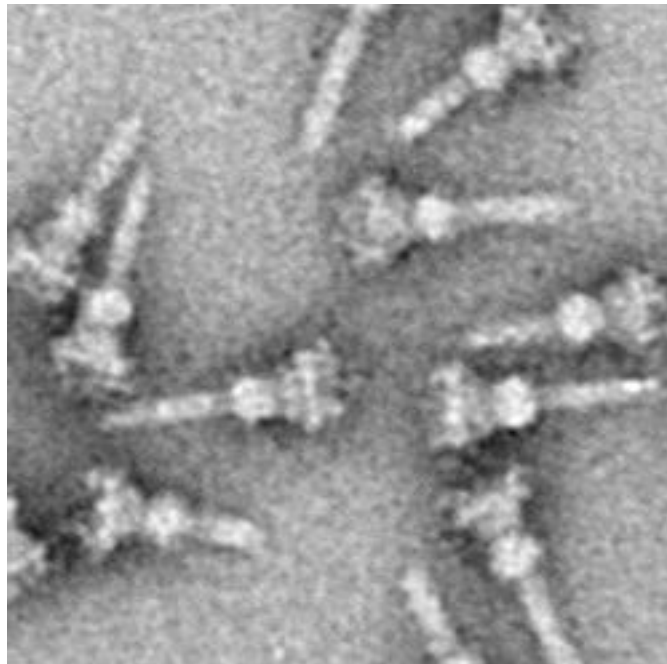




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΕΛΕΝΗ Κ. ΜΑΚΡΑΚΗ

**"ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΟΣ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΑΡΒΟΞΥΤΕΛΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ  
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ HrpZ ΤΟΥ ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΥΠΟΥ III  
ΣΤΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ *Pseudomonas syringae* pv.  
*phaseolicola*"**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :  
ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2012

«Η Ιθάκη ε'έδωσε ε' υπαίτιο ταξίδι.  
Χωρίς αυτήν δεν θα'βγαίνες στον δρόμο.  
Αλλά δεν έχει να σε δώσει τίποτα.  
Κι αν ιατρική σου βρεις, η Ιθάκη δε σε γέλασε.  
Έτσι σοφός σου έγινες, με τόση ιδείρα,  
ήδη θα το κατάλαβες οι Ιθάκες τι σημαίνουν.»

Κ.Καβάφης

(εικόνα εξώφυλλου: απεικόνιση εκκριντικού συστήματος τύπου III σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο  
-Schraidt et al.,2010-)

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>5</b>
1.1 Δομή των πρωτεϊνών.....	5
1.2 Η α-έλικα, σημαντικό στοιχείο δευτεροταγούς δομής.....	6
1.3 Μονοπάτια αναδίπλωσης πρωτεϊνών.....	7
1.4 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III και η πρωτεΐνη HcpZ.....	11
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	13
<b>2. ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>14</b>
2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR.....	14
2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	15
2.3 Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού.....	15
2.4 Αντίδραση λιγάση.....	15
2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.....	16
2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (φαινόλη/χλωροφόρμιο).....	16
2.7 Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση.....	16
2.8 Απομόνωση ζώνης DNA από gel αγαρόζης.....	17
2.9 Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα από κύτταρα (mini induction) για έλεγχο έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.....	17
2.10 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διαφόρων όγκων καλλιέργειας κυττάρων, μετασχηματισμένων με το αντίστοιχο πλασμίδιο έκφρασης.....	17
2.11 Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό φυσικές (native) συνθήκες.....	18
2.12 Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	18
2.13 Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό φυσικές (native) συνθήκες.....	18
2.14 Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	19
2.15 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή SDS-PAGE πολυακρυλαμίδης.....	19
2.16 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	20
2.17 Χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie και αποχρωματισμός.....	21
2.18 Προετοιμασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έκλουσης από στήλη Ni-NTA αγαρόζης για ανάλυσή του σε κλώνα μοριακής διήθησης (gel filtration).....	21

2.19	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	21
2.20	Πρωτεϊνικές μελέτες με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD).....	21
2.21	Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	23
2.22	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).....	25
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>28</b>
3.1	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της HrpZ158 με τη χρήση του προγράμματος PsiPred.....	28
3.2	Κλωνοποίηση του γονιδίου hrpZ158 στον φορέα έκφρασης pProEX-HTb.....	29
3.3	Καθαρισμός της πρωτεΐνης HrpZ158 από κύτταρα έκφρασης E.coli DH5α μετασχηματισμένα από τον κλωνοποιημένο φορέα έκφρασης pProEX-HTb υπό φυσικές συνθήκες.....	30
3.4	Καθαρισμός της πρωτεΐνης HrpZ158 από κύτταρα έκφρασης E.coli DH5α μετασχηματισμένα από τον κλωνοποιημένο φορέα έκφρασης pProEX-HTb υπό αποδιαταχτικές συνθήκες...31	
3.5	Φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD).....	33
3.6	Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HrpZ158.....	34
3.7	Κρυσταλλώσεις.....	35
3.8	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).....	36
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>42</b>

# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Δομή των πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες παράγονται ως γραμμικές αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες έχουν εξελιχθεί μέσω της φυσικής επιλογής, για να επιτελούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τις τρισδιάστατες δομές τους.

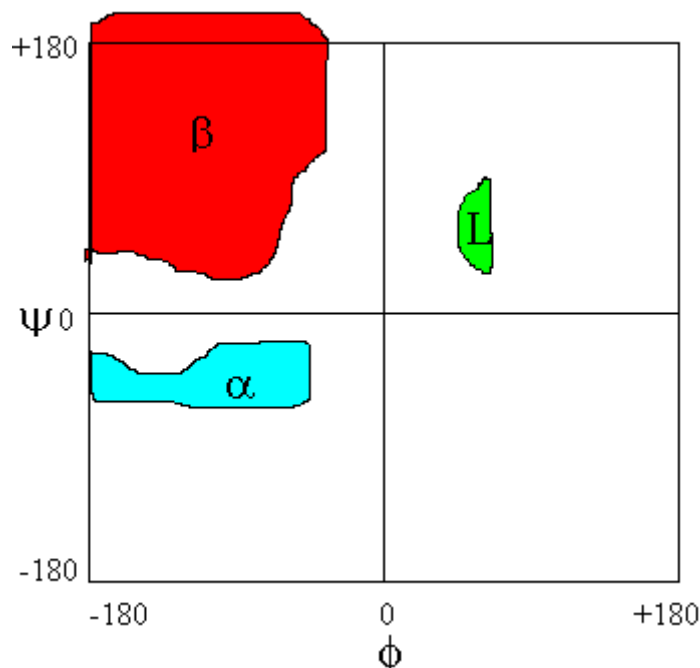
Η αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεϊνικής πολυπεπτιδικής αλληλουχίας ονομάζεται πρωτοταγής δομή η οποία αναδιπλώνεται δημιουργώντας τοπικές δευτεροταγείς δομές, όπως α-έλικες, β-πτυχωτά φύλλα και βρόγχους. Ακολουθώς, αυτά τα δομικά στοιχεία πακετάρονται σε μία ή περισσότερες συμπαγείς σφαιρικές μονάδες που ονομάζονται επικράτειες (domains), οδηγώντας στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Η τελική πρωτεΐνη μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες πολυπεπτιδικές αλυσίδες διευθετημένες σε μια τεταρτοταγή δομή. Η διαδικασία με την οποία μία πολυπεπτιδική αλυσίδα αποκτά τη σωστή τρισδιάστατη δομή, για να επιτύχει τη βιολογικά ενεργή, φυσική κατάσταση ονομάζεται πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein folding). Παρ' ότι μερικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται αυθόρμητα στη φυσική τους δομή, άλλες απαιτούν τη βοήθεια ενζύμων ή μιας κατηγορίας πρωτεϊνών που ονομάζονται σαπερόνες (chaperones, «μοριακοί συνοδοί»).

Παρά τις αξιοσημείωτες προσπάθειες των τελευταίων 25 χρόνων, το πρόβλημα της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι ακόμα άλυτο, για την πλήρη κατανόηση της βιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών και αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της μοριακής βιολογίας. Επίσης, θα έχετε τη βάση για τη δημιουργία αλγορίθμων για την πρόβλεψη τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνών από την αμινοξική τους ακολουθία ένα εργαλείο χρήσιμο στα πεδία της φαρμακευτικής, της νανοτεχνολογίας και της τεχνολογίας υλικών.

## 1.2 Η α-έλικα, σημαντικό στοιχείο δευτεροταγούς δομής.

Η ύπαρξη της α-έλικα προβλέφτηκε από τον Linus Pauling στο California Institute of Technology, το 1951. Η α-έλικα είναι ένα από τα κύρια στοιχεία δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών.

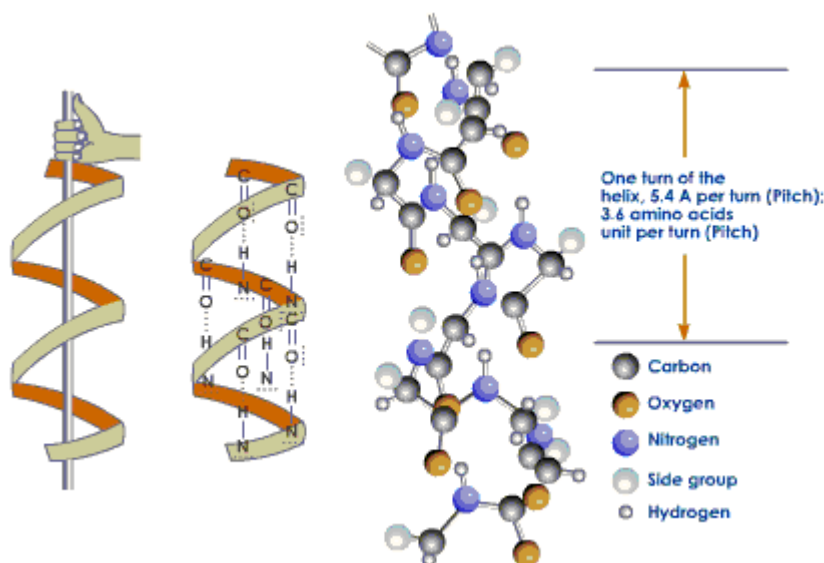
Οι α-έλικες στις πρωτεΐνες συναντώνται όταν μια σειρά διαδοχικών καταλοίπων έχει  $\phi$  και  $\psi$  γωνίες περίπου ίσες με  $-60^\circ$  και  $-50^\circ$  αντίστοιχα. Οι γωνίες αυτές αντιστοιχούν στην επιτρεπόμενη περιοχή στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο του διαγράμματος Ramachandran (Σχήμα 1.). Στην α-έλικα περιέχονται 3.6 κατάλοιπα ανά στροφή και σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στην ομάδα  $C'=O$  του καταλοίπου  $n$  και στην ομάδα  $NH$  του καταλοίπου  $n+4$ .



**Σχήμα 1.** Διάγραμμα Ramachandran όπου παρουσιάζονται οι επιτρεπτοί συνδυασμοί των γωνιών  $\phi$  και  $\psi$ . Οι έγχρωμες περιοχές δείχνουν στερεοχημικά επιτρεπτές περιοχές. Οι περιοχές με τα σύμβολα  $\alpha$ ,  $\beta$  και L αντιστοιχούν σε γωνίες που συναντώνται σε δεξιόστροφες α-έλικες,  $\beta$ -κλώνους και αριστερόστροφες έλικες αντίστοιχα.

Έτσι, όλες οι ομάδες  $NH$  και  $C'=O$  συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου, εκτός από τις πρώτες ομάδες  $NH$  και τις τελευταίες ομάδες  $C'=O$  στα άκρα της α-

έλικα. Συνεπώς, τα άκρα των α-ελίκων είναι πολικά και σχεδόν πάντα βρίσκονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων.



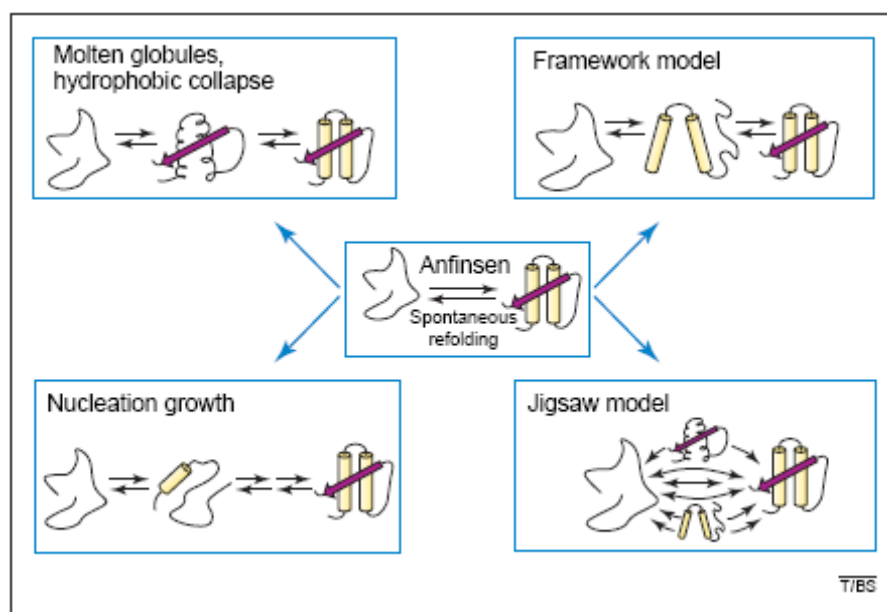
**Σχήμα 2.** Τα άτομα N και O της κύριας αλυσίδας συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους (και εντός των α-ελίκων). (α) Σχηματικό διάγραμμα της διαδρομής (στο χώρο) που ακολουθεί η κύρια αλυσίδα μιας α-έλικας. (β) Όμοια με την (α) αλλά συμπεριλαμβάνονται οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται. (γ) Σχηματικό διάγραμμα μιας α-έλικας. Τα άτομα οξυγόνου είναι καφέ και τα άτομα του αζώτου μπλε. Υπάρχουν 3.6 κατάλοιπα ανά στροφή σε μία έλικα, που αντιστοιχεί σε βήμα 5.4 Å (1.5 Å ανά κατάλοιπο).

Θεωρητικά μια α-έλικα μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη, ανάλογα με τη διαδρομή που ακολουθεί η έλικα στον τρισδιάστατο χώρο. Ωστόσο, η αριστερόστροφη α-έλικα δεν είναι συμβατή με την ύπαρξη L-αμινοξέων, εξαιτίας της στενής προσέγγισης που θα προέκυπτε μεταξύ των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων και των C'O ομάδων του σκελετού. Έτσι, οι α-έλικες που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες είναι σχεδόν πάντα δεξιόστροφες. Μικρές περιοχές αριστερόστροφων α-ελίκων (μήκους 3-5 καταλοίπων) συναντώνται μόνο περιστασιακά.

### 1.3 Μονοπάτια αναδίπλωσης πρωτεϊνών.

Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα κατά την προσπάθεια λύσης του προβλήματος της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών όπως είναι ήταν το «μοντέλο

του πυρήνα» (nucleation model) (Levinthal, 1968), το μοντέλο της «διάχυσης και σύγκρουσης» (diffusion-collision model) (Karplus and Weaver, 1976), το «μοντέλο του πλαισίου» (framework model) (Kim and Baldwin, 1982), το «μοντέλο συναρμολόγησης» (jigsaw puzzle model) (Harrison and Durbin, 1985) και το «μοντέλο της υδρόφοβης κατάρρευσης» (hydrophobic collapse model) (Levitt and Warshel, 1975).

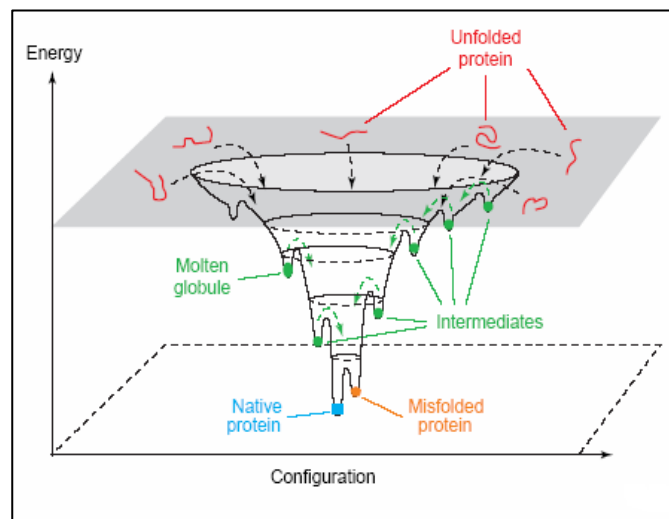


**Σχήμα 3.** Προτεινόμενα μοντέλα για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών.  
(Σχήμα από Radford, 2000)

Έχει γίνει ευρέως γνωστό και αποδεκτό πως δεν είναι ένα μόνο το μονοπάτι που μπορεί να ακολουθήσει μια πρωτεΐνη για να αναδιπλωθεί. Η διαδικασία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένα πολυδιάστατο ενεργειακό τοπίο (multidimensional energy landscape) το οποίο απεικονίζεται ως ένα αδρό χωνί (folding funnel). Τα αποδιαταγμένα μόρια που βρίσκονται στην κορυφή του χωνιού μπορούν να οδηγηθούν στην αναδιπλωμένη κατάσταση μέσω πολλών διαφορετικών οδών. Κάποιες από αυτές τις οδούς περιέχουν διακριτές ενδιάμεσες καταστάσεις, που αποτελούν τοπικά ελάχιστα, ενώ άλλες περιέχουν κινητικές παγίδες (misfolded states). Για πρωτεΐνες που αναδιπλώνονται χωρίς διακριτά ενδιάμεσα η επιφάνεια ενός τέτοιου τοπίου θα είναι λεία. (Σχήμα 4.). Η διαδικασία της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών αναφέρεται σε ενέργεια που αντιστοιχεί στην ελεύθερη ενέργεια και στις



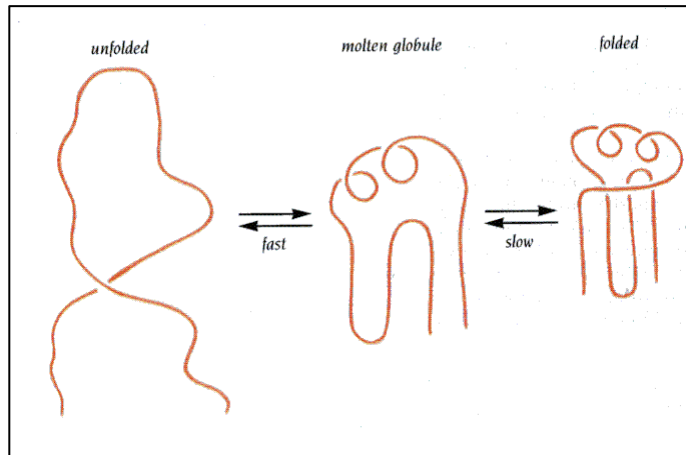
μεταβολές της, τα ενεργειακά τοπία βασίζονται στη γενικευμένη λογική όλων των χημικών αντιδράσεων, κατά την οποία η ταχύτητα είναι συνάρτηση της ενέργειας αλληλεπίδρασης των αντιδρώντων ατόμων με τη σχετική τους θέση στο χώρο.



**Σχήμα 4.** Σχηματική απεικόνιση ενός ενεργειακού τοπίου κατά την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης.

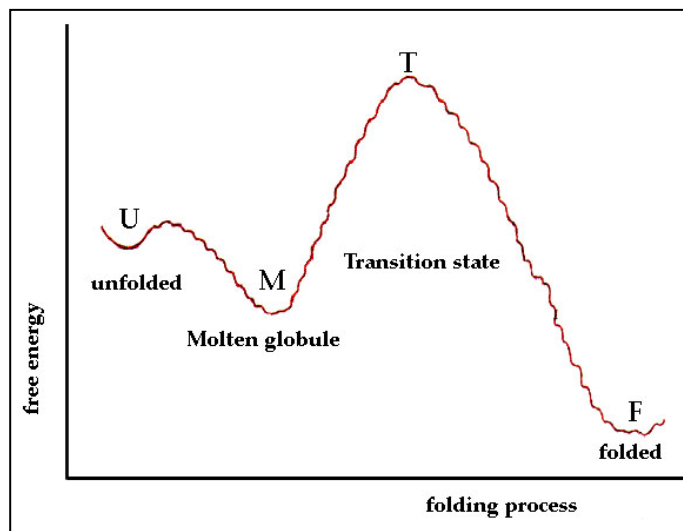
Έτσι, προκειμένου να κατανοηθεί ο μηχανισμός της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, θα πρέπει να χαρακτηριστούν τόσο δομικά όσο και θερμοδυναμικά όλες οι καταστάσεις που μεσολαβούν από μια αποδιαταγμένη πεπτιδική αλυσίδα ως την αναδιπλωμένη πρωτεΐνη.

Στο παραπάνω σχήμα, παρουσιάζονται δυο σημαντικές ενδιάμεσες καταστάσεις της πορείας αναδίπλωσης. Η κατάσταση «εύπλαστης σφαίρας» (molten globule state) και τα διάφορα ενδιάμεσα (intermediates). Αυτό που είναι γνωστό για την «molten globule» κατάσταση είναι ότι εμφανίζεται στην πορεία αναδίπλωσης ορισμένων, τουλάχιστον, πρωτεϊνών και είναι μια εν μέρει, οργανωμένη, σφαιρική κατάσταση (Σχήμα 5.).



**Σχήμα 5.** Η κατάσταση molten globule είναι μια σημαντική ενδιάμεση κατάσταση κατά την μετατροπή μιας αποδιαταγμένης αλυσίδας στην αναδιπλωμένη της μορφή.

Η λεγόμενη μεταβατική κατάσταση (transition state) αποτελεί μια καλύτερα χαρακτηρισμένη κατάσταση στην πορεία της αναδίπλωσης. Σε ένα μονοπάτι αναδίπλωσης αποτελεί το υψηλότερο ενεργειακό σημείο ένα μονοπάτι αναδίπλωσης και έχει δύο χαρακτηριστικά. Καταρχάς, ένα μόριο που βρίσκεται σε μεταβατική κατάσταση μπορεί να επιστρέψει στην κατάσταση από την οποία προήλθε με την ίδια συχνότητα με την οποία μετακινείται στην τελική κατάσταση και δεύτερον, αποτελεί μια εξαιρετικά συμπαγή κατάσταση, που δεν επηρεάζεται από διαταραχές λόγω μεταλλάξεων ή συμπεριφοράς του διαλύτη (Oliveberg, 2001).



**Σχήμα 6.** Η μετάβαση από την μη αναδιπλωμένη κατάσταση προς την αναδιπλωμένη κατάσταση χαμηλής ενέργειας περιλαμβάνει το πέρασμα από μια μη αναδιπλωμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας (transition state). (Σχήμα από Tooze, 1999).

## 1.4 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III και η πρωτεΐνη HrpZ.

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III ( Type III Secretion System, T3SS) αποτελεί το βασικό μεσολαβητή της αλληλεπίδρασης μεταξύ gram αρνητικών παθογόνων βακτηρίων και ευκαρυωτικών κυττάρων (άνθρωποι, ζώα και φυτά). Είναι ένα δομικά και λειτουργικά συντηρημένο μακρομοριακό σύστημα αποτελούμενο πάνω από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες. Περίπου οι μισές από αυτές είναι συντηρημένες στα περισσότερα εκκριτικά συστήματα τύπου III ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με πρωτεΐνες του βασικού σωματίου του βακτηριακού μαστιγίου, ένδειξη για κοινή εξελικτική ιστορία των δύο συστημάτων. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III ενεργοποιείται όταν τα βακτήρια εισέλθουν σε ευκαρυωτικά κύτταρα διαμέσου καλά ρυθμισμένων δικτύων τα οποία εξακολουθούν να μην είναι γνωστά ακόμα.

Στους φυτικούς οργανισμούς, το εκκριτικό σύστημα τύπου III κωδικοποιείται από τα *hrc/hrp* γονίδια τα οποία ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους. Έτσι, έχουμε την πρώτη κατηγορία που κωδικοποιεί τις συντηρημένες πρωτεΐνες, τη δεύτερη κατηγορία που κωδικοποιεί ρυθμιστικά μόρια της έκκρισης και η τελευταία, εξωκυττάρια πρωτεΐνες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται εκείνες που συνθέτουν τον πύλο, τους μεταφορείς και τις χαρπίνες. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III ενεργοποιείται όταν τα βακτήρια διεισδύσουν στο ξενιστή, μέσω πληγών ή φυσικών ανοιγμάτων όπως είναι τα στόματα.

Οι χαρπίνες είναι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται εξωκυττάρια μέσω του Hrp πύλου και των οποίων ο ρόλος δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος. Όλες οι χαρπίνες μοιράζονται πολλά κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά όπως είναι το κοινό ισοηλεκτρικό σημείο, υψηλή περιεκτικότητα σε κατάλοιπα γλυκίνης, χαμηλή περιεκτικότητα σε κατάλοιπα κυστεΐνης και σταθερότητα στη θερμότητα ενώ ταυτόχρονα έχει αποδειχτεί ότι συνδέονται με υποδοχείς που βρίσκονται την επιφάνεια φυτικών κυττάρων (Anastasia P. Tampakaki and Nickolas Panopoulos, 2000).

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* εκκρίνει άφθονη την χαρπίνη HrpZ. Η HrpZ είναι συντηρημένη σε όλα τα παθογόνα *P.syringae* εκτός από το *Psp tabaci* (Taguchi et al., 2001). Το γονίδιο της HrpZ είναι το δεύτερο κατά σειρά του οπερονίου της *hrpZ* και βρίσκεται μετά το γονίδιο *hrpA* (κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpA η οποία αποτελεί τις υπομονάδες που συνθέτουν τον Hrp πύλο).

Σύμφωνα με τον Justin Lee et al. (2001), η HrpZ μπορεί να συνδεθεί με λιπосώματα και συνθετικές μεμβρανικές διπλοστιβάδες. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η HrpZ ως μια τυπική χαρπίνη συνδέεται ειδικά με φωσφατιδικά οξέα των μεμβρανικών διπλοστιβάδων ευκαρυωτικών κυττάρων (Minna Haaralainen et al., 2011) ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης φέρει ομοιότητες με ένζυμα που συνδέονται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Anastasia Tampakaki et al., 2010).

Κάτω από ποικιλία συνθηκών οι χαρπίνες πολυμερίζονται για τη δημιουργία πρωτοϊνιδίων ή ινιδίων που μοιάζουν με αμυλοειδικές δομές. Τα αμυλοειδή

θεωρούνται ως ένα χαρακτηριστικό των χαρπινών τα οποία επάγονται στον αποπλάστη ή σε παρόμοιες συνθήκες (Jonghee Oh et al., 2006). Η HrpZ δημιουργεί διμερή τα οποία συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα ολιγομερή, το λιγότερο 16-μερή. Η περιοχή που είναι υπεύθυνη για αυτό βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της HrpZ. Η ίδια περιοχή είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό πόρων της HrpZ και για τις γενικότερες αλληλεπιδράσεις με της πρωτεΐνης με τα λιπίδια της μεμβράνης (Haaralarnen et al., 2011) . Παραδόξως έχειδειχθεί πως το μοτίβο ολιγομερισμού άθικτης HrpZ είναι το ίδιο με εκείνο που παίρνουμε έπειτα από μεταλλάξεις διαγραφής της πρωτεΐνης. Τα ολιγομερή και τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα γενικά παρατηρούνται σε ανεξάρτητες μελέτες και εμποδίζουν τον προσδιορισμό της τριτοταγής δομής της πρωτεΐνης. Ασθένειες που σχετίζονται με τα αμυλοειδή πιστεύεται πως είναι υπεύθυνες για τον γρήγορο φυτικό και ζωικό κυτταρικό θάνατο (Jonghee Oh et al., 2006).

Οι α-έλικες πιστεύεται ότι είναι σημαντικές για την ικανότητα των πρωτεϊνών να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας. Πολλές χαρπίνες αναμένονται να αποτελούν α-έλικες, να είναι πλούσιες σε κατάλοιπα λευκίνης, χαρακτηριστικό που συντηρείται σε ενεργές χαρπίνες (Jonghee Oh et al., 2006), οι οποίες αναγνωρίζονται από τον καπνό με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ευαισθησία σε αυτές (Haaralainen et al., 2011). Ο Haaralainen ανακάλυψε πως η διεύθυνση τμήματος της HrpZ που εμπεριέχει το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (290-313) επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive response, HR), τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο άμυνας στο σημείο εισόδου του ξενιστή, από 24 μέχρι 48 ώρες. Η HrpZ έχειδειχθεί ότι συνδέεται με τον πύλο της *Pseudomonas syringae* (Lan R. Brown et al., 2001) και ενεργοποιεί την HR (Tampakaki and Panopoulos 2000).

Τέλος, η *Erwinia amylovora* εκκρίνει μια άλλη χαρπίνη, την HrpN, η οποία επίσης παρουσιάζει την ιδιότητα σχηματισμού πόρων όπως και η HrpZ. Η HrpN και HrpZ είναι μερικώς ομόλογες στην αλληλουχία τους. Η HrpN δεν δίνει κάποιο φαινότυπο στον καπνό αλλά επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε μήλο και αχλάδι. Το καρβοξυτελικό άκρο της HrpN φαίνεται να είναι απαραίτητο για την έκκριση όπως και στην HrpZ ενώ είναι περιττό για την αντίδραση υπερευαισθησίας (Judith P.Sinn et al., 2008).

## 1.5 Σκοπός της εργασίας.

Η παρούσα μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας Ι του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας – FORTH, επικεντρώθηκε στο φυσικοχημικό και λειτουργικό χαρακτηρισμό του καρβοξυτελικού τμήματος της HrpZ (158 έως 343 κατάλοιπα) το οποίο ονομάσαμε HrpZ158. Το συγκεκριμένο τμήμα της πρωτεΐνης διατηρεί την ικανότητα ολιγομερισμού όπως η ολόκληρη HrpZ πρωτεΐνη καθώς και εκείνη του σχηματισμού πόρων. Μετά από κλωνοποίηση και έκφραση της HrpZ158, καταφέραμε να δημιουργήσουμε ένα βελτιωμένο πρωτόκολλο καθαρισμού της έτσι ώστε να πάρουμε τελικά ένα μοναδιαίο πληθυσμό πρωτεΐνης για τις βιοφυσικές και βιοχημικές αναλύσεις μας. Τέλος, μεγάλος αριθμός διαφόρων συνθηκών κρυστάλλωσης δοκιμάστηκε στην προσπάθειά μας να κρυσταλλώσουμε την εν λόγω πρωτεΐνη για τον προσδιορισμό της τριτοταγής δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, συμβάλλοντας καθαυτό τον τρόπο στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας του τύπου III εκκριτικού συστήματος.

## 2.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης- PCR.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές αλληλουχίες. Οι γνωστές αυτές αλληλουχίες αποκρίνονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους και κυρίως στο 3' άκρο, το περιεχόμενο σε GC πρέπει να είναι από 40% ως 60%, η προσθήκη περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται στο 5' άκρο. Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται από 25 μέχρι 40 φορές (κύκλοι). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα (cycler), το οποίο είναι σε θέση να θερμαίνει και να ψύχει τις αντιδράσεις σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα :

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

2.Υβριδισμός των εκκινητών: Οι εκκινητές υφίστανται στο διάλυμα σε διαρκή κίνηση Brown. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δίκλωνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες βάσεις, οι δεσμοί 10 υδρογόνου μεταξύ μήτρας και εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης.

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

## 2.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης.

Σε αυτή την τεχνική εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος της πηκτικής αγαρόζης και τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο. Με αυτό τον τρόπο, τα νουκλεϊκά οξέα διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους. Στην πηκτική αγαρόζης προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και φθορίζει στο υπεριώδες φως. Με τον τρόπο αυτό μπορούν να διακριθούν οι ζώνες του DNA σε συσκευή με UV light. Η αγαρόζη, που διατίθεται σε μορφή σκόνης αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5x σε κωνική φλάσκα. Το μείγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων (περίπου 3 min στα 900W) μέχρι διαλύσεως της αγαρόζης και αφήνεται να κρυώσει. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος είναι περίπου 50°C, προστίθεται το βρωμιούχο αιθίδιο. Ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και το διάλυμα χύνεται σε ειδική ηλεκτροφορητική συσκευή. Αμέσως τοποθετείται η ειδική χτένα, η οποία δημιουργεί τα πηγαδάκια στα οποία φορτώνονται τα δείγματα. Μετά την πήξη του διαλύματος αγαρόζης, αφαιρείται η χτένα. Τα δείγματα αναμειγνύονται με 5x agarose gel-loading buffer και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120V. Οι πηκτές αγαρόζης που παρασκευάστηκαν είναι 1-1.5%, ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA, που έπρεπε να διαχωριστούν.

## 2.3 Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού.

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων και των ενθέτων (προϊόντα PCR) για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation) όπως επίσης και για την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μετά από τον μετασχηματισμό, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία 0.1μg/ml BSA όπου προτείνεται. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 3 ώρες. Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά υπάκουαν στον κανόνα-ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μg DNA σε 1 ώρα, στους 37°C.

## 2.4 Αντίδραση λιγάση.

Η T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' ομάδας -OH μεταξύ δύο δίκλωνων άκρων DNA, είτε αυτά είναι τυφλά είτε προεξέχοντα. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση μπορεί να κυμανθεί από 0.1 έως 1μg. Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάσης της Biolabs, στους 16°C για 14-16 ώρες.

## **2.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E.coli με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.**

Μια ποσότητα 100μl δεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80°C όπου φυλάσσονται και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται 10μl της αντίδρασης λιγάσης στα κύτταρα και επωάζονται στον πάγο για 30'. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 90sec. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2', ακολουθεί προσθήκη 400μl LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) και επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Τέλος τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τριβλύα επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες.

## **2.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (φαινόλη/χλωροφόρμιο).**

Με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα παίρνουμε μια αποικία και διαλύουμε σε 5ml LB μαζί με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Αφήνουμε την καλλιέργεια να επωαστεί στους 37°C με ισχυρή ανάδευση O/N. Από την παραπάνω καλλιέργεια παίρνουμε 2ml και φυγοκεντρούμε για 5', 12.000rpm. Πετάμε το υπερκείμενο προσέχοντας να μείνει η πελέτα όσο το δυνατόν πιο στεγνή και την επαναδιαλύουμε σε 100μl κρύου διαλύματος I με Vortex. Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου διαλύματος II και αφήνουμε στον πάγο για 5'. Προσθέτουμε 150 μl κρύου διαλύματος III και αφήνουμε στον πάγο για 5'. Φυγοκεντρούμε για 10', 12.000rpm και μεταφέρουμε το 12 υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf. Κατόπιν, προσθέτουμε ίσου όγκου ουδέτερη φαινόλη, ανακινούμε, φυγοκεντρούμε και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf. Προσθέτουμε ίσου όγκου χλωροφόρμιο και όπως προηγουμένως ανακινούμε, φυγοκεντρούμε και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό erpendorf. Ακολουθεί ιζηματοποίηση του DNA προσθέτοντας 2 όγκους παγωμένης φαινόλης. Φυγοκεντρούμε για 15', 12.000rpm, πετάμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το erpendorf ανάποδα και ανοιχτά για να στεγνώσει η πελέτα. Ξεπλένουμε το DNA με 1ml 70% αιθανόλης στους 4°C, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε την πελέτα να στεγνώσει για περίπου 10min. Τέλος, επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 50 μl H<sub>2</sub>O.

## **2.7 Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση.**

Σε 550μl βακτηριακής καλλιέργειας προσθέτουμε 450μl από διάλυμα 80% γλυκερόλης και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Κατόπιν, ακολουθεί μεταφορά των καλλιεργείων για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80°C.



## 2.8 Απομόνωση ζώνης DNA από gel αγαρόζης.

Η ζώνη αγαρόζης αποκόπτεται από την πηκτή αγαρόζης (low melting agarose) με ένα καθαρό νυστέρι, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αγαρόζης κατά το δυνατόν περισσότερο. Η μπάντα ζυγίζεται και σε αυτήν προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (διευκολύνει την διαλυτοποίηση της αγαρόζης και την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη silica gel της στήλης Qiagen). Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5', ούτως ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Κατόπιν, προστίθεται ίσος όγκος του αρχικού βάρους της μπάντας ισοπροπανόλη, βήμα που αυξάνει την απόδοση σε DNA όταν αυτό έχει μέγεθος μικρότερο από 500bp ή μεγαλύτερο από 4kbp. Στη συνέχεια, φορτώνουμε το διάλυμα στη στήλη Qiagen και φυγοκεντρούμε για 2' στις 13000rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Απομακρύνουμε το διήθημα και προσθέτουμε 0.5ml QG ακόμα για απομάκρυνση των τελευταίων ιχνών αγαρόζης από την κολώνα. Φυγοκεντρούμε όμοια με παραπάνω. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε την κολώνα με 0.75ml PE (διάλυμα 9 πλύσης που περιέχει αιθανόλη) και τέλος εκλούουμε το DNA με 50μl EB (10mM Tris-Cl pH 8.5) ή H<sub>2</sub>O.

## 2.9 Επαγωγή έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα από κύτταρα (mini induction) για έλεγχο έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, χρησιμοποιούμε 0.1ml και εμβολιάζουμε 2 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, εφοδιασμένο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0.6 και 0.7. Στο σημείο αυτό λαμβάνεται ένα δείγμα 1ml από την καλλιέργεια, και η κυτταρική πελέτα (non induced δείγμα) φυλάσσεται στον πάγο μέχρι το τέλος της επαγωγής. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικές συνθήκες (τελική συγκέντρωση IPTG, θ°C επώασης και χρόνος επώασης). Τα δείγματα non induced και induced, επαναδιαλύονται σε 40μl sample buffer, βράζονται για 5' και τέλος ηλεκτροφορούνται κατά SDS-PAGE.

## 2.10 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διαφόρων όγκων καλλιέργειας κυττάρων, μετασχηματισμένων με το αντίστοιχο πλασμίδιο έκφρασης.

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, εμβολιάζουμε σε αναλογία 1:50 υγρού θρεπτικού LB, εφοδιασμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό στην κατάλληλη συγκέντρωση. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm να φτάσει μεταξύ 0.6 και 0.7. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG και η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία και για χρονικό διάστημα που έχει βρεθεί καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης. Μετά το πέρας της

επαγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 6000rpm για 20' στους 6°C, και το ίζημα φυλάσσεται στους -20°C.

### **2.11 Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό φυσικές (native) συνθήκες.**

Η αποθηκευμένη στους -20°C κυτταρική πελέτα έκφρασης αφήνεται στον πάγο να ξεπαγώσει και επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο και 5% γλυκερόλη), 5ml ανά γραμμάριο υγρού βάρους. Ακολουθεί προσθήκη αναστολέων πρωτεασών (PMSF, benzanidane, λευτεπίνη) και λύση των κυττάρων με υπερήχους, 14 x 30 sec, με διαστήματα παύσης 30 sec μεταξύ τους στον πάγο. Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται για 45' στους 6°C στις 12.500rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

### **2.12 Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες.**

Η κυτταρική πάστα επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο) που περιέχει 8M ουρία, 5ml ανά γραμμάριο υγρού βάρους. Παραλείπεται το βήμα πρόσθεσης αναστολέων πρωτεασών και το δείγμα αφήνεται O/N σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση.

### **2.13 Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένεια Ni-NTA αγαρόζης, υπό φυσικές (native) συνθήκες.**

Οι ουρές ιστιδίνης που κωδικοποιούνται μπροστά ή στο τέλος του γονιδίου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το μίγμα του ολικού βακτηριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, καθώς προσδένονται στις Ni-NTA (nickel-nitriloacetic acid) ομάδες του προσροφητικού υλικού. Η ετικέτα αυτή δεν είναι ανοσογόνος και δεν εμπλέκεται στην δίπλωση της φυσικής πρωτεΐνης. Σε συνθήκη pH οι ιστιδίνες είναι ουδέτερα φορτισμένες. Δεν επηρεάζονται, έτσι τα φυσικά χαρακτηριστικά και η ενεργότητα των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Επίσης, για αυτούς τους λόγους η απομάκρυνση της ετικέτας δεν είναι απαραίτητη μετά το πέρας της χρησιμοποίησής της. Οι ιστιδίνες προσδένονται καλά σε άτομα νικελίου. Σε προσροφητικό υλικό με ακινητοποιημένο νικέλιο είναι δυνατόν να κατακρατηθούν και κατά συνέπεια να διαχωριστούν πρωτεΐνες που φέρουν ουρές ιστιδίνης. Για να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών στο υλικό, το διάλυμα λύσης περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Για να αποφευχθεί η δέσμευση στην στήλη ενδογενών πρωτεϊνών που περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης ακολουθείται διαδικασία έκπλυσης (wash) με αυξημένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Η έκλυση (elution) γίνεται με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, οπότε η ουρά των ιστιδινών δεν μπορεί πλέον να ανταγωνιστεί το ιμιδαζόλιο για τις θέσεις πρόσδεσης στο Ni-

NTA agarose. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει τα εξής βήματα: Αρχικά, σε μια κολώνα χρωματογραφίας κλειστή στο κάτω στόμιό της, φορτώνονται 20ml διαλύματος 50% Ni-NTA αραρόζης σε 50% αιθανόλη και αφήνεται να πακεταρισθεί. Αφού πακεταρισθεί, ανοίγουμε το κάτω στόμιο και αφήνουμε να ρεύσει η αιθανόλη. Κατόπιν, εξισορροπούμε τη στήλη με 100ml του εκάστοτε διαλύματος λύσης που χρησιμοποιείται κατά περίπτωση και φορτώνουμε το διαυγές διάλυμα λύσης που παρασκευάστηκε υπό φυσικές (native) συνθήκες. Αφήνουμε να περάσει από την κολώνα υπό την επίδραση της βαρύτητας και συγκεντρώνουμε το έκπλυμα (flow through) σε καθαρό σωλήνα. Ακολουθούν τρεις πλύσεις (200ml, 100ml και 50ml), με διάλυμα πλύσης το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το διάλυμα λύσης, αλλά μεταβάλλεται αυξανόμενα η συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε αυτό (10mM, 20mM και 30mM αντίστοιχα). Τα εκπλύματα συγκεντρώνονται σε ξεχωριστούς σωλήνες. Τέλος, ακολουθεί έκλουση της πρωτεΐνης με ποικίλο αριθμό εκλούσεων, 10ml η καθεμιά με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, σε ένα εύρος από 100 έως 500mM ιμιδαζολίου. Όλα τα διαλύματα του καθαρισμού, δηλαδή εκπλύσεις και εκλούσματα διατηρούνται βραχυπρόθεσμα στους 4°C.

## **2.14 Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα ιστοιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αραρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.**

Η στήλη χρωματογραφίας πακετάρεται ως άνωθεν, με τη διαφορά ότι τώρα εξισορροπείται με 100ml εκάστοτε διαλύματος λύσης (20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM ιμιδαζόλιο) το οποίο περιέχει 8M ουρία. Η κυτταρική πάστα αφέθηκε υπό την επίδραση της ουρίας για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) με ήπια ανάδευση. Το διαυγές διάλυμα λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παράγραφος 2.12) φορτώνεται ακολούθως στη στήλη. Ο καθαρισμός συνεχίζεται όπως παραπάνω με την διαφορά ότι ακολουθούν έξι πλύσεις με όλα τα διαλύματα πλύσεις να αποτελούνται από 20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl και 5mM ιμιδαζόλιο αλλά με τη συγκέντρωση της Urea να μειώνεται από 8M του πρώτου διαλύματος σε 0M του τελευταίου (από το ένα διάλυμα πλύσης στο επόμενο δηλαδή η συγκέντρωση της Urea μειωνόταν κατά το ήμισυ). Τέλος, η έκλουση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με διάλυμα από 20mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl και με αυξανόμενη συγκέντρωση του Imidazole από 80-300mM. Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -4°C.

## **2.15 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή SDS-PAGE πολυακρυλαμίδης.**

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το φορτίο του μορίου δια την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του. Στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα

σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συν-πολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμυδίου με N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά έστω και αναμειγμένα και πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N,-16 τετραμεθυλοαιθυλενο διαμίνη) πετυχαίνει την διάδοση ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιαταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειικό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Κατά την μη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτή συσσώρευσης, stacking gel). Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της πηκτής συσσώρευσης σε pH 6.8 και ακολουθεί η δεύτερη πηκτή (πηκτή διαχωρισμού) με pH 8.8, όπου οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάση του φορτίου τους και του μεγέθους τους. Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται 1:1 με το sample buffer. Ακολουθεί πεντάλεπτος βρασμός των πρωτεϊνών και γρήγορη φυγοκέντρωσή τους πριν την φόρτωση τους στην πηκτή. Η πηκτή μετά το φόρτωμα των δειγμάτων ηλεκτροφορείται σε τάση 100V αρχικά και αφού τα δείγματα εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού αυξάνεται σε 120V.

## **2.16 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.**

Στην ηλεκτροφόρηση αυτού του είδους, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων που ηλεκτροφορούνται, διαχωρίζονται βάσει του φορτίου τους, της δομής και του μοριακού τους βάρους. Τέτοιες πηκτές δεν είναι πληροφοριακές ως προς το είδος και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που ηλεκτροφορείται σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, αλλά μπορούν να δώσουν κάποια στοιχεία για την κατάσταση και τη συμπεριφορά των φυσικών πληθυσμών της πρωτεΐνης σε ένα έκλουσμα της. Και σαφώς είναι ένας τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων που είναι επιθυμητό να διατηρήσουν την στεροδιαμόρφωσή τους για να πραγματοποιηθούν πειράματα που απαιτούν κάτι τέτοιο. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το διάλυμα φόρτωσης κατά την προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων δεν περιέχουν SDS ούτε αναγωγικούς παράγοντες, και τα πρωτεϊνικά δείγματα δεν βράζονται πριν την φόρτωσή τους στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στους 4°C.

## **2.17 Χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie και αποχρωματισμός.**

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Κατά αυτήν η πηκτή τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 2.5% w/v Coomassie blue) όπου και αφήνεται για 30-40' σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 1 ώρα σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι εμφανίζονται οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

## **2.18 Προετοιμασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έκλουσης από στήλη Ni-NTA αγαρόζης για ανάλυσή του σε κολώνα μοριακής διήθησης (gel filtration).**

Τα εκλούσματα ανασυνδυασμένης His tag πρωτεΐνης που καθαρίστηκε από κυτταρική πάστα καλλιέργειας μέσω στήλης νικελίου ενώνονται και στη συνέχεια στο διάλυμα συμπυκνώνεται με χρήση μεμβράνης Amicon. Το συμπυκνωμένο δείγμα φορτώνεται σε κολώνα μοριακής διήθησης, η οποία έχει εξισορροπηθεί με διάλυμα 20mM Tris pH 8., 400mM NaCl. Κατά την διάρκεια της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης συνελέγησαν κλάσματα όγκου 5ml το καθένα, και μετά το πέρας της διαδικασίας, δείγμα των κλασμάτων που εμφανίζονται να φέρουν πρωτεΐνη στο χρωματογράφημα, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για την αναγνώριση των φυσικών πληθυσμών που διαχωρίστηκαν κατά την εφαρμογή της μοριακής διήθησης.

## **2.19 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.**

Χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο πρωτόκολλο για τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976).

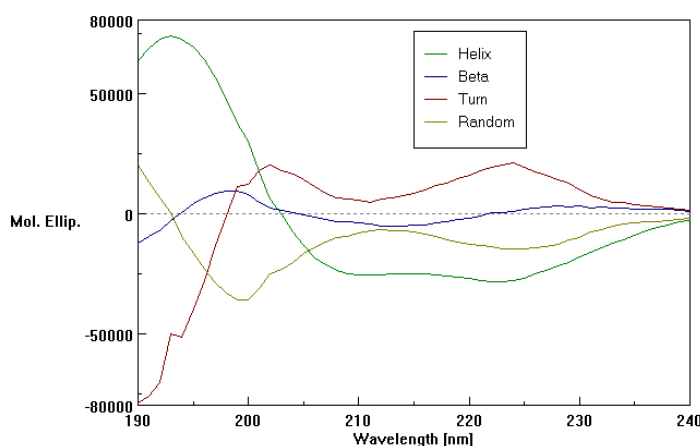
## **2.20 Πρωτεϊνικές μελέτες με τη χρήση φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD).**

Το πολωμένο φως αποτελείται από δυο κυκλικά, πολωμένα, συστατικά του ίδιου μεγέθους από τα οποία το ένα είναι αριστερόστροφο και το άλλο δεξιόστροφο. Η διαφορετική απορρόφηση των δυο αυτών συστατικών προκαλεί το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού. Προκειμένου να δημιουργηθεί αυτό το φαινόμενο θα πρέπει το πολωμένο φως να αντιδράσει με οπτικά ενεργές (χειρικές) ουσίες (Greenfield, 1996). Αυτές οι ουσίες είτε περιέχουν εγγενή χειρικότητα, είτε βρίσκονται σε χειρικό περιβάλλον (Kelly

and Price, 2000). Η διαφορετική απορρόφηση των επιμέρους συστατικών του πολωμένου φωτός οδηγεί στη δημιουργία ελλειπτικά πολωμένου φωτός, που τελικά μετατρέπεται στο σήμα του κυκλικού διχρωισμού (Kelly et al., 2005). Τα φασματοφωτόμετρα κυκλικού διχρωισμού μετράνε τη διαφορά της απορρόφησης μεταξύ αριστερόστροφα και δεξιόστροφα, πολωμένης ακτινοβολίας, δηλαδή:  $\Delta A = A_L - A_R$ . Η σχέση που συνδέει αυτή τη διαφορά απορρόφησης με την έλλειψη  $\theta$ , που προκαλείται στο πολωμένο φως είναι  $\theta = 32.98 \Delta A$ . Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού λαμβάνονται όταν η διαφορά απορρόφησης μετριέται σε σχέση με το μήκος κύματος.

Οι οπτικά ενεργές ομάδες στις πρωτεΐνες είναι οι πεπτιδικοί δεσμοί της κύριας αλυσίδας και οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες. Οι πεπτιδικοί δεσμοί απορροφούν το πολωμένο φως στην περιοχή του άπω-υπεριώδους (far UV, 240-180nm), ενώ οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες απορροφούν στο εγγύς-υπεριώδες (near UV, 320-260nm).

Τα φάσματα της απορρόφησης των πεπτιδικών δεσμών είναι χαρακτηριστικά για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (Σχήμα 7). Έτσι, η  $\alpha$ -έλικα εμφανίζει δύο αρνητικές κορυφές στα 222 και 208nm και μια έντονη, θετική, κορυφή στα 190nm. Η  $\beta$ -στροφή εμφανίζει θετικές κορυφές κοντά στα 225nm, στα 200-205nm και 180-190nm και μια αρνητική στα 210-215nm. Μια αρνητική κορυφή στα 215-216nm και μια θετική στα 195-200nm είναι το πρότυπο της  $\beta$ -πτυχωτής επιφάνειας, ενώ τα πεπτίδια χωρίς δομή (random coil) εμφανίζουν μια αρνητική κορυφή στα 197-199nm. Η ανάλυση των φασμάτων αυτών με ειδικούς αλγόριθμους μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες (ποιοτικές και ποσοτικές) για το περιεχόμενο μιας πρωτεΐνης σε δευτεροταγή, δομικά στοιχεία. Επιπρόσθετα, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμπεριφοράς μιας πρωτεΐνης κατά τη θερμική ή τη χημική της αποδιάταξη και επαναδιάταξη. Η ανάλυση των φασμάτων αυτών δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την πορεία αναδίπλωσης μια πρωτεΐνης. Επίσης, τα φάσματα αυτά χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών και κινητικών παραμέτρων των αντιδράσεων αποδιάταξης και επαναδιάταξης των υπό μελέτη πρωτεϊνών.



**Σχήμα 7.** Χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης του πολωμένου φωτός στο άπω-υπεριώδες για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

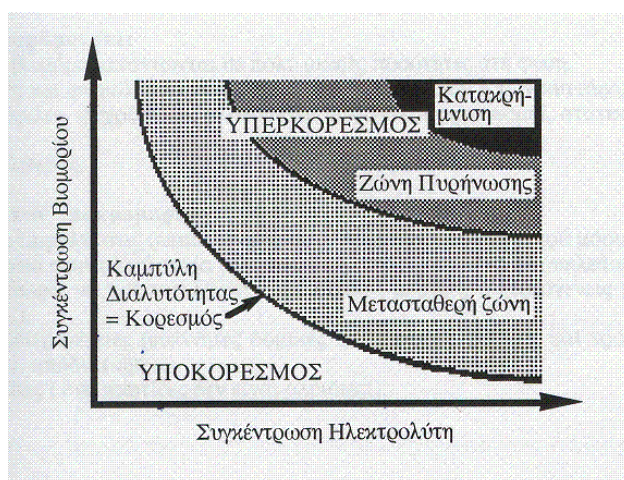
Για την αξιόπιστη εξαγωγή συμπερασμάτων θα πρέπει να τηρούνται κάποιες βασικές αρχές, όπως οι εξής:

α) Ο λόγος σήμα/θόρυβος (signal/noise ratio, S/N) θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερος. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με τη χρήση κατάλληλου πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα απορροφούν αρκετά έντονα στο άπω-υπεριώδες με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου S/N. Έτσι, είναι αναγκαία η επιλογή του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Ο λόγος S/N επηρεάζεται και από τις διάφορες παραμέτρους, που χρησιμοποιούνται κατά τη μέτρηση των φασμάτων.

β) Τα φάσματα των πρωτεϊνών θα πρέπει να περιλαμβάνουν αρκετή πληροφορία, δηλαδή οι μετρήσεις να περιλαμβάνουν τιμές σε, όσο το δυνατό, χαμηλές περιοχές του άπω-υπεριώδους. Τα φάσματα κυκλικού διχρωσισμού περιέχουν πληροφορία δευτεροταγούς δομής, μέχρι και τα 185-190nm.

## 2.21 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

Η κρυστάλλωση είναι μια μέθοδος επιλογής για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής χημικών μορίων και δη των πρωτεϊνών και βασίζεται στην περίθλαση ακτίνων X από κρυστάλλους της, υπό μελέτη, πρωτεΐνης. Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια υποκατηγορία της κατακρήμνισης των βιομορίων. Η κρυσταλλική κατάσταση χαρακτηρίζεται από υψηλή τάξη και συμμετρία στο πακετάρισμα των μορίων και το κρυσταλλικό πλέγμα προϋποθέτει επαναλήψεις όμοιων δομικών μονάδων. Αυτό σημαίνει ότι ανομοιογενή δείγματα είναι εξαιρετικά δύσκολο να κρυσταλλώσουν και για αυτό στην κρυσταλλογραφία είναι απαραίτητη η μέγιστη δυνατή καθαρότητα και ομοιογένεια του δείγματος. Για να κρυσταλλώσει ένα βιομόριο, θα πρέπει το διάλυμα στο οποίο βρίσκεται να υπερκορεστεί. Ο υπερκορεσμός του διαλύματος ενός βιομορίου είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση της διαλυτότητάς του. Η διαλυτότητα των βιομορίων περιγράφεται από τα λεγόμενα διαγράμματα διαλυτότητας, τα οποία συσχετίζουν την διαλυτότητα ενός βιομορίου με τη συγκέντρωσή του, τη συγκέντρωση των παραγόντων κατακρήμνισης, το pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ κτλ. Στο σχήμα 8, παρουσιάζεται ένα τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας.



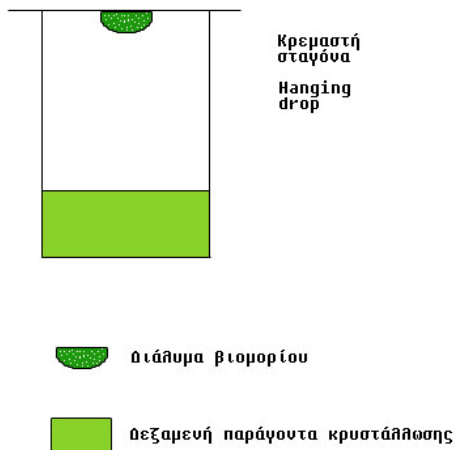
Σχήμα 8. Τυπικό διάγραμμα διαλυτότητας ενός βιομορίου.

Η ζώνη ενπυρήνωσης (nucleation zone) είναι η περιοχή όπου δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλων. Η εύρεση αυτής της περιοχής είναι ο πρωταρχικός στόχος στα πειράματα στα πειράματα κρυστάλλωσης. Η μετασταθερή ζώνη (metastable zone) είναι η περιοχή στην οποία οι ήδη σχηματισμένοι πυρήνες μπορούν να μεγαλώσουν. Ωστόσο, σε αυτή την περιοχή δεν είναι δυνατή η δημιουργία νέων πυρήνων. Η ζώνη ενπυρήνωσης και η μετασταθερή ζώνη είναι διακριτές περιοχές του υπερκορεσμού. Η κατακρήμνιση είναι μια ιδιαίτερη κατάσταση υπερκορεσμού, κατά την οποία ο υπερκορεσμός του διαλύματος είναι τόσο υψηλός, ώστε η περίσσεια του βιομορίου κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα. Ο υπερκορεσμός ενός διαλύματος βιομορίου βοηθά το σύστημα να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης. Αυτό σημαίνει ότι οι κατάλληλες συνθήκες υπερκορεσμού θα οδηγήσουν τα περισσότερα βιομόρια του διαλύματος στην κρυσταλλική φάση (δημιουργία πυρήνων), καθώς θα είναι αυτή, πλέον, που θα ευνοείται ενεργειακά. Η δημιουργία πυρήνων και το μέγεθος των κρυστάλλων επηρεάζονται από ποικίλες παραμέτρους. Η συγκέντρωση και η ομοιογένεια του πρωτεϊνικού δείγματος, το pH του διαλύματος, η φύση των κατακρημνιστών και των αλάτων, καθώς και η θερμοκρασία είναι μερικές από αυτές.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κρυστάλλωση του μεταλλάγματος είναι η διάχυση ατμών (vapor diffusion). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της τάσης ατμών. Όταν δυο διαλύματα τοποθετηθούν σε ένα αεροστεγώς κλειστό σύστημα, τείνουν να εξισορροπήσουν την τάση ατμών τους μέσω διάχυσης. Το διάλυμα που περιέχει την πρωτεΐνη έχει πολύ μικρότερο όγκο σε σχέση με το δεύτερο διάλυμα που ονομάζεται δεξαμενή, κάτι που σημαίνει ότι η συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών, που υπάρχουν στο διάλυμα της πρωτεΐνης, επηρεάζεται άμεσα από τη συγκέντρωση των συστατικών της δεξαμενής.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κρεμαστής σταγόνας (hanging drop). Σε αυτή την τεχνική, αρχικά προστίθενται όλα τα απαραίτητα συστατικά του διαλύματος της δεξαμενής (ρυθμιστικό διάλυμα, αλάτι, κατακρημνιστής, νερό κτλ.) και αναμειγνύονται. Ο συνολικός όγκος της δεξαμενής είναι 1ml και η σταγόνα δημιουργείται ως εξής: 2μl από το διάλυμα της δεξαμενής ,ή 2.5 μl σε κάποια άλλα, αναμειγνύονται με 2μl πρωτεϊνικό διάλυμα (5.9mg/ml) , ή 2.5 μl αντίστοιχα, και η σταγόνα που σχηματίζεται τοποθετείται σε σιλικοναρισμένη καλυπτρίδα. Η τελευταία τοποθετείται πάνω από το διάλυμα της δεξαμενής και ανάποδα (σχήμα 9). Η εξισορρόπηση του συστήματος έγινε στους 18oC.





**Σχήμα 9.** Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της κρεμαστής σταγόνας.

## 2.22 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι μια χρήσιμη μέθοδος ανάλυσης των υλικών σε νανοσκοπική κλίμακα (περίπου nm). Στο TEM η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα LaB<sub>6</sub>) που με την πυράκτωση, όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα, εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία των ηλεκτρονίων, ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς στους οποίους αλλάζοντας την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνά, μπορούμε να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή την εστιακή τους απόσταση) και επομένως να εστιάσουμε τη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα.

Οι κύριες ρυθμίσεις σ' ένα TEM επιτυγχάνεται με :

- α) τον συγκεντρωτή φακό (condenser lens), εστίαση της δέσμης στο παρασκεύασμα.
- β) τον αντικειμενικό φακό (objective lens), εστίαση της εικόνας στην οθόνη.
- γ) ενδιάμεσος ή και φακός προβολής (intermediate, projector lens) για τη ρύθμιση της μεγέθυνσης.

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

Φυσικά αυτές οι εικόνες εκτός του ότι μπορούμε να τις παρατηρήσουμε απ' ευθείας στην οθόνη του μικροσκοπίου, μπορούμε και να τις απεικονίσουμε με τις ειδικές φωτογραφικές μηχανές που είναι πάντα ενσωματωμένες στα μικροσκόπια. Τα πιο σύγχρονα μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένη

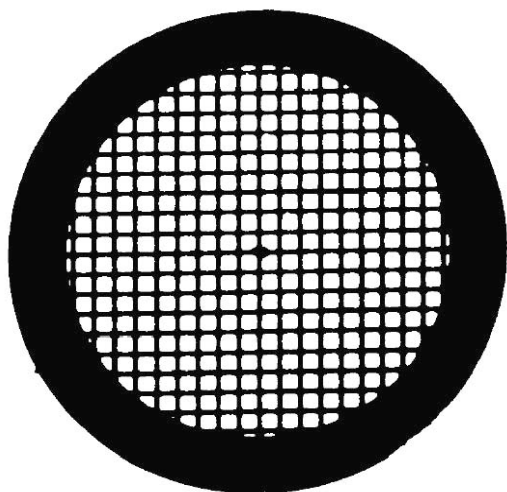
ψηφιακή κάμερα και μικροϋπολογιστή και έτσι μπορεί να γίνει απευθείας ψηφιοποίηση και αποθήκευση της εικόνας.

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

Ο τρόπος που λειτουργεί το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μας θέτει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που μπορούμε να παρατηρήσουμε. Έτσι ένα δείγμα για να είναι δυνατό να παρατηρηθεί με το κλασσικό TEM και με τις κλασσικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις παρακάτω ιδιότητες:

- α) να αντέχει σε υψηλό κενό,
- β) να είναι σταθερό στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων,
- γ) να είναι αρκετά λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια, και
- δ) να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.

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



**Σχήμα 10.** Πλέγμα (grid) ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το οποίο έχει διάμετρο 3mm.

### Αρνητική χρώση (Negative staining)

Ορισμένες κατηγορίες κυττάρων, μικροοργανισμών ή μεγαλομορίων των οποίων δε μας ενδιαφέρει άμεσα η εσωτερική τους δομή (βακτήρια, ιοί, πρωτεϊνικά μόρια, νουκλεϊκά οξέα κλπ) μπορούν να παρατηρηθούν με το TEM με αρνητική χρώση. Με αυτή τη μέθοδο συνήθως το παρασκεύασμα δε χρειάζεται να μονιμοποιηθεί παρά μόνο να τοποθετηθεί και να απλωθεί πάνω στα πλέγματα (grids) που είναι καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη, από πλαστικό ή άνθρακα. Στη συνέχεια γίνεται χρώση με ένα διάλυμα που

περιέχει ένα βαρύ μέταλλο, όπως για παράδειγμα το φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA), το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οξικό ουρανύλιο, η βολφραμική μεθυλαμίνη, το μυρμηκικό ουρανύλιο ή συνδυασμούς τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και γρήγορη και ιδιαίτερα χρήσιμη στη διάγνωση ιώσεων φυτών και ζώων. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό και με άλλες ιστοχημικές ή ανοσοβιολογικές μεθόδους (<http://www.aua.gr>).

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

Αρχικά τα διαλύματα των πεπτιδίων που παρασκευάσαμε, αραιώθηκαν, στην κατάλληλη συγκέντρωση. Στη συνέχεια πήραμε 8μl από το αραιωμένο μας διάλυμα και το τοποθετήσαμε πάνω σε grids. Μετά από 2 λεπτά αφαιρέθηκε το υπόλοιπο του διαλύματος που προεξείχε πάνω στο grid με ένα απορροφητικό χαρτάκι. Τελικά τα δείγματα βάφτηκαν με αρνητική χρώση χρησιμοποιώντας 8 μl Phosphotungstic acid (PTA) 1% για 2 λεπτά.

Τα grids είναι πλέγματα, τα οποία τοποθετείται το υλικό και παρατηρείται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης. Τα grids συνήθως έχουν 150, 200 ή 300 θέσεις. Υπάρχουν διάφοροι τύποι grids: Από διαμάντι, μόλυβδο, τιτάνιο, βολφράμιο, νάιλον, νικέλιο ή χαλκό.

#### Προετοιμασία των grids για το TEM

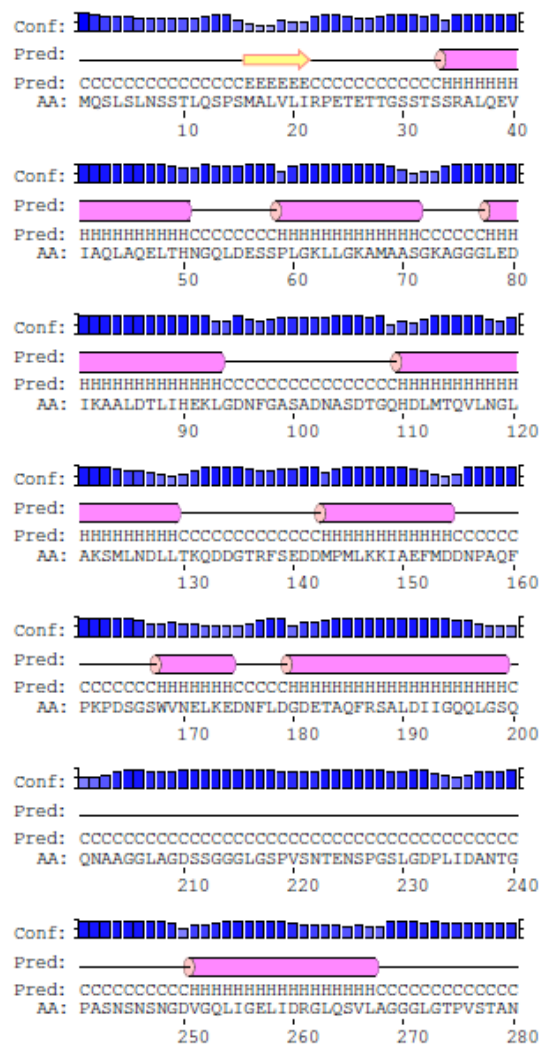
Αρχικά, καλύπτεται το grid με formvar. Το formvar λειτουργεί σαν ημιπερατή μεμβράνη και σαν «στήριγμα» για την εναπόθεση του υλικού, αφού καλύπτει τις κενές θέσεις του grid (κυψελίδες).

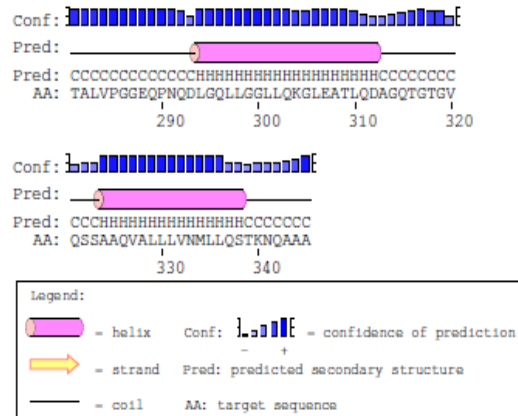
Δε χρησιμοποιούμε το νερό ως διαλύτη, γιατί είναι πολικός διαλύτης και δε μπορεί να διαλυθεί σε αυτόν η σκόνη. Ενώ, χρησιμοποιώντας τον πηκτικό διαλύτη 1,2-Dichloroethane, αποφεύγουμε τη δημιουργία συσσωματωμάτων, καθώς ο διαλύτης εξατμίζεται, δημιουργώντας αυτή την μεμβράνη. Η ιδανική συγκέντρωση της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

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της HrpZ158 με τη χρήση του προγράμματος PsiPred.

Η πρωτεΐνη HrpZ158 αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο (158 κατάλοιπο έως το 343) ολόκληρης της HrpZ από την *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Παρακάτω (Σχήμα 11) παρουσιάζεται η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpZ158 με τη χρήση του προγράμματος PsiPred.





Σχήμα 11. Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της HrpZ158 με το πρόγραμμα PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/209482>).

### 3.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου *hrpZ158* στον φορέα έκφρασης pProEX-HTb.

Ο φορέας έκφρασης pProEX-HTb που χρησιμοποιήθηκε είναι ανθεκτικός στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Amp) και φέρει 6xHis tag στο N-τελικό άκρο του. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR:

Upper\_HrpZ158:

5'- GGAGTCCATGGACGACAACCCCGCACAG -3'

Mismatch: 1bp

MW: 8570, 5

Lower\_HrpZ158:

5'- GGAATTCTCGGGTATCAGTCAGGCAGCAG -3'

Mismatch: 1bp

MW: 8973, 8

Συνθήκες PCR:

Denaturation: 95°C, 5min

Denaturation: 95°C, 30sec

Annealing: 57°C, 30sec

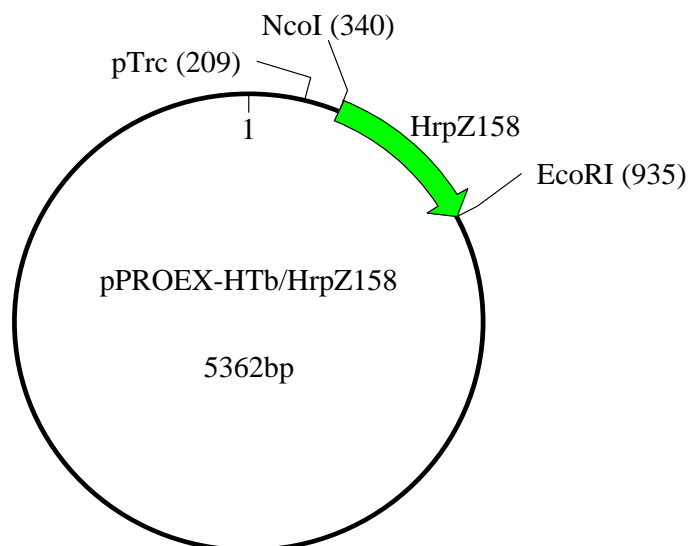
Extension: 72°C, 1min

Extension: 72°C, 5min

10°C, ∞

} 25 cycles

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του PCR προϊόντος καθώς και του φορέα ήταν η NcoI και η EcoRI.



**Σχήμα 12.** Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης και πρωτεϊνικής υπερέκφρασης pProEX HTb b μαζί με το ενθεμένο *hrpZ158* τμήμα.

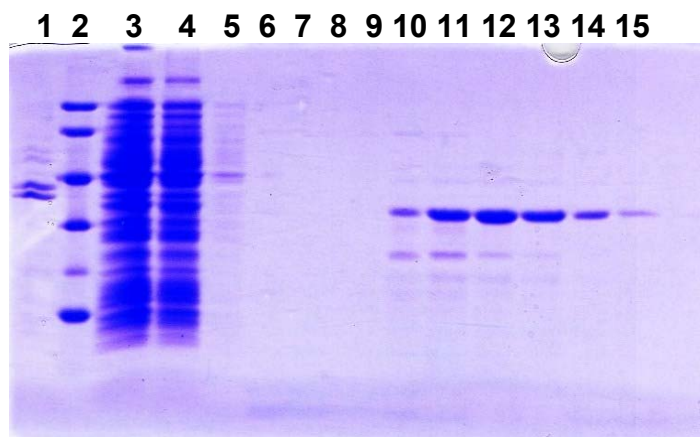
Το κλωνοποιημένο *hrpZ158* τμήμα στο φορέα έκφρασης pProEX-HTb στάλθηκε για αλληλούχηση για την επιβεβαίωση της ορθότητας της αλληλουχίας του προτού χρησιμοποιηθεί στα επόμενα πειράματα.

### **3.3 Καθαρισμός της πρωτεΐνης HrpZ158 από κύτταρα έκφρασης *E.coli* DH5α μετασχηματισμένα από τον κλωνοποιημένο φορέα έκφρασης pProEX-HTb υπό φυσικές συνθήκες.**

Πραγματοποιήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης HrpZ158 σε θερμοκρασία 23°C για 4 ώρες με 100μg/ml τελική συγκέντρωση IPTG. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχτηκαν και φυγοκεντρίθηκαν. Η τεχνική των υπερήχων χρησιμοποιήθηκε για το σπάσιμο των κυττάρων και την απελευθέρωση της πρωτεΐνης.

Ο καθαρισμός, αρχικά, έγινε υπό φυσικές συνθήκες της πρωτεΐνης με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA. Τα δείγματα από τις εκπλύσεις και τα εκλούσματα του καθαρισμού της HT-HrpZ158 συλλέχτηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE 15%.

Το μοριακό βάρος της HrpZ158 υπολογίζεται στα 18.65 kDa ενώ μαζί με την ουρά ιστιδινών του πλασμιδίου εκτιμάται στα 22.32 kDa. Στο συγκεκριμένο SDS-PAGE 15% που πραγματοποιήσαμε όπου η πρωτεΐνη διατηρεί ακόμα το His-tagged, «έτρεξε» στα 32 kDa και όχι στα 22.32 kDa που αναμέναμε θεωρητικά. Το φαινόμενο αυτό της ανώμαλης ηλεκτροφοριστικής συμπεριφοράς (Minna Haaparainen et al., 2011) κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε γλυκίνη που έχει ως αποτέλεσμα να την κάνει να «τρέχει» πιο αργά στο gel ηλεκτροφόρησης.



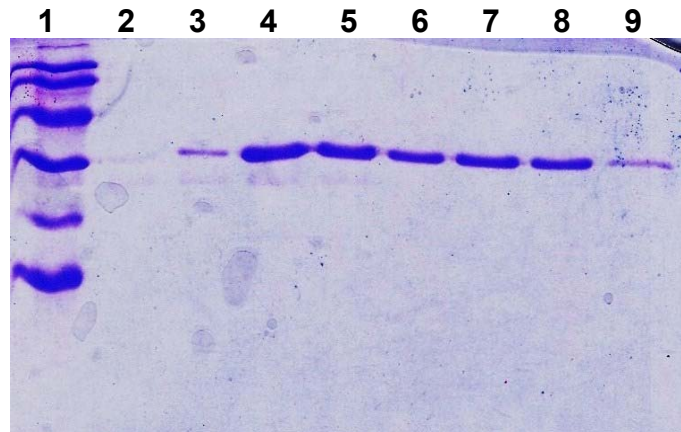
**Σχήμα 13.** Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των δειγμάτων του καθαρισμού υπό φυσικές συνθήκες(1.Pellet 2.marker-LMW 3.flow through 4.SN 5.wash1 6.wash2 7.wash3 8.elution1 9.elution2 10.elution3 11.elution4 12.elution5 13.elution6 14.elution7 15.elution8).

Για την αποκοπή του 6xHis της πρωτεΐνης λόγω του φορέα έκφρασης pProEX-HTb προστέθηκε rTEV πρωτεάση (για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου 25°C) αφού πρώτα υποβλήθηκε σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl και 10mM β-mercaptoethanol. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε και δεύτερη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA για την απομάκρυνση των ιστιδινών. Τα δείγματα συλλέχτηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης SDS-PAGE 15%.

Στη συνέχεια, για τον έλεγχο της ομοιογένειας του δείγματος, η πρωτεΐνη συγκεντρώθηκε με τη χρήση AMIKON σε 3ml όγκου για να φορτωθεί σε κολώνα μοριακής διήθησης (gel filtration). Το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης όμως συγκεντρώθηκε στο void fraction της στήλης. Η υπόλοιπη πρωτεΐνη διαχωρίστηκε σε τρεις πληθυσμούς όπου η συγκέντρωσή της υπολογίστηκε (μέθοδος Bradford) και βρέθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (0.098mg/ml) με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να προχωρήσουμε σε πειράματα για την προσπάθεια εύρεσης των κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης της HrpZ158.

### **3.4 Καθαρισμός της πρωτεΐνης HrpZ158 από κύτταρα έκφρασης E.coli DH5α μετασηματισμένα από τον κλωνοποιημένο φορέα έκφρασης pProEX-HTb υπό αποδιαταχτικές συνθήκες.**

Καθαρισμός μεγάλης κλίμακας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αποδιαταχτικού παράγοντα της ουρίας ,συγκέντρωσης 8M. Τα δείγματα που συλλέχτηκαν από τις εκπλύσεις και τα εκλούσματα, μετά από τη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA ηλεκτροφορήθηκαν με SDS-PAGE 15%.



**Σχήμα 14.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% από καθαρισμό σε αποδιαταχτικές συνθήκες (1.marker-LMW 2.elution1 3.elution2 4.elution3 5.elution4 6.elution5 7.elution6 8.elution7 9.elution8).

Τα elutions 2-8 (περίπου 41mg) που συλλέχθηκαν μετά την πρώτη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας Ni-NTA επωάστηκαν με την rTEV (βλέπε καθαρισμό υπό φυσικές συνθήκες). Το flow through και τα δυο washes μετά την rTEV Ni-NTA στήλη καθαρισμού υπολογίστηκε πως έχουν συγκέντρωση περίπου 5.9mg/ml (Μέθοδος Bradford), ικανοποιητική τιμή για να μπορούμε να προχωρήσουμε στη δοκιμή διαφόρων συνθηκών για προσπάθεια κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια «τρέξαμε» ένα native gel 10% πολυακρυλαμίδης για τον έλεγχο της ομοιογένειας και του ολιγομερισμού της πρωτεΐνης.



**Σχήμα 15.** Native gel καθαρισμού της HrpZ158 έπειτα από αποδιατακτικό καθαρισμό με Urea (1.Serva native marker 2.HrpZ158).

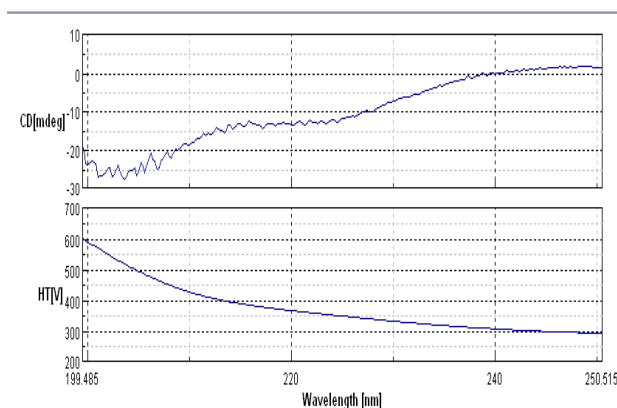


Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα από το Native gel της HrpZ158 έπεται από τον αποδιατακτικό καθαρισμό η πρωτεΐνη αποτελεί ένα μοναδιαίο πληθυσμό μοριακού βάρους 146 kDa το οποίο αντιστοιχεί σε οκταμερές μιας και το θεωρητικό βάρος του μονομερούς είναι 18.65kDa.

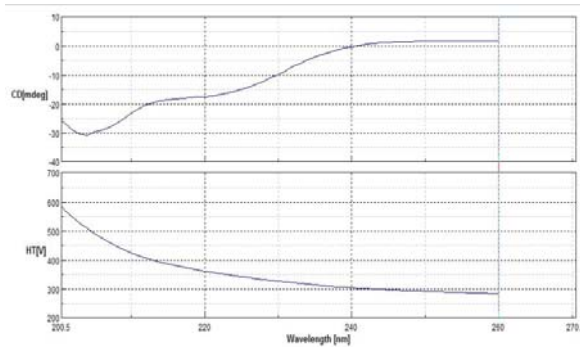
### 3.5 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD).

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού είναι μια πολύπλευρη μέθοδος, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί, μεταξύ των άλλων, για τη μελέτη της περιεκτικότητας μιας πρωτεΐνης σε δευτερογενή δομικά στοιχεία και της σταθερότητας αυτής κατά τη θερμική ή χημική της μετουσίωση.

Στη συγκεκριμένη εργασία, οι μετρήσεις έγιναν σε κυψελίδα μήκους 0.1cm και τα πρωτεϊνικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 0,2mg/ml σε 10mM Tris pH 8.0 για το δείγμα της πρωτεΐνης που καθαρίστηκε υπό φυσικές συνθήκες ενώ 0.23mg/ml σε 10mM Tris pH 8.0 και 10mM NaCl για το δείγμα πρωτεΐνης που καθαρίστηκε υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα φάσματα του κυκλικού διχρωισμού καταγράφηκαν από τα 180 ως τα 260 nm χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο (spectropolarimeter) Jansco 810. Τα φάσματα αναλύθηκαν μόνο ποιοτικά.



**Σχήμα 16.** Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού της HrpZ158 υπό φυσικές συνθήκες καθαρισμού.



**Σχήμα 17.** Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού της HrpZ158 υπό αποδιαταχτικές συνθήκες καθαρισμού.

Είναι φανερό από τα φάσματα που πήραμε με τη χρήση της μεθόδου του κυκλικού διχρωισμού πως και στις δύο περιπτώσεις καθαρισμού της πρωτεΐνης HrpZ158 υπό φυσικές και υπό αποδιαταχτικές συνθήκες έχουμε δύο αρνητικές κορυφές κοντά στα 222 και 208nm καθώς και μια έντονη, θετική κορυφή στα 190nm, χαρακτηριστικές της α-έλικας.

### 3.6 Λειτουργικός χαρακτηρισμός της HrpZ158

Ίδια ποσότητα πρωτεΐνης HrpZ158 από τον καθαρισμό υπό φυσικές και αποδιαταχτικές συνθήκες χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση ενέσεων σε φύλλα καπνού αφού πραγματοποιηθεί dialysis σε 20mM phosphate διάλυμα με pH 7.5 , με σκοπό τον έλεγχο της ικανότητας της πρωτεΐνης των δειγμάτων που προέρχονταν από τις δυο διαφορετικές συνθήκες καθαρισμού να ενεργοποιήσουν την αντίδραση υπερευαισθησίας HR. Από κάθε δείγμα πρωτεΐνης HrpZ158 (υπό φυσικές & αποδιαταχτικές συνθήκες) ενέθηκε 250μl συγκέντρωσης περίπου στα 20μM στην πίσω επιφάνεια των φύλλων με τη χρήση ειδικής σύριγγας Needleless για τη διείσδυση των δειγμάτων της πρωτεΐνης στα φύλλα καπνού. Τα φύλλα καπνού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από το δύο εβδομάδων φυτό καπνού *Nicotiana tabacum*. Επίσης, εκτός από τα δείγματα ενέθηκε αρνητικό control του 20mM phosphate διαλύματος, pH 7.5 και ως θετικό control το τμήμα πρωτεΐνης HrpZ 309 με αποδεδειγμένη ικανότητα ενεργοποίησης της HR για τις συγκρίσεις των αποτελεσμάτων. Η απόκριση των φύλλων στην HrpZ158 ήταν ορατή μετά από το πέρασμα περίπου 2 εβδομάδων από τη στιγμή της ένεσης του δείγματος.



**Σχήμα 18.** Φύλλο καπνού όπου φαίνονται τα νεκρωτικά συμπτώματα ενεργοποίησης της HR (1.αρνητικό control, buffer 2. HrpZ158 υπό φυσικές συνθήκες καθαρισμού, 25.9  $\mu\text{M}$  3.HrpZ158 υπό αποδιαταχτικές συνθήκες καθαρισμού, 16.2  $\mu\text{M}$  4.HrpZ309, θετικό control, καθαρισμός υπό φυσικές συνθήκες, 24.6  $\mu\text{M}$ )

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, αντίδραση υπερευαισθησίας παρατηρήθηκε τόσο στην πρωτεΐνη που καθαρίστηκε υπό φυσικές συνθήκες όσο και στο δείγμα που ενέθηκε έπειτα από καθαρισμό με αποδιαταχτικές συνθήκες. Η νέκρωση των φύλλων φαίνεται να είναι σοβαρότερη στο τμήμα HrpZ158 από το HrpZ309 που χρησιμοποιήσαμε ως θετικό control. Όσον αφορά κάποια μικρή διαφορά στο φαινότυπο μεταξύ των δειγμάτων της HrpZ158 (υπό φυσικές- αποδιαταχτικές συνθήκες) ίσως να οφείλεται στην μικρή απόκλιση της συγκέντρωσης μεταξύ τους ή λόγω πιθανής μη πλήρους αναδίπλωσης της πρωτεΐνης κατά τον καθαρισμό υπό αποδιαταχτικές συνθήκες.

### 3.7 Κρυσταλλώσεις.

Για την κρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διάχυσης ατμών με τη χρήση της τεχνικής της κρεμαστής βελόνας. Η συγκέντρωση του δείγματος πρωτεΐνης που χρησιμοποιήσαμε για κρυσταλλώσεις ήταν στα 5.9mg/ml. Τυχόν ίζημα που περιείχε αφαιρέθηκε από το δείγμα με φυγοκέντριση. Για την εύρεση αρχικών συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκαν τα εμπορικά διαθέσιμα screen kits, Molecular dimension και Hampton research.

Σε καμία από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν μεγάλωσαν κρύσταλλοι της πλήρους μήκους της πρωτεΐνης για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα περίθλασης ακτίνων-X. Στις περισσότερες από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είχε δημιουργηθεί ίζημα. Παρόλα αυτά, μικροί κρύσταλλοι εμφανίστηκαν σε ορισμένες συνθήκες. Σφαιρουλίτες που είναι μια ημικρυσταλλική κατάσταση σχηματίστηκαν στις εξής συνθήκες: α) 20% w/v 2-

propanol, 100 mM sodium acetate, pH 4.6, 200 mM calcium chloride, β) 50% w/v MPD, 20% w/v 2-propanol, 50 mM sodium chloride και 50 mM sodium acetate, γ) 30% v/v MPD, 0.1 M sodium acetate pH 4.5 και δ) 0.02 M Calcium chloride dehydrate, 0.1M Sodium acetate trihydrate, pH 4.6, 30% v/v 2-Methyl-2.4-pentanediol ενώ μικροί βελονοειδείς κρύσταλλοι εμφανίστηκαν στις συνθήκες που αποτελούνταν από: α) 0.2 M sodium nitrate, 20% w/v polyethylene glycol 3.350, pH 6.8 και β) 25% w/v 2-propanol, 100 mM HEPES sodium salt, pH 7.5, 100 mM magnesium chloride. Οι κρύσταλλοι αυτοί δημιουργήθηκαν μετά το πέρας περίπου με δύο εβδομάδων.

Μια πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης των κρυσταλλικών δομών που λάβαμε από την τελευταία συνθήκη έγινε με διαβάθμιση της συγκέντρωσης του  $MgCl_2$  και των τιμών του pH. Έτσι παρατηρήσαμε ξανά βελονοειδείς κρυστάλλους στις εξής νέες συνθήκες:

α. 300 λ 2-Propanol, 50 λ  $MgCl_2$ , 200 λ HEM (pH 7.5)

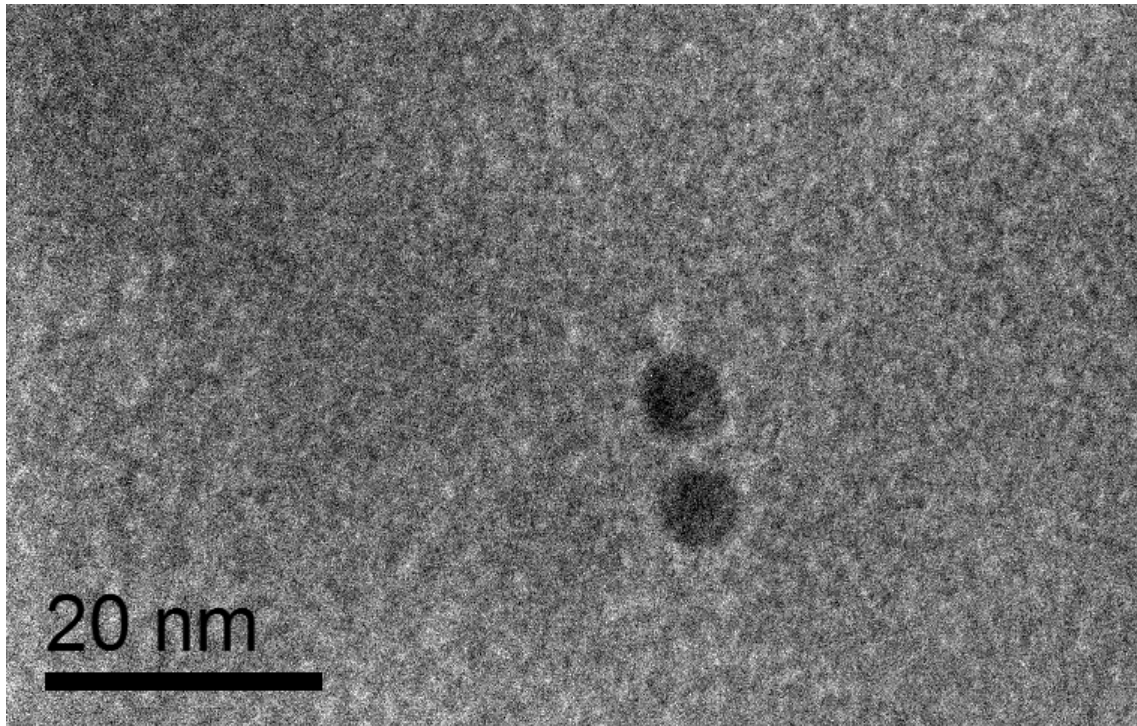
β. 250 λ 2-Propanol, 200 λ HEM, 100 λ  $MgCl_2$  (pH 7.0)

γ. 350 λ 2-Propanol, 200 λ HEM, 100 λ  $MgCl_2$  (pH 7.2)

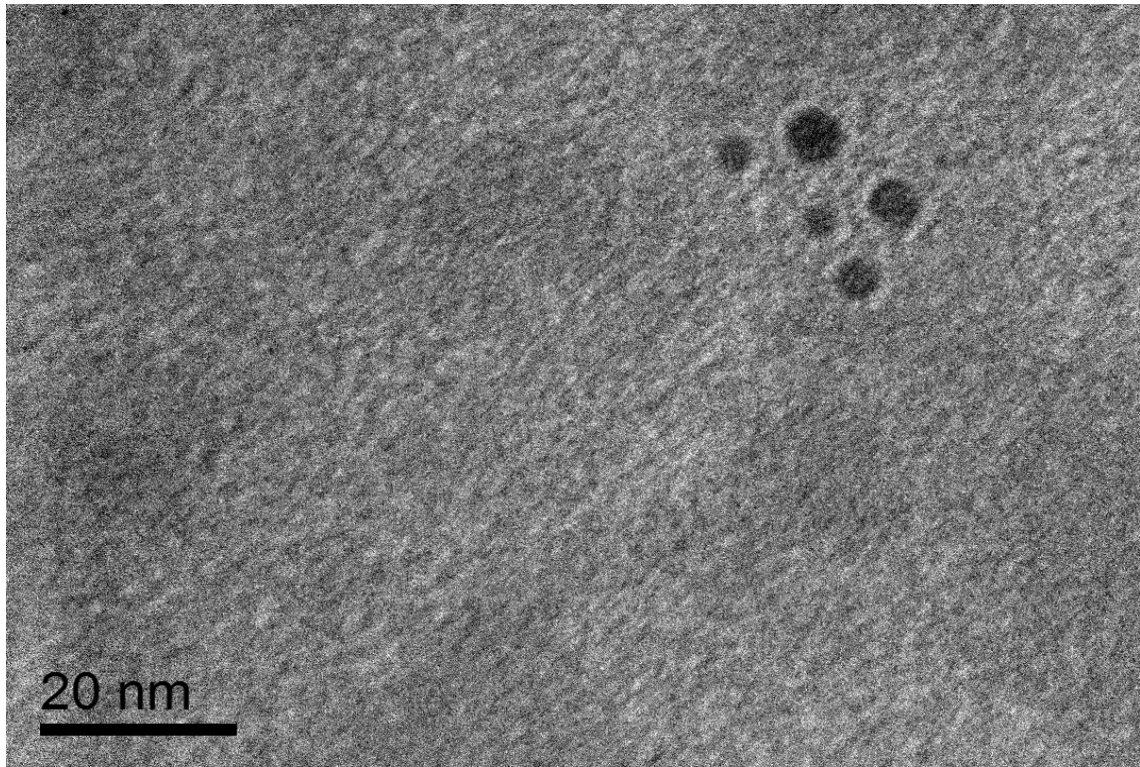
Περαιτέρω προσπάθειες για βελτίωση της ποιότητας και της μορφολογίας των κρυστάλλων από τις ανωτέρω συνθήκες περιέλαβαν την δημιουργία νέων συνθηκών με διαβάθμιση της συγκέντρωσης της 2-Propanol και του  $MgCl_2$ . Δυστυχώς, όμως, η προσπάθειά μας αυτή απέτυχε διότι παρά το ότι επίσης παρατηρήθηκαν βελονοειδείς κρύσταλλοι στις συνθήκες που αποτελούνταν από 370 λ 2-Propanol, 200 λ HEM, 100 λ  $MgCl_2$  σε pH 7.2, οι κρύσταλλοι δεν ήταν βελτιωμένοι σε σχέση με τους αρχικούς.

### **3.8 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).**

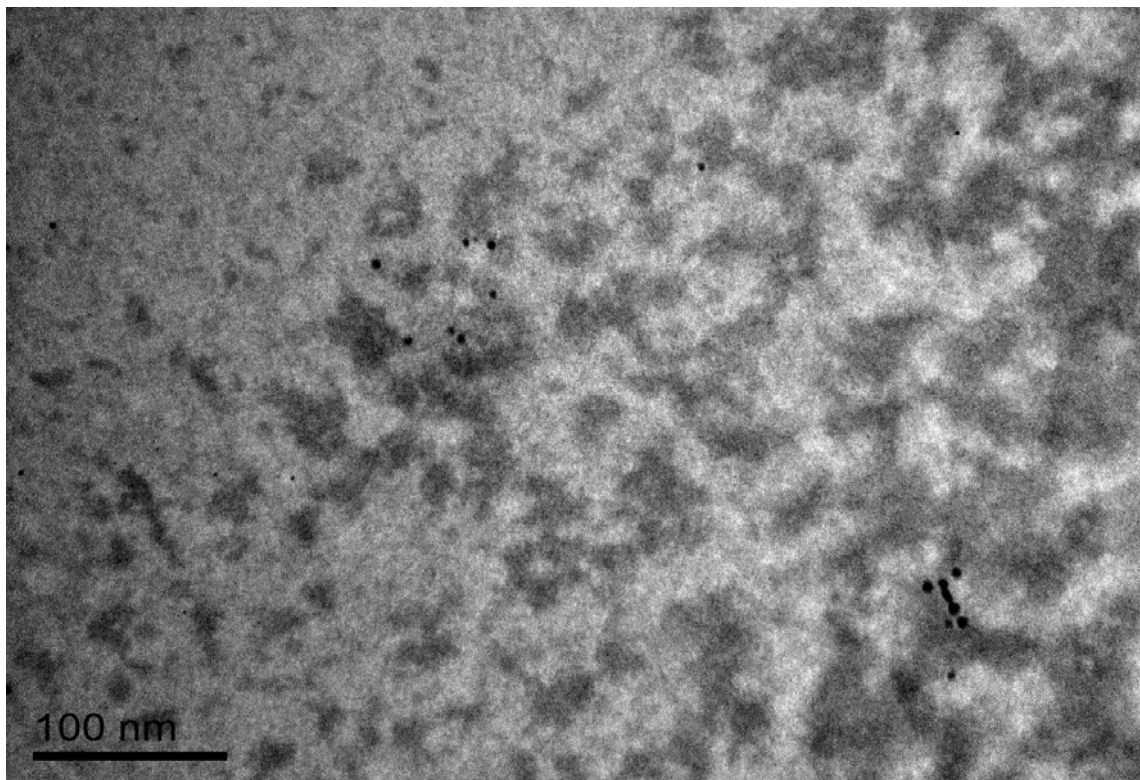
Η συγκέντρωση του δείγματος της HrpZ158 πρωτεΐνης που χρησιμοποιήσαμε για τις παρατηρήσεις στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ήταν στα 2.8mg/ml.



**Σχήμα 19.** Απεικόνιση της HrpZ158 πρωτεΐνης στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (2.8mg/ml), κλίμακας 20 nm.



**Σχήμα 20.** Απεικόνιση της HrpZ158 πρωτεΐνης στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (2.8mg/ml), κλίμακας 20 nm



**Σχήμα 21.** Απεικόνιση της HrpZ158 πρωτεΐνης στο Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (2.8mg/ml), κλίμακας 100 nm.

## 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε ένας προκαταρκτικός δομικός χαρακτηρισμός του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης HrpZ, που πιο συγκεκριμένα κωδικοποιεί την HrpZ158 πρωτεΐνη, ξεκινώντας από το 158 κατάλοιπο έως το 343.

Η πρωτεΐνη HrpZ, όπως όλες οι χαρπίνες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, έχει την ιδιότητα του ολιγομερισμού. Δημιουργεί διμερή τα οποία στη συνέχεια συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μεγαλύτερα ολιγομερή, το λιγότερο 16-μερή. Υπεύθυνη περιοχή για την ικανότητα αυτή του ολιγομερισμού εντοπίζεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της HrpZ το οποίο είναι πλούσιο σε κατάλοιπα λευκίνης τα οποία έχουν βρεθεί πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα ολιγομερισμού ενώ είναι συντηρημένα μεταξύ των χαρπινών (Jonghee et al., 2006) . Έχει παρατηρηθεί, επίσης, πως οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις που δημιουργούνταν και εξετάζονταν στην HrpZ δεν επηρέαζαν το μοτίβο ολιγομερισμού όπως είναι εκείνο ολόκληρης της HrpZ πρωτεΐνης (Minna Haapalainen et al., 2011). Έτσι, θεωρητικά αναμέναμε και η HrpZ158 που μελετούσαμε να εμφανίζει και αυτή παρόμοιο ολιγομερικό μοτίβο κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε έπειτα από τον καθαρισμό της υπό φυσικές συνθήκες. Μολονότι, πραγματοποιήσαμε πηκτή SDS πολυακρυλαμίδης παρατηρήσαμε μπάντες πρωτεΐνης με μοριακά βάρη που αντιστοιχούσαν σε διμερή, τριμερή μέχρι και εξαμερή της πρωτεΐνης.

Εξαιτίας του ολιγομερισμού της πρωτεΐνης, λοιπόν, κατά τον καθαρισμό της υπό φυσικές συνθήκες καθώς και του ιζήματος που σχημάτιζε σε υψηλές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, παράγοντες που αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα της προσπάθειάς μας για κρυστάλλωσής της, επιχειρήσαμε τον καθαρισμό της υπό αποδιαταχτικές συνθήκες. Κύριος στόχος μας ήταν να έχουμε την πρωτεΐνη HrpZ158 σε ένα ομοιογενή πληθυσμό για τη δοκιμή συνθηκών κρυστάλλωσής της. Έτσι, θεωρήσαμε πως αναδιατάσσοντας την πρωτεΐνη με τον αποδιατακτικό παράγοντα της Urea και στη συνέχεια με την επαναδιάταξή της επάνω στην κολώνα Ni-NTA με συνεχή μείωση του μετουσιωτικού παράγοντα, θα είχαμε μεγαλύτερες πιθανότητες για ένα ομοιογενή πληθυσμό στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Τελικά, η μέθοδος ολοκληρώθηκε με επιτυχία μιας και καταφέραμε να έχουμε την πρωτεΐνη σε ομοιογενή πληθυσμό οκταμερών όπως δείχτηκε στο gel ηλεκτροφόρησης υπό φυσικές συνθήκες που πραγματοποιήθηκε (βλέπε Σχήμα 15.)

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως δομές α-έλικας, κατά πάσα πιθανότητα (Jonghee Oh et al., 2006), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα πολλών χαρπινών να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, HR. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από το πρόγραμμα πρόβλεψης της δευτεροταγής δομής, PSIPRED, η HrpZ και η HrpZ158 που μελετάμε αναμένεται θεωρητικά να αντιστοιχούν σε δομές α-έλικας. Τα αποτελέσματα από την πρωτεϊνική μελέτη της HrpZ158 με τη χρήση της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσισμού (CD) επιβεβαιώνουν την αρχική υπόθεση που κάναμε με βάση τα αποτελέσματα από τη χρήση του προγράμματος PSIPRED και της βιβλιογραφίας, τόσο για το δείγμα πρωτεΐνης που προέρχεται από τον

καθαρισμό υπό φυσικές συνθήκες όσο και από αυτό έπειτα από τον καθαρισμό υπό αποδιαταχτικές συνθήκες. Όπως φαίνεται, η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης της HrpZ158, κατά την αποδιάταξη και επαναδιάταξη της πρωτεΐνης επάνω στην κολώνα Ni-NTA με τη χρήση του αποδιαταχτικού παράγοντα της Urea, δεν επηρεάστηκε.

Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη HrpZ έχει την ικανότητα ενεργοποίησης της HR (James R. Alfano et al.1996) όταν εκκρίνεται σε επαρκείς ποσότητες (Tampakaki and Panopoulos,2000). Ειδικότερα το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης HrpZ έχει βρεθεί πως είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της HR (Lee et al., 2001a) και ειδικότερα τα κατάλοιπα 290-313 της HrpZ158 σε *N. tabaccum* φυτά ενώ μεταλλάξεις απαλοιφής από το 30 μέχρι το 194 κατάλοιπο προκαλούν ακόμα ισχυρότερη απόκριση σε σχέση με την ολόκληρη HrpZ πρωτεΐνη (Lee et al., 2001a; Minna Haaparainen et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη, τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τις ενέσεις των δειγμάτων HrpZ158 τόσο από τον καθαρισμό υπό φυσικές συνθήκες όσο και από τον καθαρισμό έπειτα από τις αποδιαταχτικές, ήταν *N. tabaccum* τα οποία αναγνωρίζουν τις πλούσιες σε λευκίνη α-ελικοειδής δομές των βακτηριακών χαρπινών σύμφωνα με την Haaparainen. Τα αποτελέσματα του φαινοτύπου των φύλλων καπνού που μολύναμε επιβεβαιώνουν πως το καρβοξυτελικό άκρο της HrpZ επάγει ισχυρά την αντίδραση HR και μάλιστα πολύ περισσότερο από το τμήμα 1-309 καταλοίπων που χρησιμοποιήσαμε ως θετικό control στις μολύνσεις μας (HrpZ309), τόσο από το δείγμα πρωτεΐνης που καθαρίστηκε υπό φυσικές συνθήκες όσο και εκείνο υπό τις αποδιαταχτικές και επιβεβαιώνουν ότι η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αντίδραση υπερευαισθησίας βρίσκεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της HrpZ όπως είχαμε δει από τη βιβλιογραφία (Lee et al., 2001a). Συμπερασματικά ,λοιπόν, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης υπό αποδιαταχτικές συνθήκες δεν επηρέασε τη λειτουργία της πρωτεΐνης ως προς την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας, HR, τουλάχιστον.

Περισσότερες από 400 συνθήκες κρυστάλλωσης δοκιμάστηκαν, όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διάχυσης ατμών με τη χρήση της τεχνικής της κρεμαστής βελόνας. Όλες οι κρυσταλλώσεις πραγματοποιήθηκαν με την πρωτεΐνη να βρίσκεται σε συγκέντρωση 5.9 mg/ml. Η αποτυχία όμως κρυστάλλωσης της πλήρους μήκους πρωτεΐνης έθεσε εκτός των προσδοκιών μας τον προσδιορισμό της δομής της και μας προϊδέασε για μια μακρόχρονη πορεία επίλυσης της δομής του καρβοξυτελικού τμήματος της HrpZ158. Σε επόμενα πειράματα, κρυστάλλωσης της HrpZ158 είναι σκόπιμο να επιμείνουμε στις αρχικές συνθήκες των εμπορικών screen kits, Molecular dimension και Hampton research, όπου δημιουργήθηκαν σφαιρουλίτες και τις οποίες λόγω περιορισμένου χρόνου δεν προλάβουμε να ελέγξουμε διεξοδικά.

Τέλος, αποφασίσαμε να εξάγουμε πληροφορίες για την HrpZ158 προετοιμάζοντας δείγμα της πρωτεΐνης για την παρατήρησή της στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μιας και δεν είχε παρατηρηθεί ξανά σε προηγούμενες μελέτες. Σύμφωνα με τις εικόνες που πήραμε από το



ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (βλέπε Σχήμα 19,20 & 21), δείχνει να έχει σφαιροειδή μορφή με τη διάμετρό της να κυμαίνεται γύρω στα 3-7nm.

## 5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alfano J. R., Bauer D. W., Milos T. M. and Collmer A., Analysis of the role of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrpZ harpin in elicitation of the hypersensitive response in tobacco using functionally non-polar *hrpZ* deletion mutations, truncated HrpZ fragments, and *hrmA* mutations, 1996. *Molecular Microbiology*. **19**: 715-728.

Brown I. R., Mansfield J. W., Taira S., Roine E., and Romantschuk M., Immunocytochemical Localization of HrpA and HrpZ Supports a role for the Hrp Pilus in the Transfer of Effector Proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Across the Host Plant Cell Wall, 2001. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **14**: 394-404.

Engelhardt S., Lee J., Gabler Y., Kemmerling B., Haapalainen M.-L., Li C.-M., Wei Z., Keller H., Joosten M., Taira S., and Nurnberger T., Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity, 2009. *The Plant Journal*. **57**: 706-717.

Haapalainen M., Engelhardt S., Kufner I., Li C.-M., Nurnberger T., Lee J., Romantschuk M., and Taira S., Functional mapping of harpin HrpZ of *Pseudomonas syringae* reveals the sites responsible for protein oligomerization, lipid interactions and plant defence induction, 2011. *Molecular Plant Pathology*. **12**: 151-166.

Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A. P., Panopoulos N. J., Noller J., Weiler E. W., Cornelis G. R., Mansfield J. W., and Nurnberger T., HrpZ<sub>PspH</sub> from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro, 2000. *PNAS*. **98**: 289-294.

Li C. M., Haapalainen M., Lee J., Nurnberger T., Romantschuk M., and Taira S., Harpin of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Harbors a Protein Binding Site, 2005. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **18**: 60-66.

Oh J., Kim J.-G., Jeon E., Yoo C.-H., Moon J. S., Rhee S., and Hwang I., Amyloidogenesis of Type III-dependent Harpins from Plant Pathogenic Bacteria, 2007. *Journal of biological chemistry*. **282**: 13601-13609.

Preston G., Huang H.-C., He S. Y., and Collmer A., The HrpZ Proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *Syringae*, *glycinea*, and *tomato* Are Encoded by an Operon Containing Yersinia *ysc* Homologs and Elicit the Hypersensitive Response in Tomato but not Soybean, 1995. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **8**: 717-732.

Sinn J. P., Oh C., Jensen P. J., Carpenter S. C. D., Beer S. V., and McNellis T. W., The C-Terminal Half of the HrpN Virulence Protein of the Fire Blight

Pathogen *Erwinia amylovora* Is Essential for Its Secretion and for Its Virulence and Avirulence Activities, 2008. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 1387-1397.

Tampakaki A. P. , Fadouloglou V. E., Gazi A. D. , Panopoulos N. J., and Kokkinidis M., Conserved features of type III secretion, 2004. *Cellular Microbiology.* **6**: 805-816.

Tampakaki A. P. and Panopoulos N. J., Elicitation of Hypersensitive Cell Death by Extracellularly Targeted HrpZ<sup>PspH</sup> Produced in planta, 2000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1366-1374.

Tampakaki A. P., Skandalis N., Gazi A. D., Bastaki M. N., Sarris P. F., Charova S. N., Kokkinidis M., and Panopoulos N. J., Playing the “Harp”: Evolution of our Understanding of hrp/hrc Genes, 2010. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 17.1-17.24.

Thwaites R., Spanu P. D., Panopoulos N. J., Stevens C., and Mansfield J. W., Transcriptional Regulation of Components of the Type III Secretion System and Effectors in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, 2004. . *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**: 1250-1258.

Tsunemi K., Taguchi F., Marutani M., Watanabe-Sugimoto M., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T., and Ichinose Y., Degeneration of hrpZ gene in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaco* to evade tobacco defence: an arms race between tobacco and its bacterial pathogen, 2011. *Molecular Plant Pathology.* **12**: 709-714.