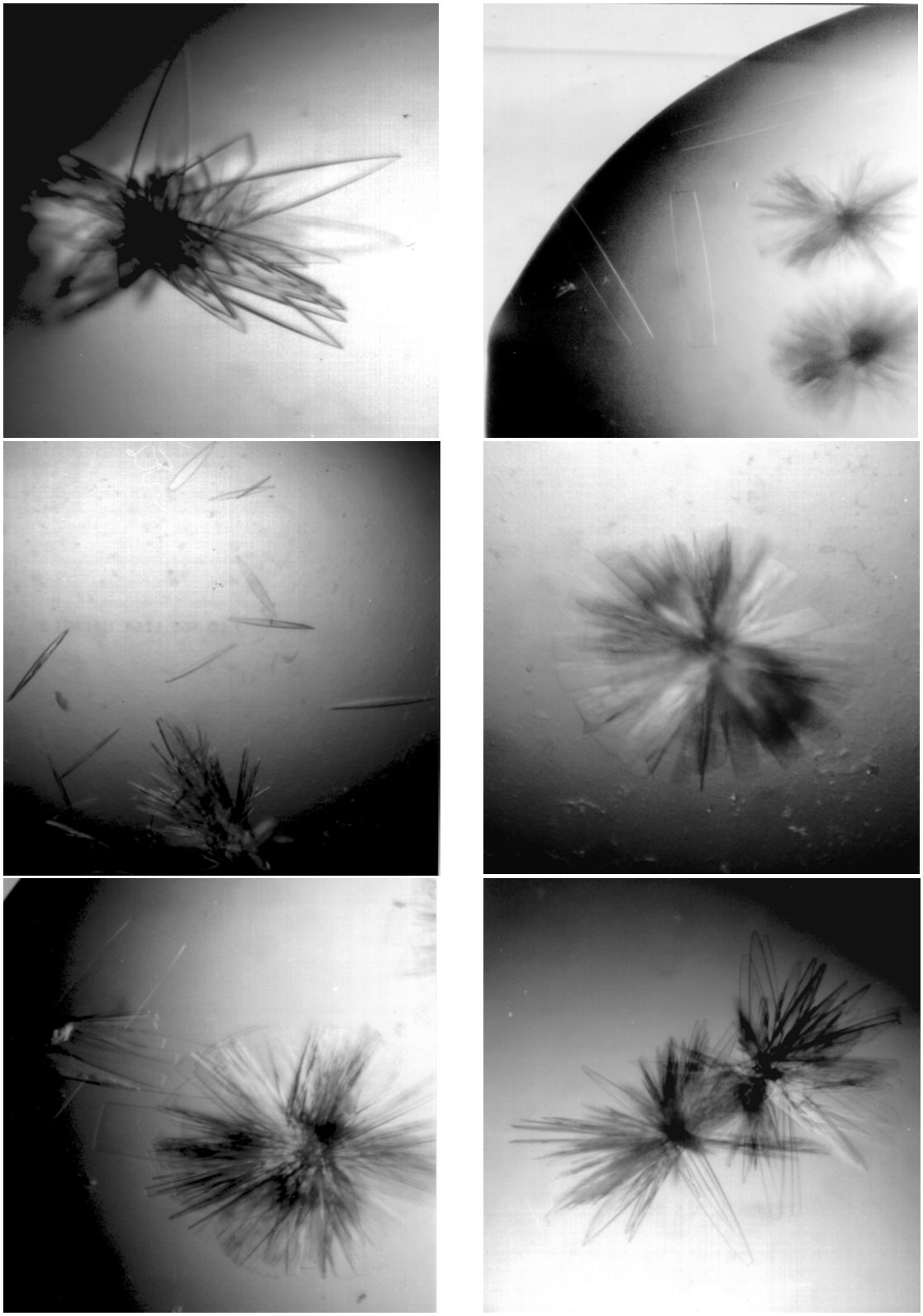
$Mg(OAc)_2$ (mM)	MPD (% v/v)	pH											
		5.0	6.0	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6
0	10												
	20												
	30												
	40												
	50												
15	10												
	20												
	30												
	40												
	50												
20	2												
	5												
	8												
	11												
	14												
	17												
25	5												
	10												
	15												
	20												
	25												
	30												
30	10												
	20												
	30												
	40												
	50												
40	2												
	5												
	8												
	11												
	14												
	17												
45	10												
	20												
	30												
	40												
	50												
50	5												
	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												

$Mg(OAc)_2$ (mM)	MPD (% v/v)	pH											
		5.0	6.0	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6
	15												
	16												
	20												
	25												
	30												
	40												
	50												
60	2												
	5												
	8												
	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												
	15												
	16												
	17												
70	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												
	15												
	16												
	17												
	18												
	19												
	20												
75	5												
	10												
	15												
	20												
	25												
	30												
80	2												
	5												
	8												
	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												
	15												
	16												
	17												
	18												
	19												
	20												

$Mg(OAc)_2$ (mM)	MPD (% v/v)	pH											
		5.0	6.0	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6
90	2												
	5												
	8												
	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												
	15												
	16												
	17												
	18												
	19												
	20												
100	2												
	5												
	8												
	9												
	10												
	11												
	12												
	13												
	14												
	15												
	16												
	17												
	20												
	25												
	30												
	40												
	50												
120	2												
	5												
	8												
	11												
	14												
	17												
140	2												
	5												
	8												
	11												
	14												
	17												
160	2												
	5												
	8												
	11												
	14												
	17												
200	5												
	10												

Mg(OAc)$_2$ (mM)	MPD (% v/v)	pH											
		5.0	6.0	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6
	20												
	30												
	40												
	50												
400	5												
	10												
	20												
	30												
	40												
	50												

Μαύρο (●): ίζημα, Γκρι (●): ελαφρύ ίζημα, κίτρινο (●): διαυγής σταγόνα, πράσινο (●):πολλοί μικροί ή μεγαλύτεροι 'αχινοί', κόκκινο (●): 'μαργαρίτες', σκούρο κόκκινο (●): συναθροίσεις από λίγες μεγάλες πλάκες.



Εικόνα 3.18 Κρύσταλλοι της $HrcQ_B$-C σχήματος λεπτής πλάκας.

3.6 Προσπάθειες βελτίωσης των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C

Όπως θα αναφερθεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο οι περισσότεροι κρύσταλλοι της $HrcQ_B$-C παράγουν προβληματικά διαγράμματα περίθλασης: πολλές από τις ανακλάσεις απέχουν από το ιδανικό στρογγυλό σχήμα, έχουν ασαφή όρια και καταγράφονται ως διαχυμένα (diffused) ή συχνά διπλά (splitted) σημεία.

Η κακής ποιότητας περίθλαση οφείλεται σε ανωμαλίες στην εσωτερική δομή των κρυστάλλων όπως διαταραχές της τάξης του κρυσταλλικού πλέγματος, παράλληλη ανάπτυξη δύο κρυσταλλικών πλεγμάτων με διαφορετικούς προσανατολισμούς (διδυμία), παρείσφρηση στο κρυσταλλικό πλέγμα μακρομοριακών προσμείξεων, ύπαρξη μη κατειλλημένων θέσεων, εκτοπίσεις και ασυνέχειες στην τάξη του πλέγματος. Μια πληθώρα παραγόντων μπορεί να επηρεάσει την εσωτερική δομή των πρωτεϊνικών κρυστάλλων μερικοί μόνο από τους οποίους έχουν εντοπιστεί και μελετηθεί συστηματικά. Τέτοιοι παράγοντες είναι η καθαρότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος και των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την κρυστάλλωση, οι διακυμάνσεις που υφίσταται το διάλυμα της κρυστάλλωσης κατά την ανάπτυξη των κρυστάλλων και ο τρόπος χειρισμού των κρυστάλλων αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη τους και κυρίως κατά την μεταφορά τους στις ακτίνες (Caylor *et al.* 1999, Dobrianov *et al.* 1999).

Για τη βελτίωση της ποιότητας και της μορφολογίας των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C έγιναν επίσης:

(i) Δοκιμές διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων. Ελέγχθησαν διαλύματα των ενώσεων: MES, bis-tris-propane, HEPES, citrate, MOPS, PIPES στο εύρος pH 6.2-6.6.

(ii) Δοκιμές διαφορετικών ανιόντων. Το $Mg(OAc)_2$ αντικαταστάθηκε διαδοχικά από $MgCl_2$ και $MgSO_4$.

(iii) Δοκιμές διαφορετικών κατιόντων. Το $Mg(OAc)_2$ αντικαταστάθηκε διαδοχικά από άλατα των Ba, Cd, Ca, Co, Cu, Sr, Y, Zn.

(iv) Προσθήκη μικρής ποσότητας ουσιών που σε πολλές περιπτώσεις έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ποιότητα των κρυστάλλων (additives και χαοτροπικοί παράγοντες (detergents)).

(v) Υποκατάσταση του MPD από διοξάνη ή προσθήκη μικρής ποσότητας διοξάνης ως πρόσθετο.

(vi) Για την αλλαγή της ταχύτητας σχηματισμού πυρήνων δοκιμάστηκαν: (1) Προσθήκη ελαίου στη δεξαμενή (Chayen 1997). (2) Προσθήκη γλυκερόλης στις συνθήκες κρυστάλλωσης. (3) Επίσης, δοκιμάστηκε η τεχνική που περιγράφεται από τη Jovine (2000) με

την οποία εκτονώνεται για λίγο η τάση ατμών στο χώρο της κρεμαστής σταγόνας ανοίγοντας την καλυπτρίδα.

(vii) Δοκιμάστηκαν οι τεχνικές της καθιστής σταγόνας και της διαπίδυσης.

(viii) Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών θερμοκρασιών. Εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες των 7, 18 και 37 ºC (Han & Lin 2000).

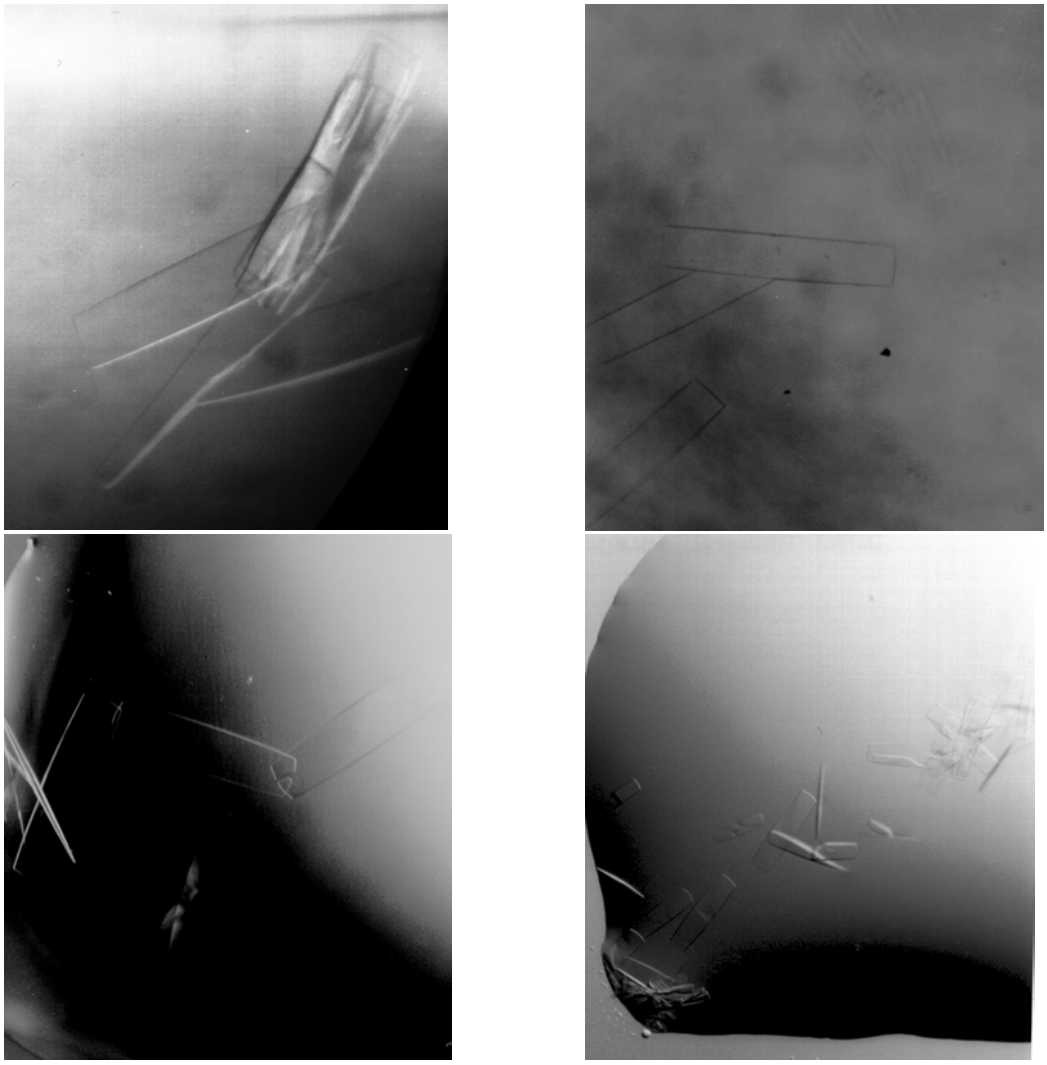
(ix) Αλλαγές στον όγκο της σταγόνας κρυστάλλωσης. Δοκιμάστηκαν όγκοι κρεμαστής σταγόνας από 2-7 μl.

(x) Δοκιμάστηκαν διαλύματα με συγκέντρωση πρωτεΐνης 3, 5, 7.5, 15 και 25 mg/ml.

(xi) Συγκρυστάλλωση με λανθανίδες (δες επίσης 5.2).

(xii) Αποσύζευξη του σχηματισμού πυρήνων από το μεγάλωμα των κρυστάλλων. Αυτό επιχειρήθηκε με τρεις τρόπους: (1) Με μακρο-ενπυρήνωση. Μικρά κομμάτια κρυστάλλων μεταφέρθηκαν σε νέες κρεμαστές σταγόνες εξισορροπημένες σε συνθήκες στη μετασταθερή περιοχή (δες 1.3.2). Έχει αναφερθεί (Thaller *et al.* 1989) ότι με την πορεία αυτή μπορεί να αλλάξει η μορφολογία των κρυστάλλων από πολύ λεπτούς (0.01 mm) σε κρυστάλλους αξιόλογου πάχους (τουλάχιστον 0.1-0.15 mm). (2) Ιδιαίτερα εκτεταμένα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης κατά την οποία οι πυρήνες μεταφέρονταν στη σταγόνα κρυστάλλωσης με την άκρη μιας τρίχας (Leung *et al.* 1989). Η μικρο-ενπυρήνωση εφαρμόστηκε σε διαδοχικούς, επαναλαμβανόμενους (repeated seeding) κύκλους έτσι ώστε οι κρύσταλλοι που μεγαλώνουν με εφαρμογή της τεχνικής να χρησιμοποιούνται ως πηγή πυρήνων για έναν επόμενο κύκλο (Shinoda *et al.* 1990). Ιδιαίτερη προσοχή δώθηκε ώστε οι πυρήνες να ληφθούν από τα εσωτερικά και πιο καλά οργανωμένα επίπεδα των κρυστάλλων. Για το λόγο αυτό οι κρύσταλλοι-δότες υποβλήθηκαν σε παρατεταμένα πλυσίματα με διαλύματα χαμηλής συγκέντρωσης κατακρημνιστή (etching). (3) Ακολουθώντας την πορεία που περιγράφεται από τους Saridakis & Chayen (2000) η (κρεμαστή) σταγόνα κρυστάλλωσης επωάζεται για μικρό χρονικό διάστημα πάνω από διάλυμα που κανονικά οδηγεί στο σχηματισμό πολλών μικρών κρυστάλλων. Πριν ολοκληρωθεί η εξισορρόπηση, η καλυπτρίδα -που φέρει τη σταγόνα- μεταφέρεται και τοποθετείται πάνω από διάλυμα που κανονικά αφήνει τις σταγόνες διαυγείς

Κρύσταλλοι με καλύτερη μορφολογία σχηματίστηκαν συστηματικά με την τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης (εικόνα 3.19). Όταν η μικρο-ενπυρήνωση συνδυάστηκε με την τεχνική της καθιστής σταγόνας αναπτύχθηκαν μεγάλυτεροι κρύσταλλοι (~0.015 x 0.3 x 0.6 mm^3). Διατήρησαν όμως τη μορφολογία της λεπτής πλάκας με αποτέλεσμα να βυθίζονται και να κολλάνε με τη μεγάλη τους επιφάνεια στον πυθμένα της γέφυρας. Πάντως, καμιά από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν οδήγησε στο σχηματισμό κρυστάλλων καλύτερης ποιότητας.



Εικόνα 3.19 Κρύσταλλοι της $HrcQ_B$-C που σχηματίζονται με την τεχνική της μίκρο-ενπυρήνωσης.

Κεφάλαιο 4

ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΠΕΡΙΘΛΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

...και σκέφτηκε όλες εκείνες τις μέρες που ανέτειλλαν υπέροχα και κατέληξαν σε θύελλα...

Oscar Wild, 'Το έγκλημα του Άρθουρ Σάβιλ'

4.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ από κρύσταλλο της φυσικής $HrcQ_B$-C

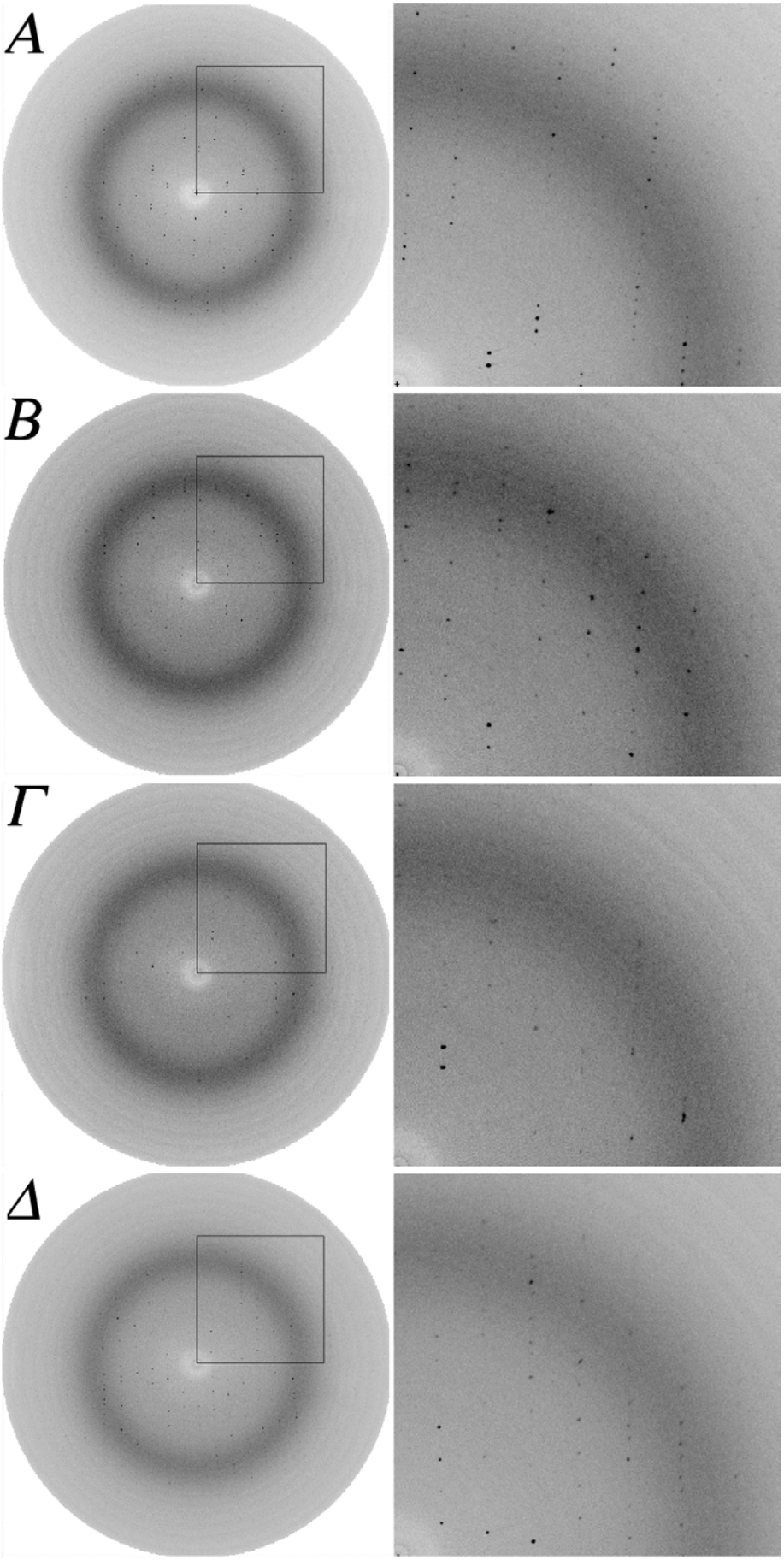
4.1.1 Αρχικά πειράματα

Για τα πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ χρησιμοποιήθηκαν κομμάτια κρυστάλλων που αποκόπηκαν από το συνήθως σχηματιζόμενο κρυσταλλικό συνονθύλευμα. Η μεταφορά τους σε τριχοειδείς σωλήνες για την έκθεση στις ακτίνες Χ αποδείχτηκε ιδιαίτερα επίπονη διαδικασία και σπάνια ολοκληρώθηκε με επιτυχία (λεπτομέρειες της πορείας αναφέρονται στη σελίδα 19). Οι κρύσταλλοι λόγω της μορφολογίας τους έχουν την τάση να προσκολλώνται στο τοίχωμα του σωλήνα με τη μεγάλη τους επιφάνεια, να λυγίζουν τείνοντας να υιοθετήσουν το κοίλο του σχήμα και τελικά να ραγίζουν πολλαπλά, φαινόμενο που εμφανίζεται συστηματικά μετά την απομάκρυνση του μητρικού υγρού. Τα προβλήματα ήταν ιδιαίτερα έντονα με τους μεγαλύτερους κρυστάλλους ενώ επέμειναν ακόμη κι όταν χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδείς

σωλήνες μεγάλης διαμέτρου. Εξαιτίας αυτών των δυσκολιών περιοριστήκαμε σε μικρά κρυσταλλικά κομμάτια με τα οποία ήταν σχετικά ευκολότερο να δουλέψουμε.

Τα πρώτα πειράματα που έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου και με εργαστηριακή πηγή ακτίνων Χ έδειξαν ότι οι κρύσταλλοι: (i) Περιθλούσαν ασθενώς την ακτινοβολία. (ii) Είχαν μικρή διάρκεια ζωής στις ακτίνες. ~5 ώρες έκθεσης ήταν αρκετές για να εξαφανιστούν οι υψηλής διακριτικότητας ανακλάσεις. (iii) Κρύσταλλοι διαστάσεων ~0.3 x 0.2 x 0.015 mm^3 έδιναν δεδομένα μέχρι τα 4 - 3.5 Å. Έτσι, λόγω της ασθενούς περίθλασης η συλλογή κάθε εικόνας δεδομένων απαιτούσε μεγάλο χρόνο έκθεσης. Επιπλέον, για τη συλλογή μιας πλήρους σειράς δεδομένων θα απαιτούνταν πολλοί κρύσταλλοι λόγω της μικρής διάρκειας ζωής τους στις ακτίνες. Το σοβαρότερο πρόβλημα που εντοπίστηκε από τα πρώτα πειράματα περίθλασης, ήταν το κακό πακετάρισμα των μορίων στους κρυστάλλους. Ως αποτέλεσμα, το μεγαλύτερο ποσοστό των κρυστάλλων (~90%) εμφάνιζαν άσχημο διάγραμμα περίθλασης όπως χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στην εικόνα 4.1. Το πρόβλημα ήταν σοβαρότερο όταν οι ακτίνες ήταν παράλληλες με την μεγάλη επιφάνεια των κρυστάλλων. Σε αυτή τη διεύθυνση οι υψηλής διακριτικότητας ανακλάσεις χάνονταν ενώ οι εναπομείνουσες είχαν σχήμα επίμηκες και ήταν διαχεόμενες (diffused) ή διαιρεμένες (splitted). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των κρυστάλλων και οι δυσκολίες που συνοδεύουν τη μεταφορά τους στις ακτίνες έκαναν σαφή την ανάγκη να εκμεταλλευτούμε τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η συλλογή δεδομένων περίθλασης σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (δες παράγραφο 1.3.4).

Για την εύρεση του κατάλληλου κρυο-προστατευτικού υγρού και την εκτέλεση των πειραμάτων σε κρυογενετικές θερμοκρασίες ακολουθήθηκε η στρατηγική που υποδεικνύεται από τους Garman & Schneider (1997). Λόγω της παρουσίας του στις συνθήκες κρυστάλλωσης το MPD ήταν ο πρώτος υποψήφιος κρυο-προστάτης. 40% MPD στο μητρικό υγρό οδήγησε σε πλήρη υαλοποίηση όπως κρίθηκε από οπτική εξέταση του παγωμένου διαλύματος στην κάμερα και από την απουσία δακτυλίων οι οποίοι θα προέκυπταν από την περίθλαση κρυσταλλικού πάγου. Απευθείας επαφή αυτού του διαλύματος με τους κρυστάλους τους άφηνε εξωτερικά ανέπαφους. Τα πειράματα που έγιναν υπό αυτές τις συνθήκες επιβεβαίωσαν την ασθενή περίθλαση και το συστηματικά κακό κρυσταλλικό πακετάρισμα στην πλειοψηφία των κρυστάλλων.


A
B
Γ
Δ

Εικόνα 4.1 (προηγούμενη σελίδα) Το χαρακτηριστικό διάγραμμα περίθλασης από την πλειοψηφία των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C. **(Α)** Η μεγάλη επιφάνεια του κρυστάλλου είναι κάθετη στη δέσμη των ακτίνων Χ. **(Β)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 45° ως προς το (Α). **(Γ)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 90° ως προς το (Α) ώστε η μεγάλη του επιφάνεια να είναι παράλληλη στη δέσμη των ακτίνων. **(Δ)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 135° ως προς το (Α). Στις εικόνες (Α), (Β) και (Δ) η περίθλαση δεν είναι ιδιαίτερα άσχημη. Στη (Γ) οι υψηλής διακριτικότητας ανακλάσεις έχουν χαθεί και όσες παραμένουν είναι διαχεόμενες με ασαφή όρια.

Οι κρύσταλλοι δοκιμάστηκε επίσης να ψυχθούν με Paratone (Hampton Research) και λάδι. Η μεγάλη επιφανειακή τάση που αναπτύσσεται, λόγω του υψηλού ιξώδους του Paratone, κατά την προσπάθεια απομάκρυνσης του κρυστάλλου από τη σταγόνα οδηγεί στο θρυμματισμό του κρυστάλλου. Αντίθετα, η χρήση κοινού ελαίου μηχανής αποδείχτηκε επιτυχής για κρύο-προστασία αλλά η ποιότητα των διαγραμμάτων περίθλασης δεν βελτιώθηκε.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι χειρότερες εικόνες περίθλασης παρατηρούνταν όταν η μεγάλη επιφάνεια του κρυστάλλου ήταν παράλληλη με τις ακτίνες. Επομένως το πρόβλημα εντοπίζεται σε ανωμαλία ή διατάραξη της εσωτερικής τάξης κατά μήκος κυρίως της μικρής διάστασης του κρυστάλλου (που είναι κάθετη στη μεγάλη του επιφάνεια). Η ανωμαλία στην εσωτερική τάξη είναι πιθανό να οφείλεται σε αδυναμία των μορίων να πακεταριστούν καλά κατά μήκος αυτής της διεύθυνσης γεγονός που δικαιολογεί και την αδυναμία των κρυστάλλων να αναπτυχθούν σε αυτή τη διάσταση. Από την άλλη, είναι επίσης πιθανό η αιτία του προβλήματος να πηγάζει από το μικρό πάχος των κρυστάλλων που συνεπάγεται ασθενή μηχανική αντοχή και τους καθιστά ευαίσθητους στην άσκηση εξωτερικών δυναμέων. Αν τα άσχημα διαγράμματα περίθλασης οφείλονται σε εγγενή ανωμαλία του κρυσταλλικού πλέγματος που εμφανίζεται και εξελίσσεται καθώς ο κρύσταλλος μεγαλώνει τότε η επίλυση του προβλήματος –αν είναι εφικτή- ανάγεται στο προγενέστερο στάδιο της κρυστάλλωσης. Αν οφείλονται όμως σε ανωμαλία που δημιουργείται εκ των υστέρων -λόγω της μηχανικής καταπόνισης των κρυστάλλων κατά τη διαδικασία μεταφοράς τους στις ακτίνες- τότε υπάρχει η πιθανότητα το πρόβλημα να μπορεί να αποφευχτεί ή να περιοστεί κατά την προετοιμασία των κρυστάλλων για τη συλλογή δεδομένων. Η επεξεργασία με γλουτεραλδεΰδη και το annealing (ανόπτηση) είναι δύο τεχνικές που χρησιμοποιούνται η πρώτη, για την αύξηση της μηχανικής αντοχής των κρυστάλλων και η δεύτερη, για την απάλειψη ανωμαλιών του πλέγματος που προκαλούνται από τους χειρισμούς που συνοδεύουν τη μεταφορά τους στις ακτίνες και τη ψύξη τους.

Το 1964 οι Quiocho & Richards ανέφεραν τη χρήση γλουτεραλδεΰδης για τη διασύνδεση (cross-linking) πρωτεϊνικών κρυστάλλων που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ. Η βελτίωση της μηχανικής αντοχής, αποτέλεσμα της επεξεργασίας με τη γλουτεραλδεΰδη, αύξησε τη σταθερότητα των κρυστάλλων χωρίς να αλλοιώσει την περίθλαση. Το αντιδραστήριο δε βρήκε γενική χρήση γιατί η μη ειδικότητα του καθιστά δύσκολη την εύρεση συνθηκών που να δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Εντούτοις, η χρήση του για τη σταθεροποίηση πρωτεϊνικών κρυστάλλων έχει αναφερθεί αρκετές φορές στη βιβλιογραφία (π.χ. Liljas & Newcomer 1981). Για τη σταυροσύνδεση κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C ακολουθήσαμε δύο πορείες όπως περιγράφονται στη βιβλιογραφία: (i) Οι κρύσταλλοι έρχονται σε άμεση επαφή με διαλύματα γλουτεραλδεΰδης διαφορετικών συγκεντρώσεων για διάφορους χρόνους (Quiocho & Richards 1964). (ii) Για πιο ήπια επεξεργασία η γλουτεραλδεΰδη εισάγεται στους κρυστάλλους με διάχυση ατμών (Lusty 1999). Σε όλες τις περιπτώσεις οι κρύσταλλοι έγιναν σκληροί και άκαμπτοι αλλά η περίθλαση είτε δεν παρουσίασε βελτίωση είτε χειροτέρεψε.

Η ανόπτηση (annealing) είναι μια τεχνική που σε αρκετές περιπτώσεις βελτιώνει το σχήμα των ανακλάσεων, ελαττώνει τη μωσαϊκότητα και αυξάνει τη διακριτικότητα (Kriminski *et al.* 2002). Οι Samatey *et al.* (2000) αναφέρουν ότι η τεχνική βελτίωσε σημαντικά την περίθλαση από τους πολύ λεπτούς κρυστάλλους με τους οποίους δούλευαν. Στην πρώτη αναφορά της στη βιβλιογραφία (Harp *et al.* 1998) η πορεία περιλάμβανε απομάκρυνση του κρυστάλλου από το ρεύμα ψυχρού αζώτου, μεταφορά του σε διάλυμα του κρυο-προστάτη για μερικά λεπτά και επανατοποθέτηση του στο ψυχρό ρεύμα. Σε μια τροποποίηση της τεχνικής (flash annealing, Yeh & Hol 1998) ο κρύσταλλος παραμένει στη γωνιομετρική κεφαλή ενώ το ψυχρό ρεύμα φράσσεται για 1-2 sec και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2-3 φορές. Η εφαρμογή της ανόπτησης και με τους δύο προαναφερόμενους τρόπους κατέληγε συνήθως σε πλήρη απώλεια της περίθλασης από τους κρυστάλλους της $HrcQ_B$-C.

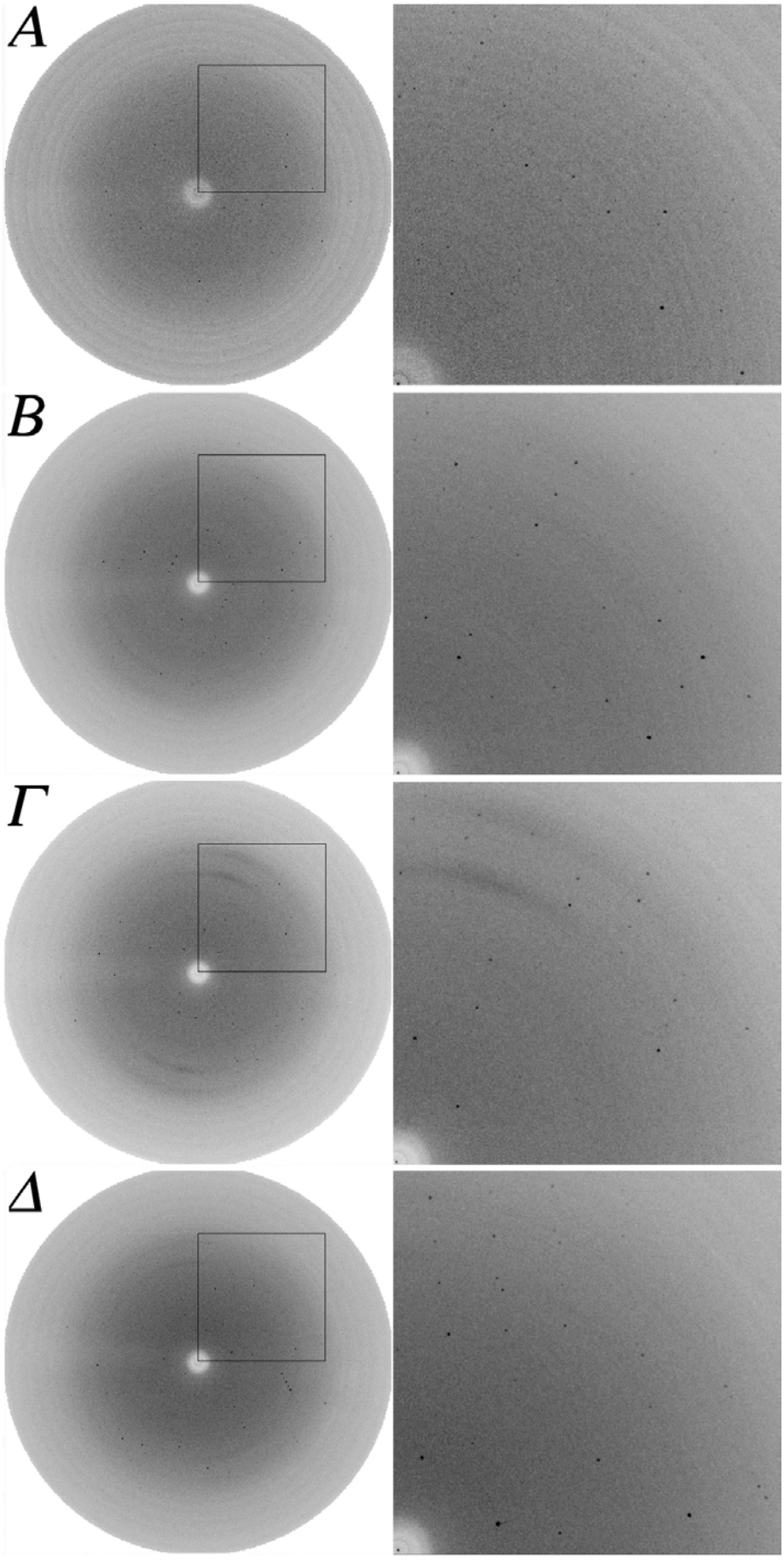
4.1.2 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων

Μια σειρά χρήσιμων δεδομένων καταγράφηκε από την περίθλαση ενός κρυσταλλικού κομματιού, διαστάσεων ~0.1 x 0.2 x 0.015 mm^3 που αποσπάστηκε από την περιφέρεια κρυστάλλου σχήματος μαργαρίτας. Ο κρύσταλλος είχε μεγαλώσει σε 15% MPD, 70 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM bis-tris pH 6.6, χωρίς ενπυρήνωση. Το κομμάτι που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή αφού αποσπάστηκε από το μητρικό κρύσταλλο μεταφέρθηκε και παρέμεινε για ~5 min σε διάλυμα 40% MPD για κρυο-προστασία. Στη συνέχεια ψύχτηκε ακαριαία σε ρεύμα

αζώτου θερμοκρασίας -170 ºC. Στη θερμοκρασία αυτή παρέμεινε σε όλη τη διάρκεια της συλλογής. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή δίσκου ειδώλου (imaging plate) της MAR Research με διάμετρο 300 mm και μέγεθος ψηφίου (pixel size) 150 μm. Η ακτινοβολία που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Cu Kα (η Kα γραμμή εκπομπής του χαλκού, λ=1.54Å) παραγόμενη από την εργαστηριακή γεννήτρια περιστρεφόμενης ανόδου (Rigaku RU-H3R) του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.

Ο ανιχνευτής τοποθετήθηκε σε απόσταση 200 mm από τον κρύσταλλο και καταγράφηκαν 98 εικόνες (images) περίθλασης που προήλθαν από συνολική περιστροφή του κρυστάλλου 196º. Κάθε εικόνα περιέλαβε δεδομένα από περιστροφή 2º του κρυστάλλου και για διάρκεια έκθεσης στις ακτίνες 30 min. Η μωσαϊκότητα του κρυστάλλου ήταν 0.3º. Η σειρά δεδομένων χαρακτηρίζεται ως native γιατί προέρχεται από φυσικό κρύσταλλο της πρωτεΐνης. Στην εικόνα 4.2 παρουσιάζεται το διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου σε τέσσερις εικόνες δεδομένων που απέχουν μεταξύ τους 45º.

Η επεξεργασία των δεδομένων (processing) περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια: (i) Κατ' αρχάς εντοπίζονται οι ανακλάσεις, τους αποδίδεται η τριάδα των δεικτών Miller hkl (indexing) και προσδιορίζεται ο προσανατολισμός του κρυστάλλου, (ii) ολοκληρώνονται τα μέγιστα περίθλασης (integration) και σε κάθε ανάκλαση αποδίδεται μια σχετική τιμή έντασης (I), (iii) οι εντάσεις ανάγονται σε κοινή κλίμακα (scaling) ώστε η σειρά δεδομένων να είναι εσωτερικά συνεπής, (iv) από την ένταση υπολογίζεται το πλάτος (|F|) δεδομένου ότι $I \propto |F|^2$. Η ολοκλήρωση των μεγίστων περίθλασης και η αναγωγή τους σε κοινή κλίμακα έγινε με τα προγράμματα DENZO και SCALEPACK από την ομάδα προγραμμάτων HKL (Otwinowski & Minor 1997) ενώ ο υπολογισμός του πλάτους των ανακλάσεων με το πρόγραμμα TRUNCATE από την ομάδα προγραμμάτων CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 1994). Τα στατιστικά από την επεξεργασία των δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.


A
B
Γ
Δ

Εικόνα 4.2 (προηγούμενη σελίδα) Παρουσιάζονται τέσσερις εικόνες περίθλασης του κρυστάλλου από τον οποίο συλλέχτηκε μια πλήρης σειρά χρήσιμων δεδομένων. **(Α)** Η μεγάλη επιφάνεια του κρυστάλλου είναι κάθετη στη δέσμη των ακτίνων Χ. **(Β)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 45° ως προς το (Α). **(Γ)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 90° ως προς το (Α) ώστε η μεγάλη του επιφάνεια να είναι παράλληλη στη δέσμη των ακτίνων. **(Δ)** Ο κρύσταλλος έχει περιστραφεί 135° ως προς το (Α). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση με αντίστοιχες εικόνες της 4.1.

Πίνακας 4.1 Στατιστική ανάλυση από τη συλλογή των native δεδομένων περίθλασης της $HrcQ_B$-C.

	Όλα τα δεδομένα	**Δεδομένα υψηλότερης διακριτικότητας**
Διακριτικότητα (Å) (Resolution)	35.0-3.00	3.11-3.00
Συνολικός αριθμός ανακλάσεων (Total number of reflections)	26299	2065
Αριθμός ανεξάρτητων ανακλάσεων (Number of unique reflections)	5675	553
Πολλαπλότητα (Multiplicity)	4.6	3.7
Πληρότητα (%) (Completeness)	100	100
$\mathbf{R_{sym}}$	0.11	0.26
I/σ(I)	11.87	4.60

$R_{sym}=\Sigma_h\Sigma_j |I_{h,j} - \hat{I}_h| / \Sigma_h\Sigma_j I_{h,j}$, για την ένταση I των j παρατηρήσεων της ανάκλασης h.

Η στοιχειώδης κυψελίδα έχει διαστάσεις a=51.6, b=27.3, c=97.2 Å, α=90.0, β=99.8, γ=90.0° και η συμμετρία της ανήκει στην ομάδα χώρου P2 ή $P2_1$ (μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα, απλό (primitive) πλέγμα). Για να διακρίνουμε ανάμεσα στις πιθανές ομάδες συμμετρίας λάβαμε υπόψη: (i) Τις συστηματικές απουσίες στο διάγραμμα περίθλασης. Η χαμηλή τιμή έντασης (I/σ(I)) των ανακλάσεων 010, 030, 050, 070, 090 εντοπίστηκε αρχικά από το πρόγραμμα με το οποίο έγινε το scaling (Scalepack). Στη συνέχεια με οπτική παρατήρηση του διαγράμματος περίθλασης με το πρόγραμμα hklview (από το πακέτο προγραμμάτων της

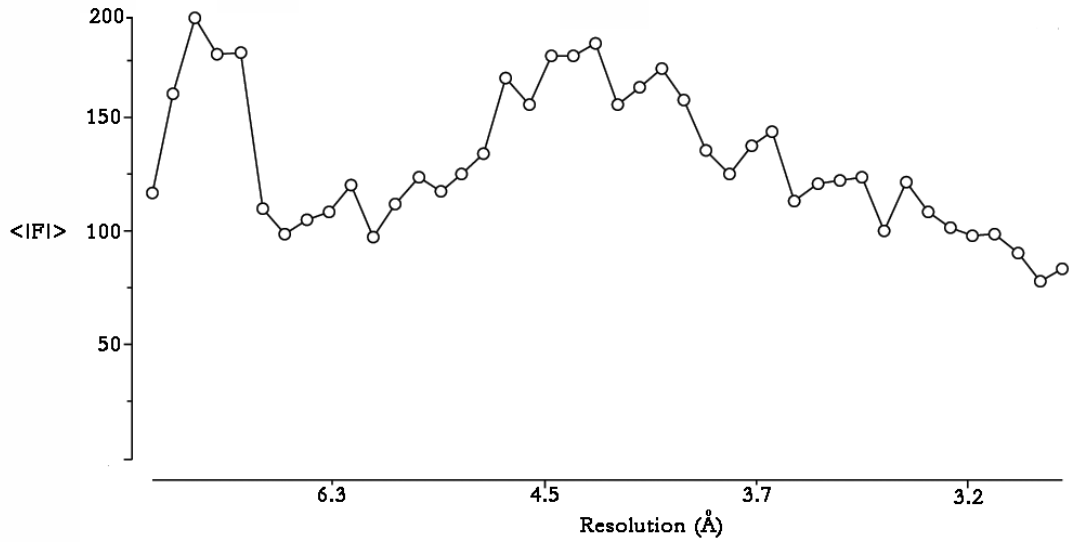
CCP4) επιβεβαιώθηκε η συστηματική απουσία ανακλάσεων του τύπου 0k0 με k περιττό. Οι απουσίες αυτές υποδεικνύουν την παρουσία ενός κοχλιωτού άξονα περιστροφής (άξονας περιστροφής με μετάθεση, Stout & Jensen 1968, International International Tables for X-ray Crystallography 1989, Vol. A). (ii) Το επίπεδο Harker της συνάρτησης Patterson. Λεπτομέρειες αναφέρονται στην παράγραφο 4.2. Και τα δύο κριτήρια υποδεικνύουν ως πιο πιθανή την ομάδα χώρου $P2_1$.

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των κρυστάλλων σε διαλύτη και του πιθανού αριθμού μορίων πρωτεΐνης στη στοιχειώδη κυψελίδα υπολογίστηκε ο συντελεστής Matthews (Matthews coefficient, Matthews 1968) όπως φαίνεται στον πίνακα 4.2. Από τις διαστάσεις και το σχήμα της στοιχειώδους κυψελίδας υπολογίζεται ότι ο όγκος της είναι $V_{u.cell}$=130354 $Å^3$, άρα ο όγκος της ασύμμετρης μονάδας είναι V_{au}= $V_{u.cell}$ /2=65177 $Å^3$. Για 3 και 4 μόρια στην ασύμμετρη μονάδα ο V_M βρίσκεται μεταξύ αποδεκτών τιμών ($1.7 \leq V_M \leq 3.5$, Matthews, 1968) ενώ για 2 μόρια είναι πολύ κοντά στο ανώτερο όριο. Στο σημείο αυτό υπενθυμίζουμε ότι τα αποτελέσματα από τη στήλη μοριακής διήθησης υποδεικνύουν την ύπαρξη τετραμερών ή πενταμερών στο διάλυμα ενώ τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία μάζας υποδεικνύουν την ύπαρξη διμερών που σχηματίζονται μέσω χημικού δεσμού. Η ύπαρξη 2 και 4 μονομερών στην ασύμμετρη μονάδα είναι συμβατή με όλα τα παραπάνω δεδομένα. Επειδή οι κρύσταλλοι δεν ήταν αρκετά εύθραυστοι για να δικαιολογείται ποσοστό διαλύτη 66% θεωρούμε ότι 4 μονομερή είναι η πιο πιθανή επιλογή.

Πίνακας 4.2 Υπολογισμός του λόγου Matthews για διάφορους αριθμούς μορίων στην ασύμμετρη μονάδα

Μοριακό βάρος (MW) μονομερούς=8945 Da V_{au}=65177 $Å^3$			
Αριθμός μορίων στην ασύμμετρη μονάδα	Μοριακό βάρος στην ασύμμετρη μονάδα, MW_{au} (Da)	Λόγος Matthews, V_M (V_M=V_{au}/MW_{au})	Περιεκτικότητα σε διαλύτη, V_{solv} (V_{solv}=1-(1.23/V_M))
1	8945	7.3	83%
2	17890	3.6	66%
3	26835	2.4	49%
4	35780	1.8	32%
5	44725	1.5	18%

Η κατανομή των μέσων πλατών ως συνάρτηση της διακριτικότητας υποδεικνύει την ύπαρξη συγκεκριμένων στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Αυτό συμβαίνει γιατί η διακριτικότητα στην οποία εμφανίζονται ισχυρές ανακλάσεις αντιστοιχεί σε αποστάσεις που περιοδικά επαναλαμβάνονται στον κρύσταλλο. Έτσι η παρουσία α-ελίκων φανερώνεται από την ύπαρξη ισχυρών ανακλάσεων στα ~5.4 Å που είναι το βήμα της α-έλικας ενώ η παρουσία β-πτυχωτής επιφάνειας χαρακτηρίζεται από ισχυρές ανακλάσεις στα ~4.7 Å που είναι η απόσταση μεταξύ των παρακείμενων β-κλώνων. Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η κατανομή μέσων πλατών των δεδομένων της $HrcQ_B$-C. Υπάρχει ένα μέγιστο περίπου στα 4.5 Å που μπορεί να ερμηνευτεί ως ένδειξη παρουσίας β-πτυχωτής επιφάνειας ενώ είναι φανερή η απουσία μεγίστου στα 5.4 Å κάτι που προϊδεάζει για χαμηλό ποσοστό α-έλικας.



Εικόνα 4.3 Κατανομή των μέσων πλατών ανά κέλυφος διακριτικότητας από τα native δεδομένα της $HrcQ_B$-C ως συναρτήση της διακριτικότητας.

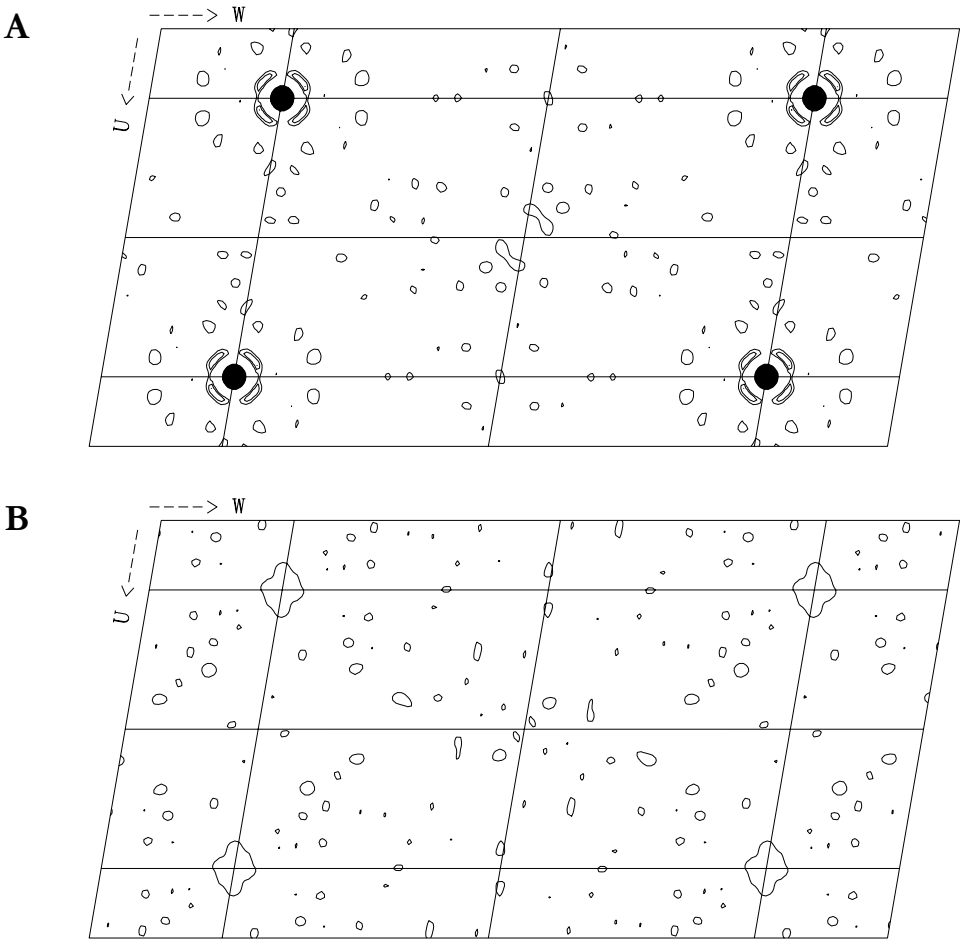
4.2 Υπολογισμός της συνάρτηση Patterson με τα δεδομένα της φυσικής $HrcQ_B$-C

Η συνάρτηση Patterson (P(uvw)) είναι μια σύνθεση Fourier με όρους τις εντάσεις των ανακλάσεων. Τα μόνα δεδομένα που απαιτούνται για τον υπολογισμό της είναι οι δείκτες των

περιθλώμενων κυμάτων και οι τιμές των $|F|^2$. Για το λόγο αυτό, μπορεί να υπολογιστεί άμεσα από τις μετρήσεις ενός πειράματος περίθλασης ακτίνων Χ. Η συνάρτηση παίρνει τιμές σ' ένα χώρο που έχει το σχήμα και το μέγεθος της στοιχειώδους κυψελίδας. Η γραφική της παράσταση είναι ένας χάρτης διανυσμάτων. Κάθε σημείο στο χώρο της συνάρτησης αντιπροσωπεύει ένα διάνυσμα με αρχή την αρχή των συντεταγμένων και τέλος το σημείο αυτό. Το μήκος και η διεύθυνση των διανυσμάτων αντιστοιχεί σε διατομικές αποστάσεις μέσα στη στοιχειώδη κυψελίδα. Σε σημεία που αντιστοιχούν στην απόσταση μεταξύ δύο ατόμων με ατομικούς αριθμούς Z_i και Z_j η συνάρτηση παίρνει τιμές ανάλογες του γινομένου Z_iZ_j. Η τιμή της συνάρτησης είναι μηδέν σε σημεία που αντιστοιχούν σε διανύσματα που δεν αντιπροσωπεύουν διατομικές αποστάσεις μέσα στον κρύσταλλο. Κάθε συνάρτηση Patterson έχει μέγιστο στο σημείο (0, 0, 0) που αντιπροσωπεύει τα διανύσματα από κάθε άτομο της στοιχειώδους κυψελίδας στον εαυτό του. Το σημείο αυτό αναφέρεται ως origin peak. Σύμφωνα με τα παραπάνω η συνάρτηση παίρνει υψηλές τιμές σε σημεία που αντιστοιχούν σε αποστάσεις μεταξύ ατόμων με μεγάλους ατομικούς αριθμούς και σε σημεία που αντιστοιχούν σε διανύσματα που επαναλαμβάνονται μέσα στη στοιχειώδη κυψελίδα. Από Ν άτομα στη στοιχειώδη κυψελίδα προκύπτουν N^2 μέγιστα στο χώρο της Patterson. Από αυτά, τα Ν συνεισφέρουν στο origin peak και τα N^2-N=N(N-1) κατανέμονται στα υπόλοιπα σημεία του χώρου. Έτσι, η πολυπλοκότητα της συνάρτησης αυξάνει πολύ γρηγορότερα από αυτή της στοιχειώδους κυψελίδας και η χρησιμότητα της για την εξαγωγή δομικής πληροφορίας ελαττώνεται όσο αυξάνει ο αριθμός ατόμων μιας ένωσης.

Ορισμένες περιοχές της συνάρτησης Patterson που είναι γνωστές ως επίπεδα Harker παρουσιάζουν ασυνήθιστα μεγάλη πυκνότητα και χρησιμοποιούνται για να εξαχθεί πληροφορία για τη συμμετρία του κρυστάλλου (Stout & Jensen 1968). Η υψηλή συγκέντρωση πυκνότητας στα επίπεδα αυτά οφείλεται στο γεγονός ότι τα διανύσματα που συνδέουν συμμετρικά άτομα έχουν μια συντεταγμένη σταθερή. Για παράδειγμα, στο μονοκλινές κρυσταλλικό σύστημα, στο οποίο ανήκουν οι κρύσταλλοι της $HrcQ_B$-C, η ομάδα χώρου P2 περιέχει ζεύγη ατόμων με συντεταγμένες x, y, z και -x, y, -z. Τα διανύσματα που συνδέουν αυτά τα άτομα έχουν συντεταγμένες 2x, 0, 2z και εμφανίζονται στο επίπεδο uw της Patterson με v=0. Αντίστοιχα, η ομάδα χώρου $P2_1$ περιέχει τα ζεύγη ατόμων x, y, z, και -x, y+1/2, -z και τα διανύσματα που συνδέουν αυτά τα άτομα έχουν συντεταγμένες 2x, 1/2, 2y και βρίσκονται στο επίπεδο uw με v=1/2. Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζονται τα δύο αυτά επίπεδα της συνάρτησης Patterson που υπολογίστηκε με τα native δεδομένα της $HrcQ_B$-C. Στο (Α) δίνεται το επίπεδο uw με v=0 στο οποίο κυριαρχεί το origin peak στο σημείο (0, 0, 0). Στο (Β) δείχνεται το uw με v=1/2. Αν και

η διαφορά της μέσης τιμής της συνάρτησης στα δύο επίπεδα δεν είναι μεγάλη, προσεκτική παρατήρηση οδηγεί μάλλον στο συμπέρασμα ότι πιθανότερο επίπεδο Harker είναι το v=1/2. Για τη σύγκριση αυτή δεν λαμβάνεται υπόψη η πυκνότητα του origin peak.



Εικόνα 4.4 Παρουσιάζονται δύο επίπεδα από τη συνάρτηση Patterson που υπολογίζεται με native δεδομένα της HrcQ$_B$-C στο εύρος διακριτικότητας 15.0 – 3.0 Å. Η κατάτμηση του χώρου σε επίπεδα γίνεται κάθετα στον άξονα v. Η πρώτη ισοϋψής αντιστοιχεί στο 2% του origin peak . Οι υπόλοιπες φέρονται σε βήματα του 2%. **(A)** Το επίπεδο uw με v=0. **(B)** Το επίπεδο uw με v=1/2.

4.3 Υπολογισμός της συνάρτηση αυτοπεριστροφής με τα δεδομένα της φυσικής $HrcQ_B$-C

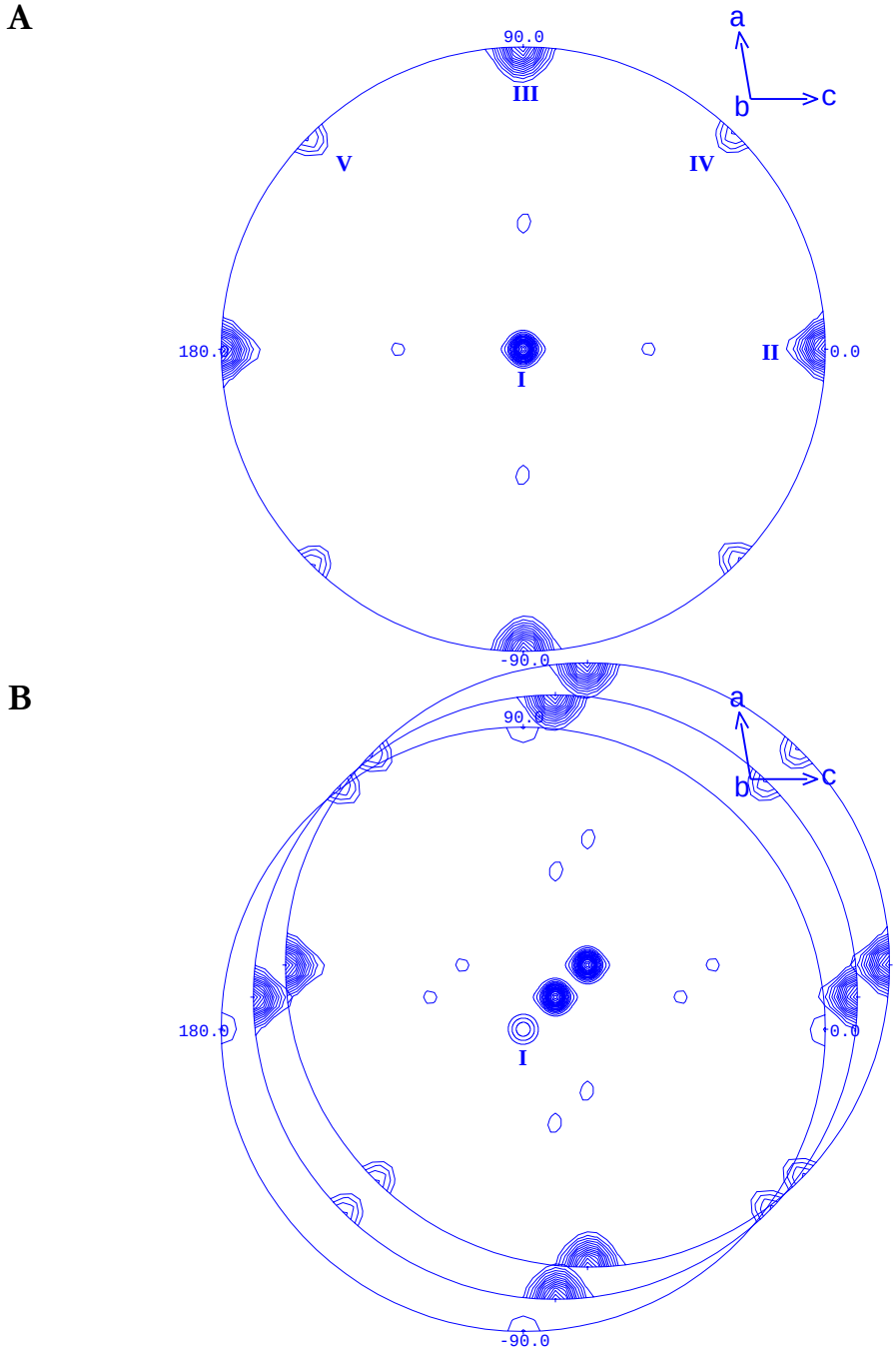
Μη-κρυσταλλογραφική καλείται η εσωτερική συμμετρία του επαναλαμβανόμενου μοτίβου του κρυστάλλου. Διαφοροποιείται από τη λεγόμενη κρυσταλλογραφική στο ότι ισχύει μόνο τοπικά δηλαδή συσχετίζει ομάδες ατόμων που βρίσκονται στην ασύμμετρη μονάδα του πλέγματος. Η γνώση της μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας του μοτίβου είναι σημαντική γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βελτίωση των πειραματικών φάσεων των παραγόντων δομής όπως θα αναφερθεί εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο (δες 6.3.1).

Η συνάρτηση Patterson εμπεριέχει πληροφορία για τη μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία του μοτίβου και αυτό γίνεται κατανοητό με το παράδειγμα που επικαλούνται οι Rossmann & Blow (1962): Ας υποθέσουμε πως το μοτίβο αποτελείται από δύο ίδια μόρια διευθετημένα με διαφορετικούς προσανατολισμούς. Η συνάρτηση Patterson θα αποτελείται από μια ομάδα διανυσμάτων που συσχετίζουν άτομα του ενός μορίου (self-Patterson διανύσματα), από μια ομάδα διανυσμάτων που συσχετίζουν άτομα του άλλου μορίου και από μια ομάδα διανυσμάτων που συσχετίζουν άτομα από το ένα μόριο στο άλλο (cross-Patterson διανύσματα). Τα self-Patterson διανύσματα έχουν κατά μέσο όρο μικρότερο μήκος από τα cross-Patterson και βρίσκονται μέσα σε μια σφαίρα με κέντρο την αρχή της συνάρτησης και ακτίνα ίση με τη μεγαλύτερη διάσταση του μορίου. Επιπλέον, οι κατανομές των self-Patterson διανυσμάτων θα είναι ίδιες για τα δύο ίδια μόρια με μόνη διαφορά ότι η μία κατανομή θα είναι περιστραμμένη ως προς την άλλη εξαιτίας του διαφορετικού προσανατολισμού των μορίων.

Λόγω του μεγάλου αριθμού μεγίστων που υπάρχουν στο χάρτη Patterson πρωτεϊνικών μορίων αυτές οι όμοιες κατανομές διανυσμάτων και η σχέση που της συνδέει δεν μπορούν να γίνουν αντιληπτές με απλή παρατήρηση. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η συνάρτηση self-rotation (συνάρτηση αυτοπεριστροφής, Rossmann & Blow 1962, Drenth 1994) της οποίας η φυσική σημασία είναι η εξής: Αν το υποσύνολο της συνάρτησης Patterson που περιέχει τα self-Patterson διανύσματα υπερτεθεί με ένα περιστρεφόμενο αντίγραφο του τότε για το προηγούμενο παράδειγμα η επικάλυψη των δύο συναρτήσεων θα γίνει μέγιστη για περιστροφές που θα φέρουν τις δύο ομάδες self-Patterson διανυσμάτων στον ίδιο προσανατολισμό. Οι περιστροφές αυτές δηλώνουν τη μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία που συσχετίζει τα μόρια. Έτσι η τιμή της συνάρτησης αυτοπεριστροφής αποτελεί μέτρο της αλληλεπικάλυψης (συμφωνίας) ανάμεσα στη συνάρτηση Patterson και ενός περιστραμμένου αντιγράφου της και μεγιστοποιείται για περιστροφές όπου οι συναρτήσεις συμπίπτουν.

Οι τιμές της συνάρτησης αυτοπεριστροφής παριστάνονται στην επιφάνεια μιας σφαίρας ως συνάρτηση της γωνίας περιστροφής (κ) και της διεύθυνσης του άξονα περιστροφής. Στις πολικές συντεταγμένες η διεύθυνση του άξονα ορίζεται από τις γωνίες φ και ω όπου η φ διατρέχει τον ισημερινό της σφαίρας και η ω μετρά την απόσταση από τον πόλο.

Για να διερευνήσουμε την παρουσία μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας υπολογίσαμε τη συνάρτηση self-rotation με τα δεδομένα της $HrcQ_B$-C στο εύρος διακριτικότητας 10.0-3.0 Å σε μια περιοχή με ακτίνα 17.0 Å γύρω από την αρχή της Patterson. Για τον υπολογισμό της συνάρτησης χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα POLARRFN από την ομάδα προγραμμάτων της CCP4. Στην εικόνα 4.5 παρουσιάζεται το γράφημα της συνάρτησης (η στερεογραφική προβολή της σφαίρας στο επίπεδο) για δύο περιστροφές, κ=180º (διερεύνηση για διπλούς άξονες) και κ=90º (διερεύνηση για τετραπλούς άξονες), (A) και (B) αντίστοιχα. Για την ομάδα χώρου $P2_1$ υπάρχει μόνο ένα κρυσταλλογραφικό στοιχείο συμμετρίας που είναι ένας διπλός άξονας περιστροφής (στην πραγματικότητα ένας διπλός άξονας με μετάθεση) παράλληλος στον κρυσταλλογραφικό b άξονα. Στον άξονα αυτό αντιστοιχεί το μέγιστο που σημειώνεται με I στην εικόνα 4.5 A και εμφανίζεται παράλληλα με τον b στο σημείο φ=0, ω=0º. Το I είναι το μόνο μέγιστο που αντιστοιχεί σε κρυσταλλογραφική συμμετρία ενώ τα υπόλοιπα προκύπτουν από μη κρυσταλλογραφική συμμετρία. Έτσι, τα μέγιστα II και III (φ=0, ω=90º και φ=90, ω=90º) της 4.5 A μπορούν να αποδωθούν σε δύο διπλούς άξονες κάθετους μεταξύ τους και κάθετους στον κρυσταλλογραφικό διπλό. Από αυτούς ο II είναι παράλληλος στον κρυσταλλογραφικό άξονα c. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχουν άλλοι δύο διπλοί άξονες, οι IV στο φ=45, ω=90º και V στο φ=135, ω=90º κάθετοι μεταξύ τους και στον I και 45º από τους II και III. Η τιμή της συνάρτησης στις θέσεις IV και V είναι σχετικά μικρή όπως φαίνεται από τις μικρές τιμές γι' αυτό μπορούμε να υποθέσουμε ότι συσχετίζουν περιοχές με χαμηλότερη ομοιότητα. Το βασικό στοιχείο συμμετρίας στην εικόνα 4.5 B είναι ένας τετραπλός άξονας (I στο φ=0, ω=0º) παράλληλος στον κρυσταλλογραφικό διπλό. Συνοψίζοντας θα λέγαμε ότι τα δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας τάξεως δύο (διπλοί άξονες περιστροφής) ενώ δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την ύπαρξη/απουσία μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας τάξεως τέσσερα (τετραπλοί άξονες περιστροφής).



Εικόνα 4.5 Η συνάρτηση self-rotation που υπολογίζεται με τα native δεδομένα της $HrcQ_B$-C για περιστροφές της Patterson ως προς το ακίνητο αντίγραφο της. Οι τιμές της συνάρτησης παρουσιάζονται σε στερεογραφική προβολή σφαίρας σε σύστημα πολικών συντεταγμένων. Η συνάρτηση υπολογίστηκε με δεδομένα διακριτικότητας 10-3 Å, σε μια σφαίρα ακτίνας 17 Å με κέντρο την αρχή της συνάρτησης Patterson. Πάνω δεξιά δίνεται η διεύθυνση των κρυσταλλογραφικών αξόνων. Ο b είναι κάθετος στο επίπεδο του χαρτιού με φορά προς τον αναγνώστη ενώ οι a και c βρίσκονται στο επίπεδο του χαρτιού. **(A)** κ=180° **(B)** κ=90°.

4.4 Δεδομένα από βιοφυσικές μεθόδους

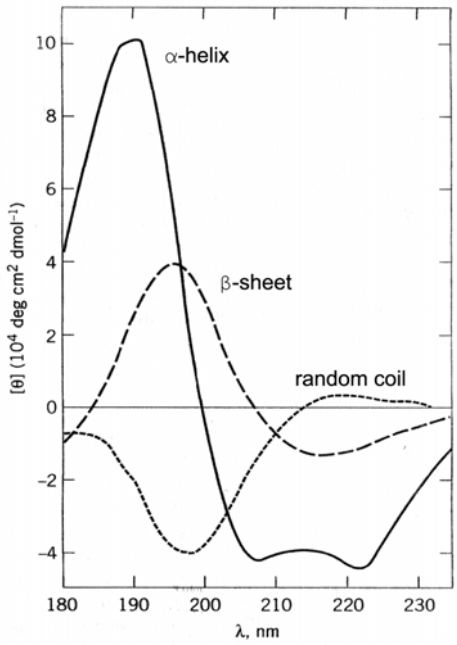
Στη συνέχεια περιγράφουμε πειράματα κυκλικού διχρωισμού και FTIR (Fourier Transform Infra Red) που έγιναν με δείγματα της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής τους.

4.4.1 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός με κυκλικό διχρωισμό (CD)

Οι χειρικές ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, παρουσιάζουν διαφορετική απορρόφηση για τη δεξιά- και αριστερά- κυκλικά πολωμένη ακτινοβολία. Αυτή η διαφορά απορρόφησης ορίζεται ως κυκλικός διχρωισμός (Circular Dichroism) και μετράται με το είδος της φασματοσκοπίας που φέρει το ίδιο όνομα (Rodger & Nordén 1997, Van Holde 1985, Τζουγκράκη & Κόκοτος 1993).

Όπως έχει δειχτεί από τη μελέτη συνθετικών πολυπεπτιδίων ορισμένης διαμόρφωσης π.χ. α-έλικα, β-πτυχωτή, β-στροφή ή αλληλουχία χωρίς δομή (random coil) κάθε στοιχείο δευτεροταγούς δομής έχει ένα χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού (εικόνα 4.6). Η α-έλικα έχει δυο αρνητικές ζώνες στα 222 και 208 nm και μια ιδιαίτερα ισχυρή θετική ζώνη στα 190 nm. Η β-πτυχωτή επιφάνεια έχει μια αρνητική ζώνη στα 215-216 nm και μια θετική παρόμοιας ισχύος στα 195-200 nm. Η β-στροφή εμφανίζει μια αδύνατη αρνητική ζώνη στα ~225 nm, μια ισχυρή θετική ζώνη στα 200-205 nm και μια ισχυρή αρνητική ζώνη στα 180-190 nm. Στην πραγματικότητα, το φάσμα της β-στροφής δεν είναι αυστηρά ορισμένο αφού δεν είναι δυνατό να έχουμε ένα συνθετικό πεπτίδιο όλο β-στροφή. Τέλος, όλα τα μοντέλα πολυπεπτιδίων χωρίς δομή έχουν μια ισχυρή αρνητική ζώνη στα 197-199 nm.

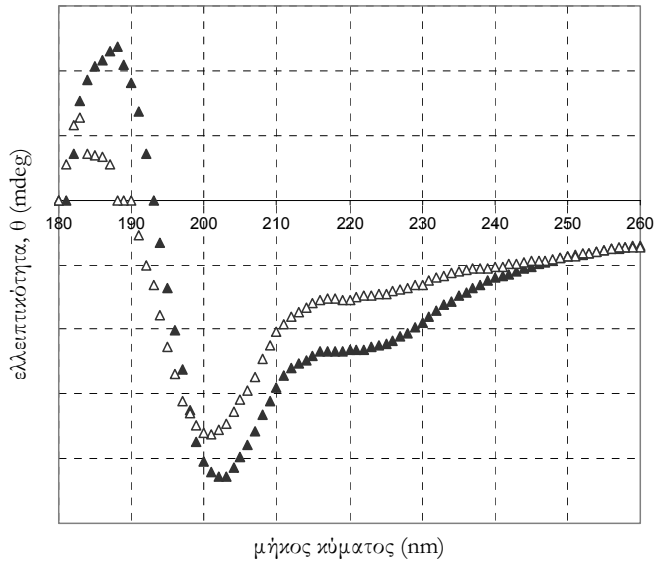
Η χρήση του φάσματος κυκλικού διχρωισμού μιας πρωτεΐνης για την εξαγωγή δομικής πληροφορίας οδηγεί κυρίως σε ποιοτικά συμπεράσματα που βασίζονται στην εμπειρική σύγκριση του πειραματικού φάσματος με τα πρότυπα φάσματα 'καθαρών' διαμορφώσεων. Από την άλλη, υπάρχουν σήμερα διαθέσιμα προγράμματα με τα οποία επιχειρείται μια περισσότερο ποσοτική προσέγγιση. Τα προγράμματα αυτά χρησιμοποιούν ως βάση αναφοράς ένα σύνολο φασμάτων πρωτεϊνών των οποίων οι δομές έχουν προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Η ανάλυση του πειραματικού φάσματος σε ένα κατάλληλα 'ζυγισμένο' άθροισμα των φασμάτων αναφοράς επιτρέπει τον προσδιορισμό του ποσοστού των διαφορετικών δομικών στοιχείων στη πρωτεΐνη. Η χρήση τέτοιων προγραμμάτων οδηγεί συνήθως σε αξιόπιστες εκτιμήσεις της α-έλικας αλλά για τα υπόλοιπα στοιχεία χρειάζεται επιβεβαίωση και με άλλες τεχνικές.



Εικόνα 4.6 Πρότυπα φάσματα κυκλικού διχρωισμού για τις 'καθαρές' διαμορφώσεις α-έλικας, β-πτυχωτής και αλληλουχίας χωρίς δομή (τροποποιημένο σχήμα από το άρθρο του Woody 1999).

Δείγματα της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C υποβλήθηκαν εκτενώς σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι υδατικού διαλύματος 20mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 pH=7.5. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού καταγράφηκαν από τα 180 ως τα 260 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοπολωσίμετρο (spectropolarimeter) Jasco J715 (εικόνα 4.7). Τα φάσματα αναλύθηκαν μόνο ποιοτικά με τη βοήθεια της Prof. S. Radford από το Πανεπιστήμιο του Leeds.

Είναι φανερό ότι τα φάσματα των δύο πρωτεϊνών απέχουν σημαντικά από τις πρότυπες καμπύλες. Το χαρακτηριστικό τους είναι μια ισχυρή αρνητική ζώνη στα 202 ($HrcQ_B$) και 204 nm ($HrcQ_B$-C) η οποία δεν μπορεί να αποδοθεί άμεσα σε κανένα στοιχείο δευτεροταγούς δομής (το αρνητικό μέγιστο του random coil εμφανίζεται συστηματικά κάτω από τα 200 nm). Με επιφύλαξη θα μπορούσαμε ίσως να αποδώσουμε το φάσμα μεταξύ 240-215 nm σε β-πτυχωτή και το μέγιστο στα ~190 nm σε α-έλικα.



Εικόνα 4.7 Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού για τις πρωτεΐνες $HrcQ_B$ (Δ) και $HrcQ_B$-C (▲) όπως καταγράφηκαν.

4.4.2 Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός με FTIR

Από τις ζώνες απορρόφησης που χαρακτηρίζουν τα φάσματα υπερύθρου των πρωτεϊνών υπάρχει μία που ονομάζεται Αμίδιο Ι (Amide I) και έχει βρεθεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δομικές μελέτες. Η Αμίδιο Ι προέρχεται κυρίως από τη δόνηση 'έκτασης' του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού και η ακριβής συχνότητα εμφάνισης της συσχετίζεται άμεσα με το περιβάλλον του καρβονυλίου όπως διαμορφώνεται από τη δευτεροταγή δομή. Στην πραγματικότητα η Αμίδιο Ι συνίσταται από την αλληλεπικάλυψη περισσότερων ζωνών απορρόφησης που καθεμιά προέρχεται από διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Η χρήση του FTIR (Fourier Transform Infra Red) τα τελευταία χρόνια έκανε δυνατή τη καταγραφή φασμάτων απορρόφησης στο υπέρυθρο σε υψηλότερη διακριτικότητα και με αύξηση της αναλογίας σήματος προς θόρυβο σε σχέση με τα κλασικά φάσματα απορρόφησης. Έτσι διευκολύνθηκε η ανάλυση της Αμίδιο Ι ζώνης στα συστατικά της στοιχεία με τη χρήση των τεχνικών της δεύτερης παραγώγου και της Fourier αποσυνέληξης.

Δείγματα της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C υποβλήθηκαν εκτενώς σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι υδατικού διαλύματος 10 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, pH=7.5 και στη συνέχεια συγκεντρώθηκαν μέχρι ~1 mg/ml. Φάσματα υπερύθρου καταγράφηκαν με ένα

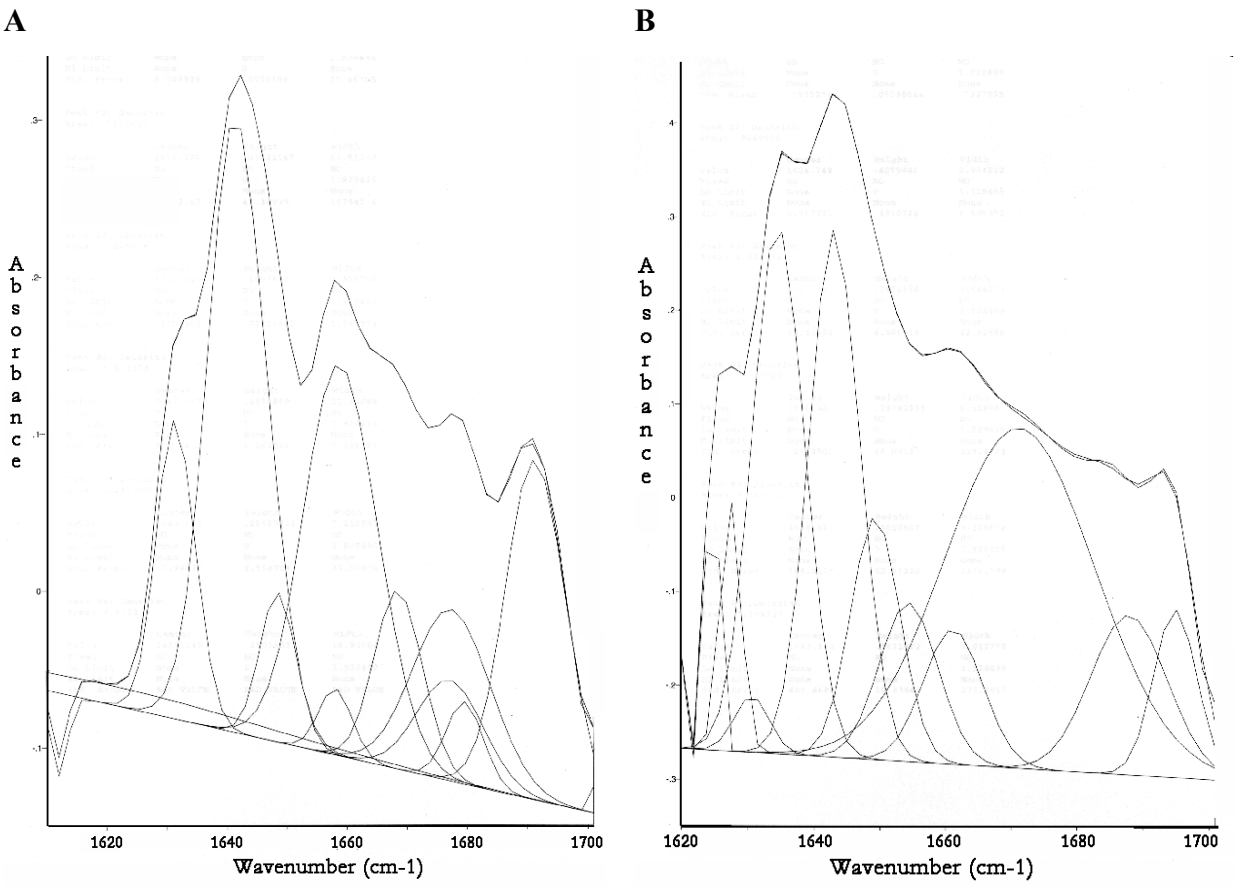
φασματοφωτόμετρο Nicolet 560 σε θερμοκρασία δωματίου και σε διακριτική ικανότητα 4 cm^{-1}. 200 μl δείγματος απλώθηκαν στην επιφάνεια γερμανίου του ειδικού δειγματολήπτη και ο διαλύτης απομακρύνθηκε με ήπια εξάτμιση, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα λεπτό στρώμα πρωτεΐνης. Το πρωτεϊνικό φάσμα ανακτήθηκε με αφαίρεση του φάσματος του διαλύτη από το φάσμα του πρωτεϊνικού διαλύματος. Για τη Fourier αποσυνέληξη (Fourier deconvolution) και τη χάραξη βέλτιστης καμπύλης (curve fitting) της Αμίδιο Ι ζώνης χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα OMNIC και PeakSolve (εικόνα 4.8).

Το εμβαδό της περιοχής που περικλείεται κάτω από κάθε κορυφή χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί το ποσοστό κάθε στοιχείου δευτεροταγούς δομής ενώ η αντιστοίχιση της κάθε κορυφής σε ένα στοιχείο δευτεροταγούς δομής έγινε με βάση τους πίνακες των Dong *et al.* (1990) και Dong & Caughey (1994). Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του Dr. A. Berry. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της Αμίδιο Ι ζώνης των $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.3 (A) Ανάλυση της Αμίδιο Ι ζώνης των FTIR φασμάτων της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C. Στις δύο πρώτες στήλες παρουσιάζονται οι συχνότητες στις οποίες αναλύονται οι Αμίδιο Ι ζώνες της $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C αντίστοιχα και σε παρένθεση δίνονται οι σχετικές τους εντάσεις (relative integrated intensities). Στη τρίτη στήλη γίνεται η αντιστοίχιση των συχνοτήτων με τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής με βάση τις αναφορές που δίνονται στο κείμενο. **(B)** Συνολική απόδοση στοιχείων δευτεροταγούς δομής στις πρωτεΐνες $HrcQ_B$ και $HrcQ_B$-C με βάση την ανάλυση της Αμίδιο Ι ζώνης που παρουσιάζεται στο Α.

A		
Μέση συχνότητα (cm^{-1})		
$HrcQ_B$	**$HrcQ_B$-C**	**Αντιστοίχιση**
	1625 (2%)	β-πτυχωτή
	1627 (3%)	β-πτυχωτή
1632 (8%)	1631 (1%)	β-πτυχωτή
	1635 (17%)	β-πτυχωτή
1649 (4%)	1649 (7%)	απουσία δομής (random)
1658 (2%)	1654 (6%)	α-έλικα
1659 (21%)	1661 (5%)	3_{10} έλικα, α_{II} έλικα ή στροφή τύπου III
1669 (7%)	1671 (30%)	στροφή
1677 (5%)		στροφή
1678 (10%)		στροφή
1680 (2%)		στροφή
	1688 (8%)	στροφή
1692 (15%)		β-πτυχωτή
	1695 (5%)	β-πτυχωτή

B		
Στοιχεία δευτεροταγούς	**$HrcQ_B$**	**$HrcQ_B$-**
β-πτυχωτή	49%	44%
α-έλικα	2%	6%
στροφή	24%	38%
απουσία δομής	4%	7%
3_{10} έλικα, α_{II} έλικα ή στροφή τύπου III	21%	5%



Εικόνα 4.8 Τα FTIR φάσματα της $HrcQ_B$ **(A)** και $HrcQ_B$-C **(B)** μετά την Fourier αποσυνέλιξη. Φαίνεται η ανάλυση σε επιμέρους ζώνες και η χάραξη της βέλτιστης καμπύλης (curve fitting) για κάθε φάσμα.

Κ ε φ ά λ α ι ο 5

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C ΜΕ ΣΕΛΗΝΟ-ΜΕΘΕΙΟΝΙΝΗ

Στην αρχή αυτού του κεφαλαίου περιγράφεται το πρόβλημα των φάσεων και παρουσιάζονται περιληπτικά οι αρχές των τεχνικών της πολλαπλής ισόμορφης αντικατάστασης και της ανώμαλης σκέδασης σε πολλαπλά μήκη κύματος που χρησιμοποιούνται ευρέως για την επίλυση του. Στη συνέχεια περιγράφονται οι προσπάθειες της επίλυσης του προβλήματος των φάσεων στην περίπτωση της $HrcQ_B$-C. Οι προσπάθειες αυτές είχαν δύο κατευθύνσεις: (i) Την εύρεση χρήσιμων παραγώγων βαρέων μετάλλων με σκοπό να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ισόμορφης αντικατάστασης (παράγραφος 5.2). (ii) Την εισαγωγή στην πρωτεΐνη ατόμων σεληνίου με σκοπό να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ανώμαλης σκέδασης σε πολλαπλά μήκη κύματος (παράγραφοι 5.3 και 5.4).

5.1 Εισαγωγή

5.1.1 Το πρόβλημα των φάσεων και η επίλυση του

Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ βασίζεται στη συμβολή των κυμάτων που περιθλώνται από κρυστάλλους της πρωτεΐνης. Η μαθηματική συμβολή των κυμάτων επιτυγχάνεται με τη σύνθεση Fourier που είναι το μαθηματικό ανάλογο ενός εστιακού φακού. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής του μετασχηματισμού Fourier είναι η δημιουργία του ειδώλου του αντικειμένου που προκαλεί την περίθλαση δηλαδή της κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας του μορίου. Το μέγεθος που μετράται από πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ είναι η ένταση των περιθλώμενων κυμάτων από την οποία υπολογίζεται άμεσα το πλάτος των κυμάτων ($I \propto |F|^2$). Το βασικό πρόβλημα της μεθόδου προκύπτει από την πρακτική αδυναμία να καταγραφούν οι φάσεις των

περιθλώμενων κυμάτων. Έτσι οι φάσεις συνάγονται έμμεσα από μεθόδους όπως η πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση (Multiple Isomorphous Replacement, MIR) και η ανώμαλη σκέδαση σε πολλαπλά μήκη κύματος (Multiwavelength Anomalous Diffraction, MAD).

Η πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση βασίζεται στις αλλαγές των εντάσεων των περιθλώμενων κυμάτων που προκαλούνται από την πρόσδεση ατόμων ενός βαρέως μετάλλου στον κρύσταλλο της πρωτεΐνης (παράγωγος κρύσταλλος). Οι φάσεις εκτιμώνται από τις διαφορές των πλατών που υπολογίζονται από τα διαγράμματα περίθλασης του φυσικού και του παράγωγου κρυστάλλου. Ως βαριά χαρακτηρίζονται τα στοιχεία με μεγάλους ατομικούς αριθμούς όπως ο λευκόχρυσος (Pt), χρυσός (Au), υδράργυρος (Hg), μόλυβδος (Pb), ουράνιο (U) και οι λανθανίδες. Ο ισομορφισμός μεταξύ του παράγωγου και του φυσικού κρυστάλλου είναι κριτικής σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου. Ένας παράγωγος κρύσταλλος χαρακτηρίζεται ισόμορφος όταν η πρόσδεση του βαρέως ατόμου δεν προκαλεί αλλαγές ούτε στη δομή του μορίου ούτε στον τρόπο που τα πρωτεϊνικά μόρια πακετάρονται στον κρύσταλλο. Σ'αυτή την περίπτωση οι διαφορές των εντάσεων οφείλονται αποκλειστικά στη συνεισφορά των ατόμων του μετάλλου στο φαινόμενο της σκέδασης. Η ισόμορφη παραγώγηση ενός κρυστάλλου είναι εμπειρική, επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία γιατί απαιτεί πολλές δοκιμές διαφορετικών ενώσεων βαρέων μετάλλων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Παράγωγοι κρύσταλλοι ετοιμάζονται με εμβάπτιση του φυσικού κρυστάλλου σε διάλυμα του βαρέως μετάλλου (soaking) ή με συγκρυστάλλωση της πρωτεΐνης με το διάλυμα του μετάλλου (co-crystallization).

5.1.2 Προσδιορισμός φάσεων με την τεχνική της ανώμαλης σκέδασης σε πολλαπλά μήκη κύματος (MAD)

Όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει μήκος κύματος κοντά σε μέγιστο απορρόφησης ενός ατόμου του κρυστάλλου τότε μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται από το άτομο για τη μετάπτωση ενός ηλεκτρονίου σε μια διηγερμένη ενεργειακή κατάσταση και σκεδάζεται με διαφορά φάσης ως προς την προσπίπτουσα. Το φαινόμενο καλείται ανώμαλη σκέδαση για να διακριθεί από τη λεγόμενη ομαλή κατά την οποία το άτομο σκεδάζει με την ίδια φάση όλη την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Ένα άτομο σκεδάζει ανώμαλα όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη διαφορά μεταξύ δύο ενεργειακών του καταστάσεων. Στο εύρος της ακτινοβολίας που συνήθως λαμβάνουν χώρα τα πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ αντιστοιχούν διαφορές ενεργειακών στιβάδων των μετάλλων μετάπτωσης από τον σίδηρο (Z=26) μέχρι τον ψευδάργυρο (Z=30), στοιχείων με μέσο ατομικό αριθμό από

το γάλιο (Z=31) μέχρι το ύττριο (Z=39), λανθανιδών με ατομικούς αριθμούς από 64 – 71 καθώς και των συμβατικών βαρέων ατόμων (Hendrickson & Ogata 1997). Άμεση συνέπεια της ανώμαλης σκέδασης στο διάγραμμα περίθλασης του κρυστάλλου είναι ότι παύει να ισχύει ο νόμος του Friedel. Σύμφωνα με το νόμο αυτό, τα ζεύγη ανακλάσεων με δείκτες hkl και -h-k-l (ζεύγη του Friedel) έχουν ίδιο πλάτος και αντίθετες φάσεις. Παρουσία ανώμαλης σκέδασης, τα ζεύγη αυτά χαρακτηρίζονται ως ζεύγη Bijvoet και οι διαφορές των πλατών τους ανώμαλες διαφορές ή διαφορές Bijvoet.

Η ισχύς σκέδασης ενός ατόμου σε σχέση με τη σκέδαση ενός ηλεκτρονίου δίνεται από τον ατομικό παράγοντα σκέδασης που συμβολίζεται με f. Ο ατομικός παράγοντας σκέδασης έχει μια ομαλή συνιστώσα (f^o) που οφείλεται στην ομαλή σκέδαση και εξαρτάται από τη γωνία σκέδασης και μια ανώμαλη συνιστώσα (f^Δ) που οφείλεται στην ανώμαλη σκέδαση και εξαρτάται από το μήκος κύματος. Η ανώμαλη συνιστώσα του ατομικού παράγοντα σκέδασης έχει ένα πραγματικό μέρος (f΄) δηλαδή μια συνιστώσα που έχει συνήθως αντίθετη φάση (-180º) από τον ομαλό παράγοντα και ένα φανταστικό μέρος (f΄΄) δηλαδή μια συνιστώσα 90º εκτός φάσης.

$$f=f^o(\theta) + f^\Delta(\lambda)=f^o(\theta) + f'(\lambda) + if''(\lambda) \qquad (1)$$

Όταν το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι πολύ διαφορετικό από το μέγιστο απορρόφησης του ατόμου τότε το φαινόμενο της ανώμαλης σκέδασης δεν συνεισφέρει σημαντικά και η ανώμαλη συνιστώσα f^Δ είναι αμελητέα.

Η τεχνική MAD βασίζεται στην ύπαρξη ενός ανώμαλου σκεδαστή στον κρύσταλλο και σε διαδοχικές μετρήσεις δεδομένων περίθλασης σε πολλαπλά μήκη κύματος. Η τεχνική εκμεταλλεύεται την ανώμαλη σκέδαση για τον προσδιορισμό των φάσεων με δύο τρόπους. Αφενός, χρησιμοποιεί τις διαφορές στα πλάτη μεταξύ των ζευγών του Bijvoet (ανώμαλες διαφορές) μέσα στην ίδια σειρά δεδομένων. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον παράγοντα f΄΄. Αφετέρου, χρησιμοποιεί τις διαφορές πλατών της ίδιας ανάκλασης σε διαφορετικά μήκη κύματος (διαφορές διασποράς). Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον παράγοντα f΄ (Hendrickson *et al.* 1985, Hendrickson & Ogata 1997). Στοιχεία που συνήθως εισάγονται στους πρωτεϊνικούς κρυστάλλους με εμβάπτιση ή συγκρυστάλλωση και χρησιμοποιούνται ως ανώμαλοι σκεδαστές είναι ο ψευδάργυρος (Zn, Hollingsworth *et al.* 2002), υδράργυρος (Hg, Armas *et al.* 2002), γαδολίνιο (Gd, Girard *et al.* 2002), δυσπρόσιο (Dy, Purdy *et al.* 2002), ρήνιο (Re, Watson *et al.* 2001). Εντούτοις, το σελήνιο (Se) αποτελεί τον ευρύτερα διαδεδομένο ανώμαλο σκεδαστή σε τέτοιου είδους πειράματα λόγω της δυνατότητας βιολογικής εισαγωγής του στο πρωτεϊνικό μόριο με τη μορφή σεληνο-μεθειονίνης (Hendrickson *et al.* 1990).

Τα πλάτη του πραγματικού και φανταστικού μέρους της ανώμαλης σκέδασης υπολογίζονται πειραματικά για τον κάθε κρύσταλλο. Αρχικά, καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης μ(Ε) του κρυστάλλου, σε μια περιοχή ενεργειών γύρω από το μέγιστο απορρόφησης του ανώμαλου σκεδαστή. Ο f΄΄ είναι απευθείας ανάλογος του μ(Ε) ενώ ο f΄ υπολογίζεται από τον f΄΄ με την εξίσωση Kramers-Kronig (Hendrickson *et al.* 1985, Hendrickson & Ogata 1997). Ένα πείραμα MAD περιλαμβάνει μετρήσεις σε τρία τουλάχιστον μήκη κύματος που επιλέγονται έτσι ώστε να μεγιστοποιούνται οι ανώμαλες διαφορές και οι διαφορές διασποράς. Συγκεκριμένα μια σειρά μετρήσεων καταγράφεται στο μήκος κύματος που μεγιστοποιείται ο παράγοντας f΄΄ και χαρακτηρίζεται ως σειρά δεδομένων στο μέγιστο (peak). Σε αυτά τα δεδομένα μεγιστοποιούνται οι ανώμαλες διαφορές. Μια ακόμα σειρά δεδομένων καταγράφεται στο μήκος κύματος που μεγιστοποιείται ο παράγοντας f΄ και χαρακτηρίζεται ως σειρά δεδομένων στο σημείο μέγιστης κλίσης (inflection). Τέλος πραγματοποιείται και ένα πείραμα σε ένα μήκος κύματος μακρυά από τα μέγιστα και αυτά τα δεδομένα χαρακτηρίζονται ως απομακρυσμένα (remote). Οι διαφορές διασποράς μεγιστοποιούνται μεταξύ της σειράς δεδομένων στο σημείο μέγιστης κλίσης και των απομακρυσμένων δεδομένων.

5.2 Προσπάθειες δημιουργίας παράγωγων κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C με βαριά μέταλλα

Συνήθως η διείσδυση ατόμων μετάλλου καταστρέφει τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο προκαλώντας ραγίσματα, κυρτώσεις ή και πλήρη διάλυση του κρυστάλλου. Συχνά η πρόσδεση είναι μη ειδική και γίνεται σε τυχαίες θέσεις καταστρέφοντας την περιοδικότητα του πλέγματος ενώ σε άλλες περιπτώσεις συνοδεύεται από αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος της στοιχειώδους κυψελίδας (ανισομορφισμός). Οι αναμενόμενες δυσκολίες στη δημιουργία ισόμορφων παράγωγων κρυστάλλων βαρέων μετάλλων σε συνδυασμό με την υψηλή συχνότητα εμφάνισης προβληματικής περίθλασης από τους κρυστάλλους της $HrcQ_B$-C μείωσαν σημαντικά τις πιθανότητες προσδιορισμού των φάσεων με την τεχνική MIR. Πράγματι, η διερεύνηση που περιγράφεται στη συνέχεια δεν κατέληξε στην εύρεση χρήσιμων παραγώγων βαρέων μετάλλων.

Η παραγώγηση επιχειρήθηκε με τις τεχνικές της εμβάπτισης και της συγκρυστάλλωσης.

Πειράματα εμβάπτισης. Η τεχνική της εμβάπτισης αναφέρεται στη μεταφορά του κρυστάλλου σε διάλυμα ένωσης βαρέως ατόμου ή στην προσθήκη της ένωσης του βαρέως

ατόμου κατευθείαν στη σταγόνα που περιέχει τον κρύσταλλο. Η συγκέντρωση του βαρέως ατόμου και ο χρόνος εμβάπτισης προσδιορίζονται εμπειρικά για την κάθε περίπτωση. Η αρχική αξιολόγηση της πορείας παραγώγισης βασίστηκε σε χρωματικές αλλαγές του κρυστάλλου ή/και σε μακροσκοπικές αλλαγές στις επιφάνειες του όπως εμφάνιση ραγισμάτων και κυρτώσεων. Η συγκέντρωση των ενώσεων των βαρέων ατόμων που χρησιμοποιήθηκε αρχικά ήταν στα επίπεδα κορεσμού. Στη συνέχεια οι ενώσεις που απορροφήθηκαν από τους κρυστάλλους μελετήθηκαν πιο συστηματικά (πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1 Πειράματα εμβάπτισης φυσικών κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C σε διαλύματα βαρέων μετάλλων.

Βαρύ άτομο (Z)	**Ένωση**	**Χρόνος εμβάπτισης /συγκέντρωση**	**Επίδραση στους κρυστάλλους / σχόλια**
Co (27)	$Co(SCN)_2$ (έγχρωμη)	72 h	Δε βάφτηκαν
Mo (42)	$Mo(NNMePh_3)(S_2CNMe_2)_2$ (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	$MoO(NNMe_2)(S_2CNMe_2)_2$ (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	$(Et_4N)_2MoS_4$ (έγχρωμη)	48 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
Ru (44)	Std. Stain ruthenium red (BDH) (έγχρωμη)	21 h/ 1 mM 5 d	Έντονο ιώδες χρώμα, ευλίγιστοι/καθόλου ή λίγες ανακλάσεις μέχρι τα 10 Å Βάφτηκαν
Pd (46)	K_2PdCl_3 (έγχρωμη)	72 h	Βάφτηκαν
La (57)	$La(NO_3)_3$ x $6H_2O$	17h/5 mM 27h/10 mM	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν
Pr (59)	Pr_6O_{11} (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	$Pr(NO_3)_3$ x $5H_2O$ (έγχρωμη)	72 h	Δε βάφτηκαν
Sm (62)	$SmCl_3$	17 h/5 mM 27 h/ 10 mM	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν
	$Sm(NO_3)_3$ x 5 H_2O	17 h/5 mM 27 h/10 mM	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν
Eu (63)	$EuCl_3$	27 h/10 mM	Οπτικά ανέπαφοι
Tb (65)	Tb_4O_7 (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	$TbCl_3$	27 h/10 mM	Οπτικά ανέπαφοι
Yb (70)	$Yb_2(SO_4)_3$	27 h/10 mM	Οπτικά ανέπαφοι
Ir (77)	K_2IrCl_6 (έγχρωμη)	5 d	Δε βάφτηκαν
	$IrCl_3$ (έγχρωμη)	5 d	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	Ir(I)-chloro-2,5cyclooctadien diamino dimmer (έγχρωμη)	24 h/1 mM 24 h/6.5mM 5 d	Οπτικά ανέπαφοι/ λίγες ανακλάσεις μέχρι τα 10 Å Οπτικά ανέπαφοι αλλά ευλίγιστοι/καθόλου ή λίγες ανακλάσεις μέχρι τα 10 Å Βάφτηκαν
Pt (78)	PtCl (έγχρωμη)	48 h	Βάφτηκαν
	PtKCl (έγχρωμη)	48 h	Βάφτηκαν
	K_2PtCl_6 x $6H_2O$ (έγχρωμη)	48 h	Βάφτηκαν
	K_2PtCl_4 (έγχρωμη)	48 h	Βάφτηκαν
	K_2PtBr_6 (έγχρωμη)	48 h 5 d	Βάφτηκαν Βάφτηκαν
	K_2PtBr_4 (έγχρωμη)	48 h	Διαλύθηκαν

Βαρύ άτομο (Z)	**Ένωση**	**Χρόνος εμβάπτισης /συγκέντρωση**	**Επίδραση στους κρυστάλλους / σχόλια**
	$PtCl_2(NH_2)_2$ (έγχρωμη)	72 h 5 d	Δε βάφτηκαν Βάφτηκαν
	$PtCl(NH_3)_2$ (έγχρωμη)	24 h/1mM 23 h/6.5 mM 72 h	Οπτικά ανέπαφοι/ανακλάσεις μέχρι τα 8Å Οπτικά ανέπαφοι αλλά ευλίγιστοι/δεν περιθλούν Βάφτηκαν
	PtS_2 (έγχρωμη)	48 h	Διαλύθηκαν
	$Pt(edam)Cl_2$ (έγχρωμη)	72 h 5 d	Δε βάφτηκαν Διαλύθηκαν
	$Pt(NH_2\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH_2)_2$ (έγχρωμη)	72 h	Δε βάφτηκαν
	$(Pt_2C_2N_4I_2)NO_3$ (έγχρωμη)	48 h	Διαλύθηκαν
	Platinum (ethylenediamide) dichloride (έγχρωμη)	20 h/1 mM 72 h	Οπτικά ανέπαφοι Βάφτηκαν
	$Ph_4PtMoONNMe_2(SPh)_3$ (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
Au (79)	Gold cyanide (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	Au_2O_3 (έγχρωμη)	20 h/1 mM 72 h	Οπτικά ανέπαφοι Κυρτώθηκαν
	$KAuCl_4$ (έγχρωμη)	60 sec	Κατακρημνίστηκε ίζημα/Οπτικά ανέπαφοι
Hg (80)	$HgTl(NO_3)_2$ (έγχρωμη)	72 h	Ένωση αδιάλυτη στο μητρικό υγρό
	C_6H_5HgCl	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν Διαχωρισμός κρυστάλλων στις μαργαρίτες & ραγίσματα
	$HgCl_2$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Κυρτώθηκαν Κυρτώθηκαν
	Mercurochrome (έγχρωμη)	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Οπτικά ανέπαφοι/παραμένουν άχρωμοι Διαχωρισμός κρυστάλλων στις μαργαρίτες & ραγίσματα
	$Hg(OAc)_2$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Οπτικά ανέπαφοι Κυρτώθηκαν
	$C_{13}H_{16}HgNO_6Na$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Πρώτα σημάδια κύρτωσης/διάλυσης Κατακερματισμός/διάλυση
	$EtHgPO_4$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Οπτικά ανέπαφοι Διαχωρισμός κρυστάλλων στις μαργαρίτες & ραγίσματα
	$HgTl(NO_3)_2$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Οπτικά ανέπαφοι Διαχωρισμός κρυστάλλων στις μαργαρίτες & ραγίσματα
	$C_6H_3(OH)(NO_2)HgCl$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Διαλύθηκαν Διαλύθηκαν
	EtHgOAc	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Πρώτα σημάδια διάλυσης Διαλύθηκαν Διαλύθηκαν
	p-chloromercuriphenyl sulfonic acid	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h	Πρώτα σημάδια διάλυσης Διαλύθηκαν

Βαρύ άτομο (Z)	Ένωση	Χρόνος εμβάπτισης /συγκέντρωση	Επίδραση στους κρυστάλλους / σχόλια
		22 h	Διαλύθηκαν
	Dichloromercurinitrophenol (έγχρωμη)	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h 72 h	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν Ράγισαν Διαλύθηκαν
	$C_6H_3(MeO)(SO_2F)HgOAc$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν
	$C_6H_4(COOH)HgCl$	30-60 min 5-5$_{1/2}$ h 22 h	Οπτικά ανέπαφοι Ράγισαν Διαχωρισμός κρυστάλλων στις μαργαρίτες & ραγίσματα

Πειράματα συγκρυστάλλωσης. Η τεχνική της συγκρυστάλλωσης αναφέρεται στην εξ' αρχής προσθήκη της ένωσης του βαρέως ατόμου στη σταγόνα κρυστάλλωσης ώστε οι κρύσταλλοι να σχηματιστούν –αν η παρουσία του βαρέως ατόμου δεν αναστείλει το σχηματισμό τους- παρουσία της. Στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι ενώσεις και οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν για το σχηματισμό παράγωγων κρυστάλλων με την τεχνική της συγκρυστάλλωσης.

Πίνακας 5.2 Πειράματα συγκρυστάλλωσης της $HrcQ_B$-C με ενώσεις βαρέων ατόμων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης Mg^{2+} στη σταγόνα κρυστάλλωσης*. *Αρχικές συνθήκες σταγόνας*: 3.75 mg/ml πρωτεΐνη, 7.5% MPD, 40 mM $Mg(OAc)_2$, 50 mM bis-tris pH 6.4, ένωση βαρέως ατόμου στη συγκέντρωση που αναφέρεται στον πίνακα. *Διάλυμα δεξαμενής*: 15% MPD, 80 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM bis-tris pH 6.4. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 7.5 mg/ml πρωτεΐνη σε 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl.

Ένωση βαρέως ατόμου	Αρχική συγκέντρωση ένωσης βαρέως ατόμου στη σταγόνα (mM)	Αποτελέσματα
$La(NO_3)_3$x $6H_2O$	0.05	Σφαιρουλίτες
	0.1	Μεγάλοι σφαιρουλίτες
	0.2	Πολλοί, μικροί σφαιρουλίτες
	0.4	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.5	Κρυσταλλικό ίζημα
	1	Μικρές μαργαρίτες & πλάκες
	1.5	Διαυγής
	2	Μικροί βελονοειδείς κρύσταλλοι & ίζημα
$Pr(NO_3)_3$ x $5H_2O$	0.05	Σφαιρουλίτες
	0.1	Σφαιρουλίτες
	0.2	Σφαιρουλίτες

Ένωση βαρέως ατόμου	Αρχική συγκέντρωση ένωσης βαρέως ατόμου στη σταγόνα (mM)	Αποτελέσματα
	0.4	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.5	Πολλές, μικρές μαργαρίτες
	1	Μαργαρίτες & μικρές πλάκες
	1.5	Μαργαρίτες & σταγόνες ελαίου
	2	Διαυγής
	5	Ίζημα
	10	Ίζημα
$SmCl_3$	0.05	Σφαιρουλίτες
	0.1	Σφαιρουλίτες
	0.2	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.4	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.5	Κρυσταλλικό ίζημα
	1	Πολλές, μικρές μαργαρίτες
	1.5	Λίγο ίζημα
	2	Λίγες μικρές μαργαρίτες & πλάκες
$Sm(NO_3)_3x5H_2O$	0.05	Κρυσταλλικό ίζημα & σφαιρουλίτες
	0.1	Κρυσταλλικό ίζημα & μεγάλοι σφαιρουλίτες
	0.2	Πολλοι σφαιρουλίτες
	0.4	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.5	Μικρές μαργαρίτες
	1	Λίγες, μικρές μαργαρίτες
	1.5	Σταγόνες ελαίου
	2	Λίγο ίζημα
	5	Ίζημα
	10	Ίζημα
$EuCl_3$	0.05	Σφαιρουλίτες
	0.1	Μεγάλοι σφαιρουλίτες
	0.2	Πολλοί, μικροί σφαιρουλίτες
	0.4	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.5	Κρυσταλλικό ίζημα
	1	Μικρές μαργαρίτες
	1.5	Μαργαρίτες
	2	Λίγες μαργαρίτες & ίζημα
$TbCl_3$	0.05	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.1	Σφαιρουλίτες
	0.2	Κρυσταλλικό ίζημα
	0.4	Μικρές μαργαρίτες & ίζημα
	0.5	Σταγόνες ελαίου
	1	Ίζημα
	1.5	Ίζημα
	2	Λίγο ίζημα
	5	Ίζημα
	10	Ίζημα
$DyCl_3$ x $6H_2O$	0.5	Σταγόνες ελαίου
	1	Σταγόνες ελαίου
	1.5	Ίζημα
	2	Ίζημα
$Yb_2(SO_4)_3$	0.5	Ίζημα
	1	Ίζημα
	1.5	Ίζημα
	2	Πολύ ίζημα
	5	Πολύ ίζημα
	10	Πολύ ίζημα

*Ανάλογα πειράματα που έγιναν με χαμηλές συγκεντρώσεις (3-15 mM) Mg^{2+} στη σταγόνα κρυστάλλωσης κατέληξαν σε ίζηματα ή διαυγείς σταγόνες. Στις διαυγείς σταγόνες δεν σχηματίστηκε ίζημα ή κρύσταλλοι ούτε μετά την προσθήκη κρυσταλλικών πυρήνων με την τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης.

Με έναυσμα τα αποτελέσματα των πειραμάτων που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2 ορισμένες συνθήκες διερευνήθηκαν πιο συστηματικά όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 5.3.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα όπου η προσπάθεια συγκρυστάλλωσης της πρωτεΐνης με άτομα λανθανιδών συνοδεύτηκε από την τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης (πίνακας 5.4). Σε αυτά τα πειράματα διερευνήθηκε μια περιοχή γύρω από τις συνθήκες που όπως παρουσίαζεται στους πίνακες 5.2 και 5.3 καταλήγουν σε διαυγείς σταγόνες.

Πίνακας 5.3 Αναλυτική διερεύνηση συνθηκών με την τεχνική της συγκρυστάλλωσης για τη δημιουργία παράγωγων κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C με λανθανίδες. Η στήλη 'MPD' αναφέρεται στη συγκεντρώση του συστατικού στη δεξαμενή. Η στήλη 'συγκέντρωση βαρέως ατόμου' αναφέρεται στην αρχική συγκέντρωση της ένωσης του βαρέως ατόμου στη σταγόνα κρυστάλλωσης. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτά ήταν 7.5 mg/ml πρωτεΐνη σε 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl. Το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή ήταν 100 mM bis-tris.

Ένωση βαρέως ατόμου	**Σταγόνα**	**Δεξαμενή**		**Αποτελέσματα**
	Συγκέντρωση βαρέως ατόμου (mM)	**MPD (v/v)**	**pH**	
$La(NO_3)_3$ x $6H_2O$	0.5	12%	6.4	Μαργαρίτες & σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Λίγες, μικρές μαργαρίτες
		15%	6.5	Μαργαρίτες & σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σφαιρουλίτες
		15%	6.5	Μαργαρίτες & σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1.5	12%	6.4	Διαυγής
		14%	6.4	Διαυγής
		15%	6.5	Διαυγής
		15%	6.6	Διαυγής
$Pr(NO_3)_3$ x $5H_2O$	0.5	12%	6.4	Μικρές μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		14%	6.4	Μικρές μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		15%	6.5	Μικρές μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		15%	6.6	Μικρές μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
	1	12%	6.4	Μεγάλες μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		14%	6.4	Μεγάλες μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		15%	6.5	Μεγάλες μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου

Ένωση βαρέως ατόμου	Σταγόνα	Δεξαμενή		Αποτελέσματα
	Συγκέντρωση βαρέως ατόμου (mM)	MPD (v/v)	pH	
	1.5	12%	6.4	Διαυγής
		14%	6.4	Διαυγής
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
$Sm(NO_3)_3 \times 5H_2O$	0.5	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1.5	12%	6.4	Διαυγής
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
$SmCl_3$	0.5	12%	6.4	Μεγάλοι σφαιρουλίτες
		14%	6.4	Μικροί σφαιρουλίτες
		15%	6.5	Σφαιρουλίτες
		15%	6.6	Μεγάλοι σφαιρουλίτες
	1	12%	6.4	Μικροί σφαιρουλίτες
		14%	6.4	Μικρές μαργαρίτες & ίζημα
		15%	6.5	Μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
		15%	6.6	Μικρές μαργαρίτες & σταγ. ελαίου
	1.5	12%	6.4	Μαργαρίτες & σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	1 μεγάλη μαργαρίτα & σταγ. ελαίου
		15%	6.5	Μαργαρίτες & ίζημα
		15%	6.6	Μαργαρίτες & ίζημα
$EuCl_3$	0.5	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου
	1.5	12%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		14%	6.4	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.5	Σταγόνες ελαίου
		15%	6.6	Σταγόνες ελαίου

Πίνακας 5.4 Πειράματα συνδυασμού συγκρυστάλλωσης/μικρο-ενπυρήνωσης. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα αυτά ήταν 20-30 mg/ml πρωτεΐνη σε 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1mM DTT. Το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή ήταν 100 mM bis-tris.

Ένωση βαρέως ατόμου	Σταγόνα	Δεξαμενή			Αποτελέσματα
	Αρχική συγκέντρωση βαρέως ατόμου (mM)	MPD (v/v)	$Mg(OAc)_2$ (mM)	pH	
$Pr(NO_3)_3 \times 5H_2O$	1.5	9%	70	6.5	†Κρύσταλλοι σχήματος πλάκας
		10%	80	6.4	Σφαιρουλίτες & κρυστ. ίζημα
		11%	80	6.4	Σφαιρουλίτες
		12%	80	6.4	Σφαιρουλίτες
		13%	80	6.4	Σφαιρουλίτες
	2	9%	70	6.5	Διαυγής
	2.5	8%	70	6.5	Διαυγής
$La(NO_3)_3 \times 6H_2O$	1	9%	70	6.5	Διαυγής
	1.5	8%	80	6.4	Διαυγής
		9%	70	6.5	Διαυγής
		9%	80	6.4	Διαυγής
		10%	80	6.4	Διαυγής
		11%	80	6.4	Διαυγής
		12%	80	6.4	Διαυγής
		13%	80	6.4	Σφαιρουλίτες
	2	9%	70	6.5	Διαυγής
$SmCl_3$	1	9%	70	6.5	Πολλοί, μεγάλοι σφαιρουλίτες
	1.5	9%	70	6.5	Ίζημα & μικρές μαργαρίτες
	2	9%	70	6.5	Ίζημα & μικρές μαργαρίτες

†Οι κρύσταλλοι αυτοί ήταν αρκετά μεγάλοι και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων X αλλά δεν σκέδαζαν τις ακτίνες.

Ο $Hg(OAc)_2$ λόγω του κοινού ιόντος με το $Mg(OAc)_2$ που χρησιμοποιείται στις κρυσταλλώσεις εξετάστηκε πιο συστηματικά. Συγκεκριμένα, ετοιμάστηκε διάλυμα $Hg(OAc)_2$ συγκέντρωσης 8mg/ml σε 10% v/v MPD, 70 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM bis-tris pH 6.4. Διαφορετικές ποσότητες του διαλύματος αυτού χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα συγκρυστάλλωσης αλλά ακόμη και πολύ μικρές συγκεντρώσεις οδήγησαν στην κατακρήμνιση της πρωτεΐνης.

0.5 και 1 μl κορεσμένου διαλύματος $C_6H_3(OH)(NO_2)HgCl$ χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα συγκρυστάλλωσης ολικού όγκου σταγόνας 10 μl. Σε πολλές συνθήκες μεγάλωσαν κρύσταλλοι αλλά τα διαγράμματα περίθλασης ήταν άχρηστα για συλλογή δεδομένων.

5.3 Δημιουργία παραγώγου σεληνο-μεθειονίνης της $HrcQ_B$-C

Με τους διαθέσιμους κρυστάλλους η εύρεση χρήσιμου παραγώγου βαρέως ατόμου για τον προσδιορισμό φάσεων με την τεχνική της πολλαπλής ισόμορφης αντικατάστασης ήταν ιδιαίτερα δύσκολη. Από την άλλη, η ύπαρξη μιας μεθειονίνης στο αμινοτελικό άκρο της $HrcQ_B$-C (δες την αλληλουχία της πρωτεΐνης στην εικόνα 3.1, σελίδα 41) μας έδωσε τη δυνατότητα να εισάγουμε στο πρωτεϊνικό μόριο ένα άτομο σεληνίου αντικαθιστώντας τη μεθειονίνη αυτή (H_2N–CH(COOH)–CH_2–CH_2−S−CH_3, Met) από σεληνο-μεθειονίνη (H_2N–CH(COOH)–CH_2–CH_2−Se−CH_3, SeMet) και να χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια την ανώμαλη σκέδαση αυτού του ατόμου για να προσδιορίσουμε φάσεις με την τεχνική της πολλαπλής ανώμαλης σκέδασης (δες την παράγραφο 5.1). Οι δυσκολίες ενός τέτοιου πειράματος επικεντρώνονται στη διαδικασία αντικατάστασης της μεθειονίνης από σεληνο-μεθειονίνη και στην απαίτηση χρήσης ακτινοβολίας συγχροτρονίου ώστε να καταγραφούν τα διαγράμματα περίθλασης σε τρία τουλάχιστον, διαφορετικά μήκη κύματος. Συνήθως η υποκατάσταση της μεθειονίνης από σεληνο-μεθειονίνη προκαλεί μόνο μικρές αλλαγές στη διαλυτότητα του μακρομορίου και κατά συνέπεια στις συνθήκες κρυστάλλωσης. Κατ' εξαίρεση έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκαν αλλαγές στις κρυσταλλικές επαφές και στην ομάδα χώρου (Poulsen *et al.* 2001).

Το πλεονέκτημα της τεχνικής που αποδείχτηκε καθοριστικής σημασίας για την περίπτωση της $HrcQ_B$-C, είναι ότι η εύρεση ενός μόνο καλού κρυστάλλου της παράγωγης πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό της δομής. Τέτοιου είδους πειράματα εκτελούνται σε πέντε στάδια: (i) Έκφραση της πρωτεΐνης σε συνθήκες που ευνοούν την υποκατάσταση των μεθειονινών από σεληνο-μεθειονίνη. (ii) Παραγωγή της υποκατεστημένης πρωτεΐνης σε μεγάλες ποσότητες για τη διεξαγωγή πειραμάτων κρυστάλλωσης. (iii) Απομόνωση. (iv) Κρυστάλλωση. (v) Συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ.

Υπάρχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί η υποκατάσταση των μεθειονινών μιας πρωτεΐνης από σεληνο-μεθειονίνη (Doublié 1997): (i) Στα κύτταρα μιας αυξότροφης σε μεθειονίνη κυτταρικής σειράς εισάγεται το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει με απλό μετασχηματισμό (transformation, McCarthy *et al.* 2001, Weaver *et al.* 1999). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεγαλώνουν σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με σεληνο-μεθειονίνη. (ii) Η κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει μετατρέπεται σε αυξότροφη για μεθειονίνη (met^-) με τεχνικές γενετικής τροποποίησης (transduction). (iii) Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της μεθειονίνης αναστέλλεται χωρίς γενετική τροποποίηση. Το επιθυμητό αποτέλεσμα επιτυγχάνεται

προσθέτοντας στο θρεπτικό μέσο υψηλές συγκεντρώσεις παραγόντων που δρουν ανασταλτικά στη σύνθεση της μεθειονίνης. Ως τέτοιοι παράγοντες αναφέρονται τα αμινοξέα ισολευκίνη, λυσίνη και θρεονίνη (Doublié 1997). Έτσι δεν είναι απαραίτητη η χρήση αυξότροφων κυτταρικών σειρών ούτε προεργασία σε μοριακό επίπεδο για την έκφραση της υποκατεστημένης πρωτεΐνης (van Duyne *et al.* 1993).

Στην περίπτωση της $HrcQ_B$-C ακολουθήσαμε την πρώτη πορεία. Το πλασμίδιο που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη αφού απομονώθηκε από DH5α κύτταρα, όπου ήταν αρχικά κλωνοποιημένο, χρησιμοποιήθηκε για να μετασχηματίσει εμπορικώς διαθέσιμα met^- *E. coli* κύτταρα της σειράς B834. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία του μετασχηματισμού και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στα αυξότροφα κύτταρα. Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση των κυττάρων στο ειδικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται σε τέτοια πειράματα και βελτιστοποιήθηκε η ποσότητα της προστιθέμενης σεληνο-μεθειονίνης ώστε να επιτευχθεί η πλήρης υποκατάσταση των μεθειονινών. Η SeMet-$HrcQ_B$-C παράχθηκε σε μεγάλες ποσότητες και κρυσταλλώθηκε χωρίς ουσιαστικές αποκλίσεις από τις συνθήκες απομόνωσης και κρυστάλλωσης της φυσικής πρωτεΐνης. Η πορεία που ακολουθήσαμε περιγράφεται αναλυτικά στα επόμενα.

5.3.1 Κλωνοποίηση της $HrcQ_B$-C σε met^- κύτταρα

Απομόνωση του πλασμιδίου pPROEX HTa που φέρει το γονίδιο της $HrcQ_B$-C. Το πλασμίδιο pPROEX HTa στο οποίο είναι κλωνοποιημένη η $HrcQ_B$-C απομονώθηκε από DH5α κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την υπερέκφραση της. Η απομόνωση του πλασμιδίου έγινε με ένα QIAGEN-tip 100 ακολουθώντας την πορεία που προτείνει η εταιρεία. Το πλασμίδιο αποθηκεύτηκε στους -20 ºC.

Δημιουργία επιδεκτικών (competent) B834 κυττάρων. Εμπορικώς διαθέσιμα B834 κύτταρα, χωρίς καμιά ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό απλώθηκαν γραμμωτά (streaking) σε τριβλίο στρωμένο με LB και άγαρ. Το τριβλίο τοποθετήθηκε σε θάλαμο των 37 ºC για ~24 ώρες. Δέκα από τις αποικίες που μεγάλωσαν μεταφέρθηκαν από το τριβλίο σε μία κωνική φιάλη που περιείχε 50 ml αποστειρωμένου διαλύματος 2% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.05% w/v NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ (SOB) και αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε επωαστήρα συνεχούς ανάδευσης στους 37 ºC. Όταν έφτασε η OD_{600} ~0.6 τα κύτταρα μεταφέρθηκαν για 30 min στον πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε κρύο, αποστειρωμένο διάλυμα 55 mM $MgCl_2$,

15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 10mM PIPES, pH 6.7 (διάλυμα μετασχηματισμού θερμοκρασίας 4 ºC, αποστειρωμένο με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm) και το αιώρημα επωάστηκε για 10 min στον πάγο. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου επαναδιαλύθηκαν σε 4 ml κρύο διάλυμα μετασχηματισμού που περιείχε επιπλέον 7% DMSO. Το αιώρημα επωάστηκε στον πάγο για 10 min και αφού μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες eppendorff σε μερίδες όγκου 400 μl ψύχτηκε ακαριαία σε υγρό άζωτο. Τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους -70 ºC.

Μετασχηματισμός B834 κυττάρων με το πλασμίδιο pPROEX HTa που φέρει το γονίδιο της $HrcQ_B$-C. Κύτταρα και πλασμίδιο που ετοιμάστηκαν όπως αναφέρεται στις προηγούμενες παραγράφους, τοποθετήθηκαν στον πάγο προκειμένου να αποψυχτούν αργά. Σε 200 μl αιωρήματος επιδεκτικών κυττάρων προστέθηκαν 10 μl διαλύματος πλασμιδίου και το μίγμα επωάστηκε για 30 min στους 4 ºC. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε για 45 sec σε υδατόλουτρο των 42 ºC και αφού προστέθηκε 1 ml LB επωάστηκε για 60 min στους 37 ºC. Μετά την επώαση, απομακρύνθηκε το μεγαλύτερο μέρος του θρεπτικού μέσου και τα κύτταρα στρώθηκαν σε τέσσερα τριβλία: (Α) 100 μl δυνητικά μετασχηματισμένων κυττάρων απλώθηκαν σε τριβλίο στρωμένο με LB και 100 μg/ml αμπικιλίνη. (Β) 50 μl δυνητικά μετασχηματισμένων κυττάρων απλώθηκαν σε τριβλίο στρωμένο με LB και 100 μg/ml αμπικιλίνη. (Γ) 100 μl μη-μετασχηματισμένων, επιδεκτικών B834 κυττάρων απλώθηκαν σε τριβλίο στρωμένο με LB χωρίς αντιβιοτικό. (Δ) 100 μl μη-μετασχηματισμένων, επιδεκτικών B834 κυττάρων απλώθηκαν σε τριβλίο στρωμένο με LB και 100 μg/ml αμπικιλίνη. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν σε θάλαμο των 37 ºC. Μετά από επώαση 16 ωρών στα (Α) και (Β) μεγάλωσαν πολλές και μεγάλες αποικίες. Το (Γ), που έχει το ρόλο θετικού τυφλού καλύφτηκε πλήρως από πλήθος μικρών αποικιών επιβεβαιώνοντας τη ζωτικότητα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό. Στο (Δ), που χρησίμευσε ως αρνητικό τυφλό δεν μεγάλωσε καμία αποικία και έτσι επιβεβαιώθηκε ότι το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ενεργό και επομένως ότι οι αποικίες που μεγάλωσαν στα (Α) και (Β) είχαν την ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη που μπορούσε να τους προσδόσει η απορρόφηση του φορέα pPROEX HTa.

Ένδειξη του επιτυχούς μετασχηματισμού αποτέλεσε η υπερέκφραση προϊόντος στο αναμενόμενο για την $HrcQ_B$-C, μοριακό βάρος. Η ύπαρξη της αλληλουχίας ιστιδινών στο προϊόν αυτό έγινε με τη διαδικασία του Western blot χρησιμοποιώντας το SuperSignal® HisProbe™ Kit (Pierce, INDIA™ technology). Συγκεκριμένα, 4 αποικίες από το τριβλίο (Α) μεταφέρθηκαν σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες που καθένας περιείχε 10 ml LB και 100 μg/ml αμπικιλίνη και επωάστηκαν στους 37 ºC υπό συνεχή ανάδευση. 7 ώρες αργότερα

απομακρύνθηκαν 2 ml από κάθε καλλιέργεια και τα κύτταρα αφού φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε επαναδιαλύθηκαν σε ίσο όγκο διαλύματος 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue (διάλυμα δείγματος) και φυλάχτηκαν στους -20 ºC. Στα υπόλοιπα 8 ml κάθε καλλιέργειας προστέθηκε IPTG ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mM και η επώαση συνεχίστηκε για ακόμα 16 ώρες στους 30 ºC. Άλλα 2 ml απομακρύνθηκαν από κάθε καλλιέργεια και τα κύτταρα κατακρημνίστηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε ίσο όγκο διαλύματος δείγματος. Τα δείγματα πριν και μετά την επαγωγή αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και διαπιστώθηκε η υπερέκφραση προϊόντος στο μοριακό βάρος που αναμένεται η $HrcQ_B$-C. Επιπλέον οι πρωτεΐνες του πηκτώματος μεταφέρθηκαν και σταθεροποιήθηκαν σε μεμβράνη (Protran BA 85, cellulosenitrace) ακολουθώντας τη πορεία του Western blot. Η μεμβράνη επωάστηκε με την περοξιδάση του ραπανιού ενεργοποιημένη με Ni^{2+} (INDIA™HisProbe™-HRP), εκπλύθηκε και ενεργοποιήθηκε με υπόστρωμα της περοξιδάσης ικανό να ανιχνευτεί μέσω χημειοφωταύγειας (SuperSignal®West Pico Substrate). Διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός κυρίως προϊόντος που αλληλεπιδρά με την περοξιδάση.

5.3.2 Παραγωγή, καθαρισμός και κρυστάλλωση της SeMet-$HrcQ_B$-C

Η αύξηση των κυττάρων για την έκφραση του παραγώγου της σεληνο-μεθειονίνης μιας πρωτεΐνης γίνεται σε ειδικό θρεπτικό μέσο (SeMet-θρεπτικό μέσο) από το οποίο απουσιάζει η μεθειονίνη και τη θέση της έχει πάρει η σεληνο-μεθειονίνη. Η σεληνο-μεθειονίνη είναι τοξικός παράγοντας για τα κύτταρα και ένα ιδιαίτερα ακριβό αντιδραστήριο. Από την άλλη, υπάρχει μια ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση κάτω από την οποία η υποκατάσταση των μεθειονινών από σεληνο-μεθειονίνες δεν είναι πλήρης. Για τους λόγους αυτούς η συγκέντρωση σεληνο-μεθειονίνης στο μέσο ποικίλει και βελτιστοποιείται εμπειρικά για την κάθε περίπτωση. Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις στο εύρος 20-60 mg/lt και ο βαθμός υποκατάστασης ελέγχεται με φασματοσκοπία μάζας. Επειδή τα κύτταρα μεγαλώνουν με σχετικά αργούς ρυθμούς στο SeMet-θρεπτικό μέσο συνηθίζεται το πρώτο εμβολίασμα να είναι κύτταρα μεγαλωμένα σε μια μικρή, LB καλλιέργεια. Συνήθως, η πορεία του καθαρισμού και οι συνθήκες κρυστάλλωσης δεν αποκλίνουν σημαντικά από την πορεία που ακολουθείται για τον καθαρισμό και την κρυστάλλωση της φυσικής πρωτεΐνης (Doublié 1997). Για να αποφευχθεί η οξείδωση της σεληνο-μεθειονίνης λαμβάνονται επιπρόσθετα μέτρα τα οποία είναι: (i) τα διαλύματα απαερώνονται, (ii) προστίθενται υψηλές συγκεντρώσεις κάποιου αναγωγικού παράγοντα (DTT ή 2-mercaptoethanol) και (iii) η πορεία απομόνωσης συντομεύεται κατά το δυνατό. Η πρωτεΐνη

που περιέχει σελήνιο είναι πιο υδρόφοβη από τη φυσική επομένως λιγότερο ευδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα και γι' αυτό κρυσταλλώνει σε ελαφρώς μικρότερη συγκέντρωση κατακρημνιστή (Doublié 1997). Κάποιες φορές οι κρύσταλλοι που αποδίδει είναι μικρότεροι από τους κρυστάλλους της φυσικής πρωτεΐνης και αρκετά συχνά προκειμένου να μεγαλώσουν οι πρώτοι κρύσταλλοι της υποκατεστημένης πρωτεΐνης χρησιμοποιείται η τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης με θραύσματα κρυστάλλων της φυσικής πρωτεΐνης.

Έκφραση και απομόνωση της SeMet-HrcQ$_B$-C. Η παραγωγή της SeMet-HrcQ$_B$-C έγινε από μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pPROEX HTa κύτταρα της αυξότροφης κυτταρικής σειράς B834 μεγαλωμένα σε SeMet-θρεπτικό μέσο. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα αλάτων εμπλουτισμένο με 17 αμινοξέα και γλυκόζη για πηγή υδατανθράκων (πίνακας 5.2). Περιείχε επιπλέον τα ιχνοστοιχεία Mo, Co, Cu, Mn, Zn. Λίγο πριν τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου με τα κύτταρα προστίθεται επίσης διάλυμα βιταμινών 1% v/v (vitamin solution, SIGMA), καρμπενισιλίνη 100 μg/ml και το διάλυμα της σεληνο-μεθειονίνης. Λεπτομέρειες για τη σύσταση και την παρασκευή του θρεπτικού μέσου αναφέρονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2 Σύσταση και παρασκευή του SeMet-θρεπτικού μέσου. Αρχικά ζυγίζονται και αναμιγνύονται τα αμινοξέα με τα άλατα και στο μίγμα προστίθενται 500 ml νερό. Για τη διάλυση των αμινοξέων το μίγμα θερμαίνεται για 20 min στους 120 ºC και στη συνέχεια αραιώνεται μέχρι τα 2 lt. 200 ml από το διάλυμα αυτό αραιώνονται και πάλι με 300 ml νερό και το μίγμα αποστειρώνεται (θερμαίνεται ξανά για 20 min στους 120 ºC, διάλυμα Α). Τα συστατικά του διαλύματος γλυκόζης αναμιγνύονται με τα ιχνοστοιχεία και διαλύονται με 500 ml νερό. Το διάλυμα αυτό αποστειρώνεται με φίλτρο acrodisc διαμέτρου πόρου 0.22 mm (διάλυμα Β). Στα 500 ml του διαλύματος Α προστίθενται υπό στείρες συνθήκες 50 ml από το διάλυμα Β και λίγο πριν τον εμβολιασμό των κυττάρων προστίθεται επίσης το αντιβιοτικό, οι βιταμίνες και η SeMet.

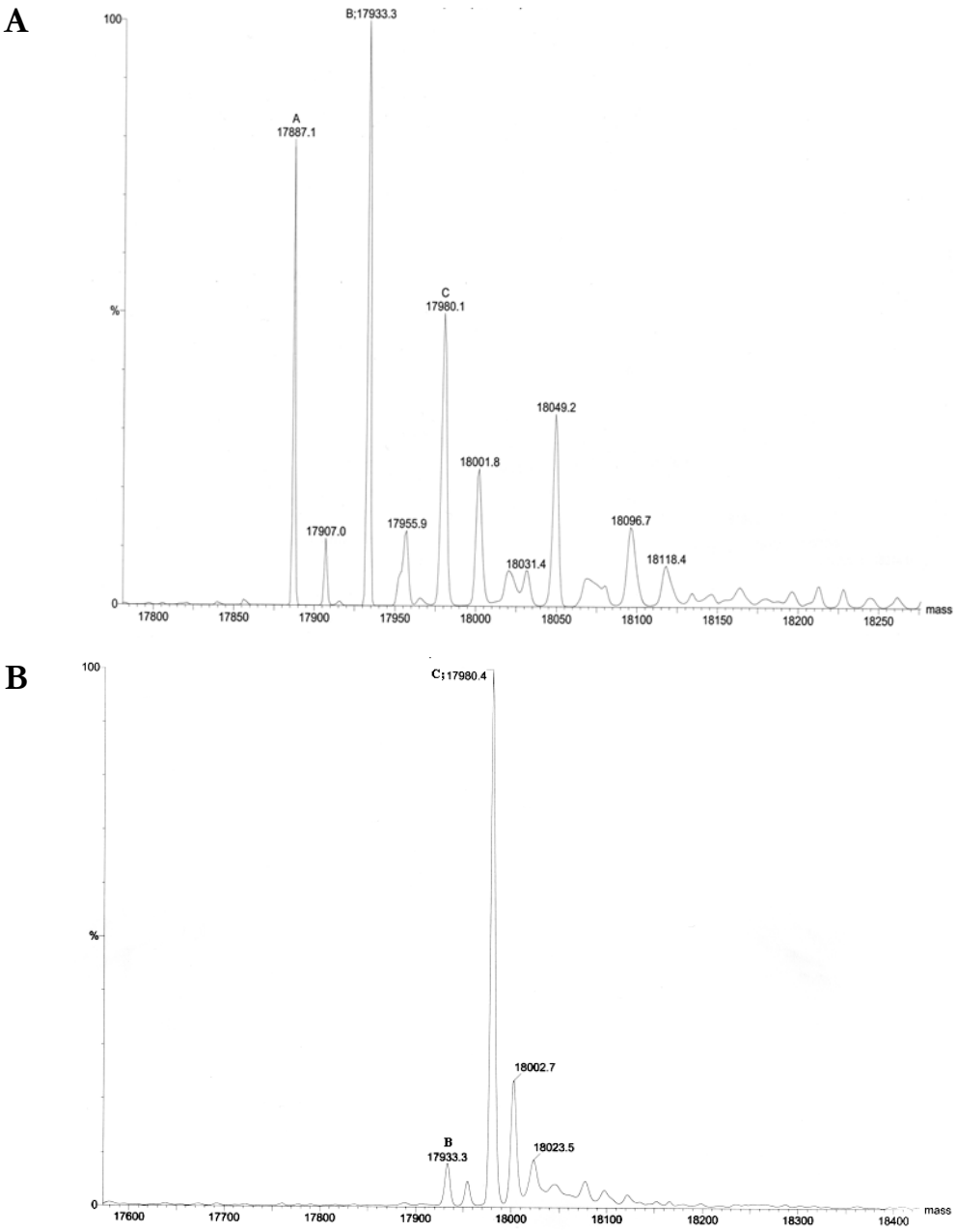
SeMet-θρεπτικό μέσο	
Άλατα/οξέα/βάσεις	**Τελική συγκέντρωση (% w/v)**
K_2HPO_4 x $3H_2O$	1.05
NaOH	0.105
NH_4Cl	0.075
Succinic acid	0.15
Na(OAc) x $3H_2O$	0.15
Αμινοξέα	**Τελική συγκέντρωση (mg/ml)**

SeMet-θρεπτικό μέσο	
Αλανίνη	0.5
Υδροχλωρική αργινίνη	0.8
Ασπαρτικό οξύ	0.4
Κυστίνη	0.03
Γλουταμικό οξύ	0.7
Γλουταμίνη	0.3
Γλυκίνη	0.5
Ιστιδίνη	0.06
Ισολευκίνη	0.2
Λευκίνη	0.2
Λυσίνη	0.4
Φαινυλαλανίνη	0.1
Προλίνη	0.1
Σερίνη	2
Θρεονίνη	0.2
Τυροσίνη	0.2
Βαλίνη	0.2
Διάλυμα γλυκόζης	**Τελική συγκέντρωση (mg/ml)**
Γλυκόζη	10
$MgSO_4$ x $7H_2O$	0.2
$FeSO_4$ x $7H_2O$	0.4
Ιχνοστοιχεία	**Τελική συγκέντρωση (μg/ml)**
Na_2MoO_4 x $2H_2O$	0.17
H_3BO_3	0.247
$CoCl_2$	0.071
$CuSO_4$	0.014
$MnCl_2$	0.158
$Zn(OAc)_2$	0.029
Άλλοι παράγοντες	**Τελική συγκέντρωση**
Διάλυμα βιταμινών	1% v/v
Καρμπενισιλίνη	50 μg/ml
Σεληνο-μεθειονίνη	40 μg/ml

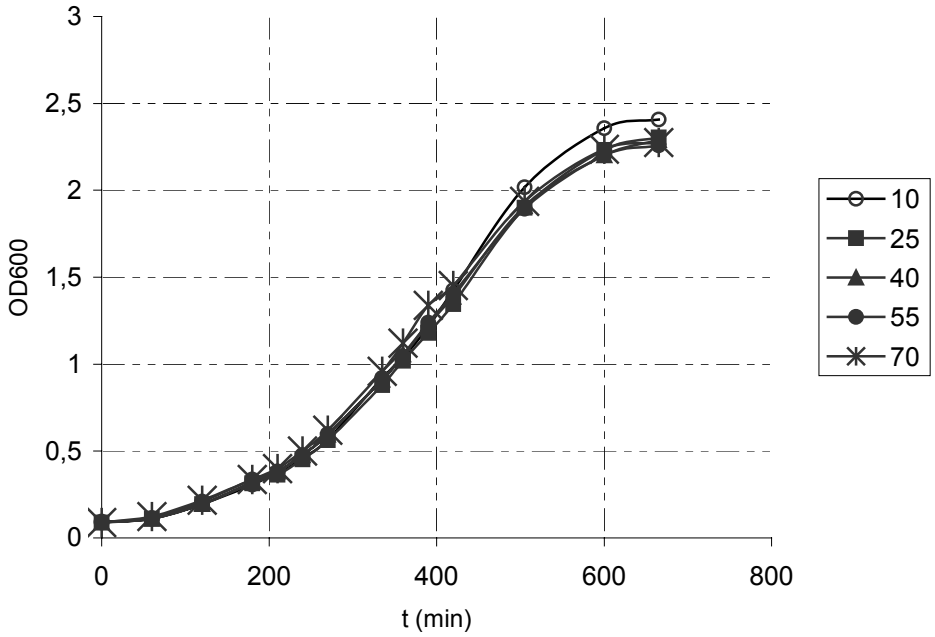
Β834 κύτταρα από 50 ml LB-καλλιέργειας μεγαλωμένη για ένα βράδυ στους 37 °C, κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση και μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου επαναδιαλύονται σε 50 ml SeMet-θρεπτικό. Μέρος του αιωρήματος προστίθεται σε 200 ml του

SeMet-θρεπτικού έτσι ώστε η αρχική OD_{600}~0.01 και τα κύτταρα αφήνονται να μεγαλώσουν εκ νέου στους 37ºC για ένα βράδυ. Η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 550 ml SeMet-θρεπτικού ώστε η αρχική OD_{600}~0.1. Τα κύτταρα μεγαλώνουν στους 30 ºC μέχρι OD_{600}~0.7-0.9 οπότε προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Η καλλιέργεια επιστρέφει στον επωαστήρα των 30 ºC για άλλες ~18 ώρες. Για να εξασφαλιστεί ο καλός αερισμός τα 550 ml καλλιέργειας μεγαλώνουν σε κωνική φιάλη όγκου 2 lt υπό συνεχή και έντονη ανάδευση. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 30 min στα 6000 rpm (φυγόκεντρος Beckman, ρότορας JA-20). Η κυτταρική πάστα λύεται αμέσως ή αποθηκεύεται στους -70 ºC.

Στα αρχικά πειράματα για παραγωγή της SeMet-$HrcQ_B$-C τα κύτταρα μεγάλωσαν παρουσία 25 μg/ml σεληνο-μεθειονίνης και η υποκατάσταση των μεθειονινών δεν ήταν πλήρης. Με φασματοσκοπία μάζας (εικόνα 5.1Α) η υποκατάσταση εκτιμήθηκε στο ~50-60% και το τελικό προϊόν ταυτοποιήθηκε ως μίγμα τριών ειδών διμερών (έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 3 ότι το φυσικό μόριο είναι διμερές σε διάλυμα). Όπως κρίθηκε συγκρίνοντας τα μοριακά βάρη του φυσικού προϊόντος και των προϊόντων του πειράματος υποκατάστασης υπήρχαν διμερή στα οποία καμιά από τις μεθειονίνες δεν είχε αντικατασταθεί από σεληνο-μεθειονίνη, διμερή στα οποία είχε αντικατασταθεί η μεθειονίνη μόνο του ενός πρωτεϊνικού μορίου και διμερή που είχαν αντικατασταθεί και οι δύο μεθειονίνες (εικόνα 5.1Α). Ως πιθανή αιτία της ελλειπούς υποκατάστασης θεωρήθηκε η μικρή συγκέντρωση της σεληνο-μεθειονίνης στις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων. Λόγω της τοξικότητας του αντιδραστηρίου κρίθηκε σκόπιμο πριν την αύξηση της συγκέντρωσης του στο θρεπτικό μέσο να διερευνηθεί συστηματικά η επίδραση του στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Έτσι πέντε καλλιέργειες B834 κυττάρων μεγάλωσαν παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σεληνο-μεθειονίνης στο θρεπτικό τους και η OD_{600} μετρήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα για έντεκα ώρες από τη στιγμή του εμβολιασμού. Από το πείραμα αυτό (εικόνα 5.2) φαίνεται ότι τουλάχιστον μέχρι τη συγκέντρωση των 70 μg/ml η σεληνο-μεθειονίνη δεν επιδρά στο ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων. Έτσι σε ακόλουθα πειράματα η συγκέντρωση της αυξήθηκε στα 40 μg/ml και όπως δείχθηκε με φασματοσκοπία μάζας (εικόνα 5.1Β) η υποκατάσταση έφτασε μέχρι 95%.



Εικόνα 5.1 Φασματοσκοπία μάζας της πρωτεΐνης SeMet-HrcQ$_B$-C που παρήχθει χρησιμοποιώντας σεληνο-μεθειονίνη σε συγκεντρώσεις 25 μg/ml (A) και 40 μg/ml (B). Όπως έχει αναφερθεί η φυσική HrcQ$_B$-C είναι διμερές σε διάλυμα με MB 17887 Da. Κατά την παραγωγή της SeMet-HrcQ$_B$-C αναγνωρίζουμε τρία είδη μορίων: Διμερή στα οποία καμία από τις μεθειονίνες δεν έχει αντικατασταθεί από σεληνο-μεθειονίνη (κορυφή A, MW=17887), διμερή στα οποία έχει αντικατασταθεί μόνο μία από τις δύο μεθειονίνες (κορυφή B, MW=17933) και διμερή στα οποία έχουν υποκατασταθεί και οι δύο μεθειονίνες (κορυφή C, MW=17980). Οι υπόλοιπες κορυφές στα φάσματα (εκτός των A, B και C) αποδίδονται σε πρωτεϊνικά μόρια που έχουν δεσμεύσει ένα ή περισσότερα ιόντα Na από το διαλύτη (AB_{Na}=23).

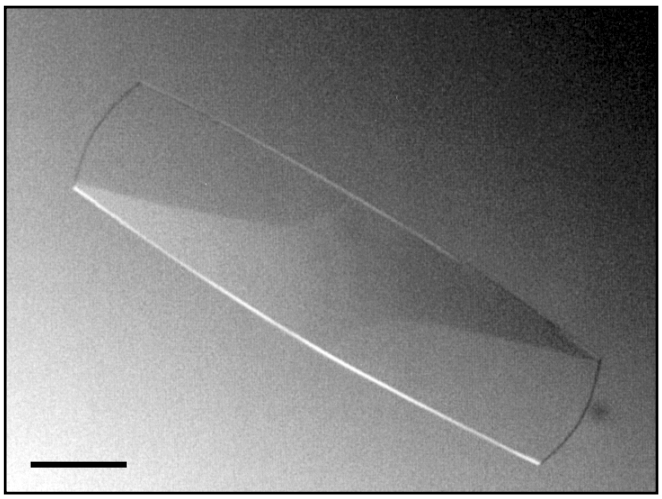


Εικόνα 5.2 Πέντε καλλιέργειες B834 κυττάρων μεγάλωσαν σε SeMet-θρεπτικό μέσο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων σεληνο-μεθειονίνης: 10, 25, 40, 55 και 70 μg/ml. Η OD_{600} μετρήθηκε σε τακτά χρονικά διαστήματα και σχεδιάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης που φαίνονται στο σχήμα. Η αυξανόμενη συγκέντρωση της σεληνο-μεθειονίνης δε φαίνεται να επηρεάζει ή να αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων τουλάχιστον μέχρι τη συγκέντρωση των 70 μg/ml που ελέγχθηκε.

Για την απομόνωση του παραγώγου της σεληνο-μεθειονίνης υιοθετήθηκε το σχήμα που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 για τη φυσική πρωτεΐνη με τις εξής αλλαγές: (i) το υλικό Ni-NTA agarose αντικαταστάθηκε από το Ni-NTA superflow το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διπλάσιες ταχύτητες ροής από το πρώτο με αποτέλεσμα τη μείωση του απαιτούμενου χρόνου για τον καθαρισμό. (ii) Για την αποφυγή της οξείδωσης του σεληνίου προστίθεται DTT -τελική συγκέντρωση 10 mM- σε όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται στον καθαρισμό, από τη λύση των κυττάρων μέχρι και την αποθήκευση της καθαρής πρωτεΐνης.

Κρυστάλλωση. Πειράματα κρυστάλλωσης σε συνθήκες γύρω από την περιοχή όπου μεγαλώνουν κρύσταλλοι της φυσικής πρωτεΐνης απέδωσαν μικρούς και κακοσχηματισμένους κρυστάλλους. Η μορφολογία των κρυστάλλων βελτιώθηκε με την τεχνική της μικρο-

ενπυρήνωσης (micro-seeding). Αρχικά η σταγόνα εξισορροπείται για τρεις έως είκοσι-τέσσερις ώρες πάνω από το διάλυμα της δεξαμενής που είναι 5-10% MPD, 70 mM $Mg(OAc)_2$, 100 mM bis-tris pH 6.4-6.7. Στη συνέχεια προστίθενται οι πυρήνες σε κάθε σταγόνα. Στα περισσότερα από αυτά τα πειράματα σχηματίστηκαν κρύσταλλοι σχήματος λεπτής πλάκας (εικόνα 5.3) τυπικών διαστάσεων 0.1 x 0.3 x 0.01 mm^3 ενώ οι μεγαλύτεροι από αυτούς έφτασαν μέχρι 0.2 x 0.6 x 0.02 mm^3.



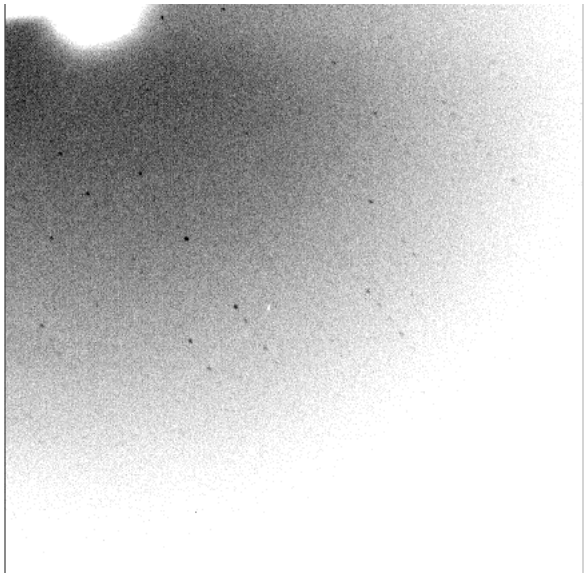
Εικόνα 5.3 Η χαρακτηριστική μορφολογία λεπτής πλάκας των κρυστάλλων της SeMet-$HrcQ_B$-C που σχηματίζονται με τη τεχνική της μικρο-ενπυρήνωσης. Ο συγκεκριμένος κρύσταλλος ήταν από τους μεγαλύτερους με διαστάσεις 0.15 x 0.6 x 0.015 mm^3. Η κλίμακα που εμφανίζεται κάτω αριστερά στη φωτογραφία αντιστοιχεί σε μήκος ίσο με 0.1 mm.

5.3.3 Συλλογή δεδομένων περίθλασης

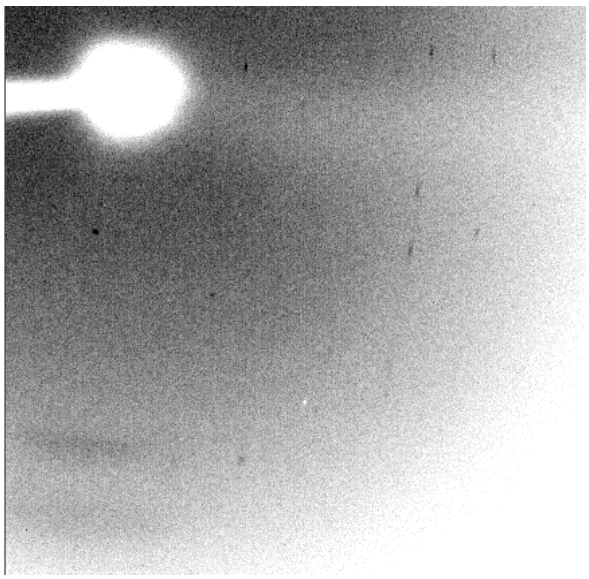
Η πλειονότητα των κρυστάλλων της SeMet-$HrcQ_B$-C παρουσιάζει το τυπικό χαρακτηριστικό των κρυστάλλων της φυσικής πρωτεΐνης δηλαδή καλή περίθλαση όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία είναι κάθετη στη μεγάλη επιφάνεια του κρυστάλλου αλλά διαχεόμενες ή/και διπλές ανακλάσεις όταν είναι παράλληλη (με τη μεγάλη του επιφάνεια). Δυο

εικόνες από ένα τυπικό διάγραμμα περίθλασης της SeMet-HrcQ$_B$-C παρουσιάζονται στην εικόνα 5.4.

A



B



Εικόνα 5.4 Διάγραμμα περίθλασης από κρύσταλλο της SeMet-HrcQ$_B$-C. Παρουσιάζονται δυο εικόνες, όταν **(A)** η μεγάλη επιφάνεια του κρυστάλλου είναι κάθετη στη δέσμη των ακτίνων Χ, **(B)** η μεγάλη επιφάνεια είναι παράλληλη στη δέσμη των ακτίνων. Το τυπικό χαρακτηριστικό της πλειονότητας των κρυστάλλων της φυσικής HrcQ$_B$-C εμφανίζεται και στην πλειοψηφία των κρυστάλλων της παράγωγης πρωτεΐνης.

Για ένα πείραμα MAD είναι απαραίτητη η χρήση ακτινοβολίας συγχρότρου όπου ο χρόνος για τη συλλογή δεδομένων είναι περιορισμένος και αυστηρά προκαθορισμένος. Δεδομένου του μικρού ποσοστού χρήσιμων κρυστάλλων της SeMet-HrcQ$_B$-C και προκειμένου να αυξήσουμε τις πιθανότητες επιτυχίας ενός τέτοιου πειράματος εξετάσαμε προκαταρκτικά την περίθλαση χρησιμοποιώντας μια εργαστηριακή πηγή ακτίνων X (Πανεπιστήμιο του Leeds και Astbury Centre for Structural Molecular Biology). Όσοι από τους κρυστάλλους περιθλούσαν καλά αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο και μεταφέρθηκαν στο συγχροτρόνιο. Στα πλαίσια αυτής της έρευνας, περίπου 6 mg καθαρής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κρυστάλλωσης και η περίθλαση από 121 κρυστάλλους εξετάστηκε προκαταρκτικά. Σε κάθε περίπτωση καταγράφηκαν τουλάχιστον δύο εικόνες με διαφορά 90º μεταξύ τους. Βρέθηκαν 16 κρύσταλλοι με καλό διάγραμμα περίθλασης και στις δύο διευθύνσεις και διακριτική ικανότητα από 4 έως 3 Å. Αποθηκεύτηκαν σε υγρό άζωτο και ένας από αυτούς χρησιμοποιήθηκε για συλλογή δεδομένων περίθλασης σε ένα πείραμα MAD στο ESRF.

Μια πλήρης σειρά δεδομένων περίθλασης καταγράφηκε από έναν κρύσταλλο σε τρία μήκη κύματος μέχρι τη διακριτική ικανότητα των 2.3 Å. Ο κρύσταλλος τοποθετήθηκε στην γωνιομετρική κεφαλή, ευθυγραμμίστηκε με την προσπίπτουσα δέσμη και καταγράφηκαν δυο εικόνες περίθλασης -κάθετα και παράλληλα στην μεγάλη του επιφάνεια- που επιβεβαίωσαν το καλό πακετάρισμα των μορίων. Καταγράφηκε το φάσμα φθορισμού του κρυστάλλου (EXAFS) και υπολογίστηκε η γραφική παράσταση των f΄ και f΄΄ ως συνάρτηση της ενέργειας (εικόνα 5.5). Με βάση την εικόνα 5.5 επιλέχτηκαν τα μήκη κύματος στα οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα. Έτσι, μια σειρά δεδομένων συλλέχτηκε εκεί που μεγιστοποιείται ο f΄΄ (λ=0.9799 Å) δηλαδή στο μέγιστο του φάσματος φθορισμού (peak). Η επόμενη καταγράφηκε εκεί που μεγιστοποιείται ο f΄ (λ=0.9804 Å) που αντιστοιχεί στο σημείο με την μέγιστη κλίση στο φάσμα (inflection point). Τέλος καταγράφηκε μια σειρά δεδομένων σε ένα απομακρυσμένο σημείο (λ=0.8856 Å, remote) του φάσματος.

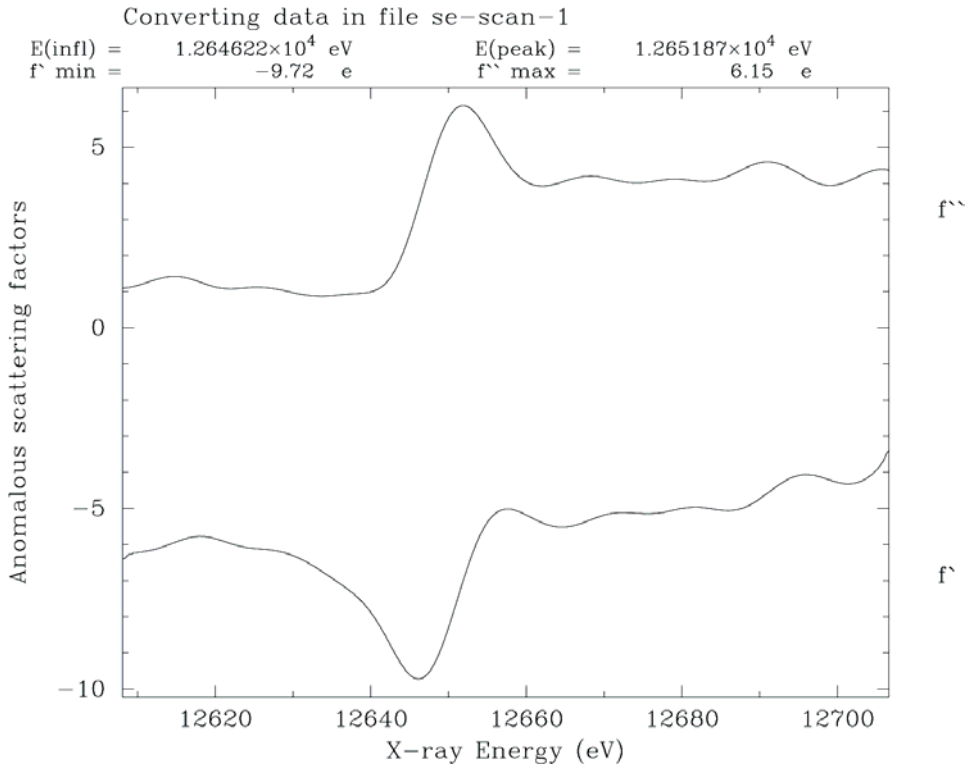
Η αναμενόμενη ισχύς του ανώμαλου σήματος και του σήματος διασποράς υπολογίζεται από τις εξισώσεις:

$$|\Delta F|_{\pm h} / |F| = (N_A/2N)^{1/2}\ 2f''/Z_{eff} \qquad (2)$$

$$|\Delta F|_{\Delta\lambda} / |F| = (N_A/2N)^{1/2}\ |^{\lambda 1}f' - {}^{\lambda 2}f'| / Z_{eff} \qquad (3)$$

όπου N_A είναι ο αριθμός των ανώμαλων σκεδαστών ανά μόριο πρωτεΐνης, N είναι ο συνολικός αριθμός ατόμων - εκτός των υδρογόνων- ανά μόριο και Z_{eff} είναι ο μέσος ατομικός αριθμός που για τις πρωτεΐνες λαμβάνεται ίσος με 6.7. Χρησιμοποιώντας τις σχέσεις (2) και (3) και τις πληροφορίες που παρατίθονται στον πίνακα 5.3 για το μόριο της HrcQ$_B$-C και για τα δεδομένα

που συλλέχτηκαν στο ESRF υπολογίζεται το αναμενόμενο ανώμαλο σήμα να είναι 4.5% και το αναμενόμενο σήμα διασποράς 3%. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά συνηθισμένες συγκρινόμενες με αντίστοιχες τιμές που οδήγησαν σε επιτυχή προσδιορισμό πρωτεϊνικών δομών με MAD.



Εικόνα 5.5 Οι ανώμαλοι παράγοντες σκέδασης κοντά στη K γραμμή απορρόφησης του σεληνίου από τον κρύσταλλο της $HrcQ_B$-C που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης στο σύγχροτρο του ESRF.

Πίνακας 5.3 Πληροφορίες για τον υπολογισμό της αναμενόμενης ισχύος του ανώμαλου σήματος και του σήματος διασποράς των MAD δεδομένων που συλλέχτηκαν στο ESRF. Τα σύμβολα επεξηγούνται στο κείμενο.

$HrcQ_B$-C	
Αριθμός αμινοξέων	84
N	~84x7.8=815
N_A	1
Z_{eff}	~6.7

Σειρές δεδομένων του ESRF	
λ_{peak}	f΄΄=6.15
$\lambda_{inflection}$	f΄=-9.72
λ_{remote}	f΄=-1.28

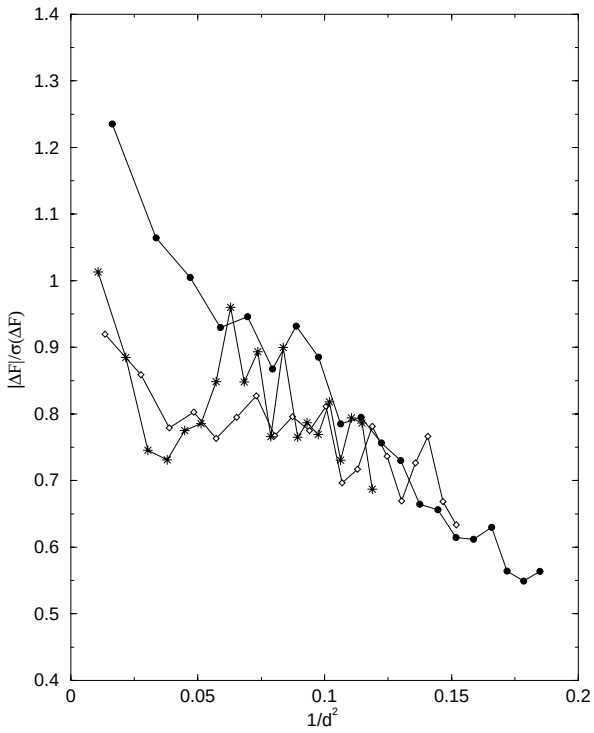
Η επεξεργασία των δεδομένων (processing και scaling) έγινε με τα προγράμματα MOSFLM και SCALA που ανήκουν στο πακέτο προγραμμάτων της CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 1994, Powell 1999). Λεπτομέρειες από τη συλλογή των δεδομένων και τα στατιστικά από την επεξεργασία τους δίνονται στον πίνακα 5.4.

Αν και η ύπαρξη σεληνίου επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας του πρωτεϊνικού διαλύματος και με το φάσμα φθορισμού του κρυστάλλου, τα δεδομένα περίθλασης δεν περιείχαν χρήσιμο ανώμαλο σήμα όπως γίνεται φανερό από την εικόνα 5.6. Οι υποθέσεις που μπορούμε να κάνουμε για να δικαιολογήσουμε την απουσία ανώμαλου σήματος είναι: (i) Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, στο οποίο βρίσκεται το σελήνιο παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα. Όπως έχουμε αναφέρει (παράγραφος 1.3.3) η ισχύς της κρυσταλλογραφίας οφείλεται στην επανάληψη του ίδιου μοτίβου. Εξαιτίας αυτής της επανάληψης η σκέδαση ενισχύεται σε ορισμένες διευθύνσεις και μπορεί να μετρηθεί. Όταν ένα μέρος του μοτίβου είναι ευκίνητο η απαίτηση της ομοιότητας δεν ικανοποιείται -αφού το ευκίνητο τμήμα μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις στα διαφορετικά μοτίβα- και τα δεδομένα που προέρχονται από αυτό το τμήμα είναι ασθενή ή απουσιάζουν εντελώς. (ii) Η ακρίβεια με την οποία μετρήθηκαν τα δεδομένα ήταν μικρότερη από το ανώμαλο σήμα ώστε δεν ήταν δυνατό να το διακρίνουμε.

Επειδή η κινητικότητα των άκρων είναι πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στις πρωτεΐνες και επειδή η βελτίωση της ποιότητας των δεδομένων δεν φαινόταν εφικτή στραφήκαμε στην προσπάθεια εισαγωγής μιας επιπλέον μεθειονίνης στο εσωτερικό του πρωτεϊνικού μορίου όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο.

Πίνακας 5.4 Πληροφορίες για το πείραμα MAD που πραγματοποιήθηκε στο ESRF. Λεπτομέρειες από τη συλλογή δεδομένων που πραγματοποιήθηκε στη γραμμή συλλογής BM14 και στατιστικά από την επεξεργασία αυτών των δεδομένων. Τα στοιχεία που δίνονται σε παρένθεση αφορούν τα δεδομένα της υψηλότερης διακριτικότητας.

Πηγή ακτίνων X (X-ray source)	BM14, ESRF, Grenoble		
Ανιχνευτής (Detector)	MAR Research CCD		
Ομάδα χώρου (Space group)	$P2_1$		
Διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας (Å, μοίρες) (Unit cell parameters)	a=53.2 b=27.8 c=99.2 β=99.2		
Σειρά δεδομένων (data set)	**peak**	**inflection**	**remote**
Μήκος κύματος (Å) (Wavelength)	0.9799	0.9804	0.8856
Διακριτικότητα (Å) (Resolution)	39-2.3	33-2.5	33-2.9
Συνολικός αριθμός ανακλάσεων (Total number of reflections)	44315	34546	23496
Αριθμός ανεξάρτητων ανακλάσεων (Number of unique reflections)	13028	9861	6957
Πολλαπλότητα (Multiplicity)	3.5 (1.8)	3.5 (3.5)	3.4 (3.4)
Πληρότητα (%) (Completeness)	98.5 (98.5)	99.5 (99.5)	98.5 (98.5)
I/σ(I)	9.7 (4.5)	9.7 (3.9)	5.8 (2.3)
Rsym	5.9 (15.9)	6.0 (18.3)	10.3 (30.5)



Εικόνα 5.6 Παρουσιάζεται η κατανομή του ανώμαλου σήματος (|ΔF|) προς την τυπική απόκλιση (σ(ΔF)) ως συνάρτηση της διακριτικότητας για τις τρεις σειρές δεδομένων που συλλέχτηκαν στο ESRF. Ο γεμάτος κύκλος (-●-) αντιστοιχεί στα δεδομένα που συλλέχτηκαν στο μέγιστο απορρόφησης, ο άδειος κύκλος (-ο-)στα δεδομένα που συλλέχτηκαν στο σημείο μέγιστης κλίσης και το αστέρι (-*-)στα δεδομένα που συλλέχτηκαν στο απομακρυσμένο σημείο. Είναι φανερό ότι το μέτρο του ανώμαλου σήματος είναι περίπου ίσο ή μικρότερο από την αβεβαιότητα των μετρήσεων.

5.4 Το μετάλλαγμα L28M της $HrcQ_B$-C. Δημιουργία παραγώγου σεληνομεθειονίνης αυτού του μεταλλάγματος

Επειδή η απουσία ανώμαλου σήματος στα δεδομένα που συλλέχτηκαν στο ESRF είναι πιθανό να οφείλεται στην υψηλή κινητικότητα του άκρου στο οποίο βρίσκεται η μεθειονίνη δοκιμάσαμε να εισάγουμε μια μετάλλαξη μεθειονίνης στο εσωτερικό του μορίου. Όπως θα αναφερθεί λεπτομερώς στη συνέχεια, η επιλογή του αμινοξέως που μεταλλάχτηκε και η θέση της μετάλλαξης βασίστηκε στη σχετική βιβλιογραφία, σε στοιχίσεις ομόλογων με την $HrcQ_B$

πρωτεϊνών και σε προβλέψεις δευτεροταγούς δομής. Το νέο προϊόν εκφράστηκε ως παράγωγο σεληνο-μεθειονίνης σε B834 κύτταρα, απομονώθηκε και κρυσταλλώθηκε χωρίς προβλήματα. Δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ συλλέχτηκαν σε τρία μήκη κύματος στο σύγχροτρο του EMBL Hamburg Outstation (Deutsches Elektronen Synchrotron, DESY). Από αυτά τα δεδομένα προσδιορίστηκε η κρυσταλλική δομή του μορίου της $HrcQ_B$-C. Η επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων καθώς και η πορεία που οδήγησε στον προσδιορισμό της δομής περιγράφονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

5.4.1 Το μετάλλαγμα L28M της $HrcQ_B$-C

Η εισαγωγή μεθειονινών σε συντηρημένες υδρόφοβες θέσεις είναι συνηθισμένη τακτική που ακολουθείται για την ενίσχυση του ανώμαλου σήματος σε πειράματα MAD. Οι λευκίνες και οι ισολευκίνες είναι τα αμινοξέα που συνήθως επιλέγονται να μεταλλαχτούν σε μεθειονίνες αφού έχει δειχτεί ότι αυτές οι υποκαταστάσεις παρουσιάζονται με την υψηλότερη συχνότητα σε συγγενείς αλληλουχίες. Για να αποφασίσουμε ποιά λευκίνη ή ισολευκίνη της $HrcQ_B$-C θα μπορούσε να υποκατασταθεί από μεθειονίνη χωρίς να επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη δομή του μορίου λάβαμε υπόψη την αμινοξική στοίχιση της $HrcQ_B$-C με μια σειρά από ομόλογες πρωτεΐνες (εικόνα 5.7). Όπως φαίνεται, η λευκίνη 28 της $HrcQ_B$-C από την *P. syringae* ανήκει στα συντηρημένα αμινοξέα της αλληλουχίας ενώ από τις επτά φορές που μεταλλάσεται τις πέντε υποκαθίσταται από μεθειονίνη. Επιπλέον, η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής με τα προγράμματα JPRED και SSpro (Pollastri & Baldi 2002) υποδεικνύει ότι η λευκίνη 28 βρίσκεται στην αρχή μιας α-έλικας αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα να έχει μικρή κινητικότητα.

Έτσι, η λευκίνη 28 της $HrcQ_B$-C αντικαταστάθηκε από μια μεθειονίνη (το μετάλλαγμα αυτό θα αναφέρεται ως L28M). Η μεταλλαξογένεση και η κλωνοποίηση σε DH5α κύτταρα έγινε στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο του καθηγητή Ν. Πανόπουλου από την κ. Μ. Μπαστάκη. Φορέας παρέμεινε ο pPROEX HTa τον οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε για να μετασχηματίσουμε met− κύτταρα της σειράς B834. Η πορεία που ακολουθήσαμε για το μετασχηματισμό είναι ίδια με αυτήν που αναφέρεται στην παράγραφο 5.3.1.

```
CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

HrcQb-C          ---------GAMDPQDEPPALDSLALDLTLRCGELRLTLAELRRLDAGTILEVTG-ISPG 50
HrpU syr         YADSDAEHEEQSGDHHESPMLDSLELDLTLRCGDLRLTLAELRRLDAGSILEVSG-IAPG 99
HrcQb to         EAEPDDDEQEEQEEQQAPSGLDSLALDLTLRCGELRLTLAELRRLDAGTILEVGG-VAPG 103
HrcQ erw         DDALTEGSLPEYTGCEDNPQLASLPLSLEVRCDRTALTLGELQRLQAGSVVTLDN-VTPG 299
HrcQb pa         ADETNPVSLSEPLQSEDNPHIALLPLSLEVRCGRTRLTLGELQQLQLGRILTLDN-MTPG 69
RscQB fl         PHYAGEEDDEPVTDVFGHEPFDELSMALNVRCGTLNLTLGELRNLAPGAVLGIAG-YAPG 99
PscQ             LELLDMHDTPSLADGEDLHELDQLPIPVSFEVGRRTLDLHTLSTLQPGSLLDLDS-ALDG 273
YscQ yer         LEFIGMSHESDELNPEPLTDLNQLPVQVSFEVGRQILDWHTLTSLEPGSLIDLTT-PVDG 271
FliN eco         QQFGGGDVSGT---LQDIDLIMDIPVKLTVELGRTRMTIKELLRLTQGSVVALDG-LAGE 95
FliN Salty       QQLGGGDVSGA---MQDIDLIMDIPVKLTVELGRTRMTIKELLRLTQGSVVALDG-LAGE 95
FliN erw         KSLDGHDPLGA---LQDIDLILDIPVKLTVELGRTKMTIKELLRLTQGSVVALDG-LAGE 64
FliY hel         EEVKTHDASLENIEIRNISMLLDVKLNVKVRIGQKKMILKDVVSMDIGSVVELDQ-LVND 245
FliN bra         TDVGYNEDEYAARAAADLEAVFDVPVQVSAVLGRSKMDVGELLKLGPGTVLELDR-RVGE 80
BscQ             DGTRTPDPGETPAQAEATLDTDQIPVRLTFDLGEREFTLAQLRSLHPGCTFDLERPIADG 88
SctQ             EEVDQASAGLGVVTTDEPTRIGELELPVQFEIDTVSLPIDQLSALEPGYVIELPVAVTDA 272
YsaQ             EDTVPTLDEVLPEYLPSRFDVAKLTVKLTFVLGHSEILLEELAHIQPGSVYSLGA-DKDR 272
                                          : : :    .   :    :  :  *    :
```

Εικόνα 5.7 Αμινοξική στοίχιση της HrcQ$_B$-C με ομόλογες πρωτεΐνες από φυτικά και ζωικά παθογόνα και το μαστίγιο. Παρουσιάζεται μόνο τμήμα της αλληλουχίας εκατέρωθεν της Leu 28 που σημειώνεται με έντονα τυπογραφικά. Η αρίθμηση της HrcQ$_B$-C (δες εικόνα 3.1) ξεκινά από τα κατάλοιπα GAM που παραμένουν στην αλληλουχία μετά την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών. Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994). Οι αλληλουχίες που στοιχίζονται είναι οι: *P. syringae* pv. syringae HrpU (HrpU_syr; SWall accession number Q60235; 89% identity), *P. syringae* pv. tomato HrcQb (HrcQb_to; Q9F0H3; 83%), *P. syringae.* pv. fluorescence RscQ$_B$ (RscQB_fl; Q93PZ3; 47%), *E. amylovora* HrcQ (HrcQ_erw; Q46646; 50%), *Pantoea agglomerans* HrcQb (HrcQb_pa; Q47885; 50%), *E. coli* FliN (FliN_eco; P15070; 30%), *E. carotovora* FliN (FliN_erw; P35539; 30%), *Helicobacter pylori* FliY (FliY_hel; O25674; 29%), *Bradyrhizobium japonicum* FliN (FliN_bra; BAC52267; 33%), *Y. pestis* YscQ (YscQ_yer; P42713; 28%), *Y. enterocolitica* YsaQ (YsaQ; Q9KKH3; 30%), *P. aeruginosa* PscQ (PscQ; Q9I333; 30%), *P. pseudomalei* SctQ (SctQ; Q9ZGR1; 31%), and *Bordetella bronchiseptica* BscQ (BscQ; Q9L9E0; 32%).

5.4.2 Παραγωγή, καθαρισμός και κρυστάλλωση της SeMet-L28M

Η SeMet-L28M παράχθηκε, απομονώθηκε και κρυσταλλώθηκε χωρίς προβλήματα και χωρίς αποκλίσεις από την πορεία και τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την παραγωγή, απομόνωση και κρυστάλλωση της SeMet-HrcQ$_B$-C. Οι κρύσταλλοι που μεγάλωσαν από

πρωτεϊνικό διάλυμα της μετάλλαξης είχαν τη συνηθισμένη μορφολογία λεπτής πλάκας και η πλειοψηφία τους παρουσίαζε προβλήματα στο κρυσταλλικό πακετάρισμα. Ένας από αυτούς τους κρυστάλλους με καλό διάγραμμα περίθλασης χρησιμοποιήθηκε στο σύγχροτρο του DESY και τρεις σειρές δεδομένων συλλέχτηκαν σε τρία μήκη κύματος στα πλαίσια ενός πειράματος MAD. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής του μορίου όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο που ακολουθεί.

Κεφάλαιο 6

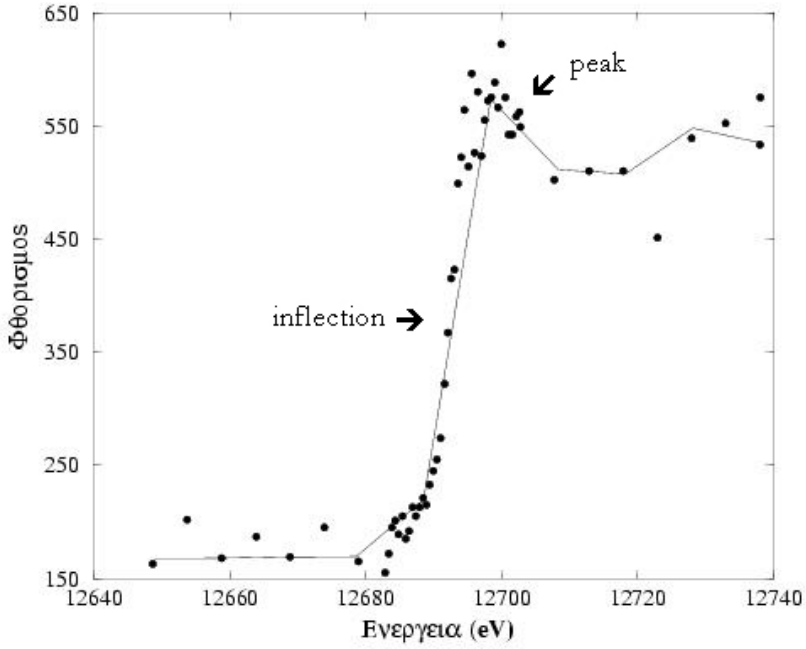
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C

Φάσεις για την κρυσταλλική δομή της $HrcQ_B$-C προσδιορίστηκαν αρχικά μέχρι τα 2.5 Å χρησιμοποιώντας τις τρεις σειρές MAD δεδομένων που συλλέχτηκαν στο σύγχροτρο του DESY από έναν κρύσταλλο της SeMet-L28M (δες παράγραφο 5.4.2). Η πληροφορία για τις φάσεις επεκτάθηκε μέχρι τα 2.3 Å χρησιμοποιώντας μια σειρά δεδομένων που συλλέχτηκε στο ESRF από κρύσταλλο της SeMet-$HrcQ_B$-C (δες παράγραφο 5.3.3). Το μεγαλύτερο μέρος του μοντέλου κατασκευάστηκε και ανακατασκευάστηκε αυτόματα. Ακολούθησαν διαδοχικοί κύκλοι βελτιστοποίησης και ανακατασκευής του με ένα πρόγραμμα μοριακών γραφικών. Η πορεία που οδήγησε από τον αρχικό υπολογισμό των φάσεων στον προσδιορισμό της δομής παρουσιάζεται αναλυτικά στις επόμενες παραγράφους αυτού του κεφαλαίου.

6.1 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περίθλασης

Συλλογή δεδομένων από κρύσταλλο της SeMet-L28M έγινε σε κρυο-συνθήκες, στη γραμμή ακτινοβολίας BW7A στο συγχροτρόνιο του DESY (τα χαρακτηριστικά της γραμμής περιγράφονται αναλυτικά στο άρθρο των Pohl *et al.* 2001). Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή MAR CCD. Συλλέχτηκαν τρεις σειρές δεδομένων σε τρία μήκη κύματος που

επιλέχτηκαν πειραματικά από το φάσμα φθορισμού του κρυστάλλου (εικόνα 6.1). Για να αυξηθεί η πιθανότητα επιτυχίας του πειράματος σε περίπτωση που η ευαισθησία του κρυστάλλου στην ακτινοβολία ή τυχόν τεχνικά προβλήματα δε θα επέτρεπαν την ολοκλήρωση της συλλογής, καταγράφηκαν αρχικά τα δεδομένα στο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (peak), μετά στο απομακρυσμένο μήκος κύματος (remote) και τέλος στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο σημείο μέγιστης κλίσης του φάσματος φθορισμού (inflection) όπως προτείνεται στη βιβλιογραφία (González *et al.* 1999, Schmidt *et al.* 2002). Λεπτομέρειες για τη συλλογή αναφέρονται στον πίνακα 6.1.



Εικόνα 6.1 Φάσμα φθορισμού στην περιοχή της K γραμμής απορρόφησης του σεληνίου. Το φάσμα μετρήθηκε από τον κρύσταλλο που χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή δεδομένων περίθλασης. Ο φθορισμός δίνεται σε αυθαίρετες μονάδες. Τα μήκη κύματος στα οποία πραγματοποιήθηκε η συλλογή σημειώνονται με βέλη. Το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στη σειρά δεδομένων remote είναι εκτός φάσματος.

Πίνακας 6.1 Λεπτομέρειες για τη συλλογή των MAD δεδομένων που συλλέχτηκαν στο σύγχροτρο του DESY.

Σειρά δεδομένων	**peak**	**remote**	**inflection**
Μήκος κύματος (Å)	0.9760	0.9221	0.9770
Απόσταση κρυστάλλου-ανιχνευτή (mm)	180	210	190
Περιστροφή ανά εικόνα (μοίρες)	0.5	0.5	0.5
Συνολικό εύρος δεδομένων (μοίρες)	253.5	272.5	242.5

Οι τιμές των f΄ και f΄΄ στα μήκη κύματος μέγιστης απορρόφησης και κλίσης υπολογίστηκαν από το πειραματικό φάσμα φθορισμού με το πρόγραμμα CHOOCH (Evans & Pettifer 2001). Για το απομακρυσμένο μήκος κύματος χρησιμοποιήθηκαν θεωρητικές τιμές (Brennan & Cowan 1992, http://www.bmsc.washington.edu, πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2 Δίνονται οι τιμές των συνιστωσών του ανώμαλου ατομικού παράγοντα σκέδασης για τα μήκη κύματος στα οποία πραγματοποιήθηκε η συλλογή δεδομένων. Οι τιμές αυτές αναφέρονται σε ηλεκτρόνια.

Μήκος κύματος (Å)	**f΄**	**f΄΄**
0.9760 (peak)	-6.8	5.0
0.9770 (inflection)	-9.9	2.8
0.9221 (remote)	-1.9	3.4

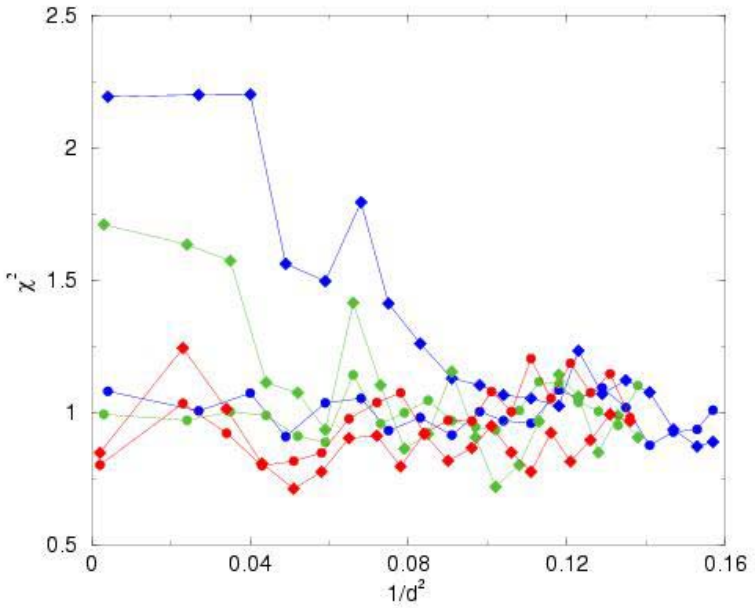
Από τις τιμές του πίνακα 6.2, τις εξισώσεις (2) και (3) της παραγράφου 5.3.3 και τις τιμές για την πρωτεΐνη: Z_{eff}=6.7, N=815 και N_A=2 υπολογίζουμε τις θεωρητικά αναμενόμενες τιμές για το ανώμαλο σήμα και το σήμα διασποράς να είναι 5% και 4% αντίστοιχα. Για N_A=1 οι τιμές αυτές γίνονται 4% και 3% αντίστοιχα.

Η επεξεργασία των δεδομένων (processing και scaling) έγινε με τα προγράμματα DENZO και SCALEPACK του πακέτου προγραμμάτων HKL (Otwinowski & Minor 1997). Τα στατιστικά από την επεξεργασία των δεδομένων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3 Στατιστικά από την επεξεργασία των MAD δεδομένων που συλλέχτηκαν στο DESY. Οι τιμές σε παρένθεση αναφέρονται στα δεδομένα της υψηλότερης διακριτικότητας.

Ομάδα χώρου	$P2_1$		
Διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας (Å, μοίρες)	a=52.9 b=27.7 c=99.05 β=99.8		
Σειρά δεδομένων	**peak**	**remote**	**inflection**
Διακριτικότητα (Å)	26-2.5 (2.54-2.50)	31-2.67 (2.72-2.67)	35-2.69 (2.74-2.69)
Μωσαϊκότητα (μοίρες)	1.5	1.4	1.5
Αριθμός ανεξάρτητων ανακλάσεων	10064	8578	8673
Πολλαπλότητα	4.9 (3.9)	5.4 (5.0)	4.2 (4.1)
Πληρότητα (%)	91.7 (51.3)	96.5 (88.2)	94.5 (84.0)
I/σ(I)	17.1 (9.5)	21.0 (9.6)	16.3 (7.3)
Rsym	8.1 (19.9)	7.6 (27.9)	7.6 (31.0)

Για την αρχική εκτίμηση της ύπαρξης ανώμαλου σήματος στα δεδομένα υπολογίστηκαν οι διαφορές των πλατών ανάμεσα στα ζεύγη Bijvoet (ανακλάσεις hkl και -h-k-l, εικόνα 6.2). Το μέγεθος χ^2 χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για τον αν οι διαφορές αυτές ήταν στατιστικά σημαντικές (χ^2 >1) ή όχι (χ^2 ~1). Από την εικόνα 6.2 φαίνεται ότι στα δεδομένα του peak υπάρχει ανώμαλο σήμα τουλάχιστον μέχρι τα 3.5 Å ($1/d^2$=0.08). Ανώμαλο σήμα φαίνεται επίσης να υπάρχει και στα δεδομένα του remote μέχρι τα ~5 Å ($1/d^2$=0.04).



Εικόνα 6.2 Αρχική εκτίμηση της ύπαρξης ανώμαλου σήματος στις τρεις σειρές δεδομένων (peak, remote, inflection) του DESY. Παρουσιάζονται οι τιμές της δοκιμής χ^2 ως συνάρτηση της διακριτικότητας για τα δεδομένα στο peak (μπλε καμπύλη), στο remote (πράσινη) και το inflection (κόκκινη), για τις περιπτώσεις που τα ζεύγη Bijvoet συγχωνεύονται (κύκλος), ή όχι (ρόμβος).

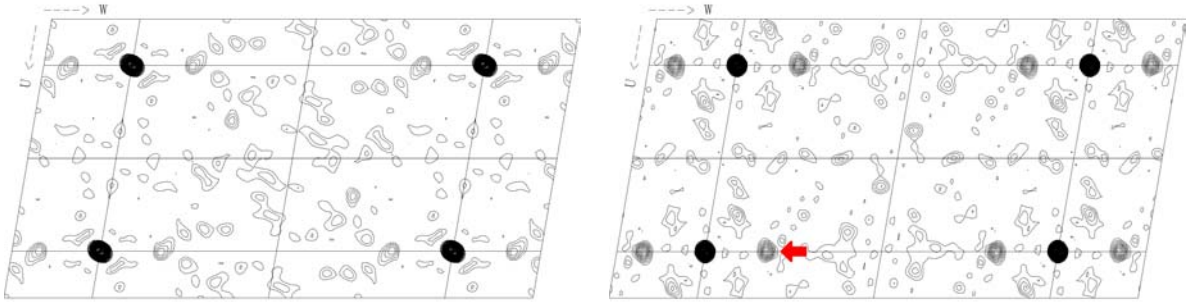
6.2 Προσδιορισμός της θέσης των σεληνίων

Με τις ανώμαλες διαφορές από τη σειρά δεδομένων στο peak και με τις διαφορές διασποράς ανάμεσα στα δεδομένα που συλλέχτηκαν στο inflection και το remote υπολογίστηκαν ο χάρτης Patterson ανώμαλων διαφορών και ο χάρτης Patterson διαφορών διασποράς αντίστοιχα. Οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα FFT από την ομάδα προγραμμάτων της CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4 1994) χρησιμοποιώντας δεδομένα στο εύρος διακριτικότητας 15-4.25 Å για το χάρτη των ανώμαλων διαφορών και 15-5 Å για το χάρτη των διαφορών διασποράς. Στην εικόνα 6.3 παρουσιάζονται αντίστοιχοι τομείς από τους δύο χάρτες. Η σύγκριση τους αποκαλύπτει τη συνεπή παρουσία ορισμένων μεγίστων πυκνότητας και στις δύο συνθέσεις. Το γεγονός αυτό ερμηνεύεται ως μία ακόμη ένδειξη της παρουσίας σήματος στα δεδομένα που εξετάζουμε.

Πράγματι, από το χάρτη Patterson των διαφορών διασποράς προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος RSPS (από το πακέτο προγραμμάτων της CCP4, Knight 2000) οι θέσεις τεσσάρων σεληνίων στην ασύμμετρη μονάδα. Οι ίδιες συντεταγμένες για τέσσερα άτομα σεληνίου προσδιορίστηκαν με τα προγράμματα Solve και SnB.

Χάρτης Patterson ανώμαλων διαφορών **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**

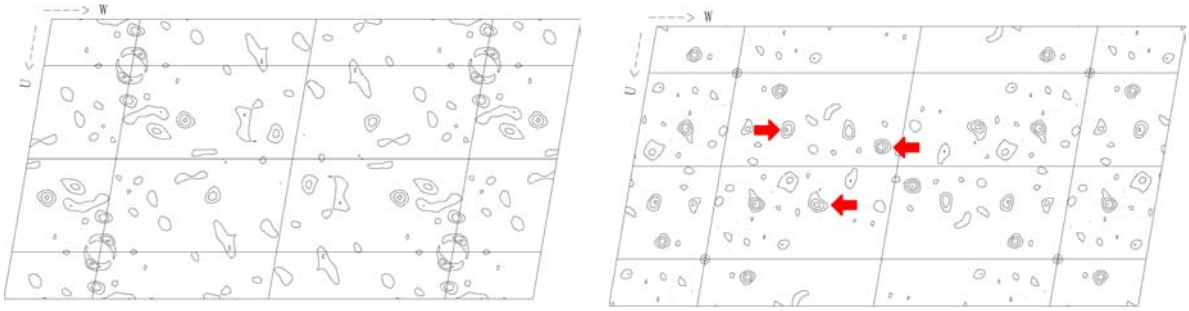
v=0



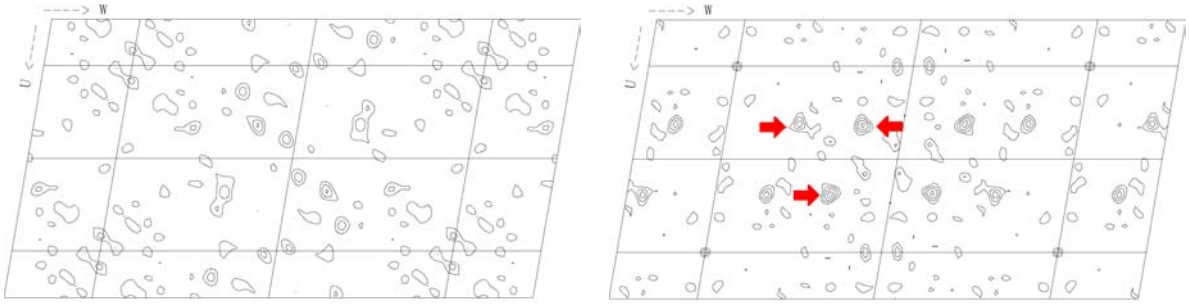
Χάρτης Patterson ανώμαλων διαφορών **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**

Εικόνα 6.3 (συνεχίζεται)

v=0.16



v=0.31

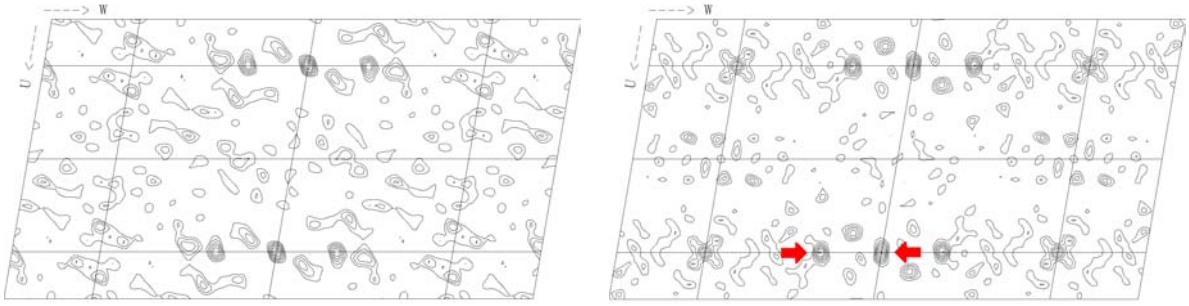


v=0.38

Εικόνα 6.3 (συνεχίζεται)

Χάρτης Patterson ανώμαλων διαφορών **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**

v=0.50



Εικόνα 6.3 Παρατίθενται για σύγκριση αντίστοιχοι τομείς από τους χάρτες Patterson των ανώμαλων διαφορών (αριστερή στήλη) και των διαφορών διασποράς (δεξιά στήλη). Οι συνθέσεις υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα FFT, η επέκταση τους κατά ¼ εκατέρωθεν της στοιχειώδους κυψελίδας έγινε με το πρόγραμμα EXTEND και η παρουσίαση/σχεδίασμα των χαρτών με το NPO. Όλα τα προγράμματα είναι από την ομάδα προγραμμάτων της CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Οι ισοϋψείς σχεδιάστηκαν με βήμα 2% του origin peak με την πρώτη στο 2%. Ο χάρτης των ανώμαλων διαφορών υπολογίστηκε για δεδομένα μεταξύ 15 και 4.25 Å αποκλείοντας μεγάλες ανώμαλες διαφορές (DANOmax=40). Ο χάρτης των διαφορών διασποράς υπολογίστηκε από τις σειρές δεδομένων remote και inflection αφού πρώτα ανάχθηκαν σε κοινή κλίμακα με το πρόγραμμα SCALEIT (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μεταξύ 15 και 4.0 Å αποκλείοντας τις μεγάλες διαφορές (DIFFmax=65). Με βέλη σημειώνονται μέγιστα που είναι κοινά και στους δύο χάρτες.

Για τον προσδιορισμό της υποδομής των ανώμαλων σκεδαστών με το πρόγραμμα Solve (Terwilliger & Berendzen 1999) επιλύονται οι συναρτήσεις Patterson των ανώμαλων διαφορών και των διαφορών διασποράς. Η αξιοπιστία των πιθανών λύσεων ελέγχεται στη συνέχεια από το πόσο καλά ικανοποιούν τέσσερα κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά είναι: (i) Ο βαθμός συμφωνίας της συνάρτησης Patterson που υπολογίζεται από την προτεινόμενη λύση με τη συνάρτηση Patterson που υπολογίζεται από τις πειραματικές μετρήσεις και τις διαφορές τους. (ii) Η τιμή του παράγοντα fom (figure-of-merit) που είναι ένα μέτρο της ακρίβειας με την οποία υπολογίζονται οι φάσεις από την προτεινόμενη λύση. Ο fom παίρνει τιμές μεταξύ 0 (άγνωστες φάσεις) και 1 (φάσεις γνωστές με βεβαιότητα). (iii) Ο βαθμός κατά τον οποίο ο υπολογιζόμενος

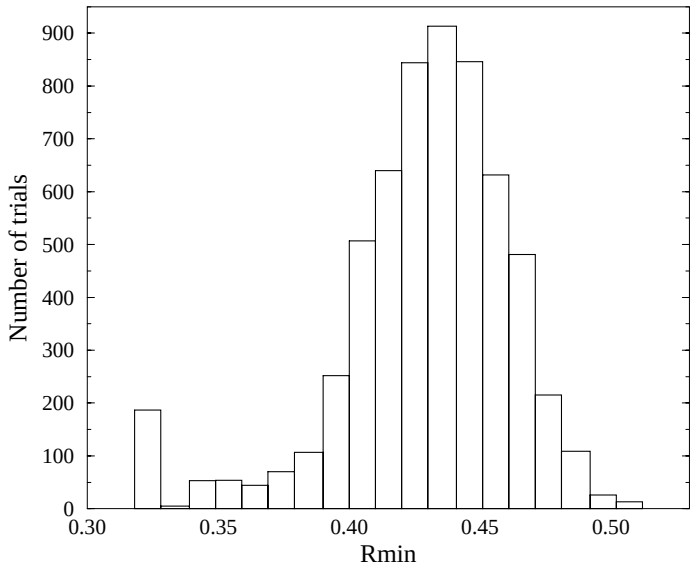
χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας έχει τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά της κρυσταλλικής δομής ενός μακρομορίου. Συγκεκριμένα, εκείνο που εξετάζεται είναι το αν υπάρχουν διακριτές περιοχές διαλύτη (ομοιόμορφη κατανομή ηλεκτρονικής πυκνότητας) και μακρομορίου (περιοχή με μεγάλες διακυμάνσεις πυκνότητας. (iv) Οι συνεκτίμηση όλων αυτών των κριτηρίων γίνεται μέσω ενός ολικού Zscore.

Οι εντάσεις των δεδομένων της $HrcQ_B$-C από τα τρία μήκη (μετά το SCALEPACK) αποτέλεσαν την είσοδο στο SOLVE. Δώθηκαν επίσης ο προσεγγιστικός αριθμός αμινοξέων της πρωτεΐνης στην ασύμμετρη μονάδα (336), ο αναμενόμενος αριθμός ανώμαλων σκεδαστών (4) και οι πειραματικά προσδιοριζόμενες τιμές των ανώμαλων ατομικών παραγόντων σκέδασης (πίνακας 6.2) για κάθε μήκος κύματος. Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα μέχρι τα 3.6 Å το πρόγραμμα βρήκε μόνο μία λύση τεσσάρων ατόμων σεληνίου με ολική τιμή fom 0.46 και συνολικό Zscore 36. Η ίδια λύση βρέθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα σε άλλα εύρη διακριτικότητας ή όταν χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι ανώμαλες διαφορές από τη σειρά δεδομένων στο peak σαν να επρόκειτο για ένα πείραμα SAD (Single wavelength Anomallous Diffraction).

Το πρόγραμμα SnB (Miller *et al.* 1994, Smith *et al.* 1998, Howell *et al.* 2000) το οποίο αποτελεί μια εφαρμογή των λεγόμενων 'άμεσων μεθόδων' (Glusker & Trueblood 1972) χρησιμοποιήθηκε επίσης σε μια ανεξάρτητη έρευνα για την εύρεση της θέσης των σεληνίων και κατέληξε στην ίδια λύση. Οι 'άμεσες μέθοδοι' χρησιμοποιούν τις σχέσεις που συνδέουν τις φάσεις ισχυρών ανακλάσεων για να εκτιμήσουν τις φάσεις όλων των ανακλάσεων. Οι σχέσεις αυτές προκύπτουν από το γεγονός ότι η ηλεκτρονική πυκνότητα είναι παντού μηδέν εκτός από περιοχές που αντιστοιχούν σε ατομικές θέσεις και ποτέ δεν μπορεί να γίνει αρνητική. Κατά τη διαδικασία επίλυσης μιας δομής το SnB προσπαθεί να φτάσει στο ολικό ελάχιστο μιας συνάρτησης που καλείται συνάρτηση ελαχιστοποίησης R(φ). Αρχικά θεωρώντας άτομα σε τυχαίες θέσεις παράγεται ένα σύνολο από δοκιμαστικές δομές (trial structures). Για κάθεμια από αυτές τις δομές: (i) Υπολογίζονται οι αντίστοιχες φάσεις. (ii) Υπολογίζεται η αρχική τιμή της R(φ). (iii) Ξεκινά ένας κύκλος βελτιστοποίησης κατά τον οποίο οι φάσεις τροποποιούνται ώστε να ελαττωθεί η αρχική τιμή της R(φ), με τις φάσεις αυτές υπολογίζεται ένας χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας του οποίου τα μέγιστα αντιστοιχούν σε ατομικές θέσεις. Οι θέσεις αυτές μεταβάλλονται εφαρμόζοντας τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας και τέλος από τις νέες θέσεις υπολογίζονται νέες φάσεις και ένας νέος κύκλος βελτιστοποίησης ξεκινά. Κριτήριο για το αν βρέθηκε λύση είναι η μορφή του ιστογράμματος που δίνει την τελική τιμή της R(φ) (Rmin) για κάθε δοκιμαστική δομή. Αν το ιστόγραμμα εμφανίζει δύο μέγιστα (bimodal) αυτό θεωρείται

ένδειξη ότι βρέθηκε λύση ενώ αν υπάρχει μόνο ένα μέγιστο (unimodal, bell-shaped) αυτό είναι ένδειξη ότι δεν βρέθηκε λύση.

Οι εντάσεις των δεδομένων της $HrcQ_B$-C από τα τρία μήκη κύματος χρησιμοποιήθηκαν ως είσοδος στο SnB. Οι 430 ισχυρότερες ανώμαλες διαφορές και διαφορές διασποράς ($\Delta|F|/\sigma(F) \geq 1$) χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθούν 7000 τριάδες σχετιζόμενων ανακλάσεων διακριτικότητας μέχρι τα 3.7 Å. Τοποθετώντας τέσσερα άτομα σεληνίου σε τυχαίες θέσεις δημιουργήθηκαν 6000 δοκιμαστικές δομές καθεμία από τις οποίες υποβλήθηκε σε 20 κύκλους βελτιστοποίησης. Το ιστόγραμμα της ανάλυσης παρουσιάζεται στην εικόνα 6.4. Η μορφή του αποτελεί σαφή ένδειξη ότι βρέθηκε λύση που αντιστοιχεί στις χαμηλότερες τιμές του Rmin.



Εικόνα 6.4 Το ιστόγραμμα παρουσιάζει την τελική τιμή της συνάρτησης ελαχιστοποίησης για καθεμία από τις 6000 δοκιμαστικές δομές της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με δεδομένα της $HrcQ_B$-C. Η παρουσία δύο μεγίστων στην κατανομή είναι ενδεικτικό χαρακτηριστικό της εύρεσης λύσης.

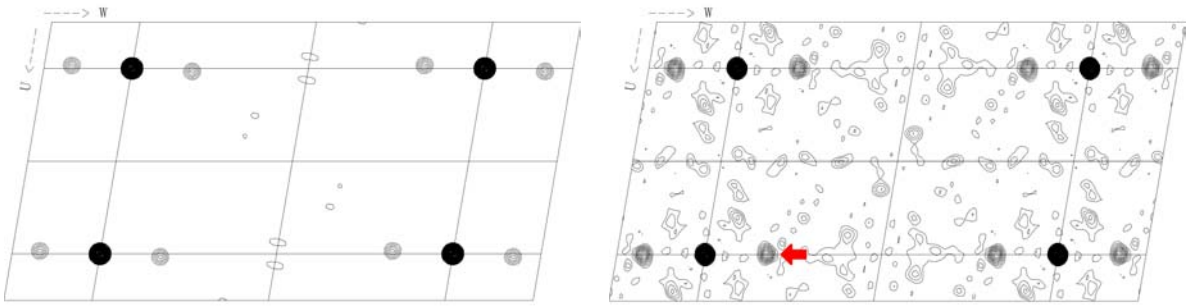
Η εγγυρότητα της λύσης ελέγχθηκε συγκρίνοντας τον πειραματικό χάρτη Patterson με τον χάρτη Patterson που θα έδινε αυτή η λύση (υποθετικός χάρτης) και επίσης συγκρίνοντας τις

συναρτήσεις αυτοπεριστροφής που υπολογίζονται με τα δεδομένα της πρωτεΐνης και με τις διαφορές διασποράς.

Έτσι, υπολογίστηκαν οι παράγοντες δομής που αντιστοιχούν στην προτεινόμενη δομή των σεληνίων και στη συνέχεια τα πλάτη τους χρησιμοποιήθηκαν ως συντελεστές μιας σύνθεσης Patterson που θα αναφέρεται ως υποθετική. Ο υπολογισμός των παραγόντων δομής έγινε με το πρόγραμμα MLPHARE και της Patterson με το FFT. Και τα δύο ανήκουν στο πακέτο προγραμμάτων της CCP4. Η σύγκριση του υποθετικού χάρτη Patterson με τους πειραματικούς χάρτες ανώμαλων διαφορών και διαφορών διασποράς αποκάλυψε αξιόλογη ομοιότητα. Στην εικόνα 6.5 παρατίθενται ο υποθετικός και ο πειραματικός χάρτης των διαφορών διασποράς. Οι χάρτες όχι απλώς παρουσιάζουν μέγιστα στις ίδιες περιοχές αλλά τα μέγιστα αυτά ακολουθούν το ίδιο πρότυπο αυξομείωσης καθώς κινούμαστε κατά μήκος του άξονα v, σαφής ένδειξη ότι δεν πρόκειται για σύμπτωση. Για παράδειγμα, κοιτώντας τον υποθετικό χάρτη της εικόνας 6.5 είναι φανερό ότι στους γειτονικούς τομείς 0.31 και 0.38 καταγράφονται διαφορετικά στιγμιότυπα από τα ίδια μέγιστα. Έτσι, ενώ κάποια είναι ισχυρά στο 0.31 και ασθενή στο 0.38 για κάποια άλλα συμβαίνει το αντίθετο. Παρατηρούμε ότι τα μέγιστα του πειραματικού χάρτη είναι κατ' αναλογία με τα αντίστοιχα τους του υποθετικού ισχυρά ή ασθενή στον ίδιο τομέα.

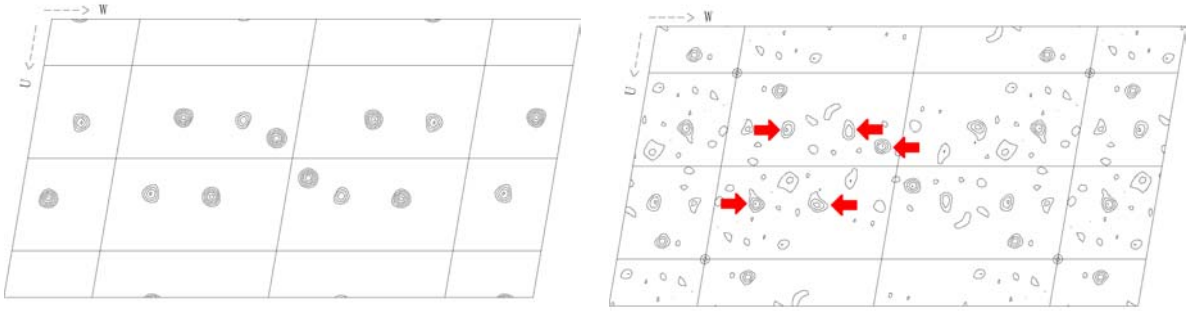
Υποθετικός χάρτης Patterson **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**

v=0



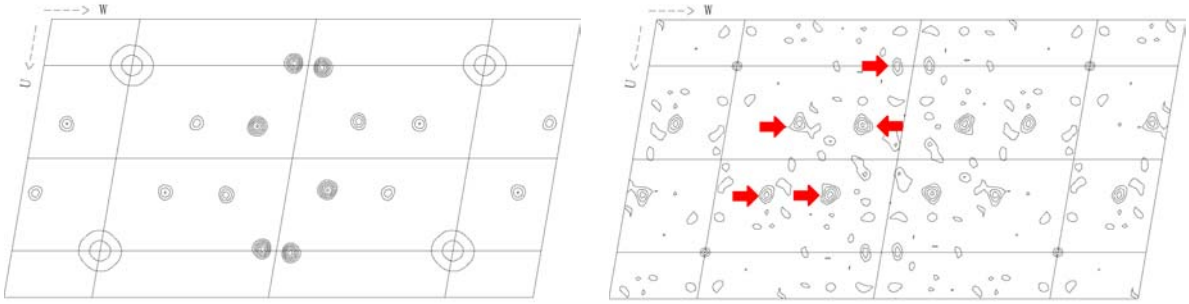
v=0.16

Υποθετικός χάρτης Patterson **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**

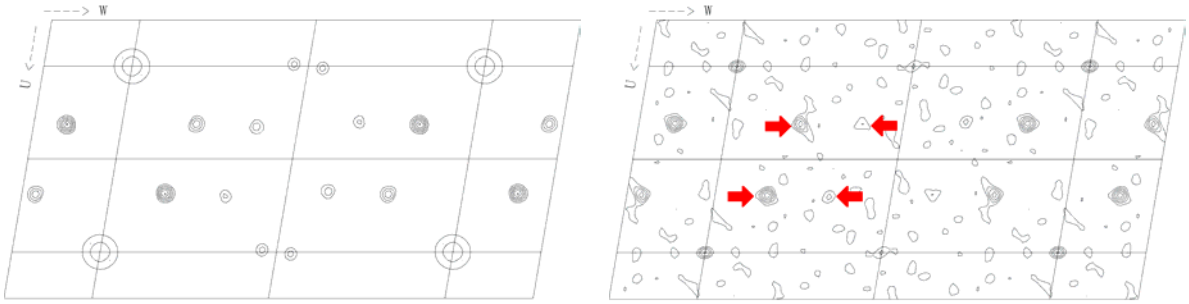


Εικόνα 6.5 (συνεχίζεται)

v=0.31

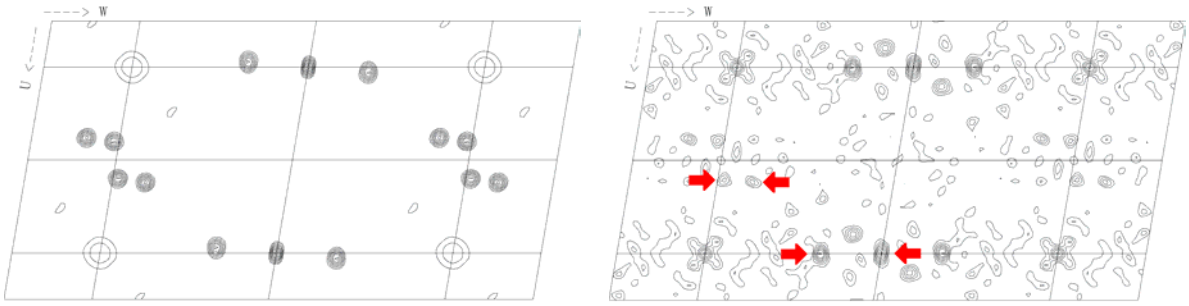


v=0.38



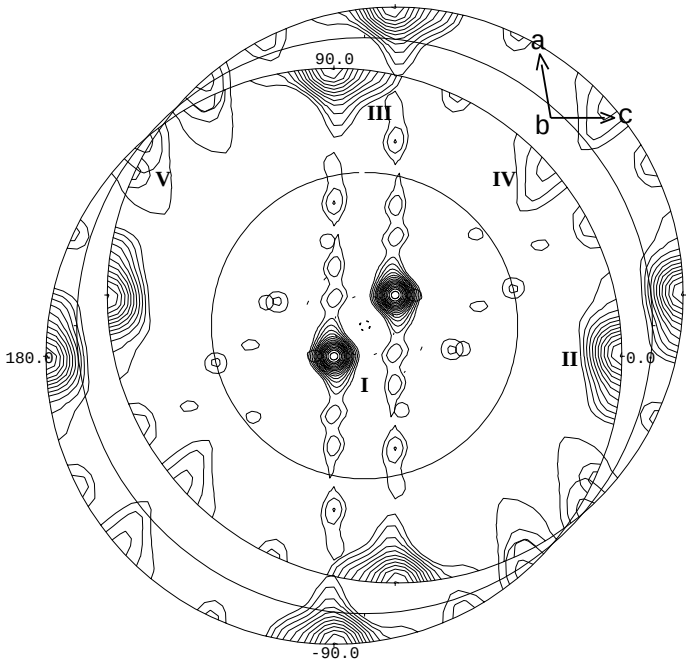
v=0.50

Υποθετικός χάρτης Patterson **Χάρτης Patterson διαφορών διασποράς**



Εικόνα 6.5 Παρατίθενται για σύγκριση αντίστοιχοι τομείς από τον χάρτη Patterson των διαφορών διασποράς (δεξιά στήλη) και του υποθετικού χάρτη που υπολογίζεται από τις θέσεις των ανώμαλων σκεδαστών (αριστερή στήλη). Ο χάρτης των διαφορών διασποράς είναι αυτός που παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3. Με βέλη σημειώνονται μέγιστα που είναι κοινά και στους δύο χάρτες.

Υπολογίστηκε επίσης η συνάρτηση αυτο-περιστροφής με τις διαφορές διασποράς από τις οποίες προήλθε η προτεινόμενη δομή των σεληνίων (εικόνα 6.6). Σύγκριση με την αντίστοιχη συνάρτηση που υπολογίζεται με τα φυσικά δεδομένα της πρωτεΐνης (εικόνα 4.5A) δείχνει ότι η προτεινόμενη λύση υπακούει στη συμμετρία του μορίου.



Εικόνα 6.6 Η συνάρτηση self-rotation που υπολογίζεται με τις διαφορές διασποράς των δεδομένων της $HrcQ_B$-C για κ=180º. Πάνω δεξιά δίνεται η διεύθυνση των κρυσταλλογραφικών αξόνων. Ο b είναι κάθετος στο επίπεδο του χαρτιού με φορά προς τον αναγνώστη ενώ οι a και c βρίσκονται στο επίπεδο του χαρτιού. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα διακριτικότητας 15-5 Å και η ακτίνα ολοκλήρωσης στο χώρο της Patterson ήταν 18 Å. Οι ισοϋψείς φέρονται σε βήματα του 5%.

6.3 Υπολογισμός αρχικών φάσεων και βελτιστοποίηση τους

Οι θέσεις των ανώμαλων σκεδαστών χρησιμοποιούνται για την αρχική εκτίμηση των φάσεων. Οι φάσεις αυτές μαζί με τα πλάτη των παραγόντων δομής, τα μετρημένα από το πείραμα συνδυάζονται σε μια σύνθεση Fourier που αποτελεί τον πρώτο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας της δομής. Συνήθως η εκτίμηση των αρχικών φάσεων έχει μεγάλη απόκλιση από τις πραγματικές τιμές με αποτελέσμα ο χάρτης που υπολογίζεται από αυτές να είναι μια κακή προσέγγιση του πραγματικού χάρτη. Οι τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας που ορίζονται και αναλύονται παρακάτω, είναι το εργαλείο με τη βοήθεια του οποίου από τις αρχικές εκτιμήσεις των φάσεων και τον πρώτο συνήθως ελάχιστα πληροφοριακό χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας καταλήγουμε σε ένα σύνολο από αξιόπιστες φάσεις και σε ένα σαφή χάρτη. Ακολουθείται μια κυκλικά επαναλαμβανόμενη πορεία που είναι η εξής: Ο χάρτης βελτιώνεται εφαρμόζοντας τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας και χρησιμοποιείται μέσω μιας ανάλυσης Fourier για τον υπολογισμό τροποποιημένων παραγόντων δομής. Οι τροποποιημένες φάσεις από τους παράγοντες αυτούς συνδυάζονται με τις αρχικές (phase combination) και προκύπτει ένα σύνολο νέων φάσεων. Οι νέες φάσεις και τα μετρημένα πλάτη των παραγόντων δομής χρησιμοποιούνται σε μια σύνθεση Fourier που είναι ένας καλύτερος από τον προηγούμενο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ο χάρτης αυτός υφίσταται έναν καινούριο κύκλο τροποποίησης πυκνότητας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι να συγκλίνει, δηλαδή μέχρι οι νέες φάσεις που υπολογίζονται να μη διαφέρουν από τις προηγούμενες.

6.3.1 Τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας

Η τροποποίηση πυκνότητας είναι ένα εργαλείο που αποσκοπεί στη βελτίωση της εκτίμησης που έχουμε για τις φάσεις και επομένως στη βελτίωση του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας (Cowtan & Zhang 1999). Για την εφαρμογή της αρκεί να είναι διαθέσιμο ένα

αρχικό σύνολο παραγόντων δομής, πλατών και φάσεων. Η μέθοδος συνδυάζει τα πειραματικά δεδομένα με εκ των προτέρων γνώση για τις φυσικοχημικές ιδιότητες του συστήματος. Μερικές από τις ιδιότητες που θεωρούνται δεδομένες για τον χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας ενός πρωτεϊνικού μορίου που πακετάρεται με τάξη σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα είναι: (i) Ένα μέρος της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυστάλλου καταλαμβάνεται από διαλύτη. (ii) Το ιστόγραμμα της ηλεκτρονικής πυκνότητας είναι σχεδόν ίδιο για όλες τις πρωτεΐνες. Εξαρτάται μόνο από τη διακριτικότητα των δεδομένων και τον συνολικό θερμικό παράγοντα. (iii) Η ηλεκτρονική πυκνότητα δεν μπορεί να είναι αρνητική. (iv) Όταν δύο ή περισσότερα μόρια συναθροίζονται σε ολιγομερή, όταν δηλαδή υπάρχει μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία στην ασύμμετρη μονάδα, στα δεδομένα παρατηρείται ένα είδος πλεονασμού αφού η πληροφορία για την κάθε όμοια υπομονάδα επαναλαμβάνεται.

Εξομάλυνση διαλύτη (solvent flattening). Τα πρωτεϊνικά μόρια έχουν ακανόνιστα σχήματα και έτσι κατά το πακετάρισμα τους στους κρυστάλλους αφήνονται μεταξύ τους κενά που καταλαμβάνονται από τον διαλύτη που έχει χρησιμοποιηθεί στις κρυσταλλώσεις. Τα μόρια του διαλύτη διευθετούνται στον κρύσταλλο γύρω από την πρωτεΐνη σε σφαίρες ενυδάτωσης. Όσα από αυτά βρίσκονται κοντά στην πρωτεΐνη, δηλαδή στις πρώτες σφαίρες ενυδάτωσης έχουν καλά καθορισμένες θέσεις που προσδιορίζονται με ακρίβεια. Αντίθετα, τα μόρια διαλύτη που βρίσκονται μακριά από την πρωτεΐνη παρουσιάζουν σχετικά μεγάλη κινητικότητα, έχουν τυχαίους προσανατολισμούς και αναφέρονται ως bulk solvent. Επειδή η εικόνα της στοιχειώδους κυψελίδας που προκύπτει από ένα πείραμα περίθλασης είναι μια μέση εικόνα στο χώρο του κρυσταλλικού πλέγματος και στο χρόνο του πειράματος οι περιοχές του bulk solvent έχουν μια μέση σταθερή τιμή ηλεκτρονικής πυκνότητας. Η τεχνική της εξομάλυνσης διαλύτη εφαρμόζεται σε δύο βήματα. Πρώτα, δημιουργείται μια 'μάσκα' του μακρομορίου ώστε ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας να διαχωριστεί στην περιοχή της πρωτεΐνης -που περιλαμβάνει και το διαλύτη στις πρώτες σφαίρες ενυδάτωσης- και στην περιοχή του bulk solvent. Στη συνέχεια, η πυκνότητα στην περιοχή του bulk solvent τίθεται ίση με μια σταθερή τιμή.

Μοριακός μέσος (molecular averaging). Όταν υπάρχει μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία οι υπομονάδες που σχετίζονται από αυτήν μπορούν να συνδυαστούν και να υπολογιστεί ένα μέσος. Με την αντικατάσταση κάθε υπομονάδας από τον μέσο παράγεται ένας βελτιωμένος χάρτης γιατί έτσι εξαλείφεται μεγάλο μέρος του θορύβου και αυξάνει η αναλογία σήματος προς θόρυβο. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των αντιγράφων όσο μεγαλύτερη δηλαδή η τάξη της μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας τόσο μεγαλύτερη είναι η βελτίωση που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του μοριακού μέσου.

Καθώς η συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας βελτιώνεται με τις τεχνικές τροποποίησης πυκνότητας η χρήση της στην ανάλυση Fourier δίνει σταδιακά μια εκτίμηση και για τις φάσεις παραγόντων δομής που το πλάτος τους δεν έχει μετρηθεί στη σειρά δεδομένων από την οποία υπολογίζονται οι φάσεις. Αν στο σημείο αυτό είναι διαθέσιμη μια native σειρά δεδομένων σε υψηλότερη διακριτικότητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πλάτη που έχουν μετρηθεί σε αυτήν.

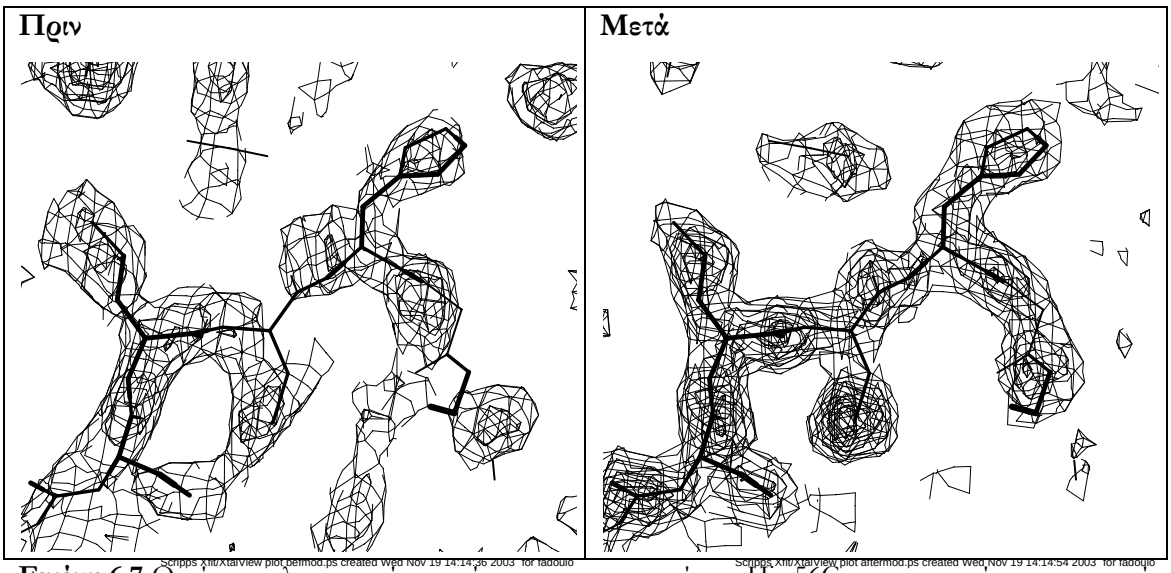
6.3.2 Συνδυασμός φάσεων

Ο τροποποιημένος χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας υποβάλλεται σε ένα αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier (ανάλυση Fourier) από τον οποίο προκύπτουν τροποποιημένοι παράγοντες δομής. Οι φάσεις αυτών των τροποποιημένων παραγόντων συνδυάζονται με τις αρχικές και οι νέες φάσεις χρησιμοποιούνται σε μια σύνθεση Fourier και σε ένα νέο χάρτη. Το κρίσιμο σημείο σε αυτή την πορεία συνδυασμού φάσεων είναι η εκτίμηση της αξιοπιστίας των νέων φάσεων και η εύρεση των κατάλληλων συντελεστών βαρύτητας με τους οποίους θα συμμετάσχουν στο συνδυασμό οι αρχικές και οι τροποποιημένες φάσεις. Η διαφορά ανάμεσα στα μετρημένα και τα τροποποιημένα πλάτη παρέχει συνήθως ένα κριτήριο της ακρίβειας των τροποποιημένων φάσεων.

6.3.3 Υπολογισμός και βελτιστοποίηση φάσεων για τη δομή της $HrcQ_B$-C

Ο υπολογισμός αρχικών φάσεων για τη δομή της $HrcQ_B$-C έγινε με το πρόγραμμα Solve με δεδομένα μέχρι τα 2.5 Å. Η εκτίμηση των αρχικών φάσεων είχε fom 0.33. Ακολούθησε βελτίωση των φάσεων εφαρμόζοντας τις τεχνικές εξομάλυνσης διαλύτη και μοριακού μέσου με το πρόγραμμα Resolve (Terwilliger 1999, Terwilliger 2000, Terwilliger 2002). Το πρόγραμμα εκτελέστηκε αρκετές φορές δοκιμάζοντας διαφορετικές αρχικές τιμές για το ποσοστό του διαλύτη και τον αριθμό αμινοξικών καταλοίπων. Στο καλύτερο αποτέλεσμα κατέληξε για 42% διαλύτη και θεωρώντας 65 κατάλοιπα στο κάθε μονομερές. Η μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία διερευνήθηκε με ρουτίνα του ίδιου προγράμματος που βασίζεται στην εύρεση της συμμετρίας που σχετίζει τις θέσεις των ανώμαλων σκεδαστών. Ένα διπλός άξονας ήταν το μόνο στοιχείο μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας που βρέθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του μοριακού μέσου. Τα τελευταία στάδια της τροποποίησης πυκνότητας συνοδεύτηκαν από διεύρυνση των φάσεων μέχρι τα 2.3 Å

χρησιμοποιώντας τα δεδομένα στο μέγιστο απορρόφησης που συλλέχθηκαν στο ESRF (δες 5.3.3). Η εκτίμηση των φάσεων μετά το στάδιο αυτό είχε fom 0.57. Η βελτίωση που επήλθε στο χάρτη μετά την εφαρμογή της τροποποίησης πυκνότητας γίνεται φανερή από την εικόνα 6.7.



Εικόνα 6.7 Ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας στην περιοχή της His 56C πριν και μετά την εφαρμογή τροποποίησης πυκνότητας. Για να διευκολυνθεί η σύγκριση έχει γίνει υπέρθεση του ατομικού μοντέλου. Όπως φαίνεται μετά την τροποποίηση πυκνότητας η συνοχή της ηλεκτρονικής πυκνότητας αποκαταστάθηκε και τα χαρακτηριστικά της έγιναν αρκετά σαφή ώστε να επιτρέψουν τη δημιουργία του ατομικού μοντέλου.

6.4 Κατασκευή αρχικού ατομικού μοντέλου και βελτιστοποίηση του

Καθώς οι φάσεις βελτιώνονται βελτιώνεται μαζί και ο χάρτης της ηλεκτρονικής πυκνότητας. Στο στάδιο αυτό ένας χάρτης χαρακτηρίζεται καλός όταν εύκολα μπορεί να διακριθεί σε δυο περιοχές. Μια περιοχή χαμηλής ηλεκτρονικής πυκνότητας που αντιπροσωπεύει το διαλύτη και μια περιοχή υψηλής πυκνότητας που αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη. Επιπλέον, στην περιοχή της πρωτεΐνης πρέπει να υπάρχουν μεγάλα τμήματα συνεχόμενης πυκνότητας και να μπορούν να αναγνωριστούν δομικά χαρακτηριστικά όπως είναι οι α-έλικες. Όταν οι φάσεις γίνουν αρκετά ακριβείς ο χάρτης γίνεται αρκετά σαφής ώστε να επιτρέπει τον προσδιορισμό των θέσεων ατόμων και τότε χρησιμοποιείται για την κατασκευή του πρώτου ατομικού μοντέλου. Η διαδικασία είναι γνωστή ως model building ή map fitting. Με ένα πρόγραμμα μοριακών γραφικών παράγεται μια τρισδιάστατη εικόνα του χάρτη και το μοντέλο κτίζεται μέσα σε αυτόν τοποθετώντας τη γνωστή αμινοξική αλληλουχία έτσι ώστε να ταιριάζει με τα χαρακτηριστικά της πυκνότητας. Στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και σε βρόχους είναι πιθανό η πυκνότητα να είναι ασθενής ή απούσα και στα σημεία αυτά το πρώτο μοντέλο παρουσιάζει ασυνέχειες που συμπληρώνονται στα επόμενα στάδια.

Μετά τη δημιουργία του πρώτου ατομικού μοντέλου οι φάσεις υπολογίζονται πλέον από τις συντεταγμένες των ατομικών θέσεων και η βελτίωση τους επιτυγχάνεται έμμεσα μέσω μιας επαναληπτικής πορείας που αποσκοπεί στη βελτίωση του μοντέλου. Η πορεία αναλυτικά είναι η εξής: Το πρώτο μοντέλο δημιουργείται και διορθώνεται. Οι ατομικές θέσεις βελτιστοποιούνται και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό φάσεων. Οι υπολογιζόμενες φάσεις συνδυάζονται με τα μετρημένα πλάτη των παραγόντων δομής σε μια σύνθεση Fourier με αποτέλεσμα έναν καλύτερο από τον προηγούμενο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ο χάρτης αυτός εμφανίζει καινούρια δομικά χαρακτηριστικά και με τη βοήθεια ενός προγράμματος γραφικών χρησιμοποιείται για την ανακατασκευή και διόρθωση του μοντέλου. Το μοντέλο βελτιστοποιείται και οι ατομικές θέσεις χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό ενός νέου συνόλου φάσεων. Η πορεία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές μέχρι να συγκλίνει, μέχρι δηλαδή το μοντέλο να μην μπορεί να βελτιστοποιηθεί περισσότερο. Όσο το μοντέλο βελτιώνεται τόσο οι φάσεις που υπολογίζονται από αυτό γίνονται ακριβέστερες και καινούρια δομικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται στο χάρτη που με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται στην ανακατασκευή και διόρθωση του μοντέλου.

Καθοριστικό βήμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η βελτιστοποίηση του μοντέλου. Ως βελτιστοποίηση ορίζεται η πορεία κατά την οποία το μοντέλο τροποποιείται έτσι ώστε οι παρατηρήσεις να ταιριάξουν όσο γίνεται καλύτερα με τα υπολογιζόμενα από το μοντέλο πλάτη των παραγόντων δομής ($|F_c|$). Στις παρατηρήσεις περιλαμβάνονται τα μετρημένα από το πείραμα πλάτη ($|F_o|$) καθώς και στερεοχημικοί παράγοντες των οποίων οι ιδανικές τιμές είναι γνωστές εκ των προτέρων από τις δομές μικρών οργανικών μορίων ή τις δομές πρωτεϊνών που έχουν προσδιοριστεί σε υψηλή διακριτικότητα. Τέτοιοι παράγοντες είναι τα μήκη και οι γωνίες χημικών δεσμών και οι δίεδρες γωνίες των πλευρικών ομάδων. Η βελτιστοποίηση του μοντέλου επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση παραμέτρων που το περιγράφουν όπως είναι οι συντεταγμένες των ατόμων της πρωτεΐνης, οι συντεταγμένες νερών που βρίσκονται κυρίως στην πρώτη σφαίρα ενυδάτωσης της πρωτεΐνης, οι θερμικοί παράγοντες (B-παράγοντες) ορισμένοι έτσι ώστε να περιγράφουν την κινητικότητα όλου ή τμημάτων του μοντέλου ή ακόμα κάθε ατόμου χωριστά (B-individual). Στη διαδικασία αυτή οι στερεοχημικές παράμετροι περιορίζονται σε ένα εύρος τιμών γύρω από τις ιδανικές ενώ περιορισμοί μπορούν να τεθούν και στους ξεχωριστούς B-παράγοντες έτσι ώστε να μεταβάλλονται ομαλά μεταξύ γειτονικών ατόμων.

Η πορεία βελτιστοποίησης του ατομικού μοντέλου αντιστοιχεί μαθηματικά στην ελαχιστοποίηση μιας συνάρτησης στόχου. Η μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων (least squares refinement) είναι από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την ελαχιστοποίηση της συνάρτησης στόχου. Βασικό της μειονέκτημα είναι ότι εύκολα παγιδεύεται σε τοπικά ελάχιστα με αποτέλεσμα να βρίσκεται με δυσκολία η πραγματικά μικρότερη τιμή της συνάρτησης στόχου. Μια αρκετά διαφορετική μέθοδος ελαχιστοποίησης είναι η προσομοίωση ανόπτησης (simulating annealing). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει στο μοντέλο να κινηθεί προς υψηλότερες ενεργειακά καταστάσεις ώστε κάνει δυνατό τον απεγκλωβισμό του από τοπικά ελάχιστα. Στην προσομοίωση ανόπτησης το μόριο θερμαίνεται σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία ώστε τα άτομα να ξεπεράσουν το ενεργειακό φράγμα ενός πιθανού τοπικού ελάχιστου και στη συνέχεια αφήνεται να ψυχθεί αργά μέχρι να καταλήξει σε μια κατάσταση ελάχιστης ενέργεια.

Εκτός από την επιλογή της μεθόδου ελαχιστοποίησης επιλέγεται επίσης και η συνάρτηση στόχος που πρόκειται να ελαχιστοποιηθεί. Η συνάρτηση αυτή μπορεί να συνίσταται από διαφορετικές παραμέτρους. Έτσι, στην απλούστερη περίπτωση στη συνάρτηση στόχο περιλαμβάνονται μόνο οι ατομικές θέσεις και κατά τη βελτιστοποίηση τροποποιούνται μόνο αυτές (positional refinement). Σε άλλες μεθόδους βελτιστοποίησης αντί για τη ρύθμιση της

θέσης κάθε ατόμου ξεχωριστά το μόριο διαιρείται σε μια ή περισσότερες ομάδες οι οποίες αντιμετωπίζονται ως άκαμπτες οντότητες των οποίων η θέση βελτιστοποιείται (βελτιστοποίηση άκαμπτου σώματος, rigid body refinement). Όταν εισάγονται στερεοχημικές παράμετροι π.χ. δίεδρες γωνίες (torsion angles refinement) η συνάρτηση ελαχιστοποίησης αποκτά έναν ή περισσότερους όρους της μορφής (x^{ideal}-x^{model}).

Η πρόοδος της πορείας βελτιστοποίησης κρίνεται από τη σταδιακή πτώση της τιμής των παραγόντων-R και R_{free} και από την πυκνότητα της σύνθεσης Fourier που υπολογίζεται με συντελεστές $(|F_o|-|F_c|)\exp(i\varphi_c)$. Στη διάρκεια της βελτιστοποίησης το μοντέλο αλλάζει έτσι ώστε τα υπολογιζόμενα από αυτό πλάτη των παραγόντων δομής ($|F_c|$) να ταιριάξουν όσο γίνεται με τις παρατηρήσεις δηλαδή τα μετρημένα από το πείραμα πλάτη ($|F_o|$). Η σύγκλιση της πορείας βελτιστοποίησης επέρχεται όταν η διαφορά των δύο μεγεθών σταματήσει να ελαττώνεται σε επόμενους κύκλους. Ο παράγοντας-R είναι μέτρο της απόκλισης ανάμεσα στα παρατηρούμενα πλάτη των παραγόντων δομής και τα πλάτη που υπολογίζονται από το μοντέλο. Ορίζεται από την εξίσωση:

$$R= (\Sigma||F_o|-|F_c||)/(\Sigma|F_o|) \qquad (4)$$

Έχει δειχτεί ότι οι τιμές του παράγοντα αυτού εξαρτώνται από την αναλογία των παρατηρήσεων προς τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το μοντέλο. Έτσι όταν ο λόγος αυτός είναι μικρός ο R μπορεί να πάρει χαμηλές τιμές ακόμα κι αν το μοντέλο είναι ελλειπές ή περιέχει σφάλματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ο R_{free} (Brünger 1992, Kleywegt & Brünger 1996). Η σειρά δεδομένων χωρίζεται από πολύ νωρίς (πριν δημιουργηθεί το πρώτο μοντέλο) σε δύο σύνολα. Το ένα ονομάζεται σύνολο εργασίας, περιέχει το 90-95% των δεδομένων και είναι αυτό που χρησιμοποιείται για την κατασκευή και βελτιστοποίηση του μοντέλου. Το άλλο ονομάζεται σύνολο ελέγχου, περιέχει το 5-10% των μετρήσεων και δεν συμμετέχει στην πορεία βελτιστοποίησης/κατασκευής του μοντέλου. Τα δεδομένα αυτού του συνόλου χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό του R_{free} από τον ίδιο τύπο (4) που χρησιμοποιείται και στον υπολογισμό του R.

Η ύπαρξη και η θέση σφαλμάτων στο μοντέλο υποδεικνύεται από μια σύνθεση Fourier που υπολογίζεται με συντελεστές $(|F_o|-|F_c|)\exp(i\varphi_c)$. Η πυκνότητα αυτής της σύνθεσης μπορεί να είναι θετική ή αρνητική ανάλογα με ποιός από τους δύο όρους ($|F_o|$ ή $|F_c|$) είναι μεγαλύτερος. Θετική πυκνότητα σε κάποιο σημείο υποδεικνύει ότι η συνεισφορά από τις μετρήσεις είναι μεγαλύτερη από αυτή που προβλέπει το μοντέλο άρα άτομα του μοντέλου πρέπει να μετακινηθούν προς το σημείο αυτό για να ικανοποιήσουν την απαίτηση για μεγαλύτερη πυκνότητα. Αντίθετα, αρνητική πυκνότητα σημαίνει ότι το μοντέλο προβλέπει περισσότερη πυκνότητα από όση πραγματικά υπάρχει άρα άτομα πρέπει να απομακρυνθούν.

Καθώς οι φάσεις που υπολογίζονται από το μοντέλο γίνονται ολοένα ακριβέστερες τείνουν να κυριαρχήσουν στο χάρτη. Έτσι για να αντισταθμιστεί η αυξανόμενη επίδραση του μοντέλου οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας υπολογίζονται με συντελεστές όχι το παρατηρούμενο πλάτος $|F_o|$ αλλά τη διαφορά $(2|F_o|-|F_c|)\exp(i\varphi_c)$. Ένας τέτοιος χάρτης αναφέρεται ως χάρτης διαφοράς ή $2F_o-F_c$.

6.4.1 Κατασκευή και βελτιστοποίηση του ατομικού μοντέλου της $HrcQ_B$-C

Το πρώτο ατομικό μοντέλο της $HrcQ_B$-C κατασκευάστηκε (autobuild) και ανακατασκευάστηκε (rebuild) αυτόματα από το πρόγραμμα Resolve (Terwilliger 2000). Ακολούθησαν περισσότεροι από 30 κύκλοι ανακατασκευής με το χέρι και βελτιστοποίησης. Με υπέρθεση του μοντέλου σε μια τρισδιάστατη εικόνα του χάρτη ήταν δυνατή η διόρθωση του με το χέρι έτσι ώστε να συμφωνεί με τα χαρακτηριστικά της πυκνότητας. Οι τρισδιάστατες εικόνες του χάρτη, του μοντέλου και της υπέρθεσης τους δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα γραφικών Xfit (McRee 1999). Η βελτιστοποίηση του μοντέλου έγινε με συνδυσμό των προγραμμάτων Refmac5 (Murshudov *et al.* 1997) και CNS (Brünger *et al* 1987, Brünger *et a*l 1990, Pannu & Read 1996). Στο τέλος κάθε κύκλου ανακατασκευής και βελτιστοποίησης το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό ενός νέου συνόλου φάσεων και ενός συνήθως καλύτερου χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ο νέος χάρτης ήταν ο οδηγός για νέες αλλαγές και προσθήκες στο μοντέλο στον επόμενο κύκλο της διαδικασίας. Το 5% των παρατηρήσεων αποτέλεσε το σύνολο ελέγχου για τον υπολογισμό του R_{free}.
Στους αρχικούς κύκλους της ανακατασκευής το μοντέλο συμπληρώθηκε με τμήματα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που έλειπαν στο αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο. Στη συνέχεια διορθώθηκαν οι δίεδρες γωνίες πολλών πλευρικών ομάδων ώστε να ταιριάξουν καλύτερα με την πυκνότητα. Βελτιστοποιήθηκαν οι ατομικές θέσεις και το μοντέλο υποβλήθηκε αρκετές φορές στη διαδικασία της προσομοίωσης ανόπτησης. Άρχισαν να προστίθενται νερά και άτομα από πλευρικές ομάδες που δεν ήταν πλήρεις. Εκτός από προσομοίωση ανόπτησης και βελτιστοποίηση των ατομικών θέσεων έγινε και βελτιστοποίηση των ισότροπων θερμικών παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο. Άτομα προστέθηκαν και αφαιρέθηκαν από τις πλευρικές ομάδες. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στη στροφή Ile 47D-Pro 49D που μέρος της ήταν εκτός πυκνότητας. Τα αμινοξέα διαγράφηκαν και αντικαταστάθηκαν με την αντίστοιχη στροφή της B αλυσίδας. Η γεωμετρία του μοντέλου και οι ατομικές θέσεις βελτιστοποιήθηκαν. Η γεωμετρία του τρέχοντος μοντέλου ελέγχθηκε με το πρόγραμμα WHATCHECK (Hooft *et al.* 1996). Όταν νέες αλλαγές στο μοντέλο έπαψαν να επιφέρουν πτώση του δείκτη R και ο χάρτης F_o-F_c δεν παρουσίαζε πλέον σημαντική πυκνότητα η πορεία βελτιστοποίησης σταμάτησε. Στον πίνακα 6.5 παρουσιάζεται μια σύνοψη της διαδικασίας με τους σημαντικότερους κύκλους της βελτιστοποίησης.

Πίνακας 6.5 Παρουσιάζονται τα κύρια στάδια της βελτιστοποίησης του ατομικού μοντέλου της $HrcQ_B$-C.

ΑΑ	**Κατασκευή, Ανακατασκευή και Διόρθωση του ατομικού μοντέλου**	**Βελτιστοποίηση του μοντέλου**	**R (%)**	**R_{free} (%)**
1	Αυτόματη κατασκευή του μεγαλύτερου μέρους του μοντέλου (Resolve)	Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)	31.8	38.7

ΑΑ	**Κατασκευή, Ανακατασκευή και Διόρθωση του ατομικού μοντέλου**	**Βελτιστοποίηση του μοντέλου**	**R (%)**	**R_{free} (%)**
2	Αυτόματη ανακατασκευή του μοντέλου (Resolve)	Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)	29.7	35.6
3	Προσθήκη αμινοξέων που λείπουν για τα οποία όμως υπάρχει πυκνότητα: Ala 11A, Leu 12A, Leu 12B, Asp 13B, Ser 14B, Arg 79B, Ser 14C, Leu 15B, Ala 16C Αλλαγή δίεδρων γωνιών της πλευρικής ομάδας της Arg 34	Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)	24.6	30.9
4	Προσθήκη των αμινοξέων: Ala 11A, Arg 83A, Asp 13B, Ser 14C, Ser 14D	Torsion angle refinement με προσομοίωση ανόπτησης (CNS, $T_{αρχ.}$=4000 K, $T_{τελ}$=300 K, αργή ψύξη σε βήματα των 25 K)	27.1	31.7
5	Προσθήκη των αμινοξέων: Ser 84A, Leu 12B, Leu 80B, Leu 81B, Leu 12C, Asp 13C, Leu 12D, Asp 13D, Thr 82D. Προσθήκη νερών. Αλλαγή δίεδρων γωνιών μερικών πλευρικών ομάδων.	Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)	23.0	29.2
6	Αυτόματη προσθήκη νερών χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη ρουτίνα του Xfit	Torsion angle refinement με προσομοίωση ανόπτησης (CNS, $T_{αρχ.}$=4000 K, $T_{τελ}$=300 K, αργή ψύξη σε βήματα των 25 K)	24.0	29.8
7	Αλλαγή δίεδρων γωνιών μερικών πλευρικών ομάδων. Προσθήκη νερών.	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Συνδυασμός ελαχιστοποίησης ενέργειας και βελτιστοποίησης B-παραγόντων (CNS, οι B-παράγοντες υπόκεινται σε περιορισμούς).	21.6	28.9
8	Προσθήκη νερών. Αλλαγή δίεδρων γωνιών μερικών πλευρικών ομάδων.	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Cartesian refinement με προσομοίωση ανόπτησης (CNS, $T_{αρχ.}$=1000 K, $T_{τελ}$=300 K, αργή ψύξη σε βήματα των 20 K)	23.7	28.6
9	Προσθήκη του τμήματος Ala 11C-Asp 13C	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)	20.2	25.4
10	Προσθήκη των αμινοξέων: Asp 13A, Asp 13B, Pro 10C, Thr 82C. Προσθήκη ατόμων από τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων: Ala 11D, Leu 12D. Προσθήκη νερών.	Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς). Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Molecular dynamics (CNS, σταθερή θερμοκρασία T=300 K, steps=3000).	22.7	27.5
11	Προσθαφαίρεση ατόμων από πλευρικές ομάδες. Αλλαγή δίεδρων γωνιών μερικών πλευρικών ομάδων. Προσθαφαίρεση νερών. Τροποποιήσης στη στροφή Ile 47D-Pro 49D.	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Molecular dynamics (CNS, σταθερή θερμοκρασία T=300 K, steps=3000).	18.9	24.1
12	Απόμακρυνση των Ile 47D, Ser 48D, Pro 49D και αντικατάσταση από τα αντίστοιχα αμινοξέα της αλυσίδας B. Προσθαφαίρεση ατόμων από πλευρικές ομάδες. Προσθαφαίρεση νερών.	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Molecular dynamics (CNS, σταθερή θερμοκρασία T=300 K, steps=3000).	18.8	23.6
13	Προσθαφαίρεση ατόμων από πλευρικές	Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων	18.2	22.8

ΑΑ	Κατασκευή, Ανακατασκευή και Διόρθωση του ατομικού μοντέλου	Βελτιστοποίηση του μοντέλου	R (%)	R_{free} (%)
	ομάδες. Προσθαφαίρεση νερών.	ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Molecular dynamics (CNS, σταθερή θερμοκρασία T=300 K, steps=3000). Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Βελτιστοποίηση ατομικών θέσεων (Refmac5, χρησιμοποιούνται όλα τα δεδομένα, η γεωμετρία υπόκειται σε περιορισμούς)		

Το τελικό μοντέλο περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Ala 11-Val 81 των μονομερών A και B, Pro 10-Val 81 του μονομερούς C, Ala 11-Thr 82 του μονομερούς D και 153 νερά. Οι τελικές τιμές των παραγόντων R και R_{free} είναι 18.2 και 22.8% αντίστοιχα.

Όπως είναι αναμενόμενο μακρυές, πλευρικές ομάδες εκτεθιμένες στο διαλύτη επιδεικνύουν μεγάλη κινητικότητα και στο χάρτη απουσιάζει η ηλεκτρονική πυκνότητα γι' αυτές τις ομάδες. Η αναλυτική τους αναφορά γίνεται στον πίνακα 6.6.

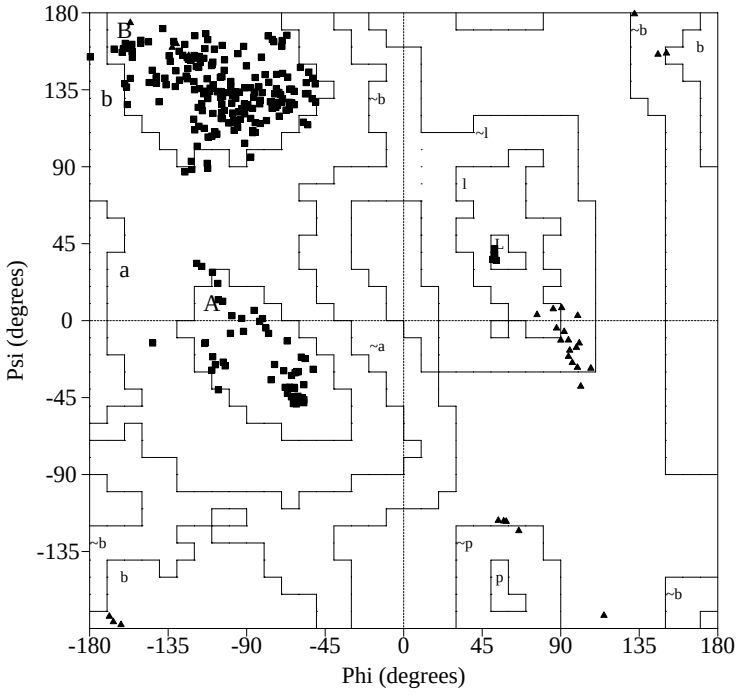
Πίνακας 6.6 Ευκίνητα αμινοξέα. 'Τελευταίο άτομο' χαρακτηρίζεται το τελευταίο άτομο της πλευρικής ομάδας για το οποίο υπάρχει πυκνότητα.

Κατάλοιπο	Τελευταίο άτομο	Κατάλοιπο	Τελευταίο άτομο
Arg 27A	C_B	Leu 12C	C_G
Arg 34A	N_E	Arg 22C	C_Z
Glu 58A	C_B	Arg 27C	N_E
Arg 79A	N_E	Leu 30C	C_G
Leu 80A	C_G	Arg 34C	C_Z
Ser 14B	C_B	Arg 35C	N_E
Arg 27B	N_E	Glu 58 C	C_D
Leu 30B	C_G	Glu 65 C	C_D
Arg 34B	N_E	Glu 25D	C_D
Glu 70B	C_D	Arg 27D	C_Z
Leu 80B	C_G	Arg 35D	C_Z
		Glu 58D	C_B
		Glu 65 D	C_G

6.5 Έλεγχος της ποιότητας του τελικού ατομικού μοντέλου

Εκτός από τις τιμές των παραγόντων R και R_{free} η ποιότητα του μοντέλου κρίνεται επίσης από την απόκλιση της στερεοχημείας του από τις ιδανικές τιμές. Το πρόγραμμα PROCHECK χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν τα μήκη, οι γωνίες δεσμών και οι τιμές των

δίεδρων γωνιών της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών ομάδων με τις ιδανικές τιμές. Από τη σύγκριση αυτή το μοντέλο φαίνεται να έχει πολύ καλή γεωμετρία αφού όλα τα μεγέθη βρίσκονται μέσα στα επιτρεπόμενα όρια (πίνακας 6.6). Στην εικόνα 6.8 παρουσιάζεται το διάγραμμα των φ/ψ δίεδρων γωνιών της κύριας αλυσίδας (Ramachandran plot). Το 95% των καταλοίπων βρίσκεται στις ευννοούμενες περιοχές και το υπόλοιπο 5% στις επιτρεπόμενες.



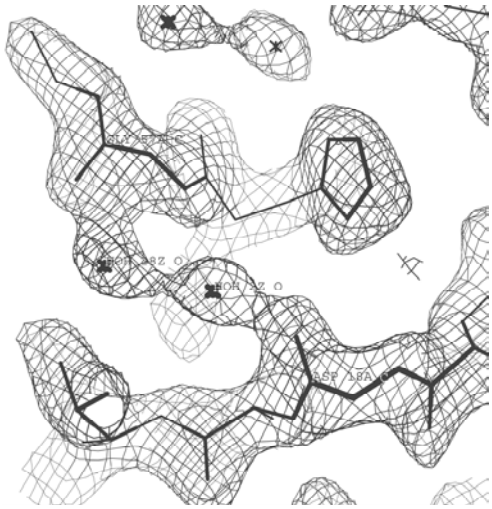
Εικόνα

σημειώ

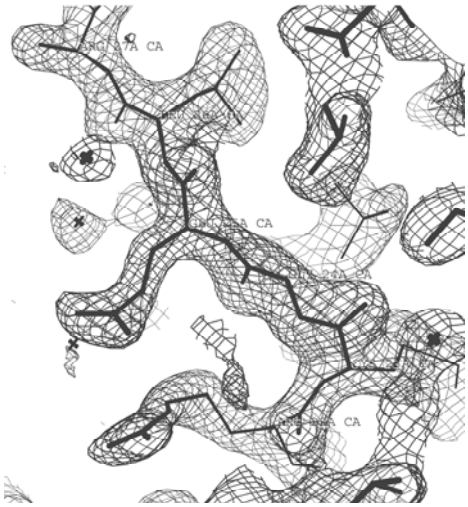
περιοχέ

Η καλή ποιότητα του χάρτη και η συμφωνία ανάμεσα στο χάρτη και το μοντέλο γίνεται φανερή από τις εικόνες που ακολουθούν (εικόνα 6.9). Οι εικόνες αυτές παρουσιάζουν περιοχές του $2F_o$-F_c χάρτη κατά μήκος του μονομερούς Α. Έχει γίνει υπέρθεση του ατομικού μοντέλου.

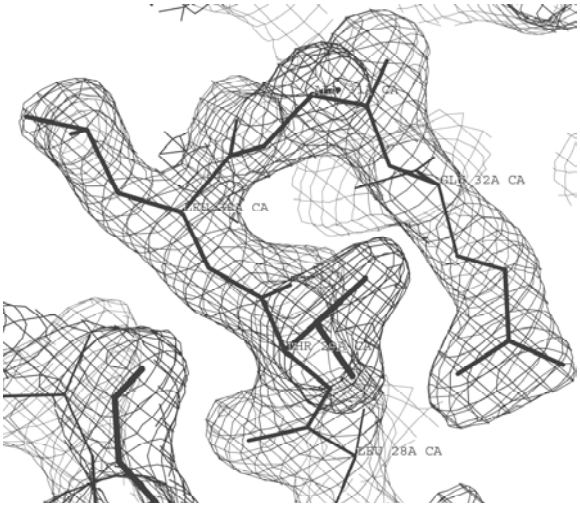
Α Asp 18A-H_2O-H_2O-Gly 57A



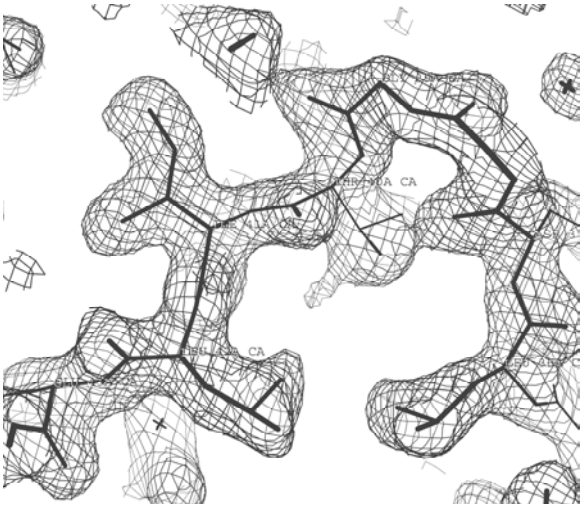
Β Arg 22A – Arg 27A



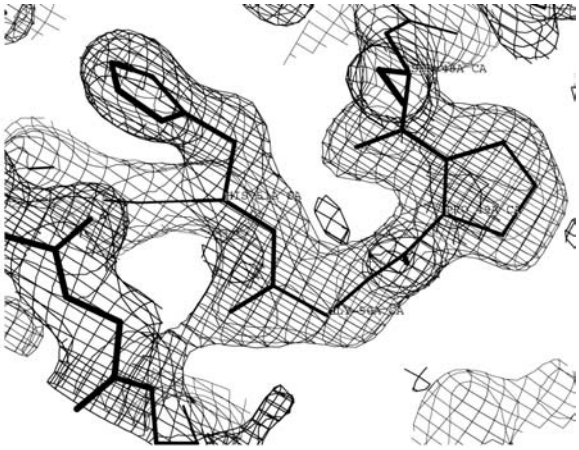
Γ Leu 28A – Glu 32A



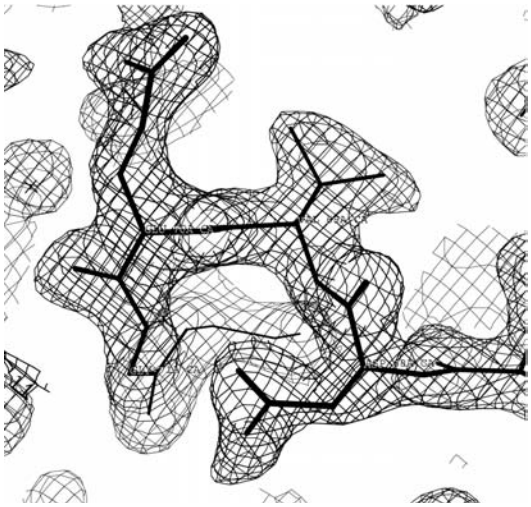
Δ Leu 36A – Glu 43A



Ε Ser 48A – His 51A

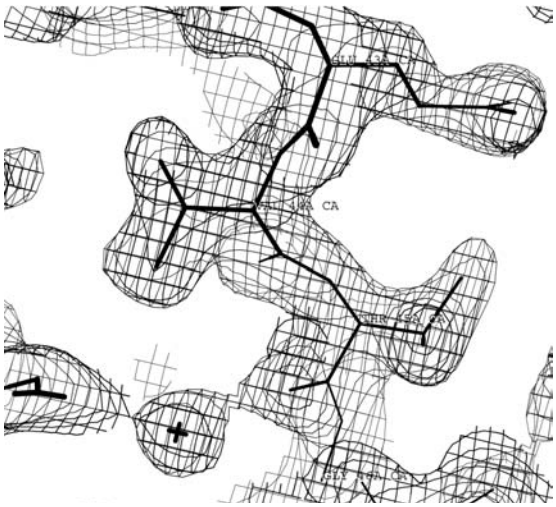


Ζ Asp 68A – Gly 71A

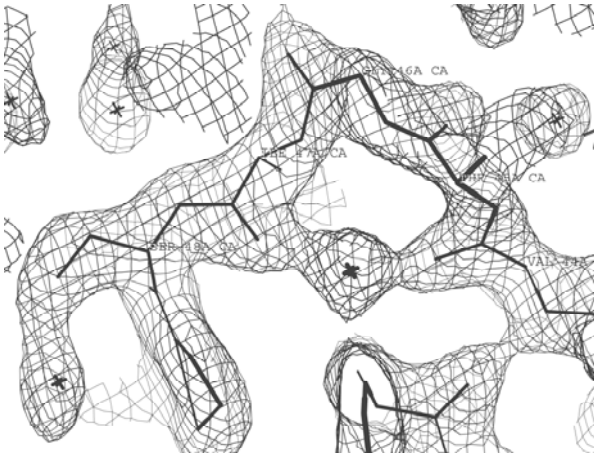


Εικόνα 6.9 (συνεχίζεται)

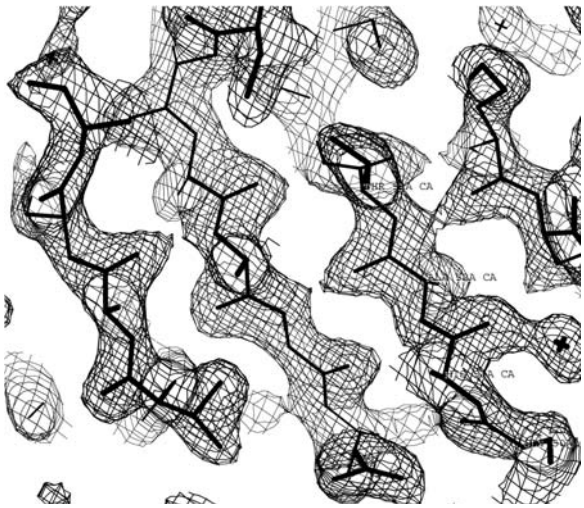
Η Glu 43A – Thr 45A



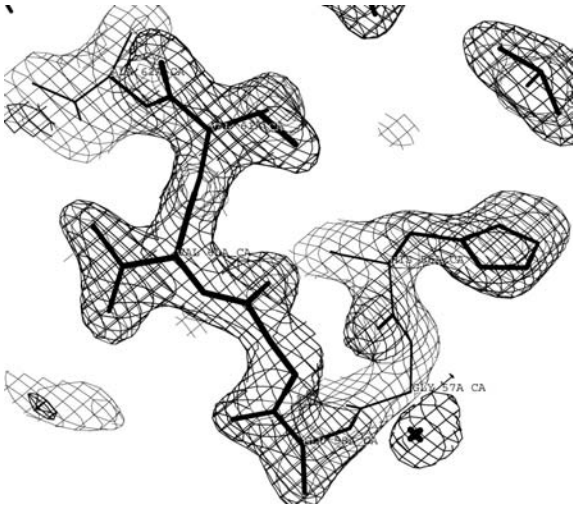
Θ Val 44A – Ser 48A



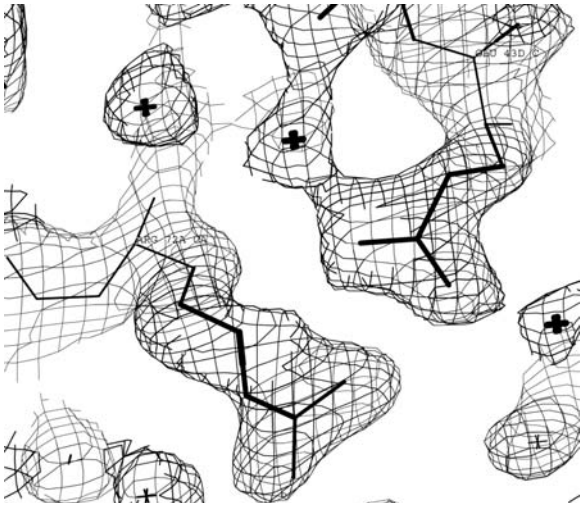
Ι Gly 50A – His 56A



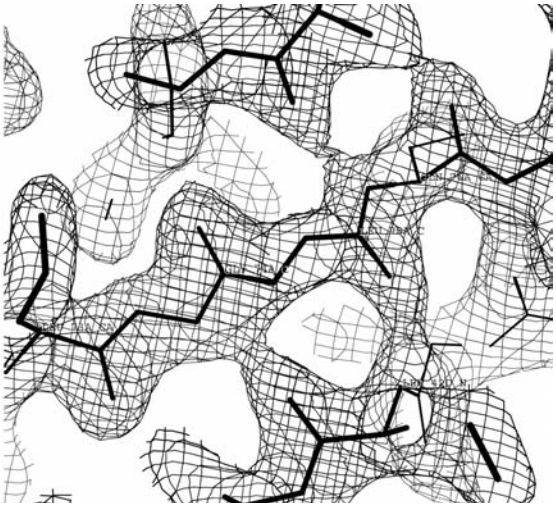
Κ His 56A – Ala 62A



Λ Arg 72A

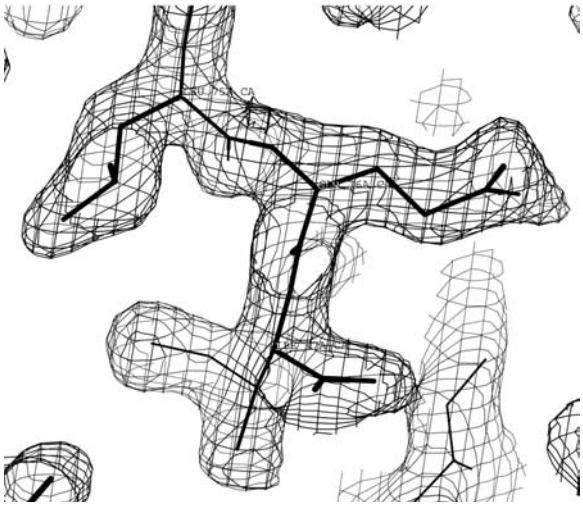


M Leu 73A – Gln 76A

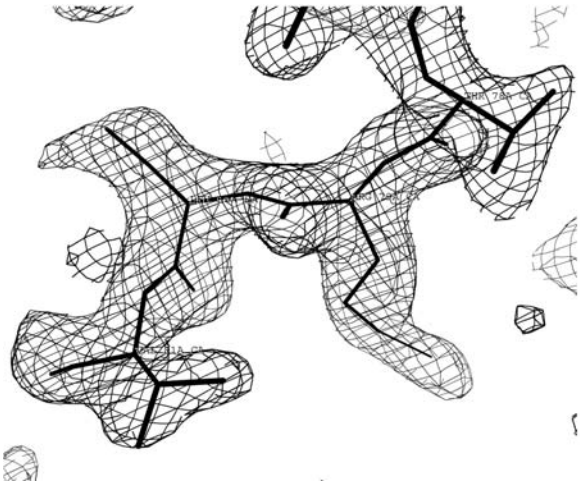


Εικόνα 6.9 (συνεχίζεται)

N Leu 75A – Ile 77A



Ξ Τέλος της αλυσίδας A



Εικόνα 6.9 Εικόνες από τον $2F_o$-F_c χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας της $HrcQ_B$-C κατά μήκος του μονομερούς A. Οι ισοϋψείς φέρονται στο 1σ. Έχει γίνει υπέρθεση του ατομικού μοντέλου. Οι εικόνες ετοιμάστηκαν με το πρόγραμμα μοριακών γραφικών Xfit.

Κεφάλαιο 7

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ $HrcQ_B$-C

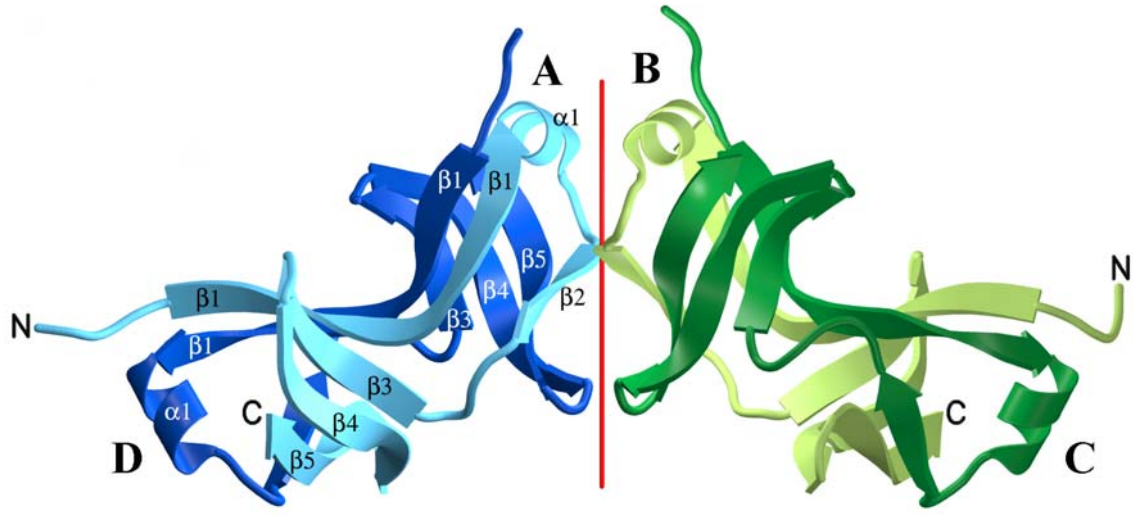
7.1 Σύντομη παρουσίαση της δομής της πρωτεΐνης $HrcQ_B$-C

Η κρυσταλλική δομή της $HrcQ_B$-C είναι ένα επίμηκες, ελαφρά κυρτωμένο ομοτετραμερές (εικόνα 7.1Α και Β) που σχηματίζεται ως ένα διμερές διμερών με κατά προσέγγιση διαστάσεις 25 x 30 x 90 $Å^3$. Τα τέσσερα μονομερή διαπλέκονται ανά δύο και σχηματίζουν δύο διμερή που πακετάρονται μαζί έτσι ώστε η γωνία μεταξύ των κύριων αδρανειακών τους αξόνων να είναι περίπου 120 μοίρες (εικόνα 7.1Α).

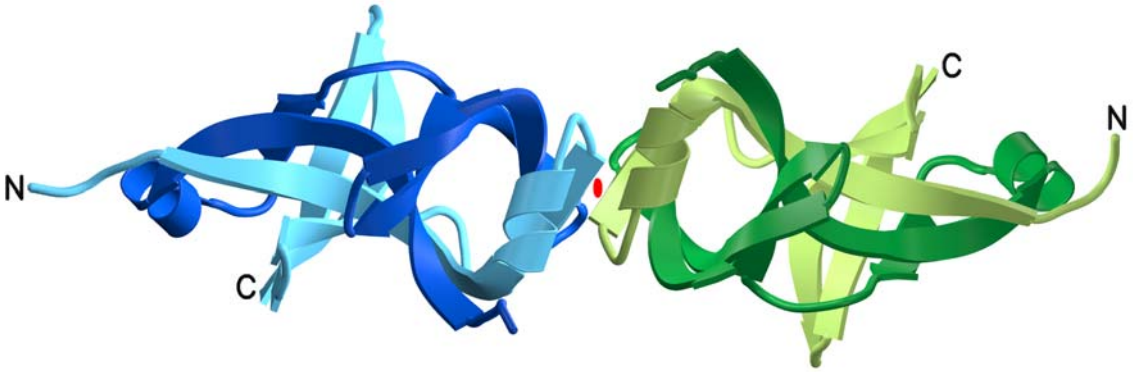
Η δομή αποτελείται από πέντε β-βαρέλια που σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των β-κλώνων των μονομερών. Κάθε μονομερές έχει μία α-έλικα και πέντε β-κλώνους που χαρακτηρίζονται από β1 έως β5 ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο. Η α-έλικα έχει μήκος έξι αμινοξέα και βρίσκεται αμέσως μετά τον β1-κλώνο. Για το σχηματισμό του διμερούς τα μονομερή αναδιπλώνονται συμμετρικά (εικόνα 7.1Γ) και συσχετίζονται μέσω πλήθους υδρογονικών δεσμών και μιας δισουλφιδικής γέφυρας. Έτσι, κάθε διμερές χαρακτηρίζεται από δύο αντιπαράλληλες, β-πτυχωτές επιφάνειες έξι β-κλώνων που κάθεμια αποτελεί ένα ανοιχτό βαρέλι. Για παράδειγμα το ένα από τα δύο βαρέλια του διμερούς A/D (εικόνα 7.1Α και Δ) αποτελείται από το τέλος της αλυσίδας β1 του Α, την αρχή της β1 του Β, τις αλυσίδες β3, β4, β5 του Β και την β2 του Α. Επιπλέον, μία μακριά β-ταινία (ribbon) που σχηματίζεται από όλο το μήκος των β1-κλώνων των Α και D μονομερών (ή αντίστοιχα των Β και C, εικόνα 7.1) διατρέχει

και σταθεροποιεί το διμερές με μια σειρά υδρογονικών δεσμών. Περίπου στο μέσο αυτής της β1-β1 ταινίας εντοπίζεται ο δισουλφιδικός δεσμός που είναι κρυμμένος στο εσωτερικό της δομής και έτσι παραμένει ανέπαφος στους κρυστάλλους ακόμα και παρουσία 10 mM DTT.

A

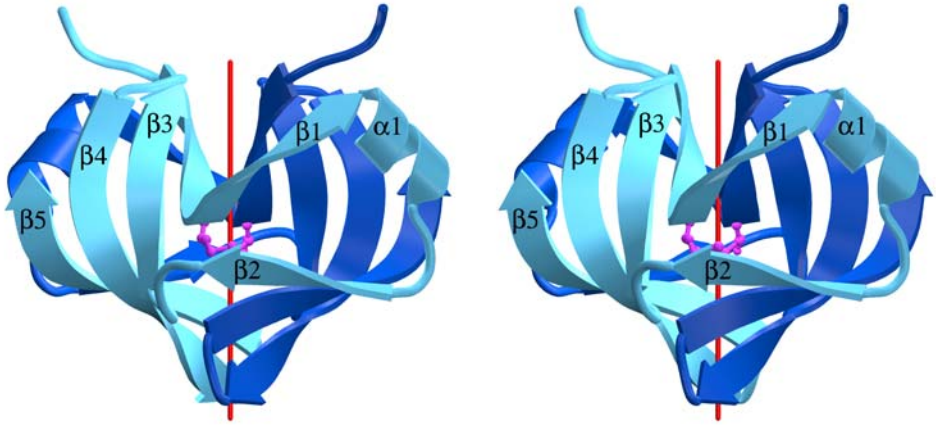


B



Εικόνα 7.1 (συνεχίζεται)

Γ



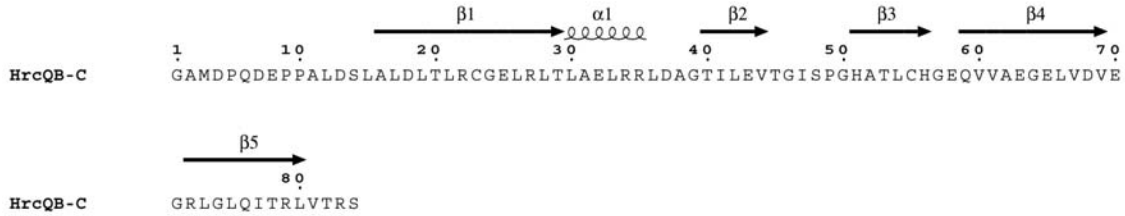
Δ

Εικόνα 7.1 Η δομή της $HrcQ_B$-C. Κάθε μονομερές παρουσιάζεται με διαφορετικό χρώμα. Σημειώνονται τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. **(Α)** Το τετραμερές της πρωτεΐνης με σημειωμένο (κόκκινη γραμμή) το διπλό άξονα μεταξύ των διμερών. **(Β)** Το τετραμερές έχει περιστραφεί 90º ως προς το (Α), ο αναγνώστης βλέπει κατά μήκος του διπλού άξονα. **(Γ)** Στερεοδιάγραμμα του διμερούς από μια θέση που κάνει εμφανή τη συμμετρία του. Ο τοπικός διπλός άξονας του διμερούς σημειώνεται με κόκκινη γραμμή. Με μωβ χρώμα και χωροπληρωτικό μοντέλο διακρίνονται στο εσωτερικό οι κυστεΐνες που σχηματίζουν το δισουλφιδικό δεσμό. **(Δ)** Το ανοιχτό β-βαρέλι που σχηματίζουν τα διμερή. Η εικόνα ετοιμάστηκε με τα προγράμματα MOLSCRIPT (Kraulis 1991) και Raster3D (Merritt & Murphy 1994).

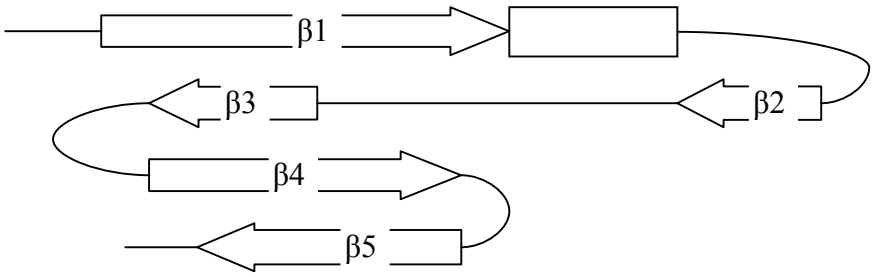
7.2 Περιγραφή και ανάλυση της δομής

Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής σε σύγκριση με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης παρουσιάζονται στην εικόνα 7.2Α. Το τοπολογικό διάγραμμα του μονομερούς παρουσιάζεται στην εικόνα 7.2 Β.

A



B



Εικόνα 7.2 Απόδοση στοιχείων δευτεροταγούς δομής στην αμινοξική αλληλουχία της $HrcQ_B$-C **(A)** και τοπολογικό διάγραμμα του μονομερούς **(B)**. Η ανάλυση δευτεροταγούς δομής έγινε με το πρόγραμμα Stride (Frishman & Argos 1995). Από τα 70 αμινοξέα που υπάρχουν στο τελικό, ατομικό μοντέλο το 8% ανήκει σε α-έλικα και το 60% σε β-πτυχωτή επιφάνεια. Η εικόνα στο (Α) δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα ESPript (Gouet *et al.*, 1999).

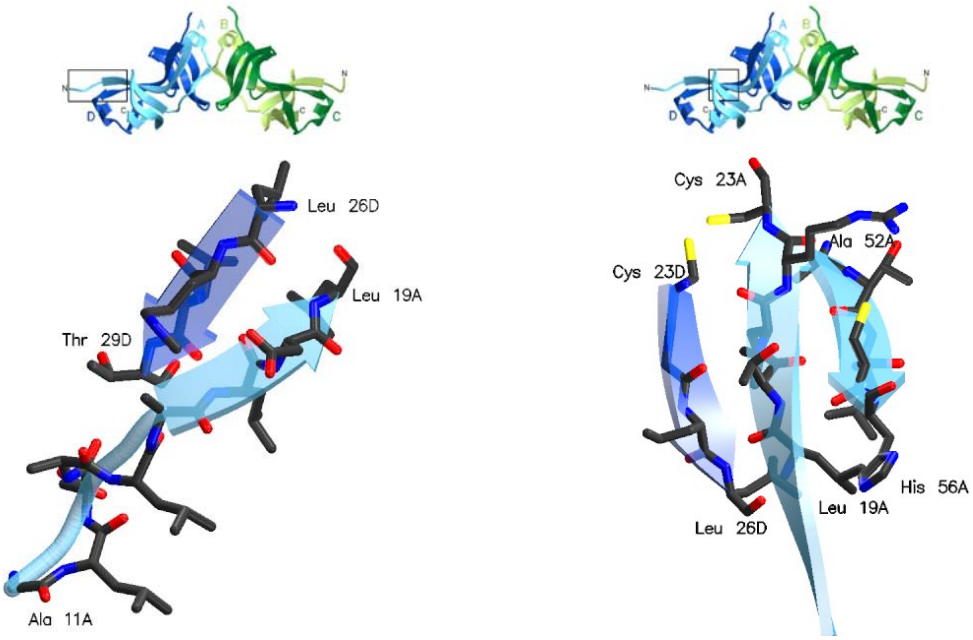
Στη συνέχεια περιγράφουμε και αναλύουμε τη δομή ακολουθώντας τη διαδρομή του μονομερούς Α. Πιθανές διαφορές με τις υπόλοιπες πεπτιδικές αλυσίδες αναφέρονται στα αντίστοιχα σημεία. Η ονομασία που χρησιμοποιείται για να μονομερή είναι συμβατή με την εικόνα 7.1. Τα ζεύγη των διμερών είναι τα A/D και B/C.

Ala 11 (Pro 10) – Leu 15. Στα μονομερή A, B και C το πρώτο αμινοξύ για το οποίο υπάρχει ηλεκτρονική πυκνότητα είναι η Ala 11 ενώ στο μονομερές D είναι η Pro 10. Το τμήμα

Ala 11 (Pro 10) – Leu 15 είναι εντελώς εκτεθειμένο στο διαλύτη και σχηματίζει μια ανοικτή ελίκωση (εικόνα 7.3Α) που στα μονομερή C και D υπακούει στη διαμόρφωση μιας 3_{10} έλικας.

Ala 16 – Thr 29. Ακολουθεί ο πρώτος και πιο εκτεταμένος β-κλώνος (β1-κλώνος) της δομής μήκους 14 αμινοξέων (Ala 16 – Thr 29). Δημιουργείται από ένα πλήθος υδρογονικών δεσμών ανάμεσα στα αντίστοιχα τμήματα των δύο μονομερών του κάθε διμερούς (εικόνες 7.1, 7.3 Α και Β).

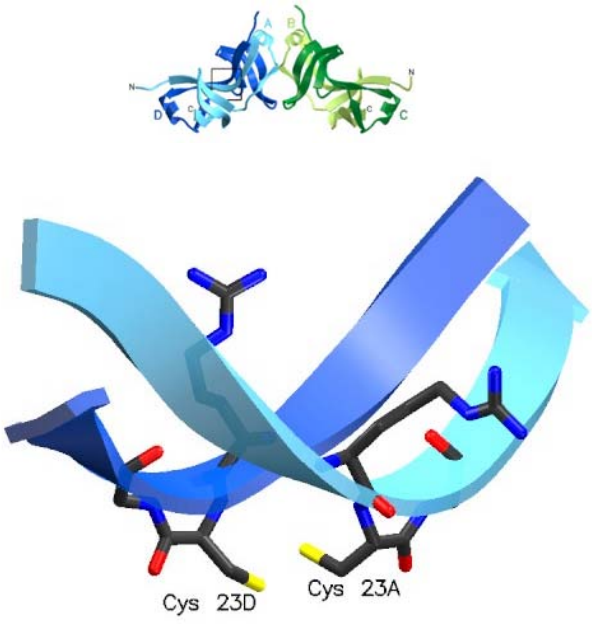
A **B**



Εικόνα 7.3 (Α) Παρουσιάζεται η αρχή της πεπτιδικής αλυσίδας. Τα αμινοξέα Ala 11 – Leu 15 (μονομερές Α) που είναι τα πρώτα αμινοξέα του μοντέλου και βρίσκονται εκτεθειμένα στον διαλύτη, σχηματίζουν μια ελίκωση. Από την Ala 16 ξεκινά ο πρώτος β-κλώνος της δομής (β1-κλώνος) που σχηματίζεται από αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα του δεύτερου μονομερούς (μονομερές D). **(Β)** Από τη Leu 19 ο β1-κλώνος αλληλεπιδρά παράλληλα και με τον β3-κλώνο από ανήκει στο ίδιο μονομερές (μονομερές Α). Στο επάνω μέρος της κάθε εικόνας παρουσιάζεται ολόκληρο το τετραμερές και το πλαίσιο εντοπίζει την περιοχή του μορίου από όπου προέρχονται οι μεγενθυμένες εικόνες.

Η Cys 23 που βρίσκεται στο μέσο του β1-κλώνου (είναι το όγδοο αμινοξύ του κλώνου) σχηματίζει έναν δισουλφιδικό δεσμό με την Cys 23 του μονομερούς D (αντίστοιχα η Cys 23 του

μονομερούς B με την Cys 23 του C, εικόνα 7.4). Ο δεσμός αυτός δεν υιοθετεί καμιά από τις δυο κυρίαρχες διαμορφώσεις των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες -το λεγόμενο 'δεξιόστοφο αγκίστρι' ή το 'αριστερόστροφο σπειροειδές', (Χαμόδρακας 1993). Οι τιμές των χαρακτηριστικών δίεδρων γωνιών, χ_3, χ_2 και χ_2' (όπου χ_3 η δίεδρη γωνία γύρω από το δεσμό S-S και χ_2, χ_2'οι γωνίες γύρω από τους δύο δεσμούς Cβ-S) και η απόσταση μεταξύ των Cα των κυστεϊνών παρουσιάζονται στον πίνακα 7.1. Η σπάνια διαμόρφωση του δισουλφιδικού δεσμού πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι γειτονεύει εκατέρωθεν με δύο β-διογκώσεις κλασσικού τύπου (Χαμόδρακας 1993) στη θέση της Leu 21A και της Leu 21D. Συγκεκριμένα, υπάρχουν δύο διαδοχικά κατάλοιπα του μονομερούς A, η Cys 23 και Gly 24 που αλληλεπιδρούν μέσω υδρογονικών δεσμών με το ίδιο κατάλοιπο, τη Leu 21 του μονομερούς D. Κατ' αναλογία η Cys 23 και η Gly 24 του μονομερούς D αλληλεπιδρούν με τη Leu 21 του μονομερούς A. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη στροφή του επιπέδου των πεπτιδικών αλυσίδων και την αλλαγή της διεύθυνσης της β1-β1 ταινίας εκατέρωθεν της δισουλφιδικής γέφυρας (εικόνα 7.1 Γ, 7.4).



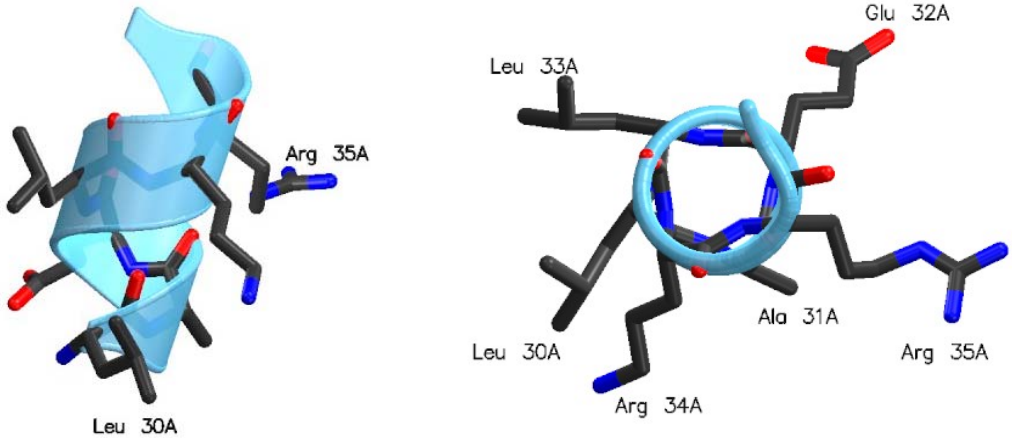
Εικόνα 7.4 Παρουσιάζεται το τμήμα Arg 22-Cys 23-Gly 24 στο μέσο του β1-κλώνου. Οι σουλφιδικές ομάδες είναι πλήρως κρυμμένες στο εσωτερικό της δομής.

Πίνακας 7.1 Γεωμετρία των δισουλφιδικών δεσμών της $HrcQ_B$-C σε σύγκριση με τις δύο συχνότερες διαμορφώσεις αυτού του δεσμού.

	Γεωμετρία S-S δεσμών			
	$HrcQ_B$-C (A/D)	**$HrcQ_B$-C (B/C)**	**Δεξιόστροφο αγκίστρι**	**Αριστερόστροφο σπειροειδές**
dCα-Cα (Å)	6	6	5	6.1
χ_3 (μοίρες)	85.4	83.3	90	-90
χ_2 (μοίρες)	85.2	89.4	120	-90
χ_2' (μοίρες)	-164.1	-159.4	-50	-90

Leu 30 – Arg 35. Αμέσως μετά τον β1-κλώνο ακολουθεί η μόνη α-έλικα της δομής (εικόνα 7.5 Α και Β). Σχηματίζεται από τα αμινοξέα Leu 30-Ala 31-Glu 32-Leu 33-Arg 34-Arg 35 και έχει μήκος 1½ στροφή. Όπως γίνεται φανερό από την εναλλαγή υδρόφοβων/υδρόφιλων αμινοξέων είναι μερικώς εκτεθειμένη στο διαλύτη με τη μια πλευρά στραμμένη στο εσωτερικό της δομής και την άλλη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Το τμήμα Ala 11-Leu 15 του άλλου μονομερούς (D) και ιδιαίτερα τα αμινοξέα Asp 13 και Ser 14 λειτουργούν ως κάλυμα (καπάκι) του υδρόφοβου άκρου (Leu 30, Ala 31) της έλικας. Το άλλο άκρο είναι υδρόφιλο με τις Arg 34 και Arg 35 πλήρως εκτεθειμένες στο διαλύτη να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν το τετραμερές όπως θα αναλυθεί σε άλλο σημείο της παραγράφου.

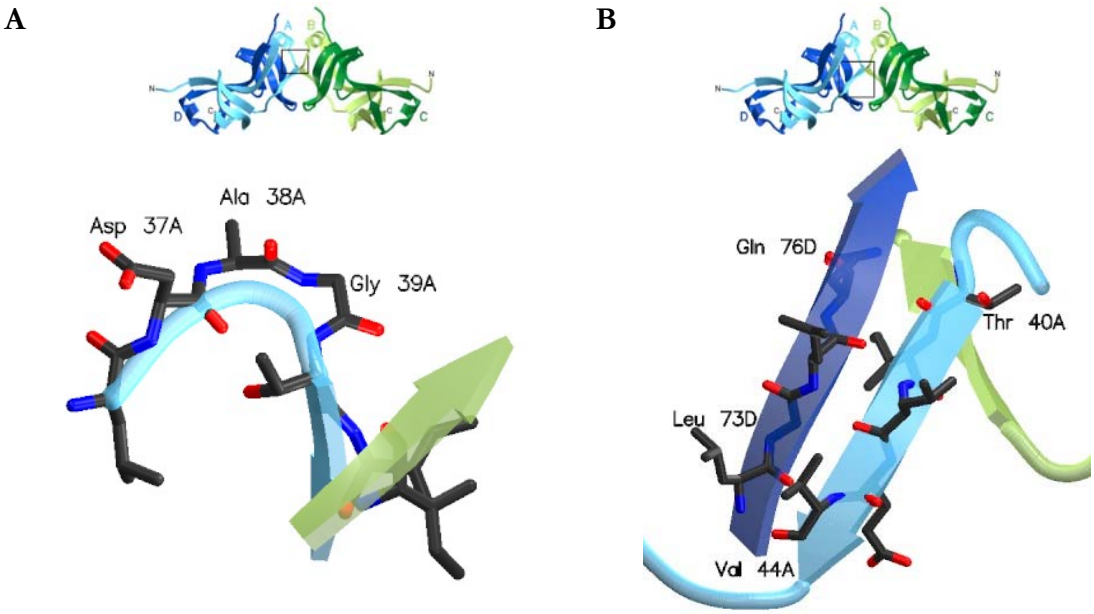
A **B**



Εικόνα 7.5 Δύο όψεις της μόνης α-έλικας της δομής. **(Α)** Εικόνα της έλικας από το πλάι. **(Β)** Προβολή ελικοειδούς τροχού (helical wheel). Η πλειοψηφία των υδρόφοβων αμινοξέων συγκεντρώνεται στη μια και τα υδρόφιλα αμινοξέα συγκεντρώνονται στην άλλη πλευρά της έλικας.

Leu 36 – Gly 50. Μια στροφή τύπου ΙΙ (Asp 37 – Thr 40, εικόνα 7.6 Α) συνδέει την α-έλικα με το επόμενο στοιχείο δευτεροταγούς δομής που είναι ο β2-κλώνος (Thr 40 – Val 44, εικόνα 7.6 Β). Είναι ο μόνος β-κλώνος που δεν συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις (π.χ. δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) με αμινοξέα του μονομερούς στο οποίο ανήκει (εικόνα 7.1 Α).

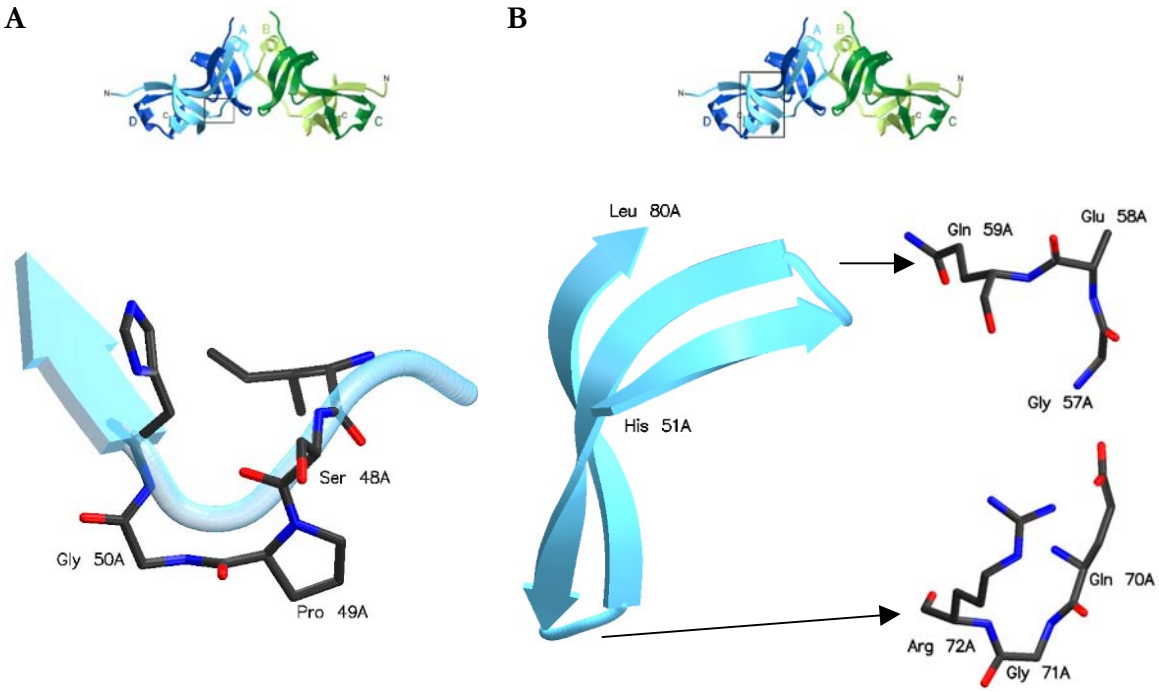
Τα αμινοξέα Thr 45 – Ile 47 υιοθετούν τυχαία διαμόρφωση (coil) ενώ τα αμινοξέα Ser 48 – His 51 υπακούουν στη γεωμετρία στροφής τύπου ΙΙ στην οποία συμμετέχει η μόνη προλίνη που βρίσκεται στο εσωτερικό της δομής (εικόνα 7.7Α).



Εικόνα 7.6 (Α) Παρουσιάζεται η στροφή που μεσολαβεί μεταξύ της α-έλικας και του β2-κλώνου. **(Β)** Παρουσιάζεται το πλήρες μήκος του β2-κλώνου (γαλάζιο). Όπως φαίνεται στο (Β), ο β2-κλώνος αλληλεπιδρά κυρίως με τον κλώνο β5 του μονομερούς D (σκούρο μπλε). Μέσω υδρογονικών δεσμών στους οποίους συμμετέχει η κύρια αλυσίδα της Ile 41 αλληλεπιδρά και με τον κλώνο β2 του μονομερούς Β (κίτρινο) όπως φαίνεται καθαρά στο (Α). Περισσότερες λεπτομέρειες για τις αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν το τετραμερές αναφέρονται στη συνέχεια.

His 51 – Leu 80. Ακολουθούν τρεις διαδοχικοί κλώνοι (εικόνα 7.7Β). Είναι οι β3 (His51 έως His56), β4 (Gln59 έως Val69) και β5 (Arg72 έως Leu80). Τα στοιχεία αυτά αποτελούν ένα β-μαίανδρο δηλαδή μια β-πτυχωτή επιφάνεια που απαρτίζεται από τρεις αντιπαράλληλους β-κλώνους που συνδέονται από δύο β-στροφές. Το πρώτο μισό αυτής της δομής αποτελείται από το πλήρες μήκος του β3 κλώνου και το πρώτο ήμισυ του β4 κλώνου

(Glu 59 – Glu 65). Η μεταξύ τους στροφή (His 56 – Gln 59, εικόναν 7.7B) είναι τύπου ΙΙ΄. Το δεύτερο μισό του β-μαίανδρου αποτελείται από το τμήμα Ala 62 – Val 69 του β4 κλώνου και το πλήρες μήκος του β5. Η μεταξύ τους στροφή (Val 69 – Arg 72, εικόνα 7.7B) είναι τύπου Ι΄.



Εικόνα 7.7 (A) Παρουσιάζεται η στροφή που προηγείται του β3 κλώνου. Στη στροφή αυτή συμμετέχει η μόνη προλίνη που υπάρχει στο εσωτερικό της δομής. **(B)** Παρουσιάζεται ο β-μαίανδρος που απαρτίζεται από τους κλώνους β3, β4 και β5. Οι κλώνοι αυτοί ακολουθούν διαδοχικά αντιπαράλληλες διαδρομές και σχηματίζουν μια δεξιά στραμμένη πτυχωτή επιφάνεια. Στα δεξιά παρουσιάζονται αναλυτικά οι στροφές που συμμετέχουν στη δομή του β-μαίανδρου.

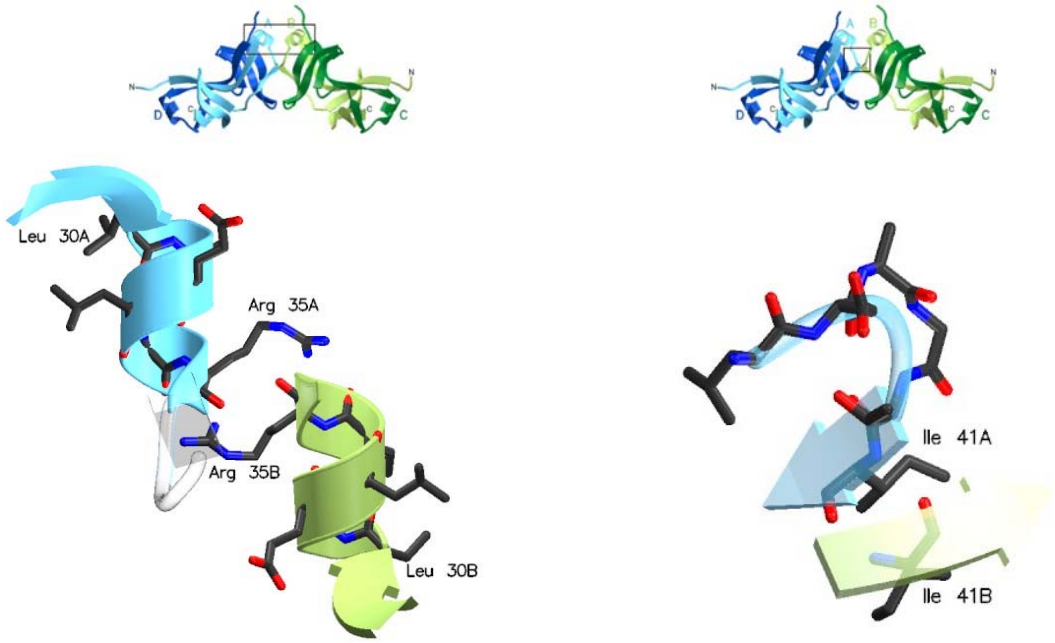
Το τελευταίο αμινοξύ για το οποίο υπάρχει ηλεκτρονική πυκνότητα στο χάρτη είναι η Val 81 για τα μονομερή A, B και C και η Thr 82 για το μονομερές D.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονομερών παρουσιάζονται στον πίνακα B.1 του παραρτήματος B ενώ στον πίνακα B.2 παρουσιάζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διμερών στη μεσεπιφάνεια του τετραμερούς.

Η μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο διμερών διακρίνεται σε ένα αντιπαράλληλο, β-βαρέλι έξι αλυσίδων (εικόνα 7.1A, 7.8) και σε μία περιοχή όπου λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων της α-έλικας (εικόνα 7.9A). Το β-βαρέλι σχηματίζεται από τις β2 αλυσίδες των μονομερών A και B και μέρος των β4 και β5 αλυσίδων των C και D. Ειδικότερα, υδρογονικοί δεσμοί σχηματίζονται ανάμεσα στις κάρβονυλο και άμινο ομάδες του Asp68 του

μονομερούς A με το Glu70 του D, του Glu70 του A με το Asp68 του D και της Ile41 του B με την Ile41 του C (εικόνα 7.9B).

Εικόνα 7.8 Παρουσιάζεται το β-βαρέλι που σχηματίζεται στη μεσεπιφάνεια του τετραμερούς. Συμμετέχουν και τα τέσσερα μονομερή.



Εικόνα 7.9 (A) Οι δύο α-έλικες συμμετέχουν στη δημιουργία της μεσεπιφάνειας του τετραμερούς μέσω υδρογονικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των Arg35. **(B)** Άποψη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των Ile41 στη μεσεπιφάνεια του τετραμερούς.

Η πιο χαρακτηριστική από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων των α-ελίκων είναι οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα σε άτομα της πλευρικής ομάδας της Arg35 του μονομερούς A με άτομα της κύριας αλυσίδας (καρβονύλιο) της Arg34 του B (εικόνα 7.9A).

Η συνολική επιφάνεια που 'κρύβεται' στο εσωτερικό της δομής μέσω της αλληλεπίδρασης διμερούς-διμερούς κατά το σχηματισμό του τετραμερούς είναι ~1200 $Å^2$ όπως υπολογίστηκε με το πρόγραμμα SURFACE της CCP4 (Chothia 1975). Το σχετικά μεγάλο εμβαδό της επιφάνειας που κρύβεται κατά το σχηματισμό του τετραμερούς και η παρουσία των υδρογονικών δεσμών υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η πρωτεΐνη είναι τετραμερές σε διάλυμα. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας του τετραμερούς και τη σύγκριση της με αποτελέσματα από στήλη μοριακής διήθησης. Έτσι, η υδροδυναμική ακτίνα της πρωτεΐνης σε διάλυμα όπως εκτιμήθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι ~28 Å. Η τιμή αυτή ταιριάζει πολύ καλά με την τιμή των 29.1 Å που υπολογίστηκε από την κρυσταλλική δομή του τετραμερούς με το πρόγραμμα HYDROPRO (García de la Torre *et al.*, 2000).

7.3 Σύγκριση της δομής με προβλέψεις

Η ανάλυση του προτύπου των υδρογονικών δεσμών και της γεωμετρίας των Cα που έγινε με το πρόγραμμα Stride (Frishman & Argos, 1995) απέδωσε στο τελικό, ατομικό μοντέλο τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.2. Για σύγκριση παρουσιάζουμε στον ίδιο πίνακα τα στοιχεία από την ανάλυση του FTIR φάσματος της πρωτεΐνης (σελ 91).

Πίνακας 7.2 Παρουσίαση της δευτεροταγούς δομής της $HrcQ_B$-C και σύγκριση με την ανάλυση του FTIR φάσματος της πρωτεΐνης.

Στοιχεία δευτεροταγούς δομής	**% ποσοστό δευτεροταγούς δομής**	
	Πειραματικά προσδιορισμένη δομή (αλυσίδα C, stride)	Απόδοση στοιχείων δευτεροταγούς δομής από την ανάλυση του FTIR φάσματος
α-έλικα	8.3	6
β-πτυχωτή επιφάνεια	59.7	44
3_{10}-έλικα	5.6	5
στροφή	15.3	38
τυχαία δομή	9.7	7

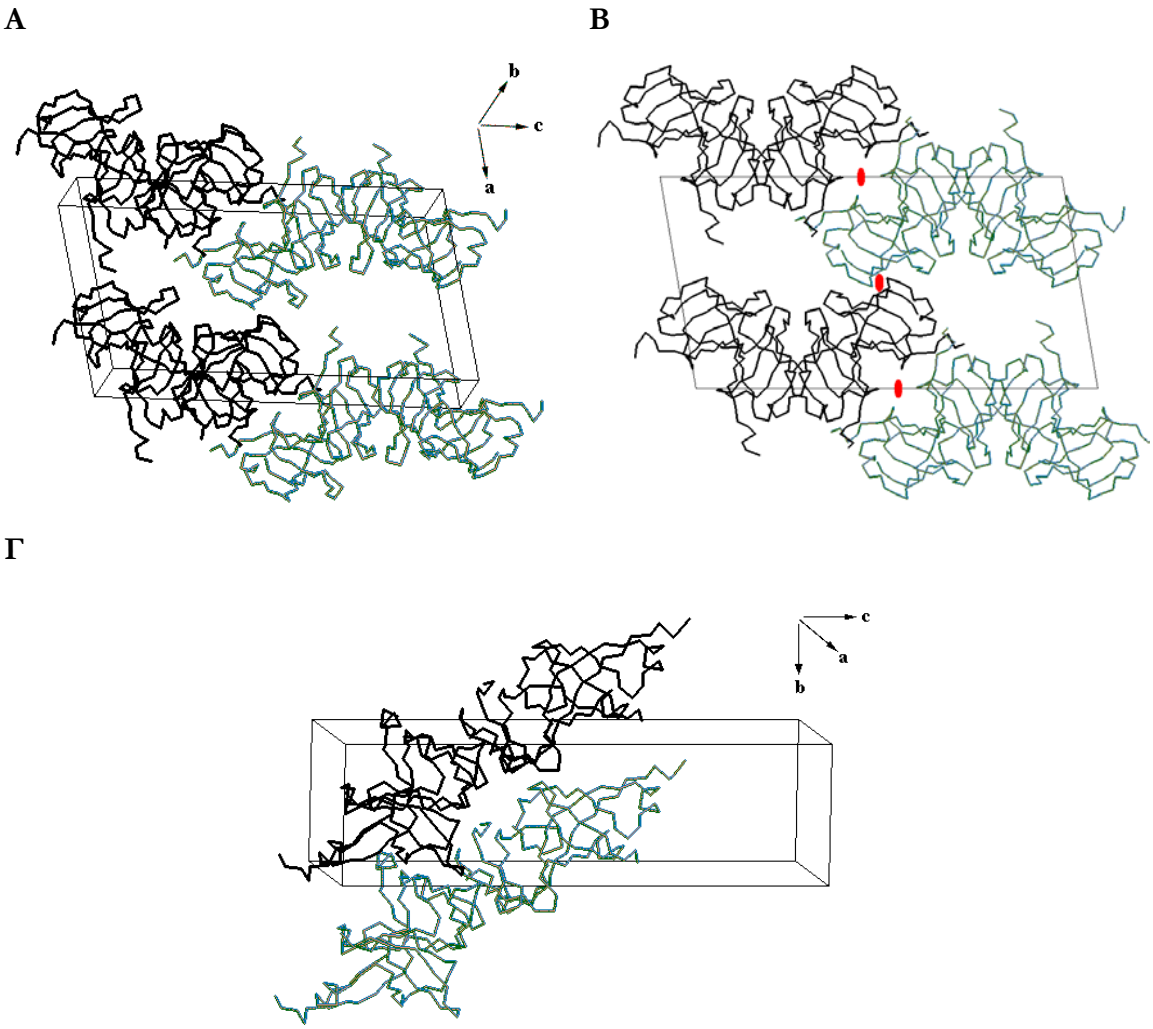
Στην εικόνα 7.10 παρουσιάζεται η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής που είχε κάνει το πρόγραμμα PSIpred (Jones, 1999) για την $HrcQ_B$-C. Το ποσοστό επιτυχούς πρόγνωσης ανέρχεται στο 77.7%. Έτσι, στη θέση της πρώτης προβλεπόμενης α-έλικας (Pro11-Ser14) στην πραγματική δομή υπάρχει μια 3_{10}-έλικα (αλυσίδες C και D) ή μια ανοιχτή ελικοειδής διαμόρφωση (αλυσίδες A και B). Η προβλεπόμενη β-αλυσίδα από Asp18 έως Cys23 αντιστοιχεί στη β1-αλυσίδα (Ala16 έως Thr29), η δεύτερη προβλεπόμενη α-έλικα από Leu30 έως Arg34 αντιστοιχεί στην α-έλικα (Leu30 έως Arg35), η προβλεπόμενη β-αλυσίδα από Ile41 έως Glu43 αντιστοιχεί στη β2-αλυσίδα (Thr40 έως Val44), η προβλεπόμενη β-αλυσίδα από Ala52 έως His56 αντιστοιχεί στη β3-αλυσίδα (His51 έως His56), η προβλεπόμενη β-αλυσίδα από Gln59 έως Val69 αντιστοιχεί στη β4-αλυσίδα (Gln59 έως Val69) και η προβλεπόμενη β-αλυσίδα από Leu75 έως Arg79 αντιστοιχεί στη β5-αλυσίδα (Arg72 έως Leu80). Υπάρχει πλήρης σύμπτωση στην πρόβλεψη της β4-αλυσίδας ενώ τα στοιχεία α και β3 προβλέπονται με απόκλιση ενός μόνο αμινοξέως.

Εικόνα 7.10 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της $HrcQ_B$-C με το πρόγραμμα PSIpred (Jones, 1999).

7.4 Πακετάρισμα των μορίων στον κρύσταλλο και πώς η δομή ερμηνεύει τη συνάρτηση αυτοπεριστροφής

Οι κρύσταλλοι της $HrcQ_B$-C που μελετήσαμε, προέρχονται από την επανάληψη μιας μονοκλινούς στοιχειώδους κυψελίδας που περιέχει οκτώ πρωτεϊνικά μόρια δηλαδή δύο τετραμερή. Η οργάνωση των τετραμερών γίνεται κατά τρόπο που υπακούει στην ύπαρξη ενός διπλού άξονα περιστροφής με μετάθεση.

Στην εικόνα 7.11 παρουσιάζεται η στοιχειώδης κυψελίδα από διαφορετικές οπτικές γωνίες και ο τρόπος που τα τετραμερή διευθετούνται μέσα σε αυτήν.



Εικόνα 7.11 Η στοιχειώδης κυψελίδα των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C. Η κατεύθυνση των κρυσταλλογραφικών αξόνων δίνεται στην πάνω, δεξιά γωνία των (Α) και (Γ). **(Α)** Διευθέτηση τεσσάρων τετραμερών στο χώρο. Οι άξονες a, c βρίσκονται στο επίπεδο της σελίδας ενώ ο b έχει φορά προς το

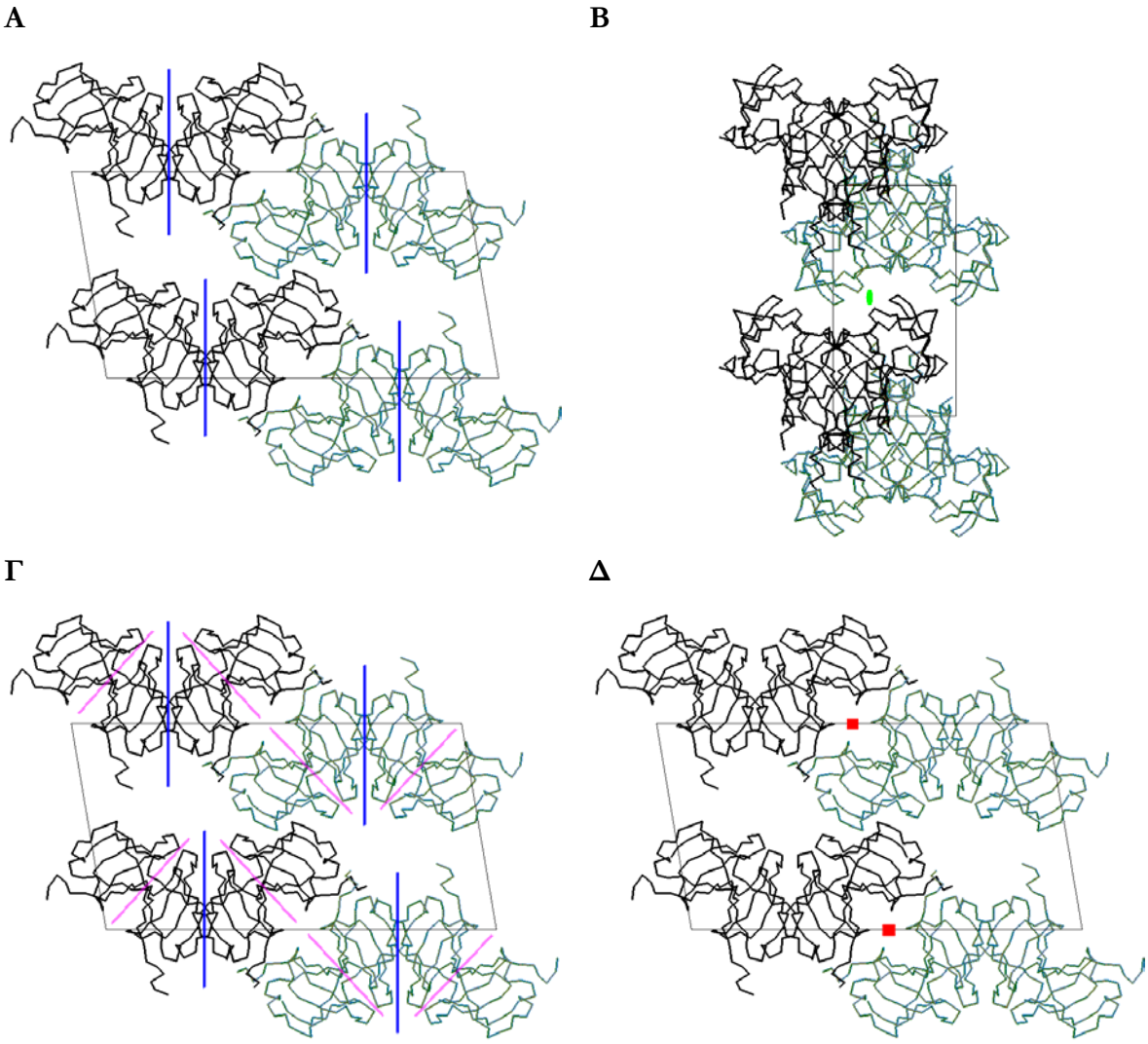
εσωτερικό της σελίδας (απομακρύνεται από τον αναγνώστη). **(Β)** Η κυψελίδα έχει περιστραφεί ως προς το (Α) έτσι ώστε ο άξονας b να είναι κάθετος στο επίπεδο του χαρτιού με φορά που να απομακρύνεται από τον αναγνώστη. Σημειώνονται οι τάξεως 2 κρυσταλλογραφικοί άξονες περιστροφής με μετάθεση που συνδέουν ανά δύο τα τετραμερή. Ξεκινώντας από οποιοδήποτε από αυτά τα τετραμερή μπορούμε να παράγουμε όλα τα υπόλοιπα περιστρέφοντας κατά 180° και στη συνέχεια μεταθέτοντας κατά ½ του άξονα y της στοιχειώδους κυψελίδας. **(Γ)** Παρουσιάζεται ο τρόπος που πακετάρονται δύο τετραμερή που ανήκουν σε γειτονικές στοιχειώδεις κυψελίδες. Οι άξονες b και c βρίσκονται στο επίπεδο του χαρτιού ενώ ο a έχει φορά προς τον αναγνώστη.

Στον πίνακα Β.3 του παραρτήματος Β παρουσιάζονται οι κρυσταλλικές επαφές μεταξύ μορίων που συνδέονται με την πράξη συμμετριας –X, Y+1/2, -Z (περιστροφή 180° και μετάθεση παράλληλα στον άξονα b κατά ½ του μήκους του) ενώ στον πίνακα Β.4 παρουσιάζονται οι κρυσταλλικές επαφές μεταξύ μορίων που συνδέονται από μετάθεση παράλληλα στον άξονα b κατά 1 μονάδα του μήκους του (X, Y+1, Z).

Γνωρίζοντας τον τρόπο που τα μόρια πακετάρονται στον κρύσταλλο, θα επιχειρήσουμε στη συνέχεια να ερμηνεύσουμε τη συνάρτηση αυτοπεριστροφής από τη δομή. Στην εικόνα 7.12 (Α, Β, Γ, Δ) παρουσιάζεται η στοιχειώδης κυψελίδα με τέσσερα τετραμερή τοποθετημένα σε αυτήν και τους μη-κρυσταλλογραφικούς άξονες σημειωμένους στις κατάλληλες θέσεις. Στις εικόνες 7.7Ε και Ζ παρουσιάζονται για υπενθύμιση και άμεση σύγκριση οι τομείς για κ=180° και κ=90° αντίστοιχα, της συνάρτησης αυτοπεριστροφής.

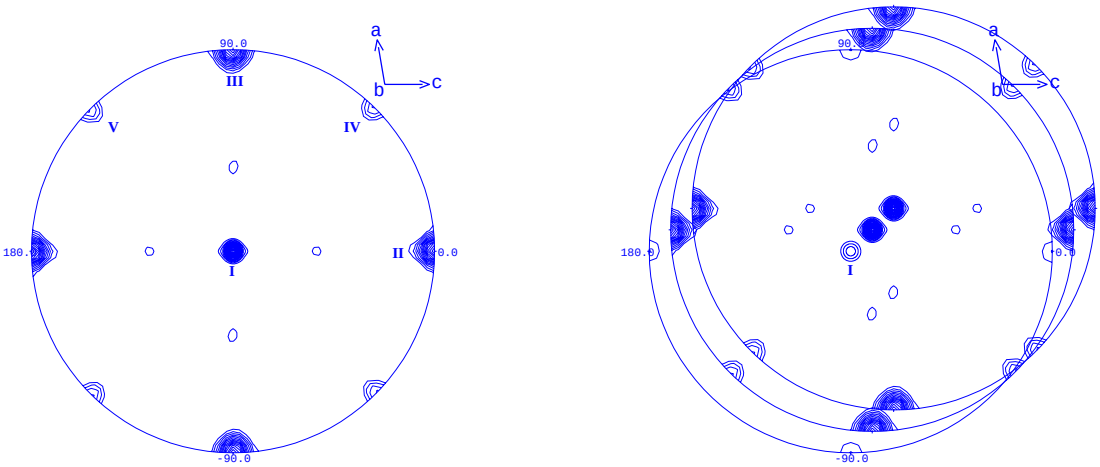
Ο κρυσταλλογραφικός διπλός άξονας περιστροφής με μετάθεση είναι παράλληλος στον b (όπως φαίνεται στην εικόνα 7.11Β) και δημιουργεί το ισχυρότερο μέγιστο της συνάρτησης αυτοπεριστροφής για κ=180°, που ονομάζουμε Ι στην εικόνα 7.12Ε. Κάθε τετραμερές έχει έναν τοπικό διπλό άξονα περιστροφής που συσχετίζει μεταξύ τους τα διμερή (εικόνα 7.12Α). Αυτό το στοιχείο συμμετρίας είναι κάθετο στους άξονες b και c και δημιουργεί το μέγιστο που ονομάζουμε ΙΙΙ στην εικόνα 7.12Ε. Κοιτώντας κατά μήκος του c (εικόνα 7.12Β) παρατηρούμε την ύπαρξη ακόμα ενός τοπικού διπλού άξονα παράλληλου στον c. Μπορούμε να αποδώσουμε το μέγιστο ΙΙ της εικόνας 7.12Ε στο στοιχείο αυτό. Υπάρχουν ακόμα δύο (για κάθε τετραμερές) διπλοί άξονες που συνδέουν τα μονομερή του κάθε διμερούς (εικόνα 7.12Γ). Οι άξονες αυτοί διευθετούνται μεταξύ τους σχεδόν ανά 90° και σχεδόν 45° ως προς τον τοπικό άξονα του τετραμερούς. Τα χαρακτηριστικά αυτά ταιριάζουν με τη θέση των μεγίστων IV και V της εικόνας 7.12Ε. Τέλος στην εικόνα 7.12Δ σημειώνεται ένας χαμηλής συμμετρίας τετραπλός

άξονας παράλληλος στο b που μπορεί να ερμηνεύσει το χαμηλής έντασης μέγιστο (I) της εικόνας 7.12Z.



Εικόνα 7.12 (συνεχίζεται)

E **Z**



Εικόνα 7.12 Η μη-κρυσταλλογραφική συμμετρία των κρυστάλλων της $HrcQ_B$-C και η ερμηνεία της συνάρτησης αυτοπεριστροφής. Στις εικόνες (Α), (Γ) και (Δ) ο άξονας b είναι κάθετος στο επίπεδο του χαρτιού με διέθυνση προς τον αναγνώστη. Στην (Β) ο αναγνώστης κοιτά κατά μήκος του άξονα c. Λεπτομέρειες αναφέρονται στο κείμενο.

Κεφάλαιο 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Η πρωτεΐνη $HrcQ_B$, συστατικό του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού

Η $HrcQ_B$ είναι μια μικρή υδρόφιλη πρωτεΐνη, μέλος του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού της *P. syringae* pv. phaseolicola. Ομόλογες πρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε όλα τα τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα και στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου. Το γεγονός αυτό κατατάσσει την $HrcQ_B$ στο λεγόμενο συντηρημένο πυρήνα της μηχανής. Είναι χαρακτηριστικό ότι η συντήρηση εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στα 80 περίπου τελευταία κατάλοιπα (Hueck 1998).

Η $HrcQ_B$ συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μέλη του συστήματος. Συγκεκριμένα έχει δειχτεί ότι (Ταμπακάκη 1999): (i) Η $HrcQ_B$ αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη $HrcQ_A$ που είναι μια μη-συντηρημένη πρωτεΐνη του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος της *P. syringae* pv. phaseolicola. Επιπλέον, μόνο το καρβοξυτελικό τμήμα της $HrcQ_A$ φαίνεται να εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με την $HrcQ_B$. (ii) Η $HrcQ_B$-C (τα 79 κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης) διατηρεί την ικανότητα της ολόκληρης πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την $HrcQ_A$.

Σε πειράματα που έγιναν με σκοπό τον υποκυτταρικό εντοπισμό των $HrcQ_B$ και $HrcQ_A$ η πρώτη βρέθηκε στο κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό κλάσμα ενώ η δεύτερη αποκλειστικά στο μεμβρανικό (Ταμπακάκη 1999). Τα αποτελέσματα αυτά με δεδομένη την

αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών μπορούν να ερμηνευτούν αν θεωρήσουμε ότι η $HrcQ_B$ βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και η επαφή της με την εσωτερική μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων με την μεμβρανική $HrcQ_A$. Η υπόθεση αυτή συμφωνεί με τον υδρόφιλο χαρακτήρα της $HrcQ_B$ και με την πρόβλεψη ύπαρξης διαμεμβρανικών περιοχών στην $HrcQ_A$ (Ταμπακάκη 1999). Από τα παραπάνω φαίνεται πολύ πιθανό η $HrcQ_B$ να βρίσκεται στην κυτταροπλασματική είσοδο της εκκριτικής μηχανής.

Η $HrcQ_B$ δεν έχει μελετηθεί συστηματικά με αποτέλεσμα η λειτουργία της να μην έχει αποσαφηνιστεί. Παρόλα αυτά, μπορούν να προταθούν διάφοροι ρόλοι, δομικοί και λειτουργικοί, με βάση τη θέση της, την υψηλή της συντήρηση, τον εντοπισμό της συντήρησης στο καρβοξυτελικό τμήμα και την ομοιότητα της με την περισσότερο μελετημένη ομόλογη πρωτεΐνη FliN της μηχανής βιογένεσης του μαστιγίου:

Ρόλος στη συνάθροιση της εκκριτικής μηχανής. Η $HrcQ_B$ είναι ομόλογη με τη FliN πρωτεΐνη του μαστιγίου που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε επαφή με την εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (Francis *et al.* 1994, Alfano & Collmer 1997). Εκτός από την αμινοξική ομοιότητα και τον ίδιο υποκυτταρικό εντοπισμό οι δύο πρωτεΐνες μοιράζονται ομοιότητες και στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μέλη της μηχανής. Έτσι, (i) η FliN αλληλεπιδρά με τη FliM που θεωρείται ανάλογη της $HrcQ_A$ (επιτελούν ανάλογες λειτουργίες). (ii) Στην αλληλεπίδραση αυτή συμμετέχουν το καρβοξυτελικό τμήμα της FliN (Tang *et al.* 1995) και το καρβοξυτελικό τμήμα της FliM (Mathews *et al.* 1998). Για τις FliN/FliM έχει δειχτεί ότι σχηματίζουν μια υπερμοριακή δομή σχήματος δακτυλίου που ονομάζεται κυτταροπλασματικός δακτύλιος (C-ring, Khan *et al.* 1998, Minamino & Macnab 1999, Lux *et al.* 2000). Ο δακτύλιος αυτός δημιουργείται πολύ νωρίς κατά την πορεία σχηματισμού του μαστιγίου –είναι η δεύτερη σε σειρά δομή που φιάχνεται, με πρώτη τον MS δακτύλιο (Aldridge & Hughes 2002). Έχει δειχτεί επίσης ότι οι FliN, FliM εμπλέκονται μαζί με άλλες πρωτεΐνες του συστήματος στον έλεγχο της εναλλαγής μεταξύ δεξιόστροφης/αριστερόστροφης περιστροφής του μαστιγίου, ότι συμμετέχουν στην πορεία βιογένεσης του μαστιγίου και ότι είναι απαραίτητες για τη δημιουργία λειτουργικών μαστιγίων (Tang *et al.* 1995, Khan *et al.* 1998). Κατ' αναλογία θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το σύμπλοκο $HrcQ_B/HrcQ_A$ συμμετέχει στη δημιουργία μιας ανάλογης με τον κυτταροπλασματικό δακτύλιο δομής απαραίτητης για τη σωστή συνάθροιση της εκκριτικής μηχανής.

Πύλη της εκκριτικής μηχανής. Ο εντοπισμός της $HrcQ_B$ στο κυτταρόπλασμα είναι επίσης συμβατός με την υπόθεση να συμμετέχει, ως δομικός λίθος, στην κυτταροπλασματική πύλη της

εκκριτικής μηχανής. Κάνει επίσης την πρωτεΐνη ιδανικό υποψήφιο να φέρει κάποιο 'σήμα' ικανό να οδηγήσει τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος προς τη συσκευή έκκρισης.

Πρωτεΐνη διαμεσολάβησης. Όπως ήδη αναφέρθηκε η αμινοξική ομοιότητα ανάμεσα στις ομόλογες της $HrcQ_B$ πρωτεΐνες περιορίζεται στο καρβοξυτελικό τους τμήμα. Αντίθετα, το αμινοτελικό τους άκρο είναι ιδιαίτερα μεταβλητό. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές πιθανόν να μεσολαβούν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συντηρημένων και μη-συντηρημένων συστατικών της τύπου ΙΙΙ εκκριτικής μηχανής (Hueck 1998).

Αναγνώριση των υποστρωμάτων. Έχει δειχτεί ότι τουλάχιστον σε μερικές περιπτώσεις ο τύπου ΙΙΙ μηχανισμός έκκρισης δεν μπορεί να διακρίνει ανάμεσα σε υποστρώματα που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς. Για παράδειγμα, το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα της *Xanthomonas* αναγνωρίζει και εκκρίνει την πρωτεΐνη YopE από το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα της *Yersinia* (Rossier *et al.* 2000). Για να δικαιολογηθεί αυτή η έλλειψη ειδικότητας έχει προταθεί ότι κύριο ρόλο στο μηχανισμό αναγνώρισης παίζουν οι πρωτεΐνες του συντηρημένου πυρήνα. Η συμμετοχή στην αναγνώριση των υποστρωμάτων είναι ρόλος συμβατός με τις προηγούμενες υπόθεσεις που θέτουν την πρωτεΐνη στην εισόδο του εκκριτικού μηχανισμού.

8.2 Εντοπισμός πιθανών λειτουργικών περιοχών της $HrcQ_B$-C

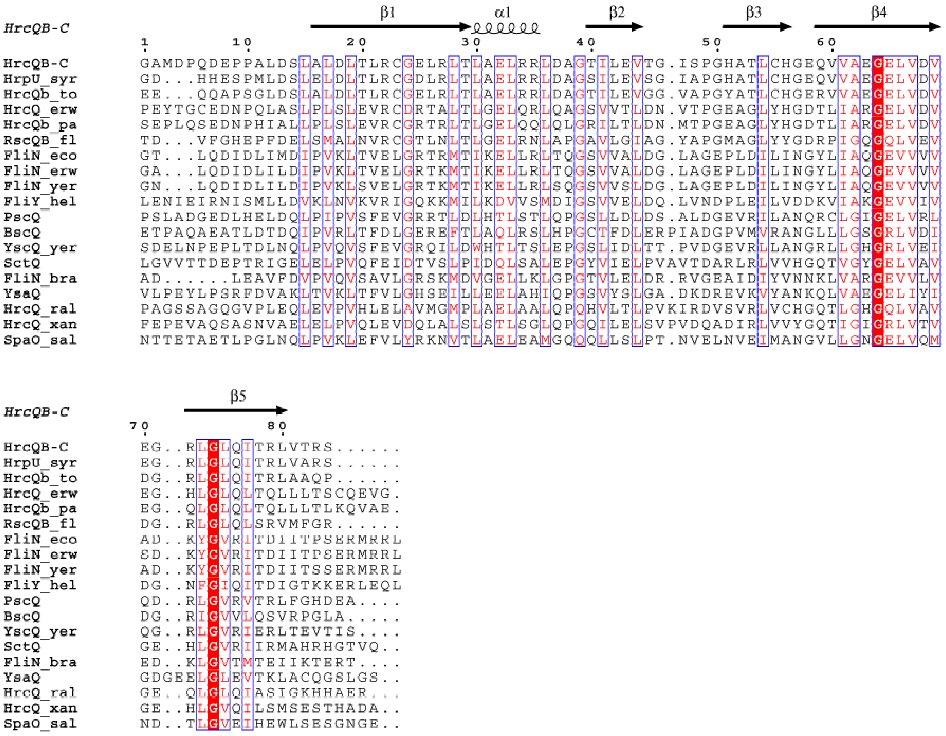
Με σκοπό τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της, η $HrcQ_B$ υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε σε ομοιογένεια. Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων αποδείχτηκε ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε πρωτεόλυση. Εκτεταμένες προσπάθειες για την κρυστάλλωση της δεν ευοδώθηκαν. Η αποτυχία κρυστάλλωσης βιολογικών μακρομορίων αποδίδεται συχνά στην απουσία δομής από μεγάλο μέρος του μορίου. Για την περίπτωση της $HrcQ_B$ η υπόθεση αυτή ελέγχτηκε αλλά δεν φαίνεται να υποστηρίζεται απο τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού και FTIR της πρωτεΐνης. Έτσι, είναι πιθανό η αποτυχία κρυστάλλωσης του μορίου να οφείλεται στην υψηλή κινητικότητα ενός μέρους του που εμποδίζει τη δημιουργία κρυσταλλικών επαφών. Είναι επίσης πιθανόν οι κατάλληλες συνθήκες να μας διέφυγαν.

Στη συνέχεια, αντικείμενο της μελέτης μας έγινε το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, συγκεκριμένα στα τελευταία 79 αμινοξέα ($HrcQ_B$-C) εκεί όπου εντοπίζεται η υψηλή αμινοξική συντήρηση ανάμεσα στην $HrcQ_B$ της *P. syringae* pv. phaseolicola με τις ομόλογες από άλλα φυτο- και ζωοπαθογόνα. Η $HrcQ_B$-C που ήταν ιδιαίτερα σταθερή σε σύγκριση με το πλήρους μήκους μόριο, κρυστάλλωσε και η δομή της προσδιορίστηκε στη διακριτικότητα των

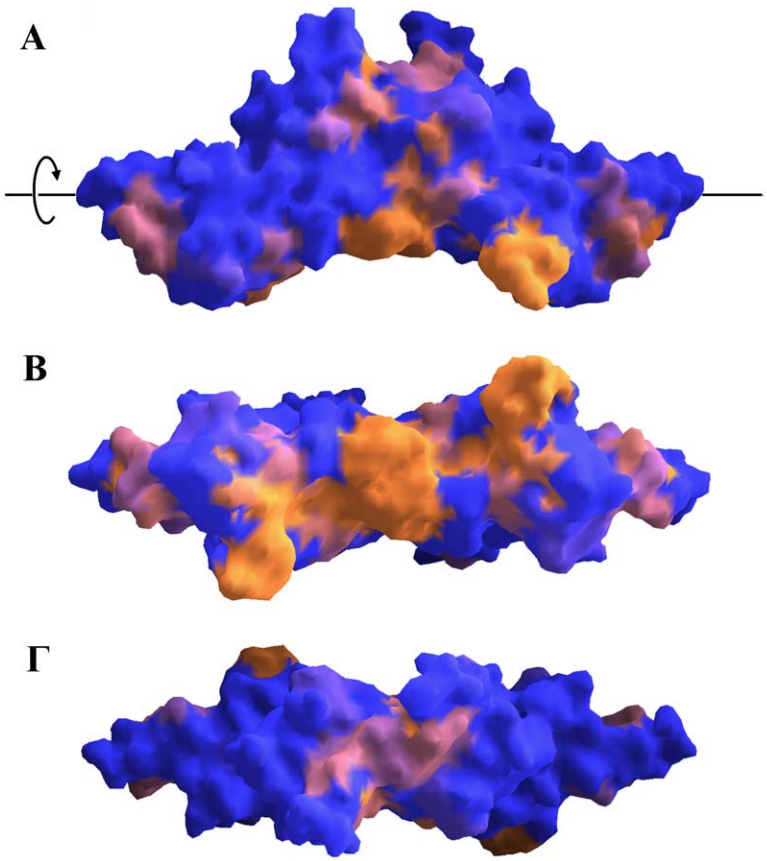
2.3 Å. Πρόκειται για ένα επίμηκες, ελαφρά κυρτωμένο ομοτετραμερές. Τα τέσσερα μονομερή συναθροίζονται σε δύο διμερή που πακετάρονται μαζί και σχηματίζουν ένα διμερές διμερών. Η δευτεροταγής δομή κάθε μονομερούς αποτελείται από πέντε β-κλώνους και μία α-έλικα.

Στην εικόνα 8.1 παρατίθεται η αμινοξική στοίχιση της $HrcQ_B$-C με τα καρβοξυτελικά τμήματα ομόλογων πρωτεϊνών από φυτοπαθογόνα βακτήρια, ζωο-παθογόνα και το μαστίγιο. Το επίπεδο αμινοξικής ταύτισης ανέρχεται στο 33 -89% με πρωτεΐνες από φυτοπαθογόνα, 29 – 33% με τις FliN πρωτεΐνες από το μαστίγιο και 28 – 32% με πρωτεΐνες ζωοπαθογόνων. Η στοίχιση αποκαλύπτει καλά συντηρημένα αμινοξέα και περιοχές με μεγάλη ομοιότητα. Οι γλυκίνες 64 και 74 που βρίσκονται στις αλυσίδες β4 και β5 αντίστοιχα συντηρούνται και στις 19 αλληλουχίες που στοιχίζονται. Στη δομή και τα δυο αυτά κατάλοιπα είναι εντελώς κρυμμένα στον υδρόφοβο πυρήνα και βρίσκονται σε μια στενά πακεταρισμένη περιοχή όπου δεν υπάρχει χώρος να διευθετηθούν πλευρικές αλυσίδες. Η μεγάλη πλειοψηφία των υπόλοιπων συντηρημένων αμινοξέων (το 91%) είναι υδρόφοβα κατάλοιπα, κυρίως λευκίνες. Όπως φαίνεται στην εικόνα 8.1 το πρότυπο συντήρησης ταιριάζει αρκετά καλά με τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής γεγονός που υποδηλώνει δομικές ομοιότητες μεταξύ των στοιχιζόμενων αλληλουχιών.

Η δομή της $HrcQ_B$-C και μια πολλαπλή αμινοξική στοίχιση της πρωτεΐνης με ομόλογες της από φυτοπαθογόνα χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα σε μια ανάλυση ομάδων (cluster analysis) που έγινε με το πρόγραμμα 3DCA (Landgraf *et al.* 2001) με σκοπό την εύρεση δυνητικά λειτουργικών καταλοίπων στην επιφάνεια του μορίου. Εντοπίστηκαν δύο συναθροίσεις συντηρημένων και κυρίως εκτεθειμένων στην επιφάνεια καταλοίπων οι οποίες προβλέπεται να συμμετέχουν σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (εικόνα 8.2). Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα αμινοξέα 27 έως 35 που απαρτίζουν το τέλος του β1 κλώνου και ολόκληρη την α-έλικα. Η δεύτερη ομάδα που είναι μεγαλύτερη, αποτελείται από τα αμινοξέα 50, 51, 64-77 και μέρος της εμπλέκεται στον σχηματισμό της μεσεπιφάνειας του τετραμερούς. Όπως είναι φανερό από την εικόνα 8.2 η κατανομή αυτών των αμινοξέων στην επιφάνεια της δομής είναι πολωμένη με την πλειοψηφία τους να συγκεντρώνεται στην κοίλη πλευρά του τετραμερούς.



Εικόνα 8.1 Αμινοξική στοίχιση της HrcQ$_B$-C με τα καρβοξυτελικά τμήματα ομόλογων πρωτεϊνών με τις οποίες μοιράζεται μεγαλύτερη από 25% αμινοξική ταύτιση. Η έρευνα έγινε με το πρόγραμμα BLAST (Altschul *et al.* 1997). Οι πρωτεΐνες που στοιχίζονται είναι οι: *P. syringae* pv. syringae HrpU (HrpU_syr; SWall accession number Q60235; 89% identity), *P. syringae* pv. tomato HrcQb (HrcQb_to; Q9F0H3; 83%), *P. syringae*. pv. fluorescence RscQ$_B$ (RscQB_fl; Q93PZ3; 47%), *E. amylovora* HrcQ (HrcQ_erw; Q46646; 50%), *Pantoea agglomerans* HrcQb (HrcQb_pa; Q47885; 50%), *X. campestris* HrcQ (HrcQ_xan; Q9RBK5; 34%), *R. solanacearum* HrcQ (HrcQ_ral; Q52489; 33%), *E. coli* FliN (FliN_eco; P15070; 30%), *E. carotovora* FliN (FliN_erw; P35539; 30%), *Y. pestis* FliN (FliN_yer; Q8ZF94; 29%), *Helicobacter pylori* FliY (FliY_hel; O25674; 29%), *Bradyrhizobium japonicum* FliN (FliN_bra; BAC52267; 33%), *Y. pestis* YscQ (YscQ_yer; P42713; 28%), *Y. enterocolitica* YsaQ (YsaQ; Q9KKH3; 30%), *P. aeruginosa* PscQ (PscQ; Q9I333; 30%), *P. pseudomalei* SctQ (SctQ; Q9ZGR1; 31%), *S. typhimurium* SpaO (SpaO_sal; Q56022; 26%) and *Bordetella bronchiseptica* BscQ (BscQ; Q9L9E0; 32%). Αυστηρώς συντηρημένα κατάλοιπα παρουσιάζονται σε κόκκινο υπόβαθρο ενώ για όμοια κατάλοιπα χρησιμοποιούνται κόκκινα τυπογραφικά. Η αρίθμηση και τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής αναφέρονται στην αλληλουχία και τη δομή της HrcQ$_B$-C. Η στοίχιση έγινε με το CLUSTAL W (Higgins *et al.* 1994) και η εικόνα ετοιμάστηκε με το ESPript.



Εικόνα 8.2 Η επιφάνεια του τετραμερούς της $HrcQ_B$-C χρωματισμένη σύμφωνα με το βαθμό αμινοξικής συντήρησης όπως υπολογίστηκε από την τρισδιάστατη ανάλυση ομάδων με το πρόγραμμα 3DCA. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε μια πολλαπλή αμινοξική στοίχιση αλληλουχιών από φυτοπαθογόνα που ήταν ταυτόσημες με την $HrcQ_B$-C σε ποσοστό μεγαλύτερο από 45%. Ο χρωματικός κώδικας είναι από μπλε για μη συντηρημένα ως πορτοκαλί για υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα. Παρουσιάζονται τρεις όψεις του μορίου που σχετίζονται από την περιστροφή του γύρω από οριζόντιο άξονα. (Α) πλευρική άποψη. (Β) κυρτή πλευρά που προήλθε από δεξιόστροφη περιστροφή κατά 90° σε σχέση με το (Α). (Γ) κοίλη πλευρά που προήλθε από αριστερόστροφη περιστροφή κατά 90° σε σχέση με το (Α). Η εικόνα ετοιμάστηκε με το πρόγραμμα GRASP (Nicholls *et al.* 1991).

8.3 Μοντέλα για το σχηματισμό υπερμοριακών δομών της $HrcQ_B$-C

Βασιζόμενοι στις πολλαπλές ομοιότητες ανάμεσα στα ζευγάρια $HrcQ_B/HrcQ_A$ και FliN/FliM μπορούμε να υποθέσουμε ότι η $HrcQ_B$-C και το καρβοξυτελικό τμήμα της $HrcQ_A$

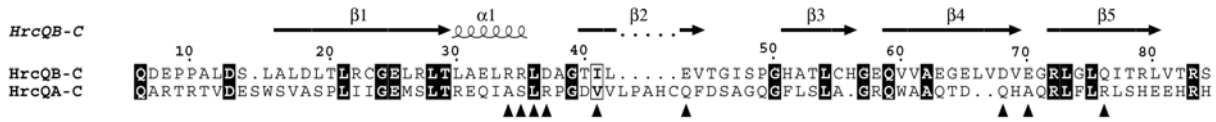
σχηματίζουν μια δομή ανάλογη του κυτταροπλασματικού δακτυλίου. Η υπόθεση αυτή είναι συμβατή με πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που δείχνουν ότι η τύπου ΙΙΙ εκκριτική μηχανή των ζωοπαθογόνων έχει πολλές μορφολογικές ομοιότητες με τη μηχανή βιογένεσης του μαστιγίου γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός κοινού δομικού μοτίβου σε όλα τα τύπου ΙΙΙ συστήματα. Πάντως αξίζει να σημειωθεί ότι τα μέχρι στιγμής πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας δεν έχουν καταδείξει την ύπαρξη κυτταροπλασματικού δακτυλίου στα ζωοπαθογόνα.

Οι Mathews *et al.* (1998) παρατήρησαν ομοιότητες ανάμεσα στην αμινοξική αλληλουχία της FliN και της FliM βάσει των οποίων πρότειναν την ύπαρξη κοινών δομικών χαρακτηριστικών ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Συνεχίζοντας το συλλογισμό τους πρότειναν ότι αυτά τα κοινά δομικά στοιχεία εμπλέκονται στο σχηματισμό του κυτταροπλασματικού δακτυλίου καταλαμβάνοντας ουσιαστικά ισοδύναμες θέσεις (quasiequivalent). Στην εικόνα 8.3 παρουσιάζεται για παράδειγμα η αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνών FliN/FliM της *E. coli*.

```
CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

FliN_eco        -------MSDMNNPADDNNGAMDDLWAEALSEQKSTSSKS------------AAETVFQQ
41
FliM_eco        MGDSILSQAEIDALLNGDSEVKDEPTASVSGESDIRPYDPNTQRRVVRERLQALEIINER
60
                             ::::   :.:. . *:  *.. .*..  . ..
* * : ::

FliN_eco        FG------------------------------------------------------------
43
FliM_eco        FARHFRMGLFNLLRRSPDITVGAIRIQPYHEFARNLPVPTNLNLIHLKPLRGTGLVVFSP
120
                *.

FliN_eco       -----------GGD------VSG-------------------------------------
49
FliM_eco        SLVFIAVDNLFGGDGRFPTKVEGREFTHTEQRVINRMLKLALEGYSDAWKAINPLEVEYV
180
                                    ***      *.*

FliN_eco        -----------TLQDIDLIMDIP-------------------------------------
61
FliM_eco        RSEMQVKFTNITTSPNDIVVNTPFHVEIGNLTGEFNICLPFSMIEPLRELLVNPPLENSR
240
                                       * .  *:::: *


FliN_eco        ------------------VKLTVELGRTRMTIKELLRLTQGSVVALDGLAGEPLDILING
103
FliM_eco        NEDQNWRDNLVRQVQHSQLELVANFADISLRLSQILKLNPGDVLPIE--KPDRIIAHVDG
298
                                                    ::*..::.    : :.::*:*.
*.*:.::    : :   ::*

FliN_eco        YLIAQGEVVVVADKYGVRITDIITPSERMRRLSR-- 137
FliM_eco        VPVLTSQYGTLNGQYALRIEHLINPILNSLNEEQPK 334
           :  .:  .: .:*.:** .:*.*  .  . .:
```

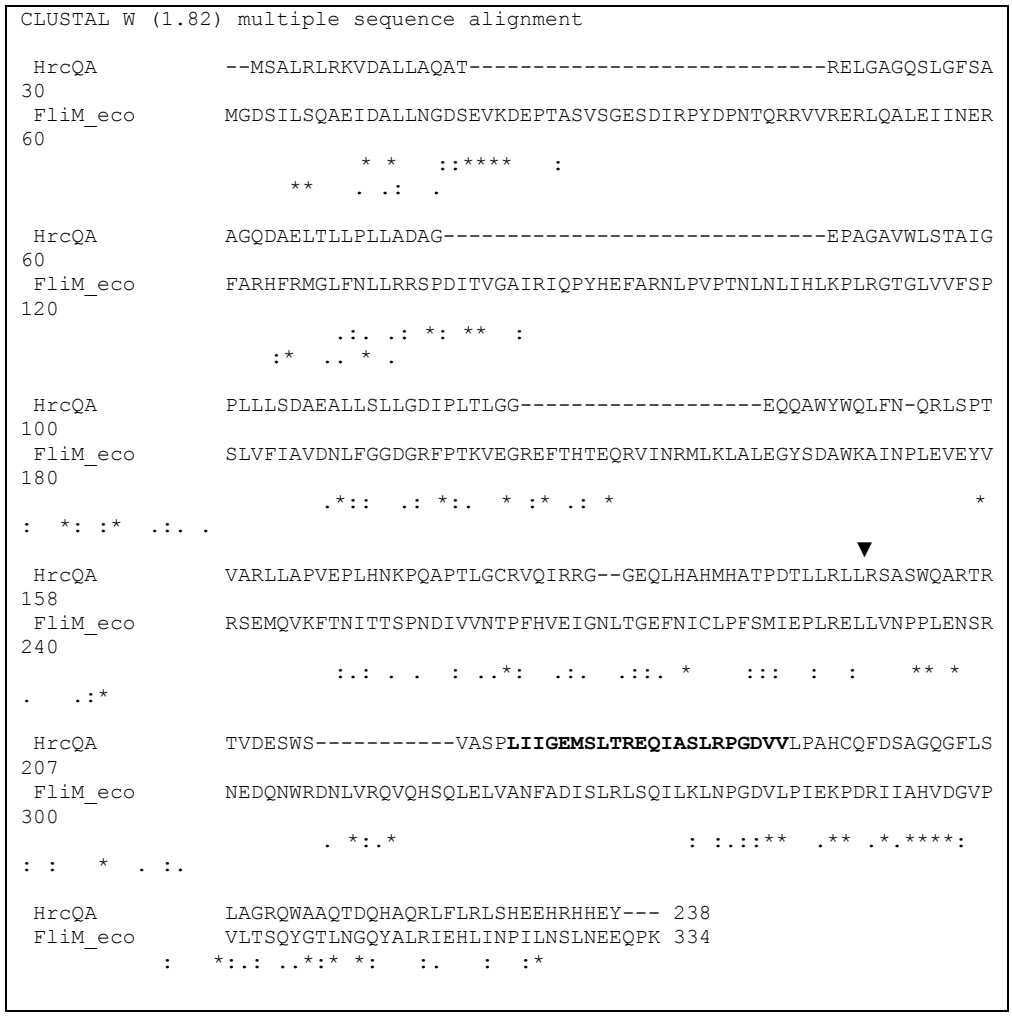
Εικόνα 8.3 Παρουσιάζεται η αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνών FliN/FliM. Όπως φαίνεται οι καρβοξυτελικές περιοχές τους παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες.

Όμοια, παρατηρήσαμε ομολογία (20.5% ταυτότητα, 54.5% ομοιότητα) ανάμεσα στην $HrcQ_B$-C και το καρβοξυτελικό άκρο της $HrcQ_A$ (εικόνα 8.4). Ως επακόλουθο η πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της $HrcQ_A$ για το τμήμα 170-185 φαίνεται να συμφωνεί πλήρως με τη δομή του αντίστοιχου τμήματος (21-36) της $HrcQ_B$-C.



Εικόνα 8.4 Παρουσιάζεται η αμινοξική στοίχιση ανάμεσα στην $HrcQ_B$-C και το καρβοξυτελικό τμήμα (κατάλοιπα 154-235) της $HrcQ_A$. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής αντιστοιχούν στη δομή της $HrcQ_B$-C. Επισημαίνονται τα ταυτόσημα αμινοξέα (μαύρο υπόβαθρο) και τα αμινοξέα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις στη μεσεπιφάνεια του τετραμερούς (▲). Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W.

Οι υποθέσεις αυτές φαίνεται να ενισχύονται και από την αμινοξική στοίχιση των πρωτεϊνών $HrcQ_A$ και FliM (εικόνα 8.5). Τα καρβοξυτελικά άκρα των πρωτεϊνών (από το κατάλοιπο 166 της $HrcQ_A$) στοιχίζονται χωρίς κενά ενώ το τμήμα 170-191 της $HrcQ_A$ (σημειωμένο με έντονα τυπογραφικά στην εικόνα 8.5) βρίσκεται σε μια περιοχή με υψηλές ομοιότητες.

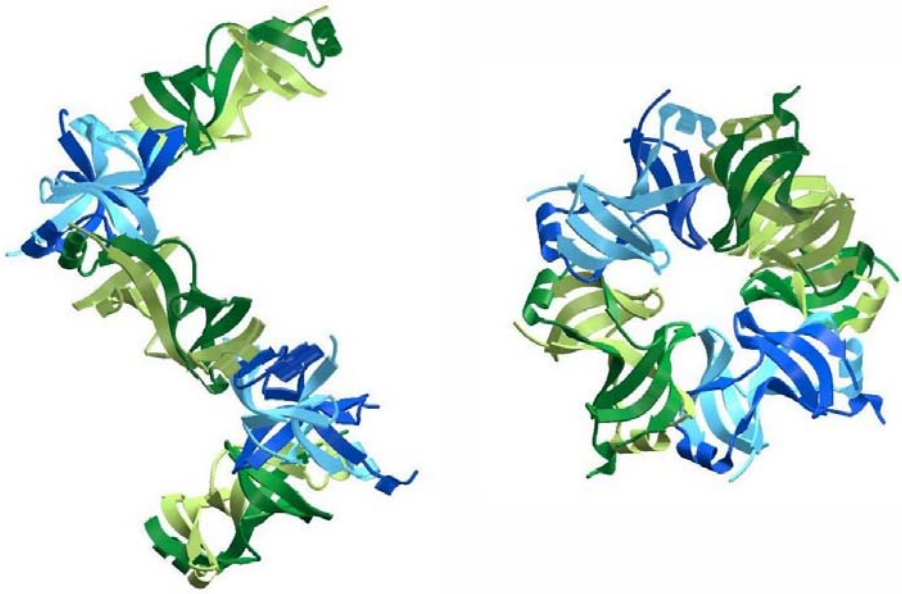


Εικόνα 8.5 Παρουσιάζεται η αμινοξική στοίχιση ανάμεσα στην $HrcQ_A$ της *P.syringae* pv. phaseolicola και τη FliM της *E. coli*. Για εύκολη σύγκριση υποδεικνύεται με βέλος (▼) το κατάλοιπο της $HrcQ_A$ από το οποίο ξεκινά η στοίχιση στην εικόνα 8.4. Με έντονα τυπογραφικά σημειώνονται τα αμινοξέα 170-191 της $HrcQ_A$ (για σύγκριση δες εικόνα 8.4). Η στοίχιση έγινε με το πρόγραμμα CLUSTAL W.

Στη συνέχεια προτείνουμε δύο μοντέλα για τους πιθανούς τρόπους με τους οποίους οι $HrcQ_B$-C/$HrcQ_A$ θα μπορούσαν να σχηματίσουν δομές με κυκλική συμμετρία. Για τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιούμε μόνο τη γνωστή δομή της $HrcQ_B$-C. Βασικές προϋποθέσεις για τις προτάσεις που ακολουθούν είναι: (i) Οι $HrcQ_B$/$HrcQ_A$ σχηματίζουν δακτύλιο ανάλογο του κυτταροπλασματικού δακτυλίου που σχηματίζουν οι FliN/FliM με αλληλεπίδραση των καρβοξυτελικών τους τμημάτων. (ii) Το τμήμα της $HrcQ_A$ που συμμετέχει στη δημιουργία αυτού του δακτυλίου είναι δομικά ανάλογο του τμήματος της $HrcQ_B$-C που συμμετέχει στο δακτύλιο. (iii) Οι θέσεις των $HrcQ_B$/$HrcQ_A$ σε αυτό το δακτύλιο είναι ισοδύναμες και αντιμεταθέσιμες.

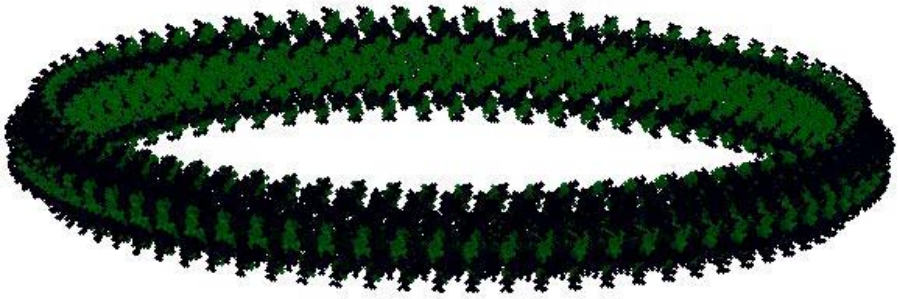
Επανάληψη της μεσεπιφάνειας μεταξύ των διμερών. Το διμερές της $HrcQ_B$-C είναι ένα συμμετρικό μόριο με έναν διπλό άξονα περιστροφής να συσχετίζει τις δύο όμοιες υπομονάδες του. Από αυτές η μία συμμετέχει στη δημιουργία του τετραμερούς αλληλεπιδρώντας με ένα δεύτερο διμερές ενώ η άλλη όχι. Το πρότυπο αυτό είναι ασυνήθιστο αφού σε πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούνται από όμοια μονομερή, ισοδύναμες υπομονάδες τείνουν να διευθετούνται σε όμοιο περιβάλλον. Πάντως στη δομή του τετραμερούς της $HrcQ_B$-C οι δύο από τις συνολικά τέσσερις δομικά ισοδύναμες υπομονάδες αποκρύπτουν μέρος τους στη μεσεπιφάνεια ενώ οι άλλες δύο φαίνεται να παραμένουν εκτεθειμένες στο διαλύτη. Υπολογίζεται ότι κατά τον σχηματισμό του τετραμερούς μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης κρύβεται στο εσωτερικό του μορίου επιφάνεια ίση με ~1200 $Å^2$. Η επιφάνεια αυτή είναι αρκετά μεγάλη ώστε ο σχηματισμός του τετραμερούς να θεωρείται σημαντικός παράγοντας σταθεροποίησης λόγω της ελάττωσης στην συνολική ενέργεια του συστήματος στην οποία οδηγεί. Το ερώτημα που ανακύπτει είναι γιατί οι άλλες δύο ισοδύναμες υπομονάδες παραμένουν εκτεθειμένες. Διερευνώντας το κρυσταλλικό πακετάρισμα παρατηρούμε ότι τα μόρια πακετάρονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι περιοχές που δεν συμμετέχουν στη μεσεπιφάνεια του τετραμερούς να αποκαθιστούν αλληλεπιδράσεις με μόρια νερών και ομάδες γειτονικών τετραμερών. Στο κύτταρο οι περιοχές αυτές είναι πιθανό να καλύπτονται μέσω αλληλεπιδράσεων που καταλήγουν σε μια υπερμοριακή δομή η οποία θα μπορούσε να έχει τη θέση του κυτταροπλασματικού δακτυλίου. Πάντως, η ακριβής αναπαραγωγή της μεσεπιφάνειας του τετραμερούς προσθέτωντας διαδοχικά διμερή καταλήγει στη δομή της υπερέλικας που φαίνεται στην εικόνα 8.6. Η έλικα αυτή έχει εσωτερική και εξωτερική διάμετρο 15 και 70 Å αντίστοιχα ενώ το βήμα της είναι 80 Å.

A **B**



Εικόνα 8.6 Η ακριβής επανάληψη της μεσεπιφάνειας μεταξύ των διμερών οδηγεί στη δημιουργία έλικας. Στην εικόνα παρουσιάζεται η έλικα που φιάχνουν 5 διμερή. **(A)** Εικόνα από το πλάι, **(B)** κάτοψη.

Επανάληψη του κρυσταλλικού πακεταρίσματος. Στον κρύσταλλο τα τετραμερή της πρωτεΐνης πακετάρονται πλευρά με πλευρά όπως φαίνεται για δύο από αυτά στην εικόνα 7.11 Γ. Αναπαράγοντας αυτές τις αλληλεπιδράσεις και μετακινώντας το τετραμερές στον ισημερινό μιας σφαίρας (σε ένα σύστημα πολικών συντεταγμένων) σε βήματα 6° παράγεται ο δακτύλιος της εικόνας 8.7 (χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα pdbset της CCP4). Στο δακτύλιο αυτό συμμετέχουν περίπου 110 αντίγραφα του τετραμερούς της $HrcQ_B$-C και οι διαστάσεις του είναι διάμετρος ~550 Å και πάχος ~90 Å. Με το μοντέλο αυτό οι συντηρημένες περιοχές κατανέμονται συστηματικά στο εσωτερικό εκεί όπου σύμφωνα με τις υποθέσεις αναμένεται η αλληλεπίδραση με τα πιθανά υποστρώματα και τις πρωτεΐνες βοηθούς του συστήματος –αν τέτοιες αλληλεπιδράσεις πραγματικά αποκαθίστανται.

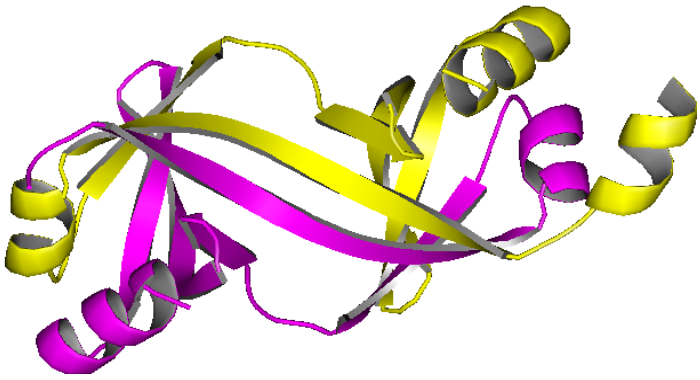


Εικόνα 8.7 Αναπαράσταση του δακτυλίου που σχηματίζεται αν αναπαράγουμε με μικρές τροποποιήσεις το κρυσταλλικό πακετάρισμα του τετραμερούς. Με πράσινο χρωματίζονται τα συντηρημένα κατάλοιπα όπως προτείνονται από το 3DCA (δες εικόνα 8.2).

Κλείνοντας θα θέλαμε να τονίσουμε ότι το μοντέλο που παρουσιάζεται στην εικόνα 8.7 αποτελεί προς το παρόν μόνο ένα πρόχειρο σκαρίφημα. Για την κατασκευή του δεν έχουν βελτιστοποιηθεί ούτε οι αποστάσεις μεταξύ των υπομονάδων ούτε η γωνία της μεταξύ τους κλίσης ώστε οι αλληλεπιδράσεις που αποκαθίστανται να ταιριάζουν κατά το δυνατό με αυτές που παρατηρούνται στον κρύσταλλο.

8.4 Η κρυσταλλική δομή της FliN

Ενώ η παρούσα εργασία βρισκόταν στα τελευταία στάδια της συγγραφής της προσδιορίστηκε η δομή του καρβοξυτελικού τμήματος (95 τελικά κατάλοιπα) της πρωτεΐνης FliN από τον οργανισμό Thermotoga maritima (κωδικός κατάθεσης στη pdb 1o6a). Η επίλυση της δομής έγινε από το 'Joint Center for Structural Genomics' σε διακριτικότητα 1.85 Å με R/R_{free} 17.1/21.2. Το περιεχόμενο της ασύμμετρης μονάδας είναι ένα διμερές που υιοθετεί ουσιαστικά την ίδια δομή με αυτή του διμερούς της $HrcQ_B$-C (εικόνα 8.8). Το μοντέλο περιλαμβάνει 86 κατάλοιπα από το μονομερές A και 80 από το μονομερές B. Δομική σύγκριση του καρβοξυτελικού τμήματος της FliN με την $HrcQ_B$-C με τον αλγόριθμο DALI (Holm & Sander 1993) απέδωσε σε 71 κατάλοιπα δομική ισοδυναμία. Συγκεκριμένα αναφέρει ως δομικά ισοδύναμες τις περιοχές που παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1.



Εικόνα 8.8 Παρουσιάζεται το διμερές του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης FliN.

Πίνακας 8.1 Παρουσιάζονται οι δομικά ισοδύναμες περιοχές των πρωτεϊνών $HrcQ_B$-C και του καρβοξυτελικού τμήματος της FliN που εντοπίστηκαν με τον αλγόριθμο DALI. Η δομή κάθε τμήματος της αλληλουχίας της $HrcQ_B$-C (πρώτη στήλη του πίνακα) αναφέρεται στην τρίτη στήλη του πίνακα.

$HrcQ_B$-C	**FliN**	**Αντίστοιχο στοιχείο δευτεροταγούς δομής της $HrcQ_B$-C**
Ala11-Arg27	Leu73-Arg89	β1 κλώνος
Thr29-Arg35	Thr91-Glu97	α-έλικα
Asp37-Val81	Ile99-Val143	β2 κλώνος και β-μαίανδρος (β3-β4-β5 κλώνοι)

Η ομοιότητα των δομών των καρβοξυτελικών τμημάτων των πρωτεϊνών $HrcQ_B$/FliN υποστηρίζει την υπόθεση ότι η $HrcQ_B$ συμμετέχει σε μια δομή ανάλογη του κυτταροπλασματικού δακτυλίου του βακτηριακού μαστιγίου.

8.5 Συμπεράσματα και προοπτικές

Τα λίγα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα για τη λειτουργία και τις αλληλεπιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η $HrcQ_B$ μας αναγκάζουν να χρησιμοποιούμε συχνά λόγο υποθετικό αποδίδοντας της ρόλους και ιδιότητες που έχει δειχτεί να έχουν ομόλογες πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα η μελέτη όλου του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος άρχισε σχετικά πρόσφατα, περίπου στις αρχές της δεκαετίας του '90. Επιπλέον, από την αρχή το ενδιαφέρον συγκεντρώθηκε στους μολυσματικούς παράγοντες και τις βοηθητικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες της μηχανής να μην έχουν μελετηθεί συστηματικά. Για την $HrcQ_B$ τα θέματα που

μένει να διευκρινιστούν είναι πολλά και μεταξύ άλλων αφορούν τον προσδιορισμό της ακριβούς της θέσης σε σχέση με την υπόλοιπη μηχανή έκκρισης, τη συστηματική διερεύνηση αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες του συστήματος και τον προσδιορισμό του ρόλου που διαδραματίζει ως μέλος του συστήματος. Μελλοντικά πειράματα θα μπορούσαν να αφορούν τις εξής κατευθύνσεις.

Διευκρίνιση των αλληλεπιδράσεων με την $HrcQ_A$. Έχει δειχτεί ότι η $HrcQ_B$ αλληλεπιδρά μόνο με το καρβοξυτελικό τμήμα της $HrcQ_A$ και ότι το καρβοξυτελικό τμήμα της $HrcQ_B$ ($HrcQ_B$-C) διατηρεί την ικανότητα γι' αυτή την αλληλεπίδραση. Επιπλέον, από την αμινοξική στοίχιση των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να έχουν σημαντική ομοιότητα στην περιοχή που αντιστοιχεί στην α-έλικα της δομής της $HrcQ_B$-C. Κατά συνέπεια τα προγράμματα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής τους αποδίδουν και δομική ομοιότητα στην περιοχή αυτή. Μερικά από τα θέματα που παραμένουν προς διευκρίνιση είναι (i) Η $HrcQ_B$ αλληλεπιδρά με την $HrcQ_A$ μόνο μέσω του καρβοξυτελικού της άκρου (όπως έχει δειχτεί για τη FliN) ή στην αλληλεπίδραση συμμετέχει και το αμινοτελικό τμήμα; (ii) Ποια είναι η δομή της $HrcQ_A$; Η δομή της $HrcQ_A$ είναι το πειραματικό αποτέλεσμα που θα επιβεβαιώσει ή θα απορρίψει τις προβλέψεις που της αποδίδουν εν μέρει δομική ομοιότητα με την $HrcQ_B$-C. (iii) Ποια αμινοξέα της $HrcQ_B$-C συμμετέχουν στις αλληλεπιδρασεις με την $HrcQ_A$; Με τα προς το παρόν διαθέσιμα δεδομένα θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ως πιθανότερη να συμμετέχει σε τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις την περιοχή της α-έλικας. Αλληλεπιδράσεις μέσω της περιοχής της έλικας συμφωνούν εν μέρει με το πρώτο μοντέλο που προτείνουμε στην παράγραφο 8.3 και παράλληλα εξηγούν κατά κάποιο τρόπο την πιθανολογούμενη δομική ομοιότητα στην περιοχή αυτή ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Στα πλαίσια αυτά θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστεί η επίδραση σημειακών μεταλλάξεων στα αμινοξέα Leu30-Arg34 –που είναι αμινοξέα της έλικας. Αφού διευκρινιστεί ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν καταστρέφουν την τεταρτοταγή δομή μπορεί να ελεγχθεί αν επιδρούν στην αλληλεπίδραση με την $HrcQ_A$. Ακολουθώντας ανάλογη πορεία αν μεταλλάξεις στην έλικα δεν επηρεάσουν την αλληλεπίδραση με την $HrcQ_A$ μπορεί να εξεταστεί στη συνέχεια η επίδραση μεταλλάξεων σε αμινοξέα που συμμετέχουν στη δημιουργία επαφών στο δεύτερο μοντέλο. (iv) Πόσο σημαντική για τη λειτουργικότητα του συστήματος είναι η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών; Αν βρεθούν μεταλλάξεις που χωρίς να επηρεάσουν τη δομή οδηγούν σε απώλεια των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί αν το σύστημα εξακολουθεί να είναι λειτουργικό.

Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων με άλλα μέλη του συστήματος. Η $HrcQ_B$ θεωρείται μέλος τους συντηρημένου πυρήνα της εκκριτικής μηχανής και ως τέτοιο είναι πιθανό συμμετέχει

στην αναγνώριση των υποστρωμάτων του συστήματος. Μένει λοιπόν να διευκρινιστεί αν αλληλεπιδρά με μολυσματικούς παράγοντες ή/και βοηθητικές πρωτεΐνες. Επιπλέον λόγω της υψηλής συντήρησης του καρβοξυτελικού της τμήματος και της υψηλής μεταβλητότητας του αμινοτελικού έχει προταθεί η συμμετοχή της στη διαμεσολάβηση μεταξύ συντηρημένων και μη-συντηρημένων συστατικών της μηχανής. Θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί η πιθανή αλληλεπίδραση της με συντηρημένες πρωτεΐνες του συστήματος όπως είναι δομικές πρωτεΐνες της εκκριτικής συσκευής και η ATPαση HrcN (Pozidis *et al.* 2003). Επίσης, οι βοηθητικές πρωτεΐνες του συστήματος που ήδη αναφέρθηκαν φαίνεται να παρουσιάζουν δομική συντήρηση παρά τις διαφορές τους στην αμινοξική αλληλουχία. Υπό αυτή την έννοια μπορούν να θεωρηθούν συντηρημένα μέλη.

Διευκρίνηση του σχηματισμού υπερμοριακής δομής. Μένει επίσης να διευκρινιστεί αν πράγματι στα φυτοπαθογόνα υπάρχει δομή ανάλογη του κυτταροπλασματικού δακτυλίου του μαστιγίου. Αν πράγματι υπάρχει τέτοια δομή θα πρέπει να διευκρινιστεί από ποιές πρωτεΐνες απαρτίζεται και σε ποια αναλογία συμμετέχει καθεμιά όπως επίσης τί μέγεθος έχει, με ποια περιοχή του μηχανισμού έκκρισης αλληλεπιδρά και με ποιό τρόπο συμμετέχει στη λειτουργία του συστήματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Στους επόμενους πίνακες παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνθήκες που εξετάστηκαν για την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης $HrcQ_B$.

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας

Πρωτεϊνικό δείγμα: 10His-$HrcQ_B$ και/ή $HrcQ_B$.
Συγκέντρωση πρωτεϊνικού δείγματος: 10-15 mg/ml.
Τύποι πρωτεϊνικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:
I. 20 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, αναστολείς πρωτεασών,
II. 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, αναστολείς πρωτεασών,
III. 300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, αναστολείς πρωτεασών.
Μέθοδος κρυστάλλωσης: διάχυση ατμών με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας. 2-5 μl του πρωτεϊνικού διαλύματος αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος δεξαμενής. Η σταγόνα τοποθετείται σε σιλικοναρισμένη καλυπτρίδα που χρησιμοποιείται για να κλείσει αεροστεγώς δοχείο με 1 ml διαλύματος δεξαμενής. Το σύστημα αφήνεται προς εξισορρόπηση στους 18ºC.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής: MPD**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%	II	Ίζημα
pH=4.5, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%	III	Ίζημα
pH=4.5, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MPD (v/v): 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%	II	Ίζημα
pH=4.5, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MPD (v/v): 65%	III	Ίζημα+διφασικό
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MPD (v/v): 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%	II	Ίζημα
pH=5.0, AcOH/AcONa 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%, 65%	II III	Ίζημα Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%, 65%	II	Ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%	III	Λίγο ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	MPD (v/v): 65%	III	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 2%, 5%	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 40%	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 65%	II	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 10%	III	Διαυγής
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 20%, 40%, 65%	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 20%, 25%, 30%, 35%	II	Ίζημα
pH=7.5, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 20%, 25%, 30%, 35%	II	Ίζημα
pH=7.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 35%	II	Λίγο ίζημα
pH=7.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 40%, 45%, 50%, 55%, 60%	II	Ίζημα
pH=7.8, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 20%, 25%, 30%, 35%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 2%, 5%, 40%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%	III	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 65%	II III	Ίζημα Λίγο ίζημα
pH=8.2, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 35%	II	Λίγο ίζημα

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας			
pH=8.2, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 40%, 45%, 50%, 55%, 60%	II	Ίζημα
pH=8.3, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 20%, 25%, 30%, 35%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.6, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 35%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.6, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 40%, 45%, 50%, 55%, 60%	II	Ίζημα
pH=9.0, Bicine 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%	II	Διαυγής
pH=9.0, Bicine 0.1 M	MPD (v/v): 65%	II	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 2%, 5%, 40%	II	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 10%, 20%, 40%	III	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 65%	III	Λίγο ίζημα
pH=9.5, Glycine/NaOH 0.1 M	MPD (v/v): 10%	I	Διαυγής
pH=9.5, Glycine/NaOH 0.1 M	MPD (v/v): 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=9.5, Glycine/NaOH 0.1 M	MPD (v/v): 40%	II	Διαυγής

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής: PEG's**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 10%, 20%, 30%	II III	Ίζημα Ίζημα
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 10%, 20%, 30%	II III	Ίζημα Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 10%, 30%	II III	Ίζημα Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 20%	II	Ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%, 3%, 6%	III	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%	II	Λίγο ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 10%	II III	Λίγο ίζημα Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 20%	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 30%	II III	Ίζημα Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%, 3%, 6%	III	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{1000} (w/v): 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%, 20%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 25%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 30%, 35%, 40%	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{4000} (w/v): 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%, 3%	III	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 2%, 4%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 6%	III	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 6%, 8%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 10%	II	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 10%, 30%	III	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 20%, 30%	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 20%, 30%	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{8000} (w/v): 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10	II	Ίζημα

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας			
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%	II	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%, 20%, 25%, 30%	II	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 35%, 40%	II	Λίγο ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%, 3%, 6%	III	Διαυγής
pH=9.0, Bicine 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%, 10%, 20%	II III	Λίγο ίζημα Διαυγής
pH=9.0, Bicine 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 30%	II III	Λίγο ίζημα Λίγο ίζημα

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής:** **Οργανικοί πτητικοί διαλύτες**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=6.0, MES 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%	II I	Ίζημα Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 5%, 10%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 20%, 30%, 40%	II I	Ίζημα Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 5%, 10%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 8%, 12%, 14%, 16%, 18%	I	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 20%, 30%, 40%	II I	Ίζημα Ίζημα
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%	I	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 5%, 10%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 8%, 12%, 14%, 16%, 18%	I	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 20%, 30%, 40%	II I	Ίζημα Ίζημα
pH=9.5, Glycine/NaOH 0.1 M	2-Βουτανόλη (v/v): 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%	I	Διαυγής
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	EtOH (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=5.5, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 2%, 4%, 6%, 10%, 15%	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=6.2, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 4%	II	Ίζημα
pH=6.2, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 5%	II	Λίγο ίζημα
pH=6.2, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 6%, 8%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=6.4, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 4%, 5%	II	Διαυγής
pH=6.4, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 6%, 8%, 10%, 20%	II	Λίγο ίζημα
pH=6.4, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=6.5, HEPES 0.1 M	EtOH (v/v): 2%, 4%, 6%, 10%, 15%	II	Διαυγής
pH=6.6, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 4%, 5%, 6%, 8%, 10%, 20%	II	Διαυγής
pH=6.6, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=6.8, MES 0.1 M	EtOH (v/v): 4%, 6%, 8%, 10%	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	EtOH (v/v): 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	EtOH (v/v): 5%, 10%, 20%	II	Διαυγής

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας			
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	EtOH (v/v): 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	MeOH (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	MeOH (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MeOH (v/v): 5%, 10%, 20%	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MeOH (v/v): 30%	II	Λίγο ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MeOH (v/v): 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MeOH (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Διαυγής
pH=6.0, MES 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 20%	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 30%, 40%, 50%	II	Ίζημα
pH=7.5, HEPES 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 40%	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 50%	II	Ίζημα
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%	II I	Διαυγής Διαυγής
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 40%, 50%	II	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	2-Προπανόλη (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%	II I	Διαυγής Διαυγής

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής: Άλατα**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.8, 1.4, 2.0, 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8, 1.6, 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.8, 1.4, 2.0, 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=5.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8, 1.6, 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=5.5, MES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0	I	Σφαιρουλίτες
pH=6.0, MES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.2, 1.4, 2.0, 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05	III	Λίγο ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.1, 0.15, 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=6.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4	II	Διαυγής
pH=6.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.4	I	Σφαιρουλίτες
pH=6.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4	I II	Σφαιρουλίτες Ίζημα
pH=6.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.6, 1.8, 2.0	II	Ίζημα
pH=6.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 2.2, 2.4	II	Πολύ ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4	II	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.4	I	Σφαιρουλίτες

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας

pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.6, 0.8, 1.0, 1.2	I II	Σφαιρουλίτες Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.4	I	Σφαιρουλίτες
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.4, 2.0	I II	Ίζημα Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.6, 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.8, 2.2	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=7.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4	II	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.4	I	Σφαιρουλίτες
pH=7.5, HEPES 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4	I II	Σφαιρουλίτες Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2	I III	Διαυγής Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.4, 0.6	I	Σφαιρουλίτες
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.5, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8	I II III	Ίζημα Ίζημα Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.0, 1.2, 1.4, 2.0, 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.6, 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=9.0, Bicine 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8	II	Ίζημα
pH=9.0, Bicine 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.6, 2.4, 3.2	II	Πολύ ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2	I III	Διαυγής Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.4, 0.6	I	Σφαιρουλίτες
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.5	III	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 2.0, 2.6, 3.0	I	Ίζημα
pH=4.5, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	III	Ίζημα
pH=5.0, AcOH/AcONa 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	III	Ίζημα
pH=6.2, Bis Tris 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	III	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6, 1.2	III	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	NaCl (M): 2.4	III	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	NaCl (M): 0.3, 0.6	III	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	NaCl (M): 1.2	III	Λίγο ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	NaCl (M): 2.4	III	Ίζημα

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής 1: MPD**	**Κατακρημνιστής 2: Άλας**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 1%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2, 0.5	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 1%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 5%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1	III	Διαυγής
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 5%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.15, 0.2	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 5%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 10%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1	III	Διαυγής
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 10%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.15, 0.2	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 10%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7	III	Ίζημα
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Ίζημα
pH=4.0, κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Ίζημα
pH=5.0, AcOH/AcONa 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Ίζημα
pH=5.0, AcOH/AcONa 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Λίγο ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 25%	NaCl (M): 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=9.0, Glycine/NaOH 0.05 M	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 25%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής
pH=9.0, Glycine/NaOH 0.05 M	MPD (v/v): 30%	NaCl (M): 0.02, 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 25%	NaCl (M): 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0	II	Διαυγής

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής 1: PEG's**	**Κατακρημνιστής 2: Άλας**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1	III	Διαυγής
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.15, 0.2	III	Λίγο ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 6%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2	III	Λίγο ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.3	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα
pH=6.0, MES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%	NaCl (M): 0.7	II	Ίζημα
pH=6.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%, 25%	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.3	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%	NaCl (M): 0.5	II	Λίγο ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 6%, 8%, 9%, 10%, 13%, 17%, 20%, 21%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%	NaCl (M): 0.7	II	Λίγο ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.7	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%, 25%	NaCl (M): 1.0	II	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%, 25%	NaCl (M): 1.3	II	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 1%	NaCl (M): 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 5%	NaCl (M): 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 10%	NaCl (M): 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3	III	Ίζημα
pH=7.2, HEPES 0.1 M	PEG_{6000} (w/v): 20%	NaCl (M): 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3	III	Ίζημα
pH=7.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v):	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα

Πίνακας 2.2 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας.

	9%, 13%, 17%, 21%, 25%			
pH=7.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%	NaCl (M): 0.7	II	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%, 25%	NaCl (M): 1.0	II	Ίζημα
pH=7.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%, 25%	NaCl (M): 1.3	II	Ίζημα
pH=7.8, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%	NaCl (M): 0.7	II	Διαυγής
pH=8.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 0.5%, 1%, 1.5%, 2.5%, 3%	NaCl (M): 0.7	II	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.3	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 9%	NaCl (M): 0.5	II	Λίγο ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%, 13%, 17%, 20%, 21%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.7	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%	NaCl (M): 1.0	II	Ίζημα
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 9%, 13%, 17%, 21%	NaCl (M): 1.3	II	Ίζημα
pH=8.3, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%	NaCl (M): 0.7	II	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%	NaCl (M): 0.3	II	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 6%, 8%, 10%	NaCl (M): 0.3	II	Λίγο ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.3	II	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%, 4%, 6%, 8%	NaCl (M): 0.5	II	Λίγο ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.5	II	Ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 2%	NaCl (M): 0.7	II	Διαυγής
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 4%, 6%, 8%	NaCl (M): 0.7	II	Λίγο ίζημα
pH=9.0, Tris/HCl 0.1 M	PEG_{3350} (w/v): 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%	NaCl (M): 0.7	II	Ίζημα

Πίνακας 2.3 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με προ-εξισορροπημένη κρεμαστή σταγόνα.

Πρωτεϊνικό δείγμα: $HrcQ_B$ με την αλληλουχία των δέκα ιστιδινών
Συγκέντρωση πρωτεϊνικού δείγματος: 8.5-14 mg/ml, όπως εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Bradford
Τύποι πρωτεϊνικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν:
I. 20 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH=7.5, αναστολείς πρωτεασών,
II. 200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH=7.5, αναστολείς πρωτεασών,
Μέθοδος κρυστάλλωσης: διάχυση ατμών με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας. 5 μl του πρωτεϊνικού διαλύματος αναμιγνύονται με 15 μl του διαλύματος κρυστάλλωσης έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να είναι αυτές που αναγράφονται στον πίνακα. Το μίγμα αφήνεται προς επώαση 2 ώρες στους 18ºC. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται και 5 μl από το υπερκείμενο τοποθετούνται σε γυάλινη καλυπτρίδα πάνω από 1 ml διαλύματος της ίδιας σύστασης με το αρχικό διάλυμα της σταγόνας.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής 1: MPD**	**Κατακρημνιστής 2: Άλας**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.2	I	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 0.6	I	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.0	I	Λίγο ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.4	I	Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	MPD (v/v): 5%, 10%, 15%, 20%	$(NH_4)_2SO_4$ (M): 1.8	I	Ίζημα
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 12%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 12%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.05, 0.1	I	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.15	I	Κρύσταλλοι
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 12%	NaCl (M): 0.05	I	Κρύσταλλοι
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 12%	NaCl (M): 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.05	I	Κρύσταλλοι
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=8.0, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Κρύσταλλοι
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 12%	NaCl (M): 0.05, 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.05	I	Σφαιρουλίτες
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 15%	NaCl (M): 0.1, 0.15	I	Διαυγής
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.05	I	Κρύσταλλοι
pH=8.5, Tris/HCl 0.1 M	MPD (v/v): 18%	NaCl (M): 0.1, 0.15	I	Διαυγής

Πίνακας 2.3 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με προ-εξισορροπημένη κρεμαστή σταγόνα.

pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	**Κατακρημνιστής 1: PEG's**	**Κατακρημνιστής 2: Άλας**	**Πρωτεΐνη**	**Αποτέλεσμα**
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (w/v): 2%	NaCl (M): 1.7, 1.9, 2.1, 2.3, 2.5	II	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (w/v): 5%	NaCl (M): 1.7, 1.9, 2.1, 2.3, 2.5	II	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 8%	NaCl (M): 0.3, 0.5	I	Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 8%	NaCl (M): 0.7, 0.8, 1.0	I	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 10%	NaCl (M): 0.3, 0.5	I II	Ίζημα Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 10%	NaCl (M): 0.7, 0.9, 1.1, 1.3	I II	Διαυγής Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 10%	NaCl (M): 0.8, 1.0	I	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (w/v): 10%	NaCl (M): 1.7, 1.9, 2.1, 2.3, 2.5	II	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 12%	NaCl (M): 0.3	I II	Ίζημα Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 12%	NaCl (M): 0.5, 0.7	I II	Σφαιρουλίτες Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 12%	NaCl (M): 0.8	I	Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 12%	NaCl (M): 0.9, 1.0, 1.1, 1.3, 1.5	I II	Διαυγής Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 14%	NaCl (M): 0.3	I II	Ίζημα Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 14%	NaCl (M): 0.5	I II	Σφαιρουλίτες Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 14%	NaCl (M): 0.7	I	Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 14%	NaCl (M): 0.8	I	Ίζημα + διφασικό
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 14%	NaCl (M): 1.0	I	Διφασικό
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 15%	NaCl (M): 0.7, 0.9, 1.1, 1.3	I II	Σφαιρουλίτες Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 16%	NaCl (M): 0.3, 0.5	I II	Ίζημα Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 16%	NaCl (M): 0.7, 0.8, 1.0	I	Διφασικό
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 18%	NaCl (M): 0.3	I	Ίζημα
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 18%	NaCl (M): 0.5, 0.7	I II	Διφασικό Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 18%	NaCl (M): 0.8	I	Διαφασικό
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 18%	NaCl (M): 0.9, 1.0, 1.1, 1.3, 1.5,	I II	Διφασικό Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 20%	NaCl (M): 0.7	I II	Σφαιρουλίτες Διαυγής
Χωρίς ρυθμιστικό δ/μα	PEG_{3350} (v/v): 20%	NaCl (M): 0.9, 1.1, 1.3,	I II	Διφασικό Διαυγής

Πίνακας 2.3 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της $HrcQ_B$ με προ-εξισορροπημένη κρεμαστή σταγόνα.				
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (v/v): 8%, 10%, 12%, 14%, 16%	NaCl (M): 0.5	I	Διαυγής
pH=7.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (v/v): 8%, 10%, 12%, 14%, 16%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής
pH=7.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (v/v): 8%, 10%, 12%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής
pH=8.0, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (v/v): 8%, 10%, 12%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής
pH=8.5, HEPES 0.1 M	PEG_{3350} (v/v): 8%, 10%, 12%	NaCl (M): 1.0	I	Διαυγής

Πίνακας 2.4 Πειράματα κρυστάλλωσης σε συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος.							
pH, ρυθμιστικό διάλυμα	**Σταγόνα (%w/v, PEG_{3350})**	**Δεξαμενή (%w/v, PEG_{3350})**					
		4	**8**	**16**	**20**	**24**	**28**
pH=5.5, κιτρικό οξύ 0.05 M	1, 3, 6, 9, 12, 15, 18	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ.ίζημα	Λ. ίζημα
pH=5.5, κιτρικό οξύ 0.05 M	19, 20					Λ. ίζημα	
pH=5.5, κιτρικό οξύ 0.05 M	21	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα
pH=5.5, κιτρικό οξύ 0.05 M	22					Λ. ίζημα	
pH=5.5, κιτρικό οξύ 0.05 M	24, 28	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα
pH=5.7, κιτρικό οξύ 0.05 M	19, 20, 21, 22					Λ. ίζημα	
pH=5.9, MES 0.05 M	19, 20, 21, 22					Λ. ίζημα	
pH=6.1, MES 0.05 M	1, 3, 6, 9, 12, 15, 18	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ.ίζημα	Λ. ίζημα
pH=6.1, MES 0.05 M	19, 20					Λ. ίζημα	
pH=6.1, MES 0.05 M	21	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα
pH=6.1, MES 0.05 M	22					Λ. ίζημα	
pH=6.1, MES 0.05 M	24, 28	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα	Λ. ίζημα
pH=6.3, MES 0.05 M	19, 20, 21, 22					Λ. ίζημα	
pH=6.5, HEPES 0.05 M	19					Κρυ/λοι	
pH=6.5, HEPES 0.05 M	20, 21, 22					Λ. ίζημα	

Στις συνθήκες που εξετάστηκαν αναφέρεται το αποτέλεσμα. Οι συνθήκες που δεν διερευνήθηκαν σημειώνονται με διαγράμμιση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

Πίνακας Β.1 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μονομερών για το σχηματισμό του διμερούς. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT της CCP4 (Collaborative Computanional Project Number 4, 1994). Η διερεύνηση έγινε για αποστάσεις από 2 έως 3.5 Å. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν υδρογονικούς δεσμούς.

Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση		Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση	
Asp	13A O	Ala	31D CB	3.40		Ala	31A N	Asp	13D O	2.97	***
		Ala	31D N	2.87	***	Ala	31A CA	Asp	13D OD2	3.45	
		Leu	30D N	3.28	***	Ala	31A CB	Asp	13D O	3.43	
Asp	13A OD1	Arg	34D NH1	2.56	***			Asp	13D OD2	3.31	
Leu	15A O	Thr	29D CA	3.08		Leu	36A O	Leu	80D CD2	3.06	
		Thr	29D C	3.35				Leu	80D CG	3.32	
		Leu	30D N	2.87	***	Ala	38A CA	Ile	77D O	3.42	
Leu	17A N	Leu	28D O	2.81	***	Ala	38A C	Ile	77D O	3.48	
Leu	17A O	Arg	27D CA	3.24		Gly	39A N	Ile	77D O	2.61	***
		Leu	28D N	3.15	***	Gly	39A O	Gln	76D NE2	2.86	***
Leu	17A CB	Leu	28D O	3.42		Thr	40A O	Ile	77D N	2.89	***
Asp	18A OD1	Arg	27D CZ	3.44				Ile	77D CG1	3.33	
Leu	19A N	Leu	26D O	2.80	***	Ile	41A CA	Leu	75D O	3.23	
Leu	19A CA	Leu	26D O	3.45		Leu	42A N	Leu	75D O	2.80	***
Leu	19A O	Leu	26D N	2.87	***	Leu	42A O	Gly	74D CA	3.19	
		Leu	26D O	3.14	***			Gly	74D C	3.43	
		Glu	25D CA	3.19				Leu	75D N	2.75	***
		Glu	25D CB	3.13		Glu	43A OE2	Arg	72D CD	3.25	
Thr	20A CG2	Arg	22D NH1	3.46				Arg	72D NE	2.68	***
Leu	21A N	Gly	24D O	2.90	***	Val	44A N	Leu	73D O	2.75	***
Leu	21A O	Arg	22D CA	3.27		Val	44A CA	Leu	73D O	3.47	
		Cys	23D N	2.96	***	Val	44A O	Leu	73D O	3.31	*
Arg	22A CA	Leu	21D O	3.48		Pro	49A CG	Gly	71D O	3.23	
Cys	23A N	Leu	21D O	2.87	***	Pro	49A CD	Gly	71D O	3.37	
Cys	23A O	Leu	73D CD2	3.12		Arg	72A CD	Glu	43D OE2	3.21	
Cys	23A CB	Cys	23D SG	3.07		Arg	72A NH1	Glu	43D OE1	3.04	***
Cys	23A SG	Cys	23D CB	3.14				Glu	43D CD	3.48	
		Cys	23D SG	2.05				Glu	43D OE2	3.15	***
		Leu	21D O	3.50		Leu	73A O	Val	44D N	3.16	***
Gly	24A O	Leu	21D N	2.83	***	Leu	73A CD2	Cys	23D O	3.18	
		Thr	20D CA	3.41		Gly	74A CA	Leu	42D O	3.11	
Glu	25A CA	Leu	19D O	3.47		Gly	74A C	Leu	42D O	3.45	
Leu	26A N	Leu	19D O	2.90	***	Leu	75A N	Leu	42D O	2.85	***
Leu	26A O	Leu	19D N	2.77	***	Leu	75A O	Ile	41D CA	3.34	
		Leu	19D CA	3.46				Leu	42D N	2.76	***
		Leu	19D O	3.06	***			Thr	40D O	3.43	*
Arg	27A CA	Leu	17D O	3.28		Gln	76A CA	Thr	40D O	3.27	
Leu	28A N	Leu	17D O	3.23	***	Gln	76A NE2	Gly	39D O	3.09	***
Leu	28A O	Leu	17D N	2.80	***	Ile	77A N	Thr	40D O	2.80	***
		Leu	17D O	3.48	*	Ile	77A O	Ala	38D CA	3.38	
Thr	29A CA	Leu	15D O	3.13				Ala	38D C	3.48	
Thr	29A C	Leu	15D O	3.43				Gly	39D N	2.66	***
Leu	30A N	Leu	15D O	2.91	***	Leu	80A CG	Leu	36D O	3.41	
		Asp	13D O	3.46	*						
Leu	30A CD2	Leu	12D O	3.48							

Πίνακας Β.2 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διμερών (αλληλεπιδράσεις μεσεπιφάνειας) που σταθεροποιούν το τετραμερές. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT της CCP4 (Collaborative Computanional Project Number 4, 1994). Η διερεύνηση έγινε για αποστάσεις από 2 έως 3.5 Å. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν υδρογονικούς δεσμούς.

Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση		Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση	
						Asp	37B OD1	Arg	35A NE	3.02	***
Arg	34B O	Arg	35A CZ	3.46				Arg	35A NH2	3.26	***
		Arg	35A NH2	3.01	***	Asp	37B OD2	Arg	35A NE	3.03	***
		Arg	35A NH1	3.13	***	Ile	41B N	Ile	41A O	2.74	***
Arg	35B O	Arg	35A CB	3.47		Ile	41B O	Ile	41A N	2.79	***
		Arg	35A O	3.27	***	Glu	43B OE1	Gln	76D NE2	3.29	***
Arg	35B CB	Arg	35A O	3.40		Val	67C CA	Glu	70D OE2	3.46	
		Asp	37A OD2	3.42		Asp	68C N	Glu	70D OE2	2.97	***
Arg	35B NE	Asp	37A CG	3.48		Asp	68C O	Glu	70D N	3.12	***
		Asp	37A OD1	3.10	***			Glu	70D CG	3.20	
		Asp	37A OD2	3.07	***	Glu	70C N	Asp	68D O	3.05	***
Arg	35B CZ	Arg	34A O	3.35		Glu	70C CG	Asp	68D O	3.38	
Arg	35B NH1	Arg	34A O	3.17	***	Glu	70C OE2	Val	67D CA	3.34	
Arg	35B NH2	Leu	36A O	3.31	*			Asp	68D N	3.06	***
		Arg	34A O	2.81	***	Gln	76C NE2	Glu	43A OE1	3.23	***
Leu	36B O	Arg	35A NH2	3.07	***						
Asp	37B CG	Arg	35A NE	3.42							

Πίνακας Β.3 Κρυσταλλικές επαφές μεταξύ τετραμερών που προκύπτουν από την εφαρμογή της πράξης συμμετρίας –X, Y+1/2, -Z. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT της CCP4. Η διερεύνηση έγινε για αποστάσεις από 2 έως 3.5 Å. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν υδρογονικούς δεσμούς.

Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση		Άτομο αναφοράς		άτομο στόχος		απόσταση	
Ala	11A CA	Thr	82D O	3.38		Ser	14C O	Gln	59B NE2	3.10	***
Ala	11A O	Val	81D O	3.31	*	Leu	15C CA	Gln	59B OE1	3.44	
Ser	14A O	Gln	59D NE2	3.17	***	Ala	16C N	Gln	59B OE1	2.73	***
Leu	15A CA	Gln	59D OE1	3.49		Ala	16C O	His	56B CE1	3.47	
Ala	16A N	Gln	59D OE1	2.70	***	His	56C CE1	Ala	16B O	3.26	
Ala	16A O	His	56D CE1	3.32		Gln	59C OE1	Leu	15B CA	3.41	
His	56A ND1	Ala	16D O	3.44	*			Leu	15B CD1	3.45	
His	56A CE1	Ala	16D O	3.28				Leu	15B C	3.50	
Gln	59A OE1	Ala	16D N	2.85	***			Ala	16B N	2.65	***
Gln	59A NE2	Ser	14D O	2.84	***	Gln	59C NE2	Ser	14B O	3.18	***
Glu	70A CD	Asp	37D CB	3.43		Ser	14D O	Gln	59A NE2	2.84	***
Glu	70A OE1	Asp	37D CB	3.26		Ala	16D N	Gln	59A OE1	2.85	***
Glu	70A OE2	Asp	37D CB	3.29		Ala	16D O	His	56A CE1	3.28	
		Ala	38D N	2.72	***			His	56A ND1	3.44	*
		Ala	38D CB	3.29		Asp	37D CB	Glu	70A OE1	3.26	
Ser	14B O	Gln	59C NE2	3.18	***			Glu	70A CD	3.43	
Leu	15B CA	Gln	59C OE1	3.41				Glu	70A OE2	3.29	
Leu	15B C	Gln	59C OE1	3.50		Ala	38D N	Glu	70A OE2	2.72	***
Leu	15B CD1	Gln	59C OE1	3.45		Ala	38D CB	Glu	70A OE2	3.29	
Ala	16B N	Gln	59C OE1	2.65	***	His	56D CE1	Ala	16A O	3.32	
Ala	16B O	His	56C CE1	3.26		Gln	59D OE1	Leu	15A CA	3.49	
His	56B CE1	Ala	16C O	3.47				Ala	16A N	2.70	***
Gln	59B OE1	Leu	15C CA	3.44		Gln	59D NE2	Ser	14A O	3.17	***
		Ala	16C N	2.73	***	Val	81D O	Ala	11A O	3.31	*

Gln	59B	NE2	Ser	14C	O	3.10	***	Thr	82D	O	Ala	11A	CA	3.38	

Πίνακας Β.4 Κρυσταλλικές επαφές μεταξύ τετραμερών που προκύπτουν από μετάθεση παράλληλα στον άξονα b κατά 1 μονάδα του μήκους του. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα CONTACT της CCP4. Η διερεύνηση έγινε για αποστάσεις από 2 έως 3.5 Å. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν υδρογονικούς δεσμούς.

Άτομο αναφοράς			άτομο στόχος			απόσταση		Άτομο αναφοράς			άτομο στόχος			απόσταση	
Glu	43A	OE1	Ser	48D	OG	3.12	***	Val	44C	O	Gly	46B	CA	3.45	
Thr	45A	OG1	Gly	46D	N	3.05	***	Gly	46C	N	Thr	45B	OG1	3.00	***
Thr	45A	CG2	Ile	47D	O	3.48		Ser	48C	CB	Glu	43B	OE2	3.45	
Ile	47A	O	Arg	72A	CD	3.32					Arg	72C	NE	3.43	
Ser	48A	OG	Arg	72A	NH2	3.28	***	Glu	65C	CD	His	51D	CE1	3.27	
Gly	71A	O	Arg	72D	NH1	2.95	***				His	51D	NE2	3.30	
Arg	72A	CD	Ile	47A	O	3.32		Arg	72C	CG	Gly	71B	O	3.49	
Arg	72A	NH2	Ser	48A	OG	3.28	***	Arg	72C	NE	Ser	48C	CB	3.43	
Ala	38B	CB	Arg	79D	NE	3.35		Arg	72C	NH1	Gly	71B	O	2.79	***
Glu	43B	OE2	Ser	48C	CB	3.45		Arg	79C	CB	Thr	78D	O	3.47	
Thr	45B	OG1	Gly	46C	N	3.00	***	Gly	46D	N	Thr	45A	OG1	3.05	***
Gly	46B	CA	Val	44C	O	3.45		Ile	47D	O	Thr	45A	CG2	3.48	
Gly	46B	C	Glu	43C	OE2	3.29		Ser	48D	OG	Glu	43A	OE1	3.12	***
			Glu	43C	CD	3.46		His	51D	CE1	Glu	65C	CD	3.27	
Gly	46B	O	Glu	43C	CD	3.46		His	51D	NE2	Glu	65C	CD	3.30	
Ile	47B	N	Glu	43C	OE2	3.26	***	Arg	72D	NH1	Gly	71A	O	2.95	***
Gly	71B	O	Arg	72C	CG	3.49		Thr	78D	O	Arg	79C	CB	3.47	
			Arg	72C	NH1	2.79	***	Arg	79D	NE	Ala	38B	CB	3.35	
Glu	43C	CD	Gly	46B	O	3.46		Glu	43C	OE2	Ile	47B	N	3.26	***
			Gly	46B	C	3.46					Gly	46B	C	3.29	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2001). How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol.* **9**, 209-214.
2. Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly, *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 160-165.
3. Alfano, J. R. & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria trafficking harpins, Avr proteins and death, *J. Bacteriol.* **179**, 5655-5662.
4. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J.,Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
5. Anderson, D. M.., Fouts, D. E., Collmer, A. & Schneewind, O. (1999). 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. USA* **96**, 12839-12843.
6. Anthony, L. C., Artsimovitch, I., Svetlov, V., Landick, R. & Burgess, R. R. (2000). Rapid purification of His_6-tagged *Bacillus subtilis* core RNA polymerase, *Protein Express. Purif.* **19**, 350-354.
7. Armas, H. N., Rabijns, A., Verboven, C., Desair, J., Broek, A. V., Vanderleyden J. & Ranter, C. (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel pectate lyase from *Azospirillum irakense*, *Acta Cryst.* D**58**, 292-295.
8. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions, *Science* **276**, 726-733.
9. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science* **289**, 905-919.
10. Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals, *J. Struct. Biol.* **142**, 66-76.
11. Birtalan, S. & Ghosh, P. (2001). Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 974-978.
12. Birtalan, S. C., Phillips, R. M. & Ghosh, P. (2002). Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacteria pathogens, *Mol. Cell* **9**, 971-980.

13. Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S.-I. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 3027-3030.
14. Bollag, D. M., Rozycki, M. D. & Edelstein, S. J. (1996). Protein methods, 2nd ed., Wiley-Liss, pp 301-349.
15. Bondos, S. & Bicknell, A. (2003). Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification, *Anal. Biochem.* **316**, 223-231.
16. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
17. Brennan, S. & Cowan, P. L. (1992). A suite of programs for calculating x-ray absiorption, reflection and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelengths, *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 850-853.
18. Brown, P. N., Hill, C. P. & Blair, D. F. (2002). Crystal structure of the middle and C-terminal domains of the flagellar rotor proteins FliG, *EMBO J.* **21**, 3225-3234.
19. Brünger, A. T., Kuriyan, J. & Karplus, M. (1987). Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics, *Science* **235**, 458-460.
20. Brünger, A. T., Krukowski, A. & Erickson, J. (1990). Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing, *Acta Cryst.* **A**46, 585-593.
21. Brünger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* **355**, 472-475.
22. Bucher, M. H., Evdokimov, A. G. & Waugh, D. S. (2002). Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein, *Acta Cryst.* D**58**, 392-397.
23. Büttner, D. & Bonas, U. (2002). Port of entry – the type III secretion translocon, *Trends Microbiol.* **10**, 186-192.
24. Büttner, D. & Bonas, U. (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell, *EMBO J.* **21**, 5313-5322.
25. Büttner, D. & Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria, *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 312-319.

26. Caylor, C. L. *et al.* (1999). Macromolecular impurities and disorder in protein crystals, *Proteins Struct. Funct. Gen.* **36**, 270-281.
27. Charkowski, A. O., Huang, H.-C. & Collmer, A. (1997). Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. syringae *hrp* mutants suggest 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**, 3866-3874.
28. Chayen, N. E. (1997). The role of oil in macromolecular crystallization, *Structure* **5**, 1269-1274.
29. Chayen, N. E. (1998). Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques, *Acta Cryst.* D**54**, 8-15.
30. Chernov, A. (2003). Protein crystals and their growth, *J. Struct. Biol.* **142**, 3-21.
31. Chothia, C. (1975). Structural inbvariants in protein folding, *Nature* **254**, 304-308.
32. Coleman, J. E., Allan, B. J. & Vallee, B. L. (1960). Protein spherulites, *Science* **131**, 350-352.
33. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Cryst.* D**50**, 760-763.
34. Collazo, C. & Galán, J. E. (1996). Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*, *Infect. Immun.* **64**, 3524-3531.
35. Collazo, C. & Galán, J. E. (1997). The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell, *Mol. Microbiol.* **24**, 747-756.
36. Collmer, A., Badel, J. L., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Derrick, Fouts, D. E., Ramos, A. R., Rehm, A. H., Anderson, D. M., Schneewind, O., Dijk, K. & Alfano, J. R. (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8770-8777.
37. Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D. J. & Alfano, J. R. (2002). Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors, *Trends Microbiol.* **10**, 462-469.
38. Cornelis, G. R. (2000). Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host, *Phil. Trans. R. Lond. B* **355**, 681-693.

39. Cornelis, G. R. & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems, *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 735-774.

40. Cornelis, G. R. (2002). The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry, *Nature Reviews* **3**, 742-752.

41. Cowtan, K. D. & Zhang, K. Y. J. (1999). Density modification for macromolecular phase improvement, *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **72**, 245-270.

42. Dale, C., Plague, G. R., Wang, B., Ochman, H. Moran, N. A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12397-12402.

43. Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N. & Sygusch, J. (2002). Crystallization and X-ray crystallographic analysis of p24, a component of the potato nuclear factor PBF-2, *Acta Cryst.* D**58**, 296-298.

44. Dobrianov, I., Caylor, C., Lemay, S. G., Finkelstein, K. D. & Thorne, R. E. (1999). X-ray diffraction studies of protein crystal disorder, *J. Crystal Growth* **196**, 511-523.

45. Dong, A., Huang, P. & Caughey, W. S. (1990). Protein secondary structure in water from second-derivative amide I infrared spectra, *Biochemistry* **29**, 3303-3308.

46. Dong, A. & Caughey, W. S. (1994). Infrared methods for study of hemoglobin reactions and structures, *Methods Enzymol.* **232**, 139-175.

47. Doublié, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination, *Methods Enzymol.* **276**, 523-530.

48. Drenth, J. (1994). Principles of protein X-ray crystallography, ed. Cantor, C. R., Springer-Verlag New York, Inc.

49. Durbin, S. D. & Feher, G. (1996). Protein crystallization, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **47**, 171-204.

50. Economou, A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway, *Trends Microbiol.* **7**, 315-320.

51. Evans, G. & Pettifer, R. F. (2001). CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra, *J. Appl. Cryst.* **34**, 82-86.

52. Evdokimov, A. G., Anderson, D. E., Routzahn, K. M. & Waugh, D. S. (2001). Unusal molecular architecture of the Yersinia pestis cytotoxin YopM: A leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit, *J. Mol. Biol.* **312**, 807-821.

53. Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Routzahn, K. M., Coleland, T. D. & Waugh, D. S. (2001). Structure of the N-terminal domain of *Yersinia pestis* YopH at 2.0 Å resolution, *Acta Cryst.* D**57**, 793-799.

54. Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Routzahn, K. M. & Waugh, D. S. (2002). Crystal structure of the *Yersinia pestis* GTPase activator YopE, *Prot. Sci.* 11, 401-408.

55. Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Routzahn, K. M. & Waugh, D. S. (2002). Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*, *Acta Cryst.* D**58**, 398-406.

56. Evdokimov, A. G., Phan, J., Tropea, J. E., Routzahn, K. M., Peters III, H. K., Pokross, M. & Waugh, D. S. (2003). Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion, *Nat. Struct. Biol.* **10**, 789-793.

57. Feher, G. & Kam, Z. (1985). Nucleation and growth of protein crystals: general principles and assays, *Methods Enzymol.* **114**, 78-110.

58. Feldman, M. F. & Cornelis, G. R. (2003). The multitalented type III chaperones: all you can do with 15 kDa, *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 151-158.

59. Fish, N. M. & Hoare, M. (1987). Recovery of protein inclusion bodies, *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 102-104.

60. Francis, N. R., Sosinsky, G. E., Thomas, D. & DeRosier, D. J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex, *J. Mol. Biol.* **235**, 1261-1270.

61. Frishman, D. & Argos, P. (1995). Knowledge-based secondary structure assignment, *Proteins* 23, 566-579.

62. Galán, J. E. (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells, *Mol. Microbiol.* **20**, 263-271.

63. Galán, J. E. & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells, *Science* **284**, 1322-1328.

64. Gao, G. F. *et al.* (1998). Assembly and crystallization of the complex between the human T cell coreceptor CD8α homodimer and HLA-A2, *Prot. Sci.* **7**, 1245-1249.

65. García de la Torre, J., Huertas, M. L. & Carrasco, B. (2000). Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* **78**, 719-730.

66. Garman, E. F. & Schneider, T. R. (1997). Macromolecular cryocrystallography, *J. Appl. Cryst.* **30**, 211-237.

67. García-Sáez, I. & Plasterk, R. H. A. (2000). Purification of the *Caenorhabditis elegans* transposase Tc1A refolded during gel filtration chromatography, *Protein Express. Purif.* **19**, 355-361.

68. Giegé, R., Lorber, B. & Théobald-Dietrich, A. (1994). Crystallogenesis of biological macromolecules: Facts and perspectives, *Acta Cryst.* D**50**, 339-350.

69. Girard, E., Chantalat, L., Vicat, J. & Kahn, R. (2002). Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: results with tetragonal hen egg-white lysozyme, *Acta Cryst.* D**58**, 1-9.

70. Glusker, J. & Trueblood, K. N. (1972). Crystal structure analysis, a primer, Oxford University Press.

71. Goldberg, M. E., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1991). A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme, *Biochemistry* **30,** 2790-2797.

72. González, A., Pédelacq, J.-D., Solà, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., Samama, J.-P. & Benini, S. (1999). Two-wavelength MAD phasing: in search of the optimal choice of wavelengths, *Acta Cryst.* D**55**, 1449-1458.

73. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metoz, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript, *Bioinformatics* **15**, 305-308.

74. Haase-Pettingell & King, J. (1988). Formation of aggregates from a thermolabile *in vivo* folding intermediate in P22 tailspike maturation, *J. Biol. Chem.* **263**, 4977-4983.

75. Hakansson, K., Broder, D., Wang, A. H.-J. & Miller, C. G. (2000). Crystallization of peptidase T from *Salmonella typhimurium, Acta Cryst.* D**56**, 924-926.

76. Hames, B. D. (1990). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, *Gel electrophoresis of proteins, a practical approach* 1-139, eds Hames, B. D. & Rickwood, Oxford University Press.

77. Han, Q. & Lin, S.-X. (2000). The study of crystallization of estrogenic 17β-hydroxysteroid dehydrogenase with DHEA and DHT at elevated temperature, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 100-106.

78. Harp, J. M., Timm, D. E. & Bunick, G. J. (1998). Macromolecular crystal annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography, *Acta Cryst.* D**54**, 622-628.

79. Hartley, D. L. & Kane, J. F. (1987). Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*, *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 101-102.

80. Hauck, P., Thilmony, R. & He S.-Y. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8577-8582.

81. He, S.-Y. (1997). Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly?, *Trends Microbiol.* **5**, 489-495.

82. He, S.-Y. & Jin, Q. (2003). The Hrp pilus: learning from flagella, *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 15-19.

83. Hendrickson, W., Smith, J. L. & Sheriff, S. (1985). Direct phase determination based on anomalous scattering, *Methods Enzymol.* **115**, 41-55.

84. Hendrickson, W., Horton, J. R. & LeMaster, D. M. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure, *EMBO J.* **9**, 1665-1672.

85. Hendrickson, W. & Ogata, C. M. (1997). Phase determination from multiwavelength anomalous diffraction measurements, *Methods Enzymol.* **276**, 494-523.

86. Hienonen, E., Roine, E., Romantschuk, M. & Taira, S. (2002). mRNA stability and the secretion signal of HrpA, a pilin secreted by the type III system in *Pseudomonas syringae*, *Mol. Genet. Genomics* **266**, 973-978.

87. Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

88. Hochuli, E. (1988). Large-scale chromatography of recombinant proteins, *J. Chromatogr.* **444**, 293-302.

89. Hofmann, A.., Proust, J., Dorowski, A., Schantz, R. & Huber, R. (2000). Annexin 24 from *Capsicum annuum, J. Biol. Chem.* **275**, 8072-8082.

90. Hollingsworth, E. J., Isupov, M. N. & Littlechild, J. A. (2002). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of L-aminoacylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*, *Acta Cryst.* D**58**, 507-510.

91. Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices, *J. Mol. Biol.* **233**, 123-138.

92. Hooft, R. W. W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures, *Nature* **381**, 272.

93. Howell, P. L., Blessing, R. H., Smith, G. D. & Weeks, C. M. (2000). Optimizing DREAR and SnB parameters for determining Se-atom substructures, *Acta Cryst.* D**56**, 604-617.

94. Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.

95. Huguet, E., Hahn, C., Wengelnik, K. & Bonas, U. (1998). *hrpA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction, *Mol. Microbiol.* **29**, 1379-1390.

96. International Tables for Crystallography (1989). Space group symmetry, ed. Hahn, T., Vol. A

97. Jackson, M. W. & Plano, G. V. (2000). Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system, *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 85-90.

98. Janknecht, R., Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R., Nordheim, A. & Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8972-8976.

99. Jeruzalmi, D. & Steitz, T. A. (1997). Use of organic cosmotropic solutes to crystallize flexible proteins: application to T7 RNA polymerase and its complex with the inhibitor T7 lysozyme, *J. Mol. Biol.* **274**, 748-756.

100. Jin, Q. & He, S.-Y. (2001). Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*, *Science* **294**, 2556-2558.

101. Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A. L. & He, S.-Y. (2001). Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*, *Mol. Microbiol.* **40**, 1129-1139.

102. Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. & He, S.-Y. (2003). Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*, *Microbes Infect.* **5**, 301-310.

103. Jones, D.T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *J. Mol. Biol.* **292**, 195-202.

104. Jovine, L. (2000). A simple technique to control macromolecular crystal nucleation efficiently using a standard vapour-diffusion setup, *J. Appl. Cryst.* **33**, 988-989.

105. Kadirvelraj, R., Harris, P., Poulsen, J.-C. N., Kauppinen, S. & Larsen, S. (2002). A stepwise optimization of crystals of rhamnogalacturonan lyase from *Aspergillus aculeatus*, *Acta Cryst.* D**58**, 1346-1349.

106. Khandelwal, P., Keliikuli, K., Smith, C. L., Saper, M. A. & Zuiderweg, E. R. P. (2002). Solution structure and phosphopeptide binding to the N-terminal domain of *Yersinia* YopH: Comparison with a crystal structure, *Biochemistry* **41**, 11425-11437.

107. Kim, K. M., Yi, E. C., Baker, D. & Zhang, K. Y. J. (2001). Post-translational modification of the N-terminal His tag interferes with the crystallization of the wild-type and mutant SH3 domains from chicken src tyrosine kinase, *Acta Cryst.* D**57**, 759-762.

108. Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11008-11013.

109. King, J. & Haase-Pettingell, C. (1987). Aggregate formation from thermolabile intermediates in the maturation of the thermostable P22 tailspike, *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 105-108.

110. Khan, S., Zhao, R. & Reese, T. S. (1998). Architectural features of the *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch revealed by disrupted C-rings, *J. Stuct. Biol.* **122**, 311-319.

111. Klein, J. & Dhurjati, P. (1995). Protein aggregation kinetics in an *Escherichia coli* strain overexpressing a *Salmonella typhimurium* CheY mutant gene, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1220-1225.

112. Kleywegt, G. J. & Brünger, A. T. (1996). Checking your imagination: applications of the free R value, *Structure* **4**, 897-904.

113. Knight, S. D. (2000). RSPS version 4.0: a semi-interative vector-search program for solving heavy-atom derivatives, *Acta Cryst.* D**56**, 42-47.

114. Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation, *Trends Cell Biol.* **10**, 524-530.

115. Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structure, *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.

116. Kriminski, S., Caylor, C. L., Nonato, M. C., Finkelstein, K. D. &Thorne, R. E. (2002). Flash-cooling and annealing of protein crystals, *Acta Cryst.* D**58**, 459-471.

117. Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S.-I. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Science* **280**, 602-605.

118. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.-I. & Galán, J. E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10225-10230.

119. Lamani, E., McPherson, D. T., Hollingshead, S. K. & Jedrzejas, M. J. (2000). Production, characterization and crystallization of truncated forms of pneumococcal surface protein A from *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.* **20**, 379-388.

120. Landgraf, R., Xenarios, I. & Eisenberg, D. (2001). Three-dimensional cluster analysis identifies interfaces and functionl residue clusters in proteins, *J. Mol. Biol.* **307**, 1487-1502.

121. LaVallie, E. R., McCoy, M., Smith, D. B. & Riggs, P. (1994). Enzymatic and chemical cleavage of fusion proteins, *Current protocols in molecular biology*, eds. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl., K. **3**, unit 164B.

122. Lech, K. & Brent, R. (1987). Media preparation and bacteriological tools, *Current protocols in molecular biology*, eds. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl., K. **1**, unit 1.1.

123. Lehr, R. V., Elefante, L. C., Kikly, K. K., O'Brien, S. P. & Kirkpatrick, R. B. (2000). A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of

Histidine-tagged recombinant proteins expressed in drosophila S2 cells, *Protein Express. Purif.* **19**, 362-368.

124. Leung, C. J., Nall, B. T. & Brayer, G. D. (1989). Crystallization of yeast iso-2-cytochrome c using a novel hair seeding technique, J. Mol. Biol. 206, 783-785.
125. Li, C.-M., Brown, I., Mansfield, J., Stevens, C., Boureau, T., Romantschuk, M. &Taira, S. (2002). The Hrp pilus of *Pseudomonas syringae* elongates from its tip and acts as a conduit for translocation of the effector protein HrpZ, *EMBO J.* **21**, 1909-1915.
126. Li, J., Ochman, H., Groisman, E. A., Boyd, E. F., Solomon, F., Nelson, K. & Selander, R. K. (1995). Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7252-7256.
127. Liljas, A. & Newcomer, M. E. (1981). Purification and crystallization of a protein complex from *Bacillus stearothermophilus* ribosomes, *J. Mol. Biol.* **153**, 393-398.
128. Lindgren, P. B., Peet, R. C. & Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants, *J. Bacteriol.* **168**, 512-522.
129. Lindwall, G., Chau, M.-F., Gardner, S. R. & Kohlstaedt, L. A. (2000). A sparse matrix approach to the solubilization of overexpressed proteins, *Protein Engng.* **13**, 67-71.
130. Lloyd, S. A., Whitby, F. G., Blair, D. F. & Hill, C. P. (1999). Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor, *Nature* **400**, 472-475.
131. Lloyd, S. A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. & Francis, M. (2001). Targeting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**, 367-371.
132. Lucas, R. W., Larson, S. B. & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus, *J. Mol. Biol.* **317**, 95-108.
133. Luft, J. R., Collins, R. J., Fehrman, N. A., Lauricella, A. M., Veatch, C. K. & DeTitta, G. T. (2003). A deliberate approach to screening for initial crystallization conditions of biological macromolecules, *J. Struct. Biol.* **142**, 170-179.

134. Luo, Y. *et al.* (2001). Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1031-1036.

135. Lusty, C. J. (1999). A gentle vapor-diffusion technique for cross-linking of protein crystals for cryocrystallography, *J. Appl. Cryst.* **32**, 106-112.

136. Lux, R., Kar, N. & Khan, S. (2000). Overproduced *Salmonella typhimurium* flagellar motor switch complexes, *J. Mol. Biol.* **298**, 577-583.

137. Marie, C., Broughton, W. J. & Deakin, W. J. (2001). *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 336-342.

138. Marston, F. A. O., Angal, S., Lowe, P. A., Chan, M. & Hill, C. R. (1987). Scale-up of the recovery and reactivation of recombinant proteins, *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 112-115.

139. Mathews, M. A. A., Tang H. L. & Blair, D. F. (1998). Domain analysis of the FliM protein of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **180**, 5580-5590.

140. Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.

141. McCarthy, A. A. *et al.* (2001). Expression, crystallization and preliminary characterization of methylmalonyl coenzyme A epimerase from *Propionibacterium shermanii*, *Acta Cryst.* D**57**, 706-708.

142. McPherson, A. (1982). Preparation and analysis of protein crystals, Wiley and Sons, Inc., New York.

143. McPherson, A. (1992). Two approaches to the rapid screening of crystallization conditions, *J. Cryst.Growth* **122**, 161-167.

144. McPherson, A., Malkin, A. & Kuznetsov. Y. (1995). The science of macromolecular crystallization, *Structure* **3**, 759-768.

145. McRee, D. E. (1999). XtalView/Xfit- a versalite program for manipulating atomic coordinates and electron density, *J. Struct. Biol.* **125**, 156-165.

146. Merritt, E. A. & Murphy, M. E. P. (1994). Raster3D version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics, *Acta Cryst.* D**50**, 869-873.

147. Miller, B. R., Gallo, S. M., Khalak, H. G. & Weeks, C. M. (1994). SnB: Crystal structure determination *via* Shake-and-Bake, *J. Appl. Cryst.* **27**, 613-621.

148. Minamino, T. & Macnab, R. M. (1999). Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates, *J Bacteriol.* **181**, 1388-1394.

149. Mudgett, M. B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Rossier, O., Bonas, U. & Staskawicz, B. J. (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13324-13329.

150. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Cryst.* D**53**, 240-255.

151. Nagai, K., Thøgersen, H-C. & Luisi, B. F. (1987). Refolding and crystallographic studies of eukaryotic proteins produced in *Escherichia coli*, *Biochem. Soc. Trans.* **16**, 108-110.

152. Nandhagopal, N., Simpson, A. A., Gurnon, J. R., Yan, X., Baker, T. S., Graves, M. V., Van Etten, J. L. & Rossman, M. G. (2002). The structure and evolution of the major capsid protein of a large, lipid-containing DNA virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14758-14763.

153. Nicholls, A., Sharp, K. A. & Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons, *Proteins* **11**, 281-296.

154. O'Neill, J. W., Kim, D. E., Baker, D. & Zhang, K. Y. J. (2001). Structures of the B1 domain of protein L from *Peptostreptococcus magnus* with a tyrosine to tryptophan substitution, *Acta Cryst.* D**57**, 480-487.

155. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.

156. Pallen, M. J., Francis, M. S. & Fütterer, K. (2003). Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators, *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 53-60.

157. Pannu, N. S. & Read, R. J. (1996). Improved structure refinement through maximum likelihood, *Acta Cryst.* A**52**, 659-668.

158. Papanikolau, Y. & Kokkinidis, M. (1997). Solubility, crystallization and chromatographic properties of macromolecules strongly depend on substances that reduce the ionic strength of the solution, *Protein Engng.* **10**, 847-850.

159. Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A. & Dougherty, W. G. (1994). Release of protein and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, *Anal. Biochem.* **216,** 413-417.

160. Patel, S., Cudney, B. & McPherson, A. (1995). Polymeric precipitants for the crystallization of macromolecules, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **207**, 819-828.

161. Patra, A. K., Mukhopadhyay, R. M., Krishnan, A., Garg, L. C. & Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli, Protein Express. Purify.* **18**, 182-192.

162. Petsko, G. A. (1975). Protein crystallography at sub-zero temperatures: cryo-protective mother liquors for protein crystals, *J. Mol. Biol.* **96**, 381-392.

163. Petty, K. J. (1996). Metal-chelate affinity chromatography, *Current protocols in molecular biology*, ed. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl., K. **2**, unit 10.11B.

164. Plano, G. V., Day, J. B. & Ferracci, F. (2001). Type III export: new uses for an old pathway, *Mol. Microbiol.* **40**, 284-293.

165. Pohl, E., González, A., Hermes, C. & van Silfhout, R. G. (2001). Overview of the tunable beamlines for protein crystallography at the EMBL Hamburg Outstation; an analysis of current and future usage and developments, *J. Synchrotron Rad.* **8**, 1113-1120.

166. Polayes, D. A., Goldstein, A., Ward, G. & Hughes, Jr. A. J. (1994). TEV protease, recombinant: a site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins, *Focus* **16**, 2-5.

167. Polayes, D. A. (1996). Prokaryotic protein expression and purification with the PROEX™ HT expression system, *Focus* **18**, 50-53.

168. Pollastri, G., Przybylski, D., Rost, B. & Baldi, P. (2002). Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles, *Proteins* **47**, 228-235.

169. Poulsen, J.-C. N., Harris, P., Jensen, K. F. & Larsen, S. (2001). Selenomethionine substitution of orotidine-5´-monophosphate decarboxylase causes a change in crystal contacts and space group, *Acta Cryst.* D**57**, 1251-1259.

170. Pozidis, C. *et al.* (2003). Type III protein translocase, *J. Biol. Chem.* **278**, 25816-25824.

171. Powell, H. R. (1999). The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM, *Acta Cryst.* D**55**, 1690-1695.
172. Preston, G., Deng, W.-L., Huang, H.-C. & Collmer, A. (1998). Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV, *J. Bacteriol.* **180**, 4532-4537.
173. Purdy, M. D., Ge, P., Chen, J., Selvin, P. R. & Wiener, M. C. (2002). Thiol-reactive lanthanide chelates for phasing protein X-ray diffraction data, *Acta Cryst.* D**58**, 1111-1117.
174. Qian, C., Lagacé, L., Massariol, M.-J., Chabot, C., Yoakim, C., Déziel, R. & Tong, L. (2000). A rational approach towards successful crystallization and crystal treatment of human cytomegalovirus protease and its inhibitor complex, *Acta Cryst.* D**56**, 175-180.
175. Quiocho, F. & Richards, F. M. (1964). Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: Carboxypeptidase-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 833-839.
176. Rhode, G. (1993). Crystallography made crystal clear, Academic Press, Inc.
177. Rodger, A. & Nordén, B. (1997). Circular dichroism and linear dichroism, Oxford University Press.
178. Rosqvist, R., Magnusson, K.-E. & Wolf-Watz, H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells, *EMBO J.* **13**, 964-972.
179. Rossmann, M. G. & Blow, D. M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit, *Acta Cryst.* **15**, 24-31.
180. Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. & Bonas, U. (1999). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9368-9373.
181. Rossier, O., Van den Ackerveken, G. & Bonas, U. (2000). HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant, *Mol. Microbiol.* **38**, 828-838.
182. Rubinson, K. A., Ladner, J. E., Tordova, M. & Gilliland, G. L. (2000). Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography, *Acta Cryst.* D**56**, 996-1001.

183. Saijo-Hamano, Y., Namba, K. & Oosawa, K. (2000). A new purification method for overproduced proteins sensitive to endogenous proteases, *J. Struct. Biol.* **132**, 142-146.

184. Sanchez, J. F. *et al.* (2001). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the cathelicidin motif of the protegrin-3 precursor, *Acta Cryst.* D**57**, 1677-1679.

185. Saridakis, E. & Chayen, N. E. (2000). Improving protein crystal quality by decoupling nucleation and growth in vapor diffusion, *Protein Sci.* **9**, 755-757.

186. Sato, H. *et al.* (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU, *EMBO J.* **22**, 2959-2969.

187. Sawyer, L. & Turner, M. A. (1992). X-ray analysis In: *Crystallization of nucleic acids and proteins* Ed. by Ducruix, A. & Giegé, R., pp. 255-289.

188. Schägger, H. & Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.

189. Schmidt, A., González, A., Morris, R. J., Costabel, M., Alzari, P. M. & Lamzin, V. S. (2002). Advantages of high-resolution phasing: MAD to atomic resolution, *Acta Cryst.* D**58**, 1433-1441.

190. Schoehn, G., Di Guilmi, A. M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. & Dessen, A. (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*, *EMBO J.* **22**, 4957-4967.

191. Schuch, R. & Maurelli, A. T. (2001). Spa33, a cell surface-associated subunit of the Mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri*, regulates Ipa protein traffic, *Infect. Immun.* **69**, 2180-2189.

192. Shinoda, Y., Shouji, A., Yamane, T., Suzuki, A., Ashida, T., Kihara, H. & Ohno, M. (1990). Preliminary crystallographic study of phospholipase A_2 from the venon of *Trimeresurus flavouridis* (Habu snake), *J. Biochem.* **107**, 84-86.

193. Smith, C. L., Khandelwal, P., Keliikuli, K.. Zuiderweg, E. R. P. & Saper, M. A. (2001). Structure of the type III secretion and substrate-binding domain of *Yersinia* YopH phospatase, *Mol. Microbiol.* **42**, 967-979.

194. Smith, G. D., Nagar, B., Rini, J. M., Hauptman, H. A. & Blessing, R. H. (1998). The use of SnB to determine an anomalous scattering substructure, *Acta Cryst.* D**54**, 799-804.

195. Spector, T. (1978). Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation, *Anal. Biochem.* **86,** 142-146.

196. Stebbins, C. E. & Galán, J. E. (2001). Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion, *Nature* **414**, 77-81.

197. Stout, G. H. & Jensen, L. H. (1968). X-ray structure determination, The Macmillan Company.

198. Tamano, K., Aizawa, S.-I., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. & Sasakawa, C. (2000). 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**, 3876-3887.

199. Ταμπακάκη, Α. Π. (1999). Μοριακή και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola και διερεύνηση του ρόλου τους στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών, Διδακτορική Διατριβή.

200. Tang, H., Billings, S., Wang X., Sharp, L. & Blair, D. F. (1995). 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**, 3496-3503.

201. Tebbe, J., Orth, P., Kuster-Schock, E., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. (2000). Crystallization and preliminary X-ray analyses of catabolite control protein A, free and in complex with its DNA-binding site, *Acta Cryst.* D**56**, 67-69.

202. Tengel, T., Sethson, I. & Francis, M. S. (2002). Conformational analysis by CD and NMR spectroscopy of a peptide encompassing the amphipathic domain of YopD from *Yersinia*, *Eur. J. Biochem.* **269**, 3959-3668.

203. Terwilliger, T. C. (1999). Reciprocal-space solvent flattening, *Acta Cryst.* D**55**, 1863-1871.

204. Terwilliger, T. C. & Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution, *Acta Cryst.* D**55**, 849-861.

205. Terwilliger, T. C. (2000). Maximum-likelihood density modification, *Acta Cryst.* D**56**, 965-972.

206. Terwilliger, T. C. (2002). Rapid automatic NCS identification using heavy-atom substructures, *Acta Cryst.* D**58**, 2213-2215.

207. Thaller, C., Weaver, L. H., Eichele, G., Wilson, E., Karlsson, R. & Jansonius, J. N. (1981). Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins, *J. Mol. Biol.* 147, 465-469.

208. Thomas, D. R., Morgan, D. G. & DeRossier, D. J. (1999). Rotational symmetry of the C ring and a mechanism for the flagellar rotatory motor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10134-10139.

209. Thomas, D., Morgan, D. G. & DeRossier, D. J. (2001). Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants, *J. Bacteriol.* **183**, 6404-6412.

210. Τζουγκράκη, Χ. & Κόκοτος, Γ. (1993). Θέματα βιοργανικής χημείας.

211. Van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A. & Alfano, J. R. (1999). 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**, 4790-4797.

212. Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. and Clardy, J. (1993). Atomic structure of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin, *J. Mol. Biol.* **229**, 105-124.

213. Watson, W. T, Frank, V., Murphy, I. V., Gould, T. A., Jambeck, P., Val, D. L., Croman Jr, J. E., Bodman, S. B. & Churchill, M. E. A. (2001). Crystallization and rhenium MAD phasing of the acyl-homoserinelactone synthase EsaI, *Acta Cryst.* D**57**, 1945-1949.

214. Weaver, T. M., Wang, W. & Ealick, S. E. (1999). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction data from selenomethionine glycinamide ribonucleotide synthetase, *Acta Cryst.* D**55**, 518-521.

215. Wei, W., Plovanich-Jones, A., Deng, W.-L., Jin, Q.-L., Collmer, A., Huang, H.-C. & He, S. Y. (2000). 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. USA* **97**, 2247-2252.

216. Winstanley, C., Hales, B. A., Sibanda, L. M., Dawson, S., Gaskell, R. M. & Hart, C. A. (2000). Detection of type III secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*, *Vet. Microbiol.* **72**, 329-337.

217. Winstanley, C. & Hart, A. (2001). Type III secretion systems and pathogenicity islands, *J. Med. Microbiol.* **50**, 116-126.

218. Woody, R. W. (1999). Circular dichroism, *Encyclopedia of Molecular Biology*, **1** ed Creighton, T. E., John Wiley & Sons, Inc.

219. Χαμόδρακας, Σ. (1993). Θέματα μοριακής βιοφυσικής, εκδόσεις Συμμετρία.

220. Yeh, J.I. & Hol, W. G. (1998). A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase, *Acta Cryst.* D**54**, 479-480.

221. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy, *Nature* **424**, 643-650.

222. Zhang, F., Robbins, D. J., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. (1993). Crystallization and preliminary X-ray studies of extracellular signal-regulated kinase-2/MAP kinase with an incorporated His-tag, *J. Mol. Biol.* **233**, 550-552.

223. Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T. S. & Khan, S. (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body, *J. Mol. Biol.* **261**, 195-208.