ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ Μ.ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΒΙΟΙΤΑΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακή εργασία:

"Μοριακός χαρακτηρισμός της ΑΤΡάσης του τύπου ΙΙΙ συστήματος έκκρισης του βακτηρίου Pseudomonas syringae"



Υπεύθυνος καθηγητής ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

ΚΑΡΑΝΤΖΑΛΗ ΕΥΘΥΜΙΑ

НРАКЛЕІО 2004

Υπεύθυνος καθηγητής ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

Β΄ Εξεταστής ΤΟΚΑΤΛΙΔΗΣ ΚΩΣΤΑΣ

ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ ΙΝΣΤΙΣΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πίσω από κάθε τέτοιο εγχείρημα υπάρχει πάντα ένας αριθμός ανθρώπων που σε στηρίζουν και σε βοηθούν σε κάθε δυσκολία να συνεχίσεις παρακάτω...

Για το λόγο αυτό θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Κο Οικονόμου που με έδωσε μια θέση στην ομάδα του και μου εμπιστεύτηκε την υλοποίηση αυτού του project. Τη Λίλυ για τις πολύτιμες συμβουλές και την εμπειρία που προσπάθησε να μου μεταδώσει, το Μπάμπη για την υπομονετική καθοδήγηση και τις πολύωρες συζητήσεις, το Γιώργο για τα πρώτα μου βήματα σε αυτό το εργαστήριο αλλά και για πολλά από τα μετέπειτα και τη Σάννυ για όλα αυτά που δε χωράνε να γράψω... ξέρει αυτή!

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τις φίλες μου, Αγάπη, Εύη και Ζωή που κι αυτό το χρόνο περπατήσαμε μαζί παρ'όλες τις δυσκολίες...

Στον μπαμπά μου

<u>Περιεχόμενα</u>

•	Εισαγωγή	σελ. 6
•		01.730
•	Υλικά και μέθοδοι	σελ. 18
•	Αποτελέσματα	σελ. 23
	Ι. ΗrcN μεταλλαγές Α. Έκφραση πρωτεινών	σελ. 24
	Β. Ολιγομερισμός πρωτεινών	
	Γ. Ενζυμική ενεργότητα	
	II. GFP κατασκευές	σελ. 33
	Α. Έκφραση πρωτεινών	
	Β. Ολιγομερισμός πρωτεινών	
	Γ. Ενζυμική ενεργότητα	
	ΙΙΙ. Έκκοιση της ποωτείνης HrnZ	σελ. 38
	ΙV. Υποκυττάρια τοπολογία της HrcN	σελ. 38
•	Συζήτηση	σελ. 47
	Βιβλιονοαφία	σcλ 51
•	σιμνισίμαλια	UGM JI

introduction

your work environment



Ένας αριθμός παθογόνων βακτηρίων έχει εξελιχθεί έτσι ώστε να είναι ικανός να δεσμεύει τους ξενιστές του σε πολύ στενές αλληλεπιδράσεις, με σκοπό όχι απαραίτητα να προκαλέσει μια ασθένεια αλλά περισσότερο να διασφαλίσει την ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται και να μεταδίδεται σε νέους ξενιστές. Η σχέση μεταξύ παθογόνων βακτηρίων και ξενιστών είναι πολύ συχνά ειρηνική επειδή έχει διαμορφωθεί μέσω μιας συνεξελικτικής διαδικασίας που στοχεύει στη διασφάλιση της επιβίωσης και των δύο (Galan, 1999). Αυτό συμβαίνει και με τα παθογόνα βακτήρια που μέσω της διαδικασίας της προσαρμογής στον ξενιστή, έχουν χάσει την ικανότητα να εξερευνούν νέα περιβάλλοντα.

Μερικές φορές όμως δρουν εις βάρος του ξενιστή. Σε μερικές περιπτώσεις τα συμπτώματα της ασθένειας που προκαλούν μπορεί να είναι απλά δυσάρεστες εκδηλώσεις μιας αυτοπεριοριστικής διαδικασίας, που οδηγεί στη μετάδοσή τους από τον ένα ξενιστή στον επόμενο. Σε άλλες περιπτώσεις όμως, όταν τα βακτήρια βρουν έναν ξενιστή εξασθενημένο από συνθήκες που μεταβάλλουν τη λεπτή ισορροπία της αλληλεπίδρασης βακτηρίου-ξενιστή, μπορεί να προκύψουν θανατηφόρες ασθένειες (Galan, 1999).

Κεντρικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-ξενιστών έχουν οι πρωτεΐνες, είτε είναι εκκρινόμενες, είτε μεμβρανικές. Στα Gram αρνητικά βακτήρια οι πρωτεΐνες αυτές πρέπει να περάσουν 2 μεμβράνες, την εσωτερική που περιβάλλει το κυτταρόπλασμα και τον εξωτερικό φάκελο που περιβάλλει το περίπλασμα και δρα ως διαχωριστικό με το περιβάλλον (εικόνα 1). Το γενικό μονοπάτι έκκρισης μεταφέρει τις πρωτεΐνες στο περίπλασμα. Πριν προσδιοριστεί το τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα (TTSS) στη Yersinia, δυο άλλα ειδικευμένα συστήματα, το τύπου Ι και τύπου ΙΙ, ήταν γνωστά για τη μεταφορά μορίων στην κυτταρική επιφάνεια (Salmond and Reeves, 1993; Pugsley, 1993; Fath and Kolter, 1993). Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το τύπου Ι μονοπάτι περνούν απ'ευθείας από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια, παρακάμπτοντας εντελώς το γενικό μονοπάτι έκκρισης (εικόνα 1) σε αντίθεση με το τύπου ΙΙ όπου οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούν το μονοπάτι αυτό για να φτάσουν στο περίπλασμα και μετά διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω διαφορετικών πρωτεϊνικών καναλιών. Και τα δυο συστήματα εκκρίνουν πρωτεΐνες που έχουν ποικίλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και της παθογένεσης (Mecsas and Strauss, 1996). Επίσης, έχει αναφερθεί και η ύπαρξη ενός άλλου βακτηριακού εκκριτικού συστήματος, του τύπου ΙV, στο οποίο όμως δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμα το ακριβές μονοπάτι έκκρισης (Christie, 2001).

Τα τελευταία 15 περίπου χρόνια, το υψηλά συντηρημένο, τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα έχει βρεθεί σε πολλά Gram αρνητικά βακτήρια που προκαλούν ασθένειες σε ζώα και φυτά. Το σύστημα έχει εξελιχθεί ώστε να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στον ξενιστή, οι οποίες μπορούν στη συνέχεια να επάγουν ή να παρέμβουν στις κυτταρικές διαδικασίες του ξενιστή και να επιβάλλουν τους όρους της αλληλεπίδρασης. Αυτή η διαδικασία ενός βήματος θυμίζει το μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα τύπου Ι συστήματα (εικόνα 1). Τα συστήματα έκκρισης τύπου ΙΙΙ βρίσκονται τόσο σε φυτοπαθογόνα όσο και σε ζωοπαθογόνα βακτήρια, γεγονός που φανερώνει την ικανότητά τους να λειτουργήσουν όχι μόνο μέσα στον πληθυσμό των βακτηρίων αλλά και μέσα στα βασίλεια των ξενιστών (Galan, 1999).

Αποτελούμενα από περισσότερες των είκοσι πρωτεϊνών, τα συστήματα τύπου ΙΙΙ είναι τα πιο πολύπλοκα από όλα τα βακτηριακά συστήματα έκκρισης και έχουν τρία χαρακτηριστικά: οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες δε διαθέτουν πεπτίδια οδηγούς που στη συνέχεια να απομακρύνονται, χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του sec-διαμεσολαβούμενου γενικού εκκριτικού μονοπατιού.



τα συστήματα χρησιμοποιούν την ενέργεια της υδρόλυσης του ATP για την έκκριση. Τα τύπου Ι και ΙΙΙ εκκρίνουν τις πρωτεΐνες κατά μήκος και της εσωτερικής μεμβράνης και του κυτταρικού φακέλου (εξωτερική μεμβράνη) σε ένα βήμα. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες δεν κάνουν ενδιάμεσο σταθμό στο περίπλασμα, όπως συμβαίνει στο τύπου ΙΙ σύστημα. Τα δυο αυτά συστήματα μοιάζουν επίσης στο ότι δεν απομακρύνουν κάποιο τμήμα της πρωτεΐνης. Αντίθετα, το N-άκρο των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το γενικό εκκριτικό μονοπάτι, απομακρύνεται κατά τη μεταφορά τους στο περιπλασμα. Η N-τελική αλληλουχία σινιάλο μπορεί να παρατηρηθεί στο περιπλασμα και η εξωκυτταρική πρωτεΐνη είναι καθαρά διαφορετική από την ενδοκυτταρική δια της απουσίας της. Τα τύπου Ι συστήματα συντίθενται από πολύ λιγότερα συστατικά από ότι τα τύπου ΙΙΙ. Αυτό φαίνεται από τον αριθμό των διαφορετικών πρωτεϊνών (σχήμα και μέγεθος) στην εικόνα. Τα τύπου ΙΙ και ΙΙΙ συστήματα μοιράζονται ένα κοινό συστατικό του κυτταρικού φακέλου, όπως φανερώνει η αλληλουχικη ομολογία. Αυτό φαίνεται στο σχήμα του συστατικού στην εικόνα.

- για την έκκριση αρκετών υποστρωμάτων, απαραίτητη είναι η παρουσία βοηθητικών πρωτεϊνών, των σαπερονών (chaperones)
- για την πλήρη ενεργοποίηση του εκκριτικού μονοπατιού απαιτείται επαφή με το κύτταρο-ξενιστή

Λόγω της αρχιτεκτονικής του κυτταρικού φακέλου των Gram αρνητικών βακτηρίων, οι πρωτεΐνες που θα μεταφερθούν πρέπει να περάσουν πολλά εμπόδια: την εσωτερική μεμβράνη, τον περιπλασμικό χώρο, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Κατά συνέπεια, τα βακτήρια αυτά έχουν διαμορφώσει εξελικτικά μια ποικιλία μηγανισμών για να μεταφέρουν πρωτεΐνες από το κυτταρόπλασμα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον (Pugsley, 1993). Η ανακάλυψη αλληλουγικής ομολογίας μεταξύ πρωτεϊνών που ενέγονται στην έκκριση ιογενών παραγόντων (virulence factors) σε διάφορα παθογόνα βακτήρια και πρωτεϊνών που ενέχονται στην εξαγωγή συστατικών του μαστιγίου, οδήγησε στην υπόθεση ότι υπάρχει ένα κοινό μονοπάτι πρωτεϊνικής έκκρισης, που ονομάστηκε τύπου ΙΙΙ (Michelis et al., 1991; Galan et al., 1992; Van Gijsegem et al., 1993). Είναι πολύ πιθανό ότι το αρχικό τύπου ΙΙΙ εκκριτικό σύστημα των ιογενών παραγόντων εξελίχθηκε από τα συστήματα της μαστιγιακής συγκρότησης (Stephens and Shapiro, 1996; Macnab, 1996). Το βακτηριακό μαστίγιο υπάργει σε μια μεγάλη γκάμα ευβακτηριων και σε μερικά αρχαιοβακτήρια, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι πιθανώς εμφανίστηκε πολύ πριν τα gram αρνητικά βακτηρία που φέρουν το τύπου ΙΙΙ σύστημα. Διαφορές βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη. Τα συστατικά του μαστιγίου περνούν από μια εξωτερική δομή δακτυλίου που είναι τμήμα του ίδιου του μαστιγίου (Aizawa, 1996), ενώ τα παθογονικά μόρια δράσης διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη μέσω ενός πρωτεϊνικού καναλιού, ομόλογου αυτών που χρησιμοποιούνται από τα τύπου ΙΙ συστήματα (Pugsley, 1993; Kaniga et al., 1994).

Τα Gram παθογόνα βακτήρια πιθανότατα απέκτησαν τα συστήματα αυτά μέσω κάποιου μηχανισμού οριζόντιας μεταφοράς. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι τα συστήματα αυτά συχνά κωδικοποιούνται από επιπλέον χρωμοσωμικά στοιχεία ή περιοχές μέσα στις νησίδες παθογονικότητας οι οποίες είναι τμήματα χρωμοσωμικού DNA που απουσιάζουν από συγγενή μη παθογόνα βακτήρια (Hueck, 1998; Lee, 1997). Οι νησίδες αυτές έχουν ένα G+C περιεχόμενο που διαφέρει από αυτό των χρωμοσωμάτων του ξενιστή και είναι συχνά δεσμευμένες από απομεινάρια αλληλουχιών ένθεσης, γονίδια βακτηριοφάγων ή μεταθετά στοιχεία. Αμινοξική και αλληλουχική σύγκριση των πιο συντηρημένων συστατικών του τύπου ΙΙΙ συστήματος έκκρισης και του συστήματος μαστιγιακής εξόδου δείχνουν μια ομαδοποίηση διαφορετικών μελών της οικογένειας σε χωριστές ομάδες (Galan,1999).

Οι πρωτεΐνες του μαστιγίου φτιάχνουν μια χωριστή ομάδα και τα συστατικά του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού συστήματος των φυτοπαθογόνων και ζωοπαθογόνων βακτηρίων ομαδοποιούνται επίσης χωριστά. Το σύστημα έκκρισης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι πιο συγγενές της μαστιγιακής μηχανής. Αυτό σημαίνει ότι είναι πιθανό τα συστήματα έκκρισης να εμφανίστηκαν πρώτα στα βακτήρια αυτά, ως μια εξελικτική προσαρμογή του συστήματος εξόδου του μαστιγίου, προκειμένου να εκκρίνουν άλλες πρωτεΐνες εκτός της συστατικής μηχανής να δημιουργούν στενές σχέσεις μα τα φυτικά κύτταρα (Galan, 1999).

Όλα τα γνωστά τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα φυτοπαθογόνων και ζωοπαθογόνων βακτηριών, διαθέτουν έναν αριθμό βασικών δομικών συστατικών που Είναι υψηλά συντηρημένα (Hueck, 1998): μια δομή γενετικά ομόλογη στο βασικό σώμα του μαστιγίου (Hueck, 1998; Kubori *et al.*, 1998), έναν εξωτερικό μεμβρανικό πόρο αποτελούμενο από μια πρωτεΐνη που ανήκει στη οικογένεια των σεκρετινών (Hobbs and Mattick, 1993) και ένα γενετικά και μορφολογικά ποικίλο εξωκυτταρικό εξάρτημα (Ginocchio *et al.*, 1994; Roine *et al.*, 1997a; Ebel *et al.*, 1998; Knutton *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 1998; Blocker *et al.*, 1999; Hoiczyk and Blobel, 2001). Η τελευταία αυτή υπερμοριακή δομή, αποτελείται από πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του τύπου ΙΙΙ συστήματος και οι οποίες συγκεντρώνονται στην επιφάνεια μετά την επαφή με τον ξενιστή.

Το πρώτο τύπου ΙΙΙ εξάρτημα βρέθηκε στο βακτήριο Salmonella typhimurium (Ginocchio et al., 1994), όπου αναφέρθηκε ότι τα επιφανειακά εξαρτήματα σχηματίζονται μετά από επαφή με τα επιθηλιακά κύτταρα. Αργότερα, παρόμοιες δομές παρατηρήθηκαν σε στελέχη E.coli που παρήγαγαν τοξίνες (Ebel et al., 1998). Στα φυτοπαθογονικά βακτηρία το πρώτο εξάρτημα παρατηρήθηκε στην P. syringae (Roine et al., 1997a) ενώ παρόμοιες δομές έχουν πλέον αναφερθεί για τα βακτήρια Erwinia amylovora (Jin et al., 2001) και Ralstonia solanacearum (Van Gijsegem et al., 2000) και ονομάζονται βελονοειδή σύμπλοκα (needle complexes). Τέτοια σύμπλοκα έχουν απομονωθεί από βακτηρία που εκφράζουν το τύπου ΙΙΙ σύστημα (Salmonella, Shigella, Yersinia, E.coli) (Kubori et al., 1998; Blocker et al., 1999; Hoiczyk and Blobel, 2001; Sekiya et al., 2001) και αποτελούν απομονωμένους τύπου ΙΙΙ εκκριτικούς μηχανισμούς που μορφολογικά μοιάζουν με το βασικό σώμα του μαστιγίου με μια βελονοειδή προέκταση συνημμένη στο μακρινό άκρο. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει περαιτέρω την εξελικτική σχέση μεταξύ των δυο συστημάτων.

Γενικά, οι πρωτεΐνες και οι επιφανειακές δομές, διαφέρουν αρκετά ανάμεσα στα παθογόνα βακτηρία. Έτσι, το βακτήριο Salmonella typhimurium και το εντεροπαθογονικό E.coli, παράγουν ινώδη εξαρτήματα διαμέτρου 50nm που γεφυρώνουν τα βακτηρία με τον ξενιστή και φαίνεται να χαλαρώνουν όταν επάγονται οι κυτταρικές αποκρίσεις (Ginocchio et al., 1994; Knutton et al., 1998). Αντίθετα, το βακτήριο Pseudomonas syringae παράγει ένα λεπτότερο ινίδιο διαμέτρου 6-8nm που μπορεί να διεισδύει μέσα στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα πάχους 200nm (Roine et al., 1997a). Το ινίδιο Αυτό έχει τη δυνατότητα να επεκταθεί σε μήκος αρκετών μικρομέτρων (Brown et al., 2001) ενώ εκείνο της Yersinia Είναι μόλις 60-80nm (Hoiczyk and Blobel, 2001). Στην *P.syringae* το μακρύ Hrp ινίδιο πιθανά να επιτρέπει τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεγάλη απόσταση, κατευθείαν στη μεμβράνη του φυτικού κυττάρου διασχίζοντας το κυτταρικό τοίχωμα (Brown et al., 2001) ενώ στα ζωοπαθογονικά Salmonella και Shigella η μεταφορά των πρωτεϊνών στους ξενιστές γίνεται μέσω μεμβρανών που βρίσκονται σε επαφή. Ίσως κατ'επέκταση, οι ινιδιακές προεκβολές που παρατηρούνται σε αυτά τα βακτηρία να είναι πιο κοντές από το Hrp ινίδιο (Li et al., 2002).

Αν και οι δομές αυτές Είναι απαραίτητες στα βακτηρία προκειμένου να μεταφέρουν τις πρωτεΐνες-υποστρώματα στους ξενιστές, δεν είναι γνωστό αν λειτουργούν ως αγωγοί η ως παράγοντες προσκόλλησης που διευκολύνουν την επαφή βακτηρίου-ξενιστή. Πειράματα που έγιναν με το βακτήριο *P.syringae* και την πρωτεΐνη-υπόστρωμα HrpZ, έδειξαν ότι το ινίδιο λειτουργεί ως αγωγός (Li *et al.*, 2002) μέσα από τον οποίο ταξιδεύουν οι πρωτεΐνες δράσης. Το ινίδιο Αυτό καθώς και τα ινίδια των ζωοπαθογονικών βακτηριών έχουν εξωτερική διάμετρο 6-8nm (Roine *et al.*, 1997b; Kubori *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2001) ενώ η εσωτερική διάμετρος στη *Yersinia* εκτιμάται γύρω στα 2nm (Hoiczyk and Blobel, 2001). Δεδομένων των διαστάσεων αυτών, οι πρωτεΐνες που διαλέγουν να μετακινηθούν μέσω αυτού του δρόμου, αναμένεται να Είναι τουλάχιστον μερικώς αποδιαταγμένες. Πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω των τύπου ΙΙΙ συστημάτων έχει δειχθεί ότι απαιτούν την παρουσία τσαπερονών που τις κρατούν σε μερική αποδιάταξη στο βακτηριακο

κυτταρόπλασμα (Stebbins and Galan, 2001). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στην υπόθεση ότι στο βακτήριο *P.syringae* οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο εκκριτικό κανάλι αποδιαταγμένες, ταξιδεύουν μέσα στο μακρύ ενδο-ινιδιακό δρόμο μέχρι το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και παίρνουν την ενεργή διαμόρφωση τους φτάνοντας στον προορισμό τους μετά την έκκριση (Li *et al.*, 2002).

Το σενάριο αυτό ενδεχομένως να ισχύει και για την ίδια τη συστατική πρωτεΐνη του ινιδίου (pilin) η οποία μπορεί να δημιουργήσει από μόνη της ινίδια in vitro (Roine et al., 1997b) και επομένως ενδέχεται να διπλώνεται και να συνδυάζεται για να σχηματίσει τη δομή του ινιδίου στο άκρο του αναπτυσσόμενου εξαρτήματος όπως υποστηρίζεται από τους Li et al. (2002). Ο τρόπος της προέκτασης του ινιδίου εξηγεί επίσης πως το μακρύ και ευλύγιστο ινίδιο μπορεί να διεισδύει στο πορώδες στρώμα κυτταρίνης που δημιουργεί το κυτταρικό τοίχωμα. καθώς η ανάπτυξη συμβαίνει στο άκρο, η συγκρότηση του ινιδίου πρέπει να συμβαίνει μέσα στο τοίχωμα και όχι να οδηγείται η δομή εκεί μέσω προέκτασης της βάσης όπως είχε προταθεί από τους Brown et al. (2001). Το τι συμβαίνει στο ινίδιο αφού φτάσει στην φυτική κυτταρική μεμβράνη παραμένει άγνωστο. Είναι πιθανό ότι τα μονομερή της συστατικής του πρωτεΐνης καθώς εμφανίζονται, διαχέονται μέσα στη λιπιδική μεμβράνη. Εναλλακτικά, το ινίδιο μπορεί να τρυπάει τη μεμβράνη, όπως έχει προταθεί για την Yersinia (Hoiczyk and Blobel, 2001). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον Είναι να αναφερθεί ότι και στην περίπτωση του μαστιγιακού σχηματισμού, νεοσχηματισμένα μονομερή φλαγγελίνης προστίθενται στο άκρο του εξαρτήματος (Emerson et al., 1970).

Η ενέργεια για την πρωτεϊνική έκκριση πιθανά να προέρχεται από το ATP. Ή άποψη αυτή υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι ένα συντηρημένο συστατικό των εκκριτικών συστημάτων τύπου ΙΙΙ, εμφανίζει αλληλουχική ομοιότητα με τις α και β υπομονάδες της βακτηριακής F1F0 ATPάσης και ότι σε τουλάχιστον 2 συστήματα, η πρωτεΐνη αυτή έγει δειγθεί να υδρολύει ATP in vitro (Hard et al., 1992). Γενικά, οι ΑΤΡάσες των συστημάτων έκκρισης είναι περιφερικά συνδεδεμένες με τη μεμβράνη και έχουν υψηλή ενεργότητα σε ολιγομερική μορφή. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη FliI του βακτηρίου Salmonella, σχηματίζει δακτυλίους που εμφανίζουν ισχυρή εξαμερική συμμετρία γύρω από μια κεντρική οπή που μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα κεντρικό κανάλι (Claret et al., 2003). Μια τέτοια δομή θα ήταν συγκρίσιμη με εκείνη των αντίστοιχων ενζύμων στο τύπου IV μονοπάτι έκκρισης του H.pylori και της E.coli (Krause et al., 2000a,b). Οι κρυσταλλικές δομές των εξαμερικών τύπου IV ΑΤΡασών (Yeo et al., 2000; Gomis-Ruth et al., 2001) δείχνουν ότι οι N- και C-τελικές περιοχές σχηματίζουν 2 δακτυλίους, που μαζί δημιουργούν μια δίοδο ανοιχτή στη μια μεριά και κλειστή στην άλλη. Έχει προταθεί ότι αυτές οι ΑΤΡάσες δρουν ως πύλες της εσωτερικής μεμβράνης, με κύκλους ΑΤΡ υδρόλυσης να ρυθμίζουν το άνοιγμα του ενός ή του άλλου άκρου με βάση αλλαγές στη στερεοδιάταξη του ενζύμου. Παρόμοια εξαμερική μορφή έχει και η DnaB ελικάση -η κύρια DNA ελικάση αντιγραφής της E.coli- η οποία έχει ανάμεσα σε άλλες και ενεργότητα υδρόλυσης ATP (Biswas and Biswas, 1999).

Οι Claret *et al.* έδειξαν επίσης ότι η ενεργότητα της FliI παρουσιάζει θετική συνεργατικότητα υποδηλώνοντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων και σύνδεση του ολιγομερισμού με την ενζυμική ενεργοποίηση. Αυτή η σύνδεση έχει δειχθεί και για άλλα ένζυμα όπως η πολυμερική περμεάση ιστιδίνης και οι ATPάσες μεταφοράς μαλτόζης (Davidson *et al.*, 1996; Liu and Ames, 1998).

<u>Αναγνώριση του υποστρώματος και μεταφορά στο κύτταρο ζενιστή</u>

Οι πρωτεΐνες υποστρώματα του μονοπατιού τύπου ΙΙΙ φέρουν πολλαπλά σινιάλα που τις οδηγούν στο μονοπάτι έκκρισης και τελικά στους υποκυτταρικούς στόχους μέσα στον ξενιστή. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τις τύπου ΙΙΙ εκκρινόμενες πρωτεΐνες YopE και YopN του εντεροπαθογονικού βακτηρίου Yersinia, έδειξαν ότι τα 15 πρώτα αμινοξέα των πρωτεϊνών αυτών ήταν αρκετά για να οδηγήσουν στην έκκριση ετερόλογων πρωτεϊνών (Cornelis et al.,1998; Sory et al., 1995). Πιο αναλυτική έρευνα οδήγησε στη σκέψη ότι το σινιάλο έκκρισης πρέπει να βρίσκεται στη δομή του mRNA επειδή μεταλλαγές που μεταβάλλουν το αναγνωστικό πλαίσιο του πιθανού σινιάλου δημιουργώντας εντελώς διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλληλουχιες, ήταν ακομα ικανες να οδηγήσουν σε τύπου ΙΙΙ έκκριση (Anderson and Schneewind, 1997; Cheng et al., 1997; Anderson and Schneewind, 1999).

Οι 5' mRNA περιοχές μερικών yop μηνυμάτων προβλέπεται να έχουν δομές stem-λούπας που κρύβουν τα AUG σινιάλα μεταφραστικής έναρξης γεγονός που προτείνει ότι η μετάφραση των πρωτεϊνών αυτών ίσως αναστέλλεται μέχρι η 5' mRNA περιοχή να αλληλεπιδράσει με ένα συστατικό του μηχανισμού έκκρισης. Αυτή η σύνδεση μεταξύ μετάφρασης και έκκρισης έχει παρατηρηθεί για την πρωτεΐνη YopQ (Anderson and Schneewind, 1997; Cheng *et al.*, 1997; Anderson and Schneewind, 1999) αλλά και τα εκκριτικά σινιάλα δυο πρωτεϊνών του φυτοποθαγονικού βακτηρίου *P. syringae* AvrB και AvrPto φαίνεται να εντοπίζονται επίσης στην 5' περιοχή του mRNA τους. Ενδεχομένως, αυτός ο τύπος αναγνώρισης να είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των εκκριτικών συστημάτων τύπου III (Anderson *et al.*, in preparation).

Παρ'ολ'αυτά, μερικές πρωτεΐνες μπορούν να εκκριθούν μετά-μεταφραστικά μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού (Anderson and Schneewind, 1997; Cheng et al., 1997; Anderson and Schneewind, 1999) που περιλαμβάνει τη λειτουργία ειδικών βοηθητικών πρωτεϊνών, των τσαπερονών, οι οποίες δεσμεύουν τα προς έκκριση υποστρώματα σε διακριτές περιοχές που εντοπίζονται στα εκατό πρώτα αμινοξέα (Cornelis et al., 1998; Sory et al., 1995; Wattiau et al., 1994; Wattiau and Cornelis, 1993). Οι τσαπερόνες εμφανίζουν μεγάλη ειδικότητα δέσμευσης και φαίνεται να μη διαθέτουν ενεργότητα νουκλεοτιδικής δέσμευσης η υδρόλυσης. Αν και εμφανίζουν μικρή ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ τους, έχουν μια σειρά κοινών ιδιοτήτων όπως Είναι το σχετικά μικρό μέγεθος (15-18 kDa), χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο και κατά κύριο λόγο δευτεροταγή δομή α-έλικας. Οι τσαπερόνες έχουν αρκετές προτεινόμενες λειτουργίες (Wattiau et al., 1996; Frithz-Lindsten et al., 1995; M rd et al., 1994). Η δέσμευση τους ίσως αποσταθεροποιεί και προλαμβάνει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε στερεοδιατάξεις που δεν μπορούν να εκκριθούν. Εναλλακτικά, όπως έχει δειχθεί για τη Shigella, μπορεί να εμποδίζουν τις πρωτεΐνες δράσης να ενώνονται μεταξύ τους πριν την έκκριση (M rd et al., 1994) η τέλος, ενδέχεται να μεταφέρουν μόρια στη μηχανή έκκρισης. Οι πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές δέσμευσης τσαπερονών δεν εκκρίνονται σε καλλιέργειες και δεν μεταφέρονται στον ξενιστή απουσία της αντίστοιχης τσαπερόνης. Απομάκρυνση της περιοχής αυτής, παρακάμπτει την ανάγκη παρουσίας της τσαπερόνης αλλά εμποδίζει επίσης και την μεταφορά της πρωτεΐνης στον ξενιστή (Galan et al., 1999).

Οι πρωτεΐνες δράσης που εκκρίνονται από το τύπου ΙΙΙ σύστημα έχουν διάφορους στόχους. Έτσι, τα ζωοπαθογονικά βακτηρία χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα για να τροποποιήσουν τον κυτταροσκελετό ακτίνης στο κύτταρο ξενιστή, προκειμένου να παρεμποδίσουν τη φαγοκυττάρωση (Cornelis *et al.*, 1998; Sory *et al.*, 1995) και να αποκτήσουν πρόσβαση σε μη φαγοκυτταρικούς ξενιστές η να προσκολληθούν σε επιθηλιακές κυτταρικές επιφάνειες. Επίσης, μπορούν να επάγουν απόπτωση στα προσβεβλημένα μακροφάγα. Στην περίπτωση των φυτοπαθογονικών βακτηριών, οι πρωτεΐνες δράσεις έχουν διαφορετικό ρόλο ανάλογα με το αν το φυτό είναι δεκτικό η μη στη βακτηριακή προσβολή. Στα μη δεκτικά φυτά προκαλούν μια αμυντική απόκριση γνωστή ως απόκριση υπερευαισθησίας (HR) που χαρακτηρίζεται από μια γρήγορη επαγωγή προγραμματισμένου θανάτου των φυτικών κύτταρων που είναι σε επαφή με το παθογόνο. Αντίθετα, στα δεκτικά φυτά, τα παθογόνα συνεχίζουν να μεγαλώνουν και να εξαπλώνονται στα διακυτταρικά διαστήματα του μολυσμένου οργάνου για αρκετές ημέρες πριν εμφανιστούν συμπτώματα ασθένειας, δημιουργώντας περιοχές νέκρωσης.

<u>Ρύθμιση της έκκρισης τύπου ΙΙΙ</u>

Τα βακτηρία χρησιμοποιούν ειδικές και πολλαπλές στρατηγικές για να ρυθμίσουν την έκφραση των τύπου ΙΙΙ εκκριτικών μηχανισμών. Η ρύθμιση γίνεται τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο. Σε μεταγραφικό επίπεδο η ρύθμιση πραγματοποιείται μέσω ενός η περισσότερων ειδικών μεταγρφικών παραγόντων αλλά και μέσω γενικών ρυθμιστικών δικτύων που ελέγχουν την έκφραση των συστατικών του τύπου ΙΙΙ συστήματος ως απόκριση σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, η ώσμωση, η διαθεσιμότητα θρεπτικών, τα δι-ιοντικά κατιόντα (κυρίως Ca⁺⁺), το PH και η φάση ανάπτυξης. Επιπρόσθετα σε μερικά βακτηρία η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται μέσω της αίσθησης της ίδιας της εκκριτικής διαδικασίας. Η στρατηγική αυτή στηρίζεται στην έκκριση ενός αρνητικού ρυθμιστή, συνδυάζοντας έτσι τη μεταγραφή και την έκκριση (Hughes *et al.*, 1993; Petterson *et al.*, 1996).

Σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο, η ρύθμιση είναι λιγότερο κατανοητή. φαίνεται ότι, τουλάχιστον σε μερικά συστήματα, το σινιάλο που επάγει Αυτό το ρυθμιστικό μονοπάτι περιλαμβάνει την επαφή με παράγοντες του ξενιστή. Παρ'ολ'αυτά, η συσχέτιση έκκρισης και μεταγραφής που αναφέρθηκε παραπάνω υποδεικνύει ότι η μετά-μεταφραστική επαγωγή της έκκρισης τελικά θα οδηγήσει στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονίδιων έκκρισης τύπου ΙΙΙ.

Φυτοπαθογονικά βακτήρια

Το φυτοπαθογονικό βακτήριο *Pseudomonas syringae* εμφανίζει πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τους ξενιστές και ειδικές ως προς αυτούς (Hirano and Upper, 1990). Κάθε κυτταρική σειρά μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε μια από τις 40 ομάδες παθογόνων στελεχών με βάση τη γκάμα ξενιστών που προσβάλλει και μπορεί περαιτέρω να κατηγοριοποιηθεί σε μια μικρότερη ομάδα με βάση τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τις διαφορετικές ποικιλίες του ξενιστή.

Τα φυτοπαθογονικά βακτηρία μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές αποκρίσεις ανάλογα με το φυτό που προσβάλλουν, νεκρωτικές περιοχές στα δεκτικά φυτά και γρήγορο προγραμματισμένο θάνατο ως άμυνα στα μη δεκτικά η στα φυλοειδικά φυτά (Alfano and Collmer, 1997). Η ικανότητα επαγωγής των αντιδράσεων αυτών φαίνεται να εξαρτάται από τα hrp και τα hrc γονίδια που κωδικοποιούν ένα τύπου ΙΙΙ μονοπάτι πρωτεϊνικής έκκρισης και από τα avr και hop γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες δράσης που μεταφέρονται στα φυτικά κύτταρα μέσω του μονοπατιού αυτού (Alfano and Collmer, 1997). μεταλλαγές στα γονίδια hrp/hrc οδηγούν στην πλειοτροπική απώλεια της ικανότητας των βακτηριών να επάγουν «αντίδραση υπερευαισθησίας» στα ανθεκτικά φυτά και παθογονικότητα ως προς αυτά (Alfano and Collmer, 1997).

Δυο ομάδες πρωτεϊνών εκκρίνονται από το τύπου ΙΙΙ σύστημα στα φυτοπαθογονικα βακτηρία: α) οι πρωτεΐνες-φουρκέτες (hairpin proteins) όπως η HrpZ, οι οποίες εκκρίνονται σε κανονικά επίπεδα in vitro και στοχεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες (Lee et al., 2001a,b) και β) οι δηλητηριώδεις η μη πρωτεΐνες (virulence-avirulence proteins) όπως οι AvrPto και VirPphA που στην καλύτερη περίπτωση εκκρίνονται σε χαμηλά επίπεδα στην καλλιέργεια αλλά πιστεύεται ότι μεταφέρονται άμεσα στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου (Jackson et al., 1999; Jin et al., 2001). έκφραση των γονίδιων avr στα ανθεκτικά φυτά, ενεργοποιεί την αντίδραση υπερευαισθησίας μέσω αλληλεπίδρασης με τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονίδιων ανθεκτικότητας R (Stevens et al., 1998). Ο ακριβής ρόλος των πρωτεϊνών δράσης στη φυτοπαθογονικότητα Είναι άγνωστος. όταν τα R γονίδια απουσιάζουν, οι Avr και Vir πρωτεΐνες πιθανά να καταστέλλουν την άμυνα του ξενιστή μέσω αλληλεπίδρασης με ενδοκυτταρικούς στόχους όπως συμβαίνει και με τις ζωοπαθογονικές πρωτεΐνες δράσης (Leach and White, 1996; Tsiamis et al., 2000). Η HrpZ πρωτεΐνη του βακτηρίου P. syringae έχει δειχθεί ότι δεσμεύεται σε λιπιδικά στρώματα σγηματίζοντας in vitro έναν ιοντο-αγώγιμο πόρο (Lee et al., 2001a).

Το πιο πιθανό Είναι ότι τα hrp/hrc γονίδια υπάρχουν σε όλα τα gram αρνητικά φυτοπαθογονικα βακτηρία που προκαλούν νέκρωση και έχουν αλληλουχηθεί για τα βακτηρία *P. syringae* pv. syringae (*Psy*) 61, Erwinia amylovora Ea321, Xanthomonas campestris pv. vesicatoria (Xcv) 85-10, και Ralstonia solanacearum GMI1000 (Alfano and Collmer, 1997). Με βάση τη διαφορετική γονιδιακή διάταξη και τους διαφορετικούς ρυθμιστές, οι ομάδες των hrp/hrc γονίδιων των τεσσάρων αυτών βακτηριών, μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγόριες: I (*Pseudomonas* and Erwinia) και II (Xanthomonas and Ralstonia). Η διαφοροποίηση σχετικά με την διάταξη σε αυτές τις δυο κατηγόριες και η βακτηριακή φυλογένεση αποτελούν ενδείξεις για το γεγονός ότι οι γονιδιακές αυτές ομάδες έχουν αποκτηθεί μέσω οριζόντιας μεταφοράς και επομένως ενδέχεται να αποτελούν νησίδες παθογονικότητας (Alfano and Collmer, 1997).

Οι Hacker et al. (1997), όρισαν ως νησίδες παθογονικοτητας ομάδες γονίδιων που (i) περιέχουν πολλά ιογενή γονίδια, (ii) είναι επιλεκτικά παρούσες σε παθογονικές κυτταρικές σειρές, (iii) έχουν διαφορετικό G + C περιεχόμενο σε σύγκριση με το υπόλοιπο βακτηριακό DNA, (iv) καταλαμβάνουν μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές, (v) συχνά περιβάλλονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, γεγονός που προτείνει πως έχει συμβεί κάποιου είδους ανασυνδυασμός ο οποίος τις μετέφερε στο χρωμόσωμα (vi) οριοθετούνται από tRNA γονίδια και/η κρυφά κινητά γενετικά στοιχεία και (vii) είναι ασταθείς. Μερικές νησίδες έχουν εντεθεί σε διαφορετικές γενωμικές περιοχές στο ίδιο είδος (Wieler et al., 1997). Άλλες εμφανίζουν μια μωσαϊκή δομή, ενδεικτική της οριζόντιας απόκτησης (Hensel et al., 1999). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα τύπου ΙΙΙ εκκριτικά συστήματα είναι ομαδοποιημένα σε νησίδες στη ζωοπαθογονική Salmonella spp και στη Pseudomonas aeruginosa και σε μεγάλα πλασμίδια στη Yersinia και Shigella spp. Τα γονίδια των πρωτεϊνών δράσης που εκκρίνονται από αυτό το μονοπάτι βρίσκονται γενικά συνδεδεμένα με τα γονίδια του μονοπατιού (Hueck, 1998).

Το 2000 οι Alfano et al., βρήκαν ότι τα hrp/hrc γονίδια της P. syringae είναι μέρος μιας Hrp νησίδας παθογονικοτητας που έχει τρεις διαφορετικούς τόπους: την ΕΕL περιοχή (περιοχή ποικίλων πρωτεϊνών δράσης), την ομάδα των hrp/hrc γονίδιων και την περιοχή CEL (περιοχή συντηρημένων πρωτεϊνών δράσης). Η ΕΕL περιοχή περιλαμβάνει γονίδια ανταλλάξιμων πρωτεϊνών δράσης και συνεισφέρει μόνο

ποσοτικά στην προσαρμογή του παρασίτου στα φυτά ξενιστές ενώ η περιοχή των hrp/hrc γονίδιων κωδικοποιεί το Hrp εκκριτικό σύστημα και απαιτείται για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, τον παρασιτισμό και την παθογονικότητα. Η CEL περιοχή δεν έχει κάποια ευδιάκριτη συνεισφορά στις εκκριτικές λειτουργίες αλλά συνεισφέρει πολύ στην παρασιτική προσαρμογή (Alfano *et al.*, 2000). αυτή η τρισκελής νησίδα διαθέτει τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν από τους (Hacker *et al.*, 1997).

<u>Κέρδος από τις πληροφορίες σγετικά με την τύπου ΙΙΙ έκκριση και τις νησίδες</u> <u>παθογονικοτητας</u>

Τα παθογονικά βακτηρία συνεχίζουν να εμφανίζουν εντυπωσιακή γενετική ευλυγισία και ανταλαξιμότητα και χρησιμοποιούν αυτές τις ικανότητες για να προσαρμοστούν σε μια ποικιλία ειδών ζωής μέσα στους ξενιστές. Η γνώση από μελέτες των νησίδων παθογονικοτητας και της τύπου ΙΙΙ έκκρισης πρέπει να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στο χαρακτηρισμό βακτηριακών μολύνσεων. Όταν ένα νέο παθογόνο απομονώνεται, ίσως αξίζει να προσδιοριστούν χρωμοσωμικές περιοχές ειδικές σε αυτό συγκρίνοντας όλη τη γενωμική δομή του με αυτήν ενός συγγενούς οργανισμού, που μπορεί να προσφέρει ένα πιο σύντομο δρομο στον προσδιορισμό των δηλητηριωδών γονίδιων. επίσης, απλές μοριακές τεχνικές μπορούν να φανερώσουν αν τα βακτηρία διαθέτουν συστήματα τύπου ΙΙΙ επειδή γονίδια που κωδικοποιούν συγκεκριμένους παράγοντες Είναι υψηλά συντηρημένα.

Η γνώση για τα τύπου ΙΙΙ συστήματα έκκρισης ίσως αποφέρει θεραπευτικό Κέρδος. Τα συστήματα που εξαρτώνται από την επαφή με τον ξενιστή φαίνεται να βρίσκονται στα παθογονικα και όχι στα συμβιωτικά βακτηρία. Αν αυτή η παρατήρηση αντικατοπτρίζει μια γενική αλήθεια, αντιβιοτικά που στοχεύουν τα συστήματα ίσως μπορέσουν να στοχεύσουν ειδικά τα βακτηρία-εισβολείς χωρίς να επηρεάσουν τη φυσιολογική χλωρίδα, παρουσιάζοντας ελάχιστες παρενέργειες. Επιπρόσθετα, τα τύπου ΙΙΙ συστήματα έκκρισης θα προσφέρουν νέους στόχους θεραπευτικών φαρμάκων που ενδεχομένως να είναι ικανά να εμποδίζουν την εκκριτική διαδικασία χωρίς να σκοτώνουν το βακτήριο. επίσης τα συστήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εξασθενημένα βακτηρία για μελέτες ανόσιας. Χιμαιρικές πρωτεΐνες-η πρωτεΐνη δράσης ενωμένη με την υπό μελέτη πρωτεΐνημπορούν να εκκριθούν σε μεγάλες ποσότητες από τον τύπου ΙΙΙ μηχανισμό και να εισέλθουν στους ξενιστές. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να επάγουν αντισωμική αντίδραση στα ποντίκια (Sory and Cornelis, 1994; Sory *et al.*, 1995).





Η πρωτεΐνη HrcN κωδικοποιείται από το οπερόνιο που κωδικοποιεί το TTSS. Είναι μια υψηλού επιπέδου ΑΤΡάση που ενεργοποιείται με τον ολιγομερισμό της και οποία συνδέεται περιφερικά με τη μεμβράνη (Pozidis *et al.*, 2002). Ο στόχος της μελέτης αυτής είναι να συσχετιστούν περιοχές της πρωτεΐνης με την ενζυμική ενεργότητα και την ικανότητα ολιγομερισμού.

Πληροφορίες που είναι γνωστές από προηγούμενες μελέτες (Pozidis et al., 2002) έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η HrcN, όπως και οι υπομονάδες της FI ΑΤΡάσης, αποτελείται από 3 περιοχές επειδή παρουσιάζει 3 διαφορετικά σημεία μετάβασης μέχρι την τελική τήξη. Υδροδυναμικές και δομικές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις χημικής διασύνδεσης (cross-linking), φανέρωσαν ότι τόσο η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη όσο και η φυσική HrcN, σχηματίζουν 4 διαφορετικές μορφές: α) μια μονομερική μορφή μεγέθους ~48 kDa, β) μια ασταθή μορφή μεγέθους ~300 kDa, μια δωδεκαμερική μορφή μεγέθους ~575 kDa η οποία σχηματίζει μια κυκλική δομή εξωτερικής διαμέτρου ~13 nm, και δ) μεγαλύτερες μορφές που αντιστοιχούν σε συσσωματώματα.

Συγκέντρωση της μονομερούς μορφής οδηγεί σε μη αντιστρεπτό de novo σχηματισμό της δωδεκαμερούς μορφής. Για την μετατροπή αυτή δεν απαιτείται η παρουσία κάποιου παράγοντα, επομένως πρόκειται για μια ενδογενή ιδιότητα της πρωτεΐνης. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρατήρηση ότι αυτή η μορφή εμφανίζει υψηλή ενεργότητα ΑΤΡάσης και άρα πιθανά να είναι η φυσιολογική μορφή που εντοπίζεται στο κύτταρο. Μετά από πειράματα βιοχημικής κλασματοποίησης και ανοσοεντοπισμού με σφαιρίδια χρυσού, παρατηρήθηκε ότι ~90% της πρωτεΐνης συνδέεται με τη μεμβράνη. Επιπρόσθετα, πειράματα ανοσοηλεκτρονικής μικροσκοπίας έδειξαν ένα σημαντικό βαθμό συσσωμάτωσης σε διακριτά σημεία της μεμβράνης. Τέτοια σημεία θα μπορούσαν να αντιπροσωπεύουν συνδέσεις της δωδεκαμερικής HrcN με τη μεμβρανική TTS μεταφοράση.

Στην εργασία αυτή αρχικά θα μελετηθεί ο πιθανός συσχετισμός των δύο άκρων της HrcN με τις ιδιότητες του ολιγομερισμού και της ενζυμικής ενεργότητας. Αυτό θα επιτευχθεί κατασκευάζοντες ελλείπτικές μορφές της πρωτείνης ή υβριδικές πρωτεΐνες με την προσθήκη της GFP στο ένα ή στο άλλο άκρο. Στη συνέχεια θα μελετηθεί αν οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να υποστηρίξουν την έκκριση των υποστρωμάτων του τύπου ΙΙΙ συστήματος και τέλος θα παρατηρηθεί η υποκυττάρια τοπολογία τους στο συνεστιακό μικροσκόπιο.



DANGER !!!

<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>

Κλωνοποιήσεις

Στο φορέα pet16b (εικόνα 2), κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη HrcN, τέσσερις μεταλλαγμένες -λόγω έλλειψης- μορφές της και 2 αγρίου τύπου που είναι ενωμένες με την πρωτεΐνη GFP στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο χωριστά (εικόνα). Ο φορέας φέρει 10 κατάλοιπα ιστιδίνης αριστερά της περιοχής κλωνοποίησης και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

Οι ελλειπτικές μορφές κατασκευάστηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας εκκινητές συμπληρωματικούς στα άκρα της πρωτεΐνης και στα κατάλληλα εσωτερικά σημεία Οι εκκινητές έφεραν επίσης περιοριστικές θέσεις των ενζύμων NdeI στο αμινοτελικό άκρο και Bam1 στο καρβοξυτελικό, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για το άνοιγμα του φορέα. Ενθέματα και φορέας συγκολλήθηκαν στη συνέχεια και οι κατασκευές εισήχθησαν στις κατάλληλες κυτταρικές σειρές.

Οι HrcN πρωτεΐνες που είναι ενωμένες με την GFP κατασκευάστηκαν ως εξής. Στην περίπτωση της αμινοτελικής GFP, με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης κατασκευάστηκε μια GFP πρωτεΐνη που έφερε ένα τμήμα DNA στο αμινοτελικό άκρο. Το τμήμα αυτό λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ των δύο πρωτεινών κρατώντας τες σε μια σχτεική απόσταση, προκειμένου να τους επιτρέπει νααναδιπλωθούν σωστά Οι εκκινητές έφεραν περιοριστικές θέσεις για το ένζυμο NdeI προκειμένου να συγκολληθούν με τον φορέα που είχε επωαστεί με το ίδιο ένζυμο. Ο φορέας είναι ο ίδιος με παραπάνω (pet16b His₁₀) στον οποίο έχει ήδη κλωνοποιηθεί η πρωτεΐνη HrcN. Στην περίπτωση της καρβοξυτελικής GFP η κλωνοποίηση έγινε από τον Σιανίδη Γιώργο.



Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά μέσα

Οι πλασμιδιακές κατασκευές αρχικά εισήχθησαν με μετασχηματισμό σε κύτταρα *E.coli* DH5α προκειμένου να ελεγχθεί η ορθότητα των κατασκευών. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* BL21 plys για την έκφραση των HrcN πρωτεϊνών. Τέλος, οι κατασκευές εισήχθησαν σε κύτταρα *E.coli* JM109 που φέρουν ένα κοσμίδιο στο οποίο είναι κλωνοποιημένο είτε όλο το οπερόνιο (pHir) είτε το οπερόνιο που στη θέση του γονιδίου της HrcN έχει μια κασέτα καναμυκίνης (pHir HrcN::Kan). Όλα τα βακτηριακά στελέχη μεγάλωσαν σε LB θρεπτικό μέσο.

Έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα E.coli BL21

Το σύστημα έκφρασης φαίνεται στην εικόνα 3. Τα κλωνοποιημένα γονίδια βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός T7 εκκινητή. Το γονίδιο της T7 πολυμεράσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός lac οπερονίου. Το οπερόνιο έχει πάνω του δεσμευμένους τους lac καταστολείς και είναι γενικά ανενεργό, διατηρώντας μια βασική ενεργότητα που επιτρέπει μια μικρή μεταγραφική διαρροή. Τα μόρια τα T7 πολυμεράσης που εκφράζονται δεσμεύονται από τη λυσοζύμη, που κωδικοποιείται από ένα άλλο πλασμίδιο, εμποδίζοντας την T7-εξαρτώμενη μεταγραφή. Το πλασμίδιο αυτό φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη Με την προσθήκη IPTG, οι lac καταστολείς δεσμεύονται στο οπερόνιο, επιτρέποντας έτσι την μεταγραφή της T7 RNA πολυμεράσης και των στόχων της.

Για την έκφραση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε LB θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 0.2 mM IPTG σε θερμοκρασία 18^{0} C για την επαγωγή των πρωτεϊνών His₁₀ HrcN, His₁₀ Δ1-16 HrcN και His₁₀ Δ1-23 HrcN, 0.01mM IPTG για την επαγωγή της πρωτεΐνης His₁₀ Δ446-449 HrcN και 0.005mM για την επαγωγή της πρωτεΐνης His₁₀ Δ432-449 HrcN προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διαλυτότητα της. Η επαγωγή διαρκεί 3-5 ώρες. Στη συνέχεια καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 5.000 στροφές / λεπτό και πελέτα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας προκειμένου στη συνέχεια να καταστραφούν όλες οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις.

Ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας: 50mM Tris-Hel, 1M NaCl, 10mM βmercaptoethanol, 20% glycerol

Καθαρισμός πρωτεϊνών-Χρωματογραφία συγγένειας

Τα επαναδιαλυμένα κύτταρα διαρρηγνύονται και το διάλυμα υπερφυγοκεντρείται για μια ώρα στις 30.000 στροφές / λεπτό και σε θερμοκρασία 4⁰C. Το υπερκείμενο υγρό φορτώνεται σε μια κολώνα με υλικό Ni/NTA. Τα ιόντα Ni δεσμεύουν τα κατάλοιπα των ιστιδινών με αποτέλεσμα οι HrcN πρωτεΐνες να παραμένουν δεσμευμένες στη ρητίνη της κολώνας. Ακολουθούν 2 πλυσίματα, το πρώτο με το ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής αλατότητας και το δεύτερο με ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας και αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου,



που ανταγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης για δέσμευση στα ιόντα Νi, αποδεσμεύοντας έτσι την πρωτεΐνη.

Ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής αλατότητας: 50mM Tris- Hcl, 50mM NaCl, 10mM βmercaptoethanol, 30mM imidazole, 20% glycerol

Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 50mM Tris-Hcl, 50mM NaCl, 10mM β-mercaptoetanol, 350mM imidazole, 20% glycerol

Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε η προπακεταρισμένη κολώνα FPLC Superose 6HR 10/30. Το υλικό της κολώνας εξισορροπείται με 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια φορτώνεται όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος 400μl της επιθυμητής συγκέντρωσης. Για συγκέντρωση 2 mg/ml χρησιμοποιείται ευαισθησία UV ανιχνευτή 0,05 (εύρος 10) και για συγκέντρωση 2 mg/ml, ευαισθησία 0,2 (εύρος 20). Ο ρυθμός ροής είναι 0.4 ml/min.

Ρυθμιστικό διάλυμα μοριακής διήθησης: 50mM Tris-HCl, 150mM KCl

Διαπίδυση

Οι εκλουσμένες πρωτεΐνες τοποθετούνται μέσα σε μεμβράνες διαπίδυσης και προστίθενται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει EDTA το οποίο δεσμεύει τυχόν ιόντα Ni που έχουν φύγει από το υλικό της κολώνας.

Ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης: 50mM Tris-Hcl, 50mM NaCl, 10mM βmercaptoethanol, 2mM EDTA, 20% glycerol

Συγκέντρωση πρωτεϊνών

Οι καθαρισμένες πρωτεΐνες φορτώνονται σε μια κολώνα Q sepharose που δρα ως ανιοντοανταλλακτής. Λόγω του θετικού τους φορτίου δεσμεύονται στο υλικό τα κολώνας από την οποία εκλούονται με το διάλυμα διαπίδυσης και αφού έχει αυξηθεί αλατότητά του.

Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης: 50mM Tris-Hcl, 600mM NaCl, 10mM β-mercaptoethanol, 2mM EDTA, 20% glycerol

Μέτρηση ενεργότητας υδρόλυσης ΑΤΡ

Μετά την χρωματογραφία όπου το πρωτεϊνικό δείγμα έχει χωριστεί σε κλάσματα, μια ποσότητα από κάθε κλάσμα χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ενεργότητας της HrcN πρωτεΐνης ως ATP υδρολάση. Αφού η πρωτεΐνη επωαστεί με το ATP στους 28°C και για το κατάλληλο χρονικό διάστημα, ανάλογα με την ενεργότητά της, στη συνέχεια στο μείγμα της αντίδρασης προστίθεται Malachite green, ένα αντιδραστήριο που έχει ως υπόστρωμα ελεύθερο φώσφορο, ο οποίος στην προκειμένη περίπτωση προέρχεται από την υδρόλυση του ATP, βάφοντας το διάλυμα πράσινο. Πέντε λεπτά μετά την προσθήκη του M.green προστίθεται 37% κιτρικό οξύ το οποίο σταματά την ανάπτυξη του χρώματος. Αφού τα δείγματα επωαστούν για 40 λεπτά στη συνέχεια μετρώνται στα 660nm και υπολογίζονται τα επίπεδα του υδρολυμένου φωσφόρου με βάση μια πρότυπη καμπύλη που έχει φτιαχτεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις φωσφόρου.

Μείγμα αντίδρασης υδρόλυσης: 1x Buffer B, 1mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 3mM ATP

Πρωτεϊνική έκκριση

Οι κυτταρικές σειρές *E.coli* JM109 που φέρουν το κοσμίδιο με το κλωνοποιημένο οπερόνιο ελέγχθηκαν για την έκκριση της πρωτεΐνης HrpZ. Οι βακτηριακές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37⁰C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να φτάσει την τιμή 0,5 και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες των πλασμιδιακών κατασκευών άρχισαν να εκφράζονται με την προσθήκη 0,15mM IPTG στους 30⁰C για 3 ώρες.

Κατακρήμνιση με ΤCA

Στο υπερκείμενο των καλλιεργειών προστίθεται 1/4 του όγκου 100% TCA και επωάζεται για μια ώρα στον πάγο. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 40 λεπτά στις 13.000 στροφές / λεπτό. Η πελέτα που σχηματίζεται από τις κατακρημνισμένες πρωτεΐνες, ξεπλένεται με 1/2 του όγκου κρύα ακετόνη και επαναφυγοκεντρείται. Η πελέτα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φορτώματος σε gel πολυακρυλαμίδης.



<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>

Ι.HrcN ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ

<u>Α.Έκφραση πρωτεϊνών</u>

Στην εικόνα φαίνεται η έκφραση της αγρίου τύπου και των τεσσάρων μεταλλαγμένων HrcN πρωτεϊνών, πριν και μετά την προσθήκη IPTG, με χρώση coomassie brilliant blue (εικόνα 5α) και με ανοσοαποτύπωση (εικόνα 5β). Όλες οι πρωτεΐνες εμφανίζουν ικανοποιητική έκφραση με την HrcN Δ1-23 να έχει τα χαμηλότερα επίπεδα και την HrcN Δ432-449 τα υψηλότερα.

• Καθαρισμός πρωτεϊνών

Για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν επωάσεις καλλιεργειών 30lt. Στην εικόνα 6 φαίνεται η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών και η περιεκτικότητα της διαλυτής φάσης και των μεμβρανών του κυττάρου σε κάθε πρωτεΐνη με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας α-HrcN αντίσωμα. Όπως φαίνεται η His₁₀ HrcN βρίσκεται στο μεγαλύτερο ποσοστό της στη διαλυτή φάση, οι His₁₀ HrcN Δ1-16 και Δ1-23 είναι διαλυτές σε ένα μεγάλο ποσοστό, η His₁₀ HrcN Δ446-449 μοιράζεται ισόποσα μεταξύ των δύο φάσεων ενώ η HrcN Δ432-449 εμφανίζεται σχεδόν ολοκληρωτικά στη μη διαλυτή φάση.







Η διαλυτή φάση πέρασε από κολώνα Ni-NTA όπου οι HrcN πρωτεΐνες λόγω της ύπαρξης του επιτόπου των ιστιδινών παρέμειναν δεσμευμένες και στη συνεχεία εκλούστηκαν με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε συγκέντρωση ~0,2 mg/ml. Στην εικόνα 7 φαίνεται ο καθαρισμός της κάθε πρωτεΐνης με χρώση coomassie. Η πρωτεΐνη HrcN Δ432-449 δεν κατάφερε να καθαριστεί καθώς παραμένει στη μη διαλυτή φάση και κατά τον καθαρισμό απομονώνεται μια πολύ μικρή ποσότητα μαζί με άλλες πρωτεΐνες. Γι'αυτό το λόγο δε χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω πειράματα.

Συγκέντρωση πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αφού καθαρίστηκαν και απαλλάχθηκαν από την παρουσία των ιμιδαζολίων, πέρασαν από μια κολώνα ανιοντοανταλλαγής Q sepharose όπου δεσμεύονται λόγω φορτίου. Χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα υλικού και μικρό όγκο διαλύματος έκλουσης, οι πρωτεΐνες εκλούονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στην προκειμένη περίπτωση οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν σε συγκέντρωση 2mg/ml.



<u>Β.Ολιγομερισμός πρωτεϊνών</u>

• Χρωματογραφία-Υδρόλυση ΑΤΡ

Οι καθαρισμένες πρωτεΐνες μετά την έκλουση από την κολώνα Ni-NTA και σε συγκέντρωση 0,2 mg/ml, πέρασαν από μια κολώνα μοριακής διήθησης προκειμένου να ανιχνευθούν οι διαφορετικοί πληθυσμοί που σχηματίζονται. Τα χρωματογραφήματα τους φαίνονται στο γράφημα (εικόνα 8α). Οι πρωτεΐνες His₁₀ HrcN, His₁₀ Δ1-16 HrcN και His₁₀ Δ1-23 HrcN εμφανίζουν δύο βασικές κορυφές, μια στα κλάσματα 30-31 που αντιστοιχεί σε έναν δωδεκαμερή πληθυσμό και μια στο κλάσμα 41 που αντιστοιχεί στο μονομερές. Κορυφές που προηγούνται του δωδεκαμερούς αντιστοιχεί στο μονομερές. Κορυφές που προηγούνται του δωδεκαμερούς αντιστοιχεί στο μονομερές στην περίπτωση της πρωτεΐνης His₁₀ Δ1-23 HrcN δεν εμφανίζει μια κορυφή στο κλάσμα 33. Η πρωτεΐνη His₁₀ Δ446-449 HrcN δεν εμφανίζει ευδιάκριτες κορυφές αλλά έχει μια εικόνα που υποδηλώνει υψηλό βαθμό συσσωμάτωσης.

Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα μετά από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Η αυξημένη συγκέντρωση ευνοεί την πρωτεΐνη να σχηματίσει ολιγομερικές μορφές, κυρίως δωδεκαμερείς (εικόνα 9α). Οι κορυφές συνεχίζουν να εμφανίζονται στα ίδια κλάσματα εκτός από την συσσωματωμένη μορφή στα κλάσματα 17-18 η οποία δεν κατακρατείται στο υλικό της κολώνας.

<u>Γ.Ενεργότητα υδρόλυσης ΑΤΡ</u>

Για κάθε πρωτεΐνη μετρήθηκε η ενεργότητα (ταχύτητα) υδρόλυσης ATP κάθε κλάσματος που προέκυψε από τη χρωματογραφία τόσο πριν όσο και μετά τη συγκέντρωσή τους. Η μεγαλύτερη ενεργότητα παρουσιάζεται στα κλάσματα 30-31, δηλαδή στα κλάσματα που αντιστοιχούν στη δωδεκαμερή μορφή. Η σχετική ταχύτητα των δωδεκαμερών μορφών των πρωτεϊνών φαίνονται στις εικόνες 8β (πριν τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης) και 9β (μετά τη συγκέντρωση). Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ATP 3mM.

• Κινητική Michaelis-Menten

Στη συνέχεια μετρήθηκε η ταχύτητα κατάλυσης κάθε ενζύμου, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ATP έτσι ώστε να υπολογιστούν τα χαρακτηριστικά της κινητικής Michaelis-Menten (εικόνα 10):

- η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) είναι η ταχύτητα κατάλυσης του ενζύμου όταν τα ενεργά κέντρα όλων των μορίων είναι κορεσμένα με υπόστρωμα
- η σταθερά Michaelis (K_m) είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος όπου τα μισά από τα ενεργά κέντρα έχουν καταληφθεί από αυτό και η ταχύτητα της αντίδρασης είναι ίση με το μισό της μέγιστης τιμής της.









Εικόνα 10: Κινητική Michaelis-Menten της ενζυμικής ενεργότητας των πρωτεϊνών His₁₀ HrcN, His₁₀ HrcN Δ 1-16, His₁₀ HrcN Δ 1-23 και His₁₀ HrcN Δ 446-449. V_{max}, μέγιστη ταχύτητα, K_m , σταθερά Michaelis

Δ.Τοπολογία των πρωτεϊνικών άκρων



Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το αμινοτελικό και καρβοζυτελικό άκρο των πρωτεϊνών συμμετέχουν στον ολιγομερισμό της πρωτείνης, μελετήθηκε η τοπολογία τους. Με τη χρήση αντισωμάτων ενάντια στα δύο άκρα πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση για να διαπιστωθεί αν είναι εκτεθειμένα στο εξωτερικό περιβάλλον ή αν βρίσκονται εσωτερικά στη δομή του δωδεκαμερούς. Τα αντισώματα αντιστοιχούν στις περιοχές 6-19 για το αμινοτελικό άκρο και 433-449 για το καρβοξυτελικό. Ως εκ τούτου το πρώτο δεν αναγνωρίζει τις πρωτεΐνες His₁₀ Δ1-16 HrcN και His₁₀ Δ1-23 HrcN και το δεύτερο δεν αναγνωρίζει την πρωτεΐνη His₁₀ Δ432-449 HrcN σε αποδιαταγμένη μορφή (εικόνα 11).

Για να διαπιστωθεί η τοπολογία των άκρων της His₁₀ HrcN στην αναδιπλωμένη μορφή, χρησιμοποιήθηκαν τα κλάσματα 30 και 41 από τη χρωματογραφία, που περιέχουν τη δωδεκαμερή και μονομερή μορφή αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες αποτυπώθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χωρίς να αποδιαταχθούν και στη συνέχεια επωάστηκαν με αντισώματα ενάντια στην ολόκληρη πρωτεΐνη HrcN και ενάντια στο αμινοτελικό και καρβοζυτελικό άκρο. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 12 και τα δύο άκρα της πρωτεΐνης φαίνεται να είναι εκτεθειμένα στο εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 12: Ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών HrcN, δωδεκαμερές (type III) και μονομερές (type I) μορφή, SecA και BSA με τα αντισώματα α-HrcN, α-N-HrcN, α-C-HrcN και α-SecA.

ΙΙ.GFP ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

<u>Α. Έκφραση πρωτεϊνών</u>

Οι ίδιες διαδικασίες που πραγαματοποιήθηκαν για τις μεταλλαγμένες HrcN, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια και για τις GFP κατασκευές. Στην εικόνα φαίνεται η έκφραση των δύο πρωτεϊνών πριν και μετά την προσθήκη IPTG με χρώση coomassie brilliant blue (εικόνα 13α) και με ανοσοαποτύπωση (εικόνα 13β). Στην εικόνα 14 φαίνεται η διαλυτότητα τους και στην εικόνα 15 ο καθαρισμός της κάθε πρωτεΐνης χωριστά. Όπως φαίνεται και στα δύο πειράματα της ανοσοαποτύπωσης η πρωτεΐνη αυτή δεν είναι πολύ σταθερή και κόβεται σε κάποιο σημείο, σχηματίζοντας έναν ακόμα πληθυσμό.

<u>Β. Ολιγομερισμός πρωτεϊνών</u>

Ο καθαρισμός και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών έγιναν με τον ίδιο τρόπο όπως και στην περίπτωση των μεταλλαγμένων HrcN πρωτεϊνών. Οι πληθυσμοί που σχηματίζουν οι πρωτεΐνες τόσο πριν όσο και μετά τη συγκέντρωση φαίνονται στις







Εικόνα 15: Καθαρισμός των πρωτεινών His₁₀ GFP lnk HrcN και His₁₀ HrcN lnk GFP. – πριν την επαγωγή της έκφρασης, +, μετά την επαγωγή, s, διαλυτή φάση, in, μη διαλυτή φάση, f.t., υπερκείμενο μετά από την κολώνα Ni-NTA, W_1 , πρώτο πλύσιμο, W_2 , δεύτερο πλύσιμο, E, έκλουση καθαρής πρωτείνης. Χρώση με coomassie brilliant blue

εικόνες 16 και 17α αντίστοιχα. Στην περίπτωση αυτών των πρωτεϊνών, λόγω διαφορετικού μεγέθους, οι κορυφές του δωδεκαμερούς και του μονομερούς εμφανίζονται στα κλάσματα 28 και 37 αντίστοιχα.

<u>Γ. Ενεργότητα υδρόλυσης ΑΤΡ</u>

Μετά τη μέτρηση της ενεργότητας των κλασμάτων που προέκυψαν από τα χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η μεγαλύτερη ενεργότητα/ταχύτητα παρατηρήθηκε στα κλάσματα 27-28, μόνο στη συγκεντρωμένη πρωτεΐνη, που συμπίπτουν με την κορυφή του δωδεκαμερούς πληθυσμού. Πριν τη συγκέντρωση οι πρωτεΐνες δεν μπορούν να σχηματίσουν δωδεκαμερή μορφή, πιθανά λόγω παρεμπόδισης από τον όγκο της GFP. Η ενεργότητα/ταχύτητα υδρόλυσης ATP των δωδεκαμερών μορφών των δύο πρωτεϊνών φαίνονται στο γράφημα 17β. Όπως φαίνεται, η ύπαρξη της GFP πρωτεΐνης στο καρβοζυτελικό άκρο μειώνει δραστικά την ενεργότητα της πρωτεΐνης χωρίς να επηρεάζει τον ολιγομερισμό της, ενώ η τοποθέτησή της στο αμινοτελικό άκρο δεν έχει τόσο μεγάλη επίδραση στην ενεργότητα αλλά επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον ολιγομερισμό. Στην εικόνα 18 φαίνονται επίσης τα χαρακτηριστικά της κινητικής Michaelis-Menten.



Εικόνα 16: Χρωματογραφήματα των HrcN πρωτεϊνών μετά την έκλουση από την κολώνα Ni-NTA.



Εικόνα 17: Α) Χρωματογραφήματα των HrcN πρωτεϊνών μετά την έκλουση από την ρητίνη ιοντοανταλλαγής Q. B) Ενεργότητα υδρόλυσης ΑΤΡ



ΙΙΙ.ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ πρωτεΐνης ΗrpZ

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι ανασυνδυασμένες HrcN πρωτεΐνες είναι ικανές να υποστηρίξουν την έκκριση της πρωτεΐνης HrpZ, οι πλασμιδιακές κατασκευές (εικόνα 2) εισήχθησαν στην κυτταρική σειρά *E.coli* JM109 που φέρει το κοσμίδιο με το κλωνοποιημένο οπερόνιο. Στο οπερόνιο αυτό, το γονίδιο της HrcN έχει αντικατασταθεί με μια κασέτα καναμυκίνης. Βακτηριακές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37^{0} C και η έκφραση των πλασμιδιακών πρωτεϊνών έγινε μετά την προσθήκη IPTG και την επώαση στους 30^{0} C (εικόνα 5 και 13).

Επίσης, για να διαπιστωθεί αν οι ανασυνδυασμένες HrcN πρωτεΐνες παρεμποδίζουν τη λειτουργία της αγρίου τύπου HrcN του οπερονίου, οι πλασμιδιακές κατασκευές εισήχθησαν στη συνέχεια στην κυτταρική σειρά *E.coli* JM109 που φέρει το κοσμίδιο με ολόκληρο το οπερόνιο. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που βρίσκονται στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, κατακρημνίστηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε gel πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια ανιχνεύθηκε η παρουσία ή όχι της HrpZ με ανοσοαποτύπωση. Τα αποτελέσματα, που δεν παρουσιάζονται, είναι τα εξής. Η πρωτεΐνη HrpZ εκκρίνεται όταν είναι παρούσες οι πρωτείνες His₁₀ Δ1-16, Δ1-23, Δ432-449 και GFP lnk HrcN, παρουσία του οπερονίου (και του γονιδίου της HrcN), αλλά όχι στην περίπτωση των His₁₀ HrcN Δ446-449 και HrcN lnk GFP. Παρουσία του οπερονίου χωρίς το γονίδιο της HrcN (ΔHrcN::Kan) δεν ανιχνεύθηκε έκκριση, ούτε και στην περίπτωση της ανασυνδυασμένης His₁₀ HrcN παρουσία ή απουσία του γονιδίου.

Όταν τα πειράματα επαναλήφθηκαν δεν ανιχνεύθηκε έκκριση της πρωτεΐνης HrpZ σε καμία περίπτωση, ούτε και σε αυτές που είχε προηγουμένως ανιχνευθεί. Η αδυναμία αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων πιθανότατα να οφείλεται σε αστάθεια του κοσμιδίου που προκαλεί ανακατατάξεις στην αλληλουχία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πειράματα που δεν δείχνουν έκκριση πουθενά να μη λαμβάνονται ως αρνητικά δεδομένα. Η αδυναμία αναπαραγωγής παρέμεινε ακόμα και όταν πραγματοποιήθηκαν εκ νέου μετασχηματισμοί της κυτταρικής σειράς με το κοσμίδιο. Σε κάθε ένα από αυτά τα πειράματα πάντως, η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών επάγεται κανονικά.

Ι**V.ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HrcN**

Προκειμένου να προσδιοριστεί η τοπολογία της πρωτεΐνης HrcN στο κύτταρο, οι πρωτεΐνες His₁₀ GFP lnk HrcN και HrcN lnk GFP εισήχθησαν στις κυτταρικές σειρές *E.coli* BL21 plys και JM109 (DE3) και η τοπολογία τους παρατηρήθηκε στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Όλες οι παρατηρήσεις και οι φωτογραφήσεις στο συνεστιακό μικροσκόπιο έγιναν από την Καραμάνου Λίλυ.

Οι πρωτεΐνες αρχικά εισήχθησαν στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* BL21 plys. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 19β, η πρωτεΐνη His₁₀ GFP lnk HrcN πριν την επαγωγή της έκφρασης της παρουσιάζει ένα μικρό ποσοστό έκφρασης και εντοπίζεται σε όλο τον κυτταρικό χώρο. Αντίθετα μετά την προσθήκη του IPTG εμφανίζει μια έντονη τοποθέτηση στους πόλους του κυττάρου, όπου πιθανότατα σχηματίζονται σωμάτια εγκλεισμού. Στην περίπτωση της His₁₀ HrcN lnk GFP (εικόνα 19γ), η εμφάνιση των σωματίων εγκλεισμού είναι έντονη ακόμα και πριν την επαγωγή της έκφρασης με ένα πολύ μικρό ποσοστό της πρωτεΐνης να παραμένει διαλυτό, ενώ το φαινόμενο γίνεται εντονότερο μετά την προσθήκη του IPTG. Ο σχηματισμός σωματίων εγκλεισμού δεν είναι κάτι που μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της GFP, αφού όταν αυτή εκφράζεται μόνη της στην ίδια κυτταρική σειρά είναι εντελώς διαλυτή και κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο τον κυτταρικό χώρο (εικόνα 19α).

Όποια και να είναι όμως η τοποθέτηση των πρωτεϊνών στην παραπάνω κυτταρική σειρά δεν μπορεί να παρομοιαστεί με αυτήν του κυττάρου που κωδικοποιεί φυσιολογικά την HrcN πρωτεΐνη αφού απουσιάζουν τα υπόλοιπα στοιχεία του οπερονίου που κωδικοποιούν τα συστατικά του τύπου ΙΙΙ συστήματος έκκρισης. Για αυτό το λόγο οι πρωτεΐνες στη συνέχεια εισήχθησαν στο βακτηριακό στέλεχος JM109 (DE3) οποία έχει ήδη μετασχηματιστεί με το οπερόνιο σε δύο μορφές. Στην άγριου τύπου και σε αυτήν που το γονίδιο της HrcN απουσιάζει και έχει αντικατασταθεί με μια κασέτα καναμυκίνης.

Παρουσία ολόκληρου του οπερονίου η πρωτεΐνη His_{10} GFP lnk HrcN πριν την επαγωγή της έκφρασης της εμφανίζεται σε σωμάτια εγκλεισμού στους πόλους αλλά και σε άλλα περιφερικά σημεία στο κύτταρο (εικόνα 20α). Μετά την προσθήκη του IPTG η εικόνα γίνεται πιο σαφής και η πρωτεΐνη εμφανίζεται στους πόλους αλλά εντοπίζεται και σε ευδιάκριτα σημεία της κυτταρικής περιφέρειας τα οποία διαφέρουν από τα σωμάτια εγκλεισμού. Όσον αφορά την πρωτεΐνη His₁₀ HrcN lnk GFP, πριν την επαγωγή εμφανίζεται σε σωμάτια εγκλεισμού ενώ μετά την επαγωγή εμφανίζεται και η χαρακτηριστική περιφερική τοποθέτηση (εικόνα 20β).

Απουσία του γονιδίου της HrcN από το οπερόνιο και παρουσία μόνο των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, η εικόνα διαφοροποιείται λίγο. Η πρωτεΐνη His₁₀ GFP lnk HrcN μετά την επαγωγή της εμφανίζει μόνο τη χαρακτηριστική περιφερική τοποθέτηση (εικόνα 21α) σε αντίθεση με την His₁₀ HrcN lnk GFP η οποία τόσο πριν όσο και μετά την επαγωγή της έκφρασης τοποθετείται στους δύο πόλους (εικόνα 21β).

Μετά το πέρας αυτών των πειραμάτων έγινε προσπάθεια να εισαχθούν οι δύο πρωτεΐνες στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* JM109 (DE3) plys, έτσι ώστε τα πειράματα στις δύο κυτταρικές σειρές να είναι συγκρίσιμα, αλλά αυτό δεν πραγματοποιήθηκε πιθανότατα λόγω προβλημάτων σταθερότητας του κοσμιδίου, προβλήματα ανάλογα με αυτά στην περίπτωση της έκκρισης της πρωτεΐνης HrpZ.

BL21 plys

+IPTG



GFP

Α



- IPTG

+ IPTG



nk HrcN U

- IPTG



+ IPTG

Εικόνα 19: Κυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών GFP (A), GFP lnk HrcN (B) και HrcN lnk GFP (Γ) στην κυτταρική σειρά *E.coli* BL21 plys πριν και μετά την προσθήκη IPTG.









+ IPTG

j,

Α





Εικόνα 20: Κυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών GFP lnk HrcN (A) και HrcN lnk GFP (B) στην κυτταρική σειρά *E.coli* JM109 (DE3) πριν και μετά την προσθήκη IPTG.

JM109 (DE3) pHir (ΔHrcN::Kan)

- IPTG





+ IPTG

B

- IPTG



Εικόνα 21: Κυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών GFP lnk HrcN (A) και HrcN lnk GFP (B) στην κυτταρική σειρά *E.coli* JM109 (DE3) pHir (ΔHrcN::Kan) πριν και μετά την προσθήκη IPTG.





Η πρωτεΐνη HrcN είναι μια ΑΤΡάση που κωδικοποιείται από το οπερόνιο που κωδικοποιεί το τύπου ΙΙΙ σύστημα έκκρισης. Στη μελέτη αυτή κατασκευάστηκαν 4 ελλειπτικές μορφές της HrcN προκειμένου να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος τους στον ολιγομερισμό και στην ενεργότητα υδρόλυσης ΑΤΡ. Οι δύο από αυτές έχουν μια έλλειψη στο αμινοτελικό άκρο (HrcN Δ1-16, Δ1-23) και οι άλλες δύο στο καρβοξυτελικό άκρο (HrcN Δ446-449, Δ432-449). Επίσης, κατασκευάστηκαν δύο υβριδικές πρωτεΐνες που φέρουν την πρωτεΐνη GFP είτε στο αμινοτελικό άκρο της HrcN (GFP lnk HrcN), είτε στο καρβοξυτελικό (HrcN lnk GFP) προκειμένου να μελετηθεί αν η παρουσία του μορίου της GFP στο ένα ή στο άλλο άκρο παρεμποδίζει τις ιδιότητες του ολιγομερισμού και της ενεργότητας. Οι έξι αυτές πρωτεΐνες καθώς και η αγρίου τύπου φέρουν 10 κατάλοιπα ιστιδίνης στην αμινοτελική περιοχή, βρίσκονται υπό τον έλεγχο ενός T7 υποκινητή και η έκφρασή τους επάγεται μετά την προσθήκη IPTG. Όλες δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να ολιγομερίζονται, να υδρολύουν ATP και να υποστηρίζουν την έκκριση της πρωτεΐνης HrpZ.

Μετά την προσθήκη IPTG όλες οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα, διαφέρουν όμως στη διαλυτότητά τους. Η αγρίου τύπου HrcN και οι HrcN Δ1-16 και Δ1-23 είναι διαλυτές στο μεγαλύτερό τους ποσοστό (εικόνα 6), η Δ446-449 HrcN και η GFP lnk HrcN μοιράζονται σχεδόν ισόποσα μεταξύ των δύο φάσεων (εικόνες 6 και 14 αντίστοιχα), ενώ η HrcN lnk GFP και κυρίως η HrcN Δ432-449 ανιχνεύονται σε μεγάλο ποσοστό στη μη διαλυτή φάση (εικόνες 14 και 6 αντίστοιχα). Για το λόγο αυτό η πρωτεΐνη HrcN Δ432-449 δεν κατάφερε να καθαριστεί. Οι δύο υβριδικές πρωτεΐνες δεν είναι πολύ σταθερές και κόβονται σε κάποια σημεία κατά τη διάρρηξη των κυττάρων, γι'αυτό και εμφανίζονται κι άλλες μπάντες κατά την ανοσοαποτύπωση της διαλυτής και μη διαλυτής φάσης (εικόνα 14).

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ρητίνη Ni-NTA, η οποία δεσμεύει τα κατάλοιπα ιστιδίνης. Η έκλουση έγινε σε συγκέντρωση 0.2 mg/ml και στο επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (SEC) για να ανιχνευθούν οι πληθυσμοί που σχηματίζονται. Όπως φαίνεται στην εικόνα, στα κλάσματα 17-18 εμφανίζεται σε όλες τις πρωτεΐνες μια κορυφή που αντιστοιχεί σε υψηλού βαθμού συσσωμάτωση. Στη συνέχεια, στα κλάσματα 29-31 εμφανίζεται μια δεύτερη κορυφή που αντιστοιχεί στο δωδεκαμερικό πληθυσμό (~600 kDa). Σε σύγκριση με την αγρίου τύπου HrcN, η HrcN Δ1-16 εμφανίζει μια χαμηλότερη κορυφή ενώ η HrcN Δ1-23 εμφανίζει μια κορυφή σε παρόμοια επίπεδα. Η Δ446-449 εμφανίζει επίσης κορυφή παρόμοιου ύψους η οποία όμως εμφανίζεται 1-2 κλάσματα νωρίτερα και πιθανότατα να είναι μορφές που έχουν αρχίσει να συσσωματώνονται και οι οποίες ενδέγεται να αλληλεπικαλύπτονται με τις δωδεκαμερικές. Στα κλάσματα 40-42 εμφανίζεται μια κορυφή που αντιστοιγεί στη μονομερική μορφή (~50 kDa). Όσον αφορά τις υβριδικές πρωτεΐνες, δεν εμφανίζουν κάποια κορυφή στα αναμενόμενα κλάσματα (26-28) (εικόνα 16), ίσως επειδή ο δωδεκαμερισμός τους σε αυτή τη χαμηλή συγκέντρωση παρεμποδίζεται από την παρουσία του όγκου της GFP.

Μετά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα 2mg/ml, η ισορροπία των διαφορετικών μορφών κινείται προς το δωδεκαμερές. Οι πρωτεΐνες Hren Δ1-16, Δ1-23 και Δ446-449 καθώς και η υβριδική πρωτεΐνη Hren Ink GFP, δεν εμφανίζουν ιδιαίτερο πρόβλημα ολιγομερισμού (εικόνες 9 και 17), ενώ η GFP Ink Hren δείχνει μια μεγάλη δυσκολία στον ολιγομερισμό (εικόνα 17). Η αγρίου τύπου Hren εμφανίζει μια ευδιάκριτη κορυφή στο κλάσμα 27 και όχι στο 30 που αναμένεται, μια πιο προσεκτική παρατήρηση όμως φανερώνει έναν δεύτερο πληθυσμό στο σημείο εκείνο, ο οποίος αλληλεπικαλύπτεται με τον πρώτο και αντιστοιχεί στο δωδεκαμερές. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα πειράματα ενζυμικής ενεργότητας που ακολουθούν

και τα οποία υποδεικνύουν τον πληθυσμό του κλάσματος 30 ως τον πιο ενεργό. Η διαφορά αυτή παρατηρείται λόγω της υψηλής συγκέντρωσης που οδηγεί την πρωτεΐνη γρήγορα σε συσσωματωμένες μορφές που αλληλεπικαλύπτονται με τη δωδεκαμερική. Η αδυναμία της GFP lnk HrcN να σχηματίσει δωδεκαμερή σε συγκρίσιμα με την αγρίου τύπου HrcN επίπεδα, δεν υποδηλώνει κάτι για την αμινοτελικό άκρο, αφού ακόμα και όταν λείπουν 23 αμινοξέα (HrcN Δ1-23) η πρωτεΐνη είναι ικανή να ολιγομεριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό. Ομοίως, το γεγονός ότι η HrcN lnk GFP ολιγομερίζεται κανονικά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το καρβοζυτελικό άκρο της μη αποδιαταγμένης μορφής μπορεί να ανιχνευθεί με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, υποδηλώνει πως ούτε αυτό το άκρο είναι σημαντικό για τον ολιγομερισμό.

Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα ποσοστά του υδρολυμένου φωσφόρου από τη δωδεκαμερή μορφή, τόσο πριν όσο και μετά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Πριν τη συγκέντρωση (εικόνα 8) η αγρίου τύπου HrcN έχει την ικανότητα να υδρολύσει περίπου 1.200 nmoles Pi/nmol type III/min. Οι HrcN Δ1-16 και Δ1-23 εμφανίζουν ενεργότητα 170 και 568 nmoles Pi/nmol type III/min αντίστοιχα, ενώ η Δ446-449 εμφανίζει 1.000 nmoles Pi/nmol type III/min. Το πρόβλημα που υπάρχει με αυτές τις τιμές είναι ότι προέρχονται από κλάσματα με πολύ χαμηλή συγκέντρωση, ειδικά στην περίπτωση των πρωτεϊνών που σχηματίζουν χαμηλά επίπεδα δωδεκαμερούς. Όπως έχει παρατηρηθεί όμως (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), όταν η πρωτεΐνη είναι πολύ αραιή, αρχίζει να χάνει την ενεργότητά της και επομένως αυτές οι τιμές μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν τις πραγματικές ενεργότητας των πρωτεϊνών.

Η ίδια ακριβώς μέτρηση έγινε και μετά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών όπου αυτό το πρόβλημα παρακάμπτεται και τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες. Οι πρωτεΐνες HrcN Δ1-16, Δ1-23 και Δ446-449 εμφανίζουν παρόμοια ενεργότητα, η οποία είναι η σχεδόν το 50% της αγρίου τύπου, αλλά σημαντικά υψηλή. Αυτό σημαίνει πως το αμινοτελικό άκρο δεν είναι πολύ σημαντικό ούτε για την ενζυμική ενεργότητα. Όσον αφορά τις χιμαιρικές πρωτεΐνες, η GFP lnk HrcN φτάνει στα επίπεδα της αγρίου τύπου (~40.000 nmoles Pi/ nmol type III/min), ενώ η ενεργότητα της HrcN lnk GFP είναι κατά πολύ μειωμένη, 7000 nmoles Pi/mg type III/min. Φαίνεται λοιπόν πως οι ιδιότητες του ολιγομερισμού και της ενζυμικής ενεργότητας μπορούν να αποδοθούν σε δύο διαφορετικές περιοχές αφού η πρώτη πρωτεΐνη με φυσιολογικά επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας παρουσιάζει πρόβλημα ολιγομερισμού και η δεύτερη με φυσιολογικά επίπεδα ολιγομερισμού εμφανίζει προβλήματα ενεργότητας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η παρουσία της GFP στο αμινοτελικό άκρο ίσως παρεμποδίζει τη γειτνίαση των πρωτομερών, χωρίς απαραίτητα να εμπλέκει άμεσα το άκρο αυτό στον ολιγομερισμό, ενώ η παρουσία της στο άλλο άκρο υποδεικνύει κάποιο καρβοξυτελικό κομμάτι ως υπεύθυνο για την ενεργότητα, το οποίο σ'αυτήν την περίπτωση αποκρύπτεται από την GFP. Ιδιαίτερα χρήσιμη σε αυτό το σημείο θα ήταν η αντίστοιχη πληροφορία από την πρωτεΐνη Δ432-449 HrcN που θα ενέπλεκε απ'ευθείας ή όχι το καρβοξυτελικό άκρο στη διαδικασία κατάλυσης.

Όποια περιοχή και αν χρησιμοποιείται από την πρωτεΐνη για τον ολιγομερισμό, θα πρέπει να βρίσκεται μακριά από τα άκρα. Αν πρόκειται για κάποια περιοχή που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό μισό της πρωτεΐνης, θα πρέπει να απέχει πολύ από το άκρο, αφού η παρουσία μιας δεύτερης πρωτεΐνης εκεί δεν εμποδίζει τον ολιγομερισμό. Αν πάλι πρόκειται για κάποια περιοχή στο αμινοτελικό μισό -όπως υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ύπαρξη της GFP στο αμινοτελικό άκρο παρεμποδίζει τον ολιγομερισμό- θα πρέπει επίσης να απέχει στην αλληλουχία από το άκρο, αφού η ΗrcN Δ1-23 μπορεί να ολιγομεριστεί, αλλά θα πρέπει να βρίσκεται και σε τέτοιο σημείο ώστε να μπορεί να παρεμποδιστεί από την GFP.

Βέβαια, το ελάττωμα που προκαλεί η αμινοτελική τοποθέτηση της GFP στον ολιγομερισμό θα μπορούσε να εξηγηθεί βάσει της απομάκρυνσης των 10 καταλοίπων ιστιδίνης από την πρωτεΐνη. Έχει παρατηρηθεί (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), ότι απουσία των καταλοίπων η πρωτεΐνη δεν μπορεί να ολιγομεριστεί, αν και έχει αυτήν την ενδογενή ιδιότητα. Η παρουσία των καταλοίπων πιθανότατα μιμείται εκείνον τον κυτταρικό παράγοντα που βοηθάει την HrcN να ολιγομεριστεί στο φυσιολογικό της περιβάλλον. Συνεπώς, η απομάκρυνση των ιστιδινών από την πρωτεΐνη λόγω της παρεμβολής της GFP μπορεί να εμποδίζει τη βοηθητική τους δράση, ενώ η ίδια πρωτεΐνη διατηρεί την θεωρητική ικανότητά της να ολιγομερίζεται.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να παρατηρηθεί αν οι πρωτεΐνες μπορούν να υποστηρίζουν την έκκριση της πρωτεΐνης HrpZ η οποία αποτελεί υπόστρωμα για το τύπου ΙΙΙ σύστημα και κωδικοποιείται από το οπερόνιο. Η παρατήρηση αυτή στάθηκε αδύνατη επειδή μετά τα πρώτα πειράματα το κοσμίδιο που έφερε το οπερόνιο εμφάνισε προβλήματα σταθερότητας.

Το ίδιο πρόβλημα εμφανίστηκε και στην προσπάθεια παρατήρησης της υποκυττάριας τοπολογίας των πρωτεϊνών GFP lnk HrcN και HrcN lnk GFP στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Στην περίπτωση αυτή όμως πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων πριν εμφανιστεί το πρόβλημα της σταθερότητας, τα οποία οδήγησαν σε κάποιες πρώτες παρατηρήσεις. Η επαγωγή της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* BL21 plys απουσία του οπερονίου, οδήγησε στο σχηματισμό σωματείων εγκλεισμού στους πόλους των κυττάρων, κάτι που δεν παρατηρήθηκε όταν η GFP εκφράστηκε μόνη της. Πιθανότατα τα κύτταρα σχημάτισαν τα σωμάτια εγκλεισμού μη μπορώντας να χειριστούν τοπολογικά την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη.

Παρουσία του οπερονίου και οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν σωμάτια εγκλεισμού αλλά και τη χαρακτηριστική περιφερική τοποθέτηση ενώ παρουσία του οπερονίου χωρίς το γονίδιο της HrcN, η GFP lnk HrcN εμφανίζει κυρίως την εστιασμένη περιφερική τοποθέτηση σε αντίθεση με την HrcN lnk GFP που εντοπίζεται μόνο στους πόλους. Άρα η GFP lnk HrcN έχει τη δυνατότητα να τοποθετηθεί στην κυτταρική μεμβράνη όταν υπάρχει ο μηχανισμός του τύπου ΙΙΙ συστήματος, είτε παρουσία είτε απουσία του γονιδίου της HrcN, γεγονός που σημαίνει πως δεν ασκεί κάποια κυρίαρχα αρνητική επίδραση επί της αγρίου τύπου, ούτε της είναι απαραίτητη για την τοποθέτησή της. Η HrcN lnk GFP από την άλλη, η οποία παρουσία του μηχανισμού και της HrcN σχηματίζει τις περιφερικές δομές, επίσης δε φαίνεται να ασκεί κυρίαρχα αρνητική επίδραση επί της αγρίου τύπου, χωρίς αυτήν όμως δεν μπορεί να τοποθετηθεί στα ίδια σημεία. Πιθανά, κάποια καρβοξυτελική περιοχή να συμμετέχει στην τοποθέτηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη και η παρουσία της αγρίου τύπου HrcN να βοηθάει στη διαδικασία αυτή όταν η περιοχή αυτή αποκρύπτεται από τη GFP.

Αρκετά διαφωτιστικός στην περίπτωση αυτή θα ήταν ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων της συνεστιακής μικροσκοπίας με τα αποτελέσματα της έκκρισης των υποστρωμάτων του τύπου ΙΙΙ συστήματος (HrpZ) το οποίο όμως δεν κατάφερε να γίνει σε αυτήν την μελέτη. Μια τέτοια σύγκριση θα φανέρωνε ποια ακριβώς υποκυττάρια τοποθέτηση είναι η πραγματική και αυτή που επιτρέπει τη λειτουργία του μηχανισμού.

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

Aizawa S-I. (1996) Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, **19**, 1-5.

Alfano, J.R. and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.*, **179**, 5655–5662

Alfano, J.R., Charkowski , A.O., Deng, W., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., Van Dijk, K. and Collmer, A. (2000) The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Microbiol.*, **97**, 4856-4861

Biswas,E.E. and Biswas,S.B. (1999) Mechanism of DnaB helicase of *Escherichia coli*: structural domains involved in ATP hydrolysis, DNA binding, and oligomerization. *Biochem* **38**, 10919-10928

Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. and Sansonetti, P. (1999) The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.*, **147**, 683–693

Brown,I.R., Mansfield,J.W., Taira,S., Roine,E. and Romantschuk,M. (2001) Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for a transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the plant cell wall. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 394–404

Christie, P.J. (2001) Type IV secretion: Intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally-related to conjugation machines. *Mol Microbiol.*, **40**, 294-305

Claret,L., Calder,S.R., Higgins,M. and Huges, C. (2003) Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol Microbiol* **48**, 1349-1355

Davidson, A.L., Laghaeian, S.S. and Mannering, D.E. The maltose transport system of *Escherichia coli* displayw positive co-operativity in ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **271**, 4858-4863

Ebel,F., Podzadel,T., Rohde,M., Kresse,A.U., Kramer,S., Deibel,C., Guzman,C.A. and Chakraborty,T. (1998) Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol. Microbiol.*, **30**, 147–161

Emerson, S.U., Tokuyasu, K. and Simon, M. (1970) Bacterial flagella: polarity of elongation. *Science*, **169**, 190–192

Fath, M.J. and Kolter, R.(1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev*, **57**, 997-1017

Frithz-Lindsten, E., Rosqvist, R., Johansson, L., Forsberg, U. (1995) The chaperone-like protein YerA of *Yersinia pseudotuberculosis* stabilizes YopE in the cytoplasm but is dispensable for targeting to the secretion loci. *Mol Microbiol*, **16**, 635-47.

Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L. and Galan, J.E. (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell*, **76**, 717–724

Gomis-Ruth, F.X., Moncalian, G., Perez-Luque, R., Gonzalez, A., Cabezon, E., de la Cruz, F. and Coll, M. The bacterial conjugation protein TrwB resembles ring helicases and Fi-ATPase. *Nature* **409**, 637-641

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997) Mol. Microbiol. 23, 1089-1097

Hensel, M., Nikolaus, T. & Egelseer, C. (1999) Mol. Microbiol. 31, 489-498

Hirano, S. S. & Upper, C. D. (1990) Annu. Rev. Phytopathol. 28, 155-177

Hobbs, M. and Mattick, J.S. (1993) Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.*, **10**, 233–243

Hoiczyk,E. and Blobel,G. (2001) Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* USA, **98**, 4669–4674

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

Jackson, R.J. *et al.* (1999) Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 10875–10880

Jin,Q., Hu,W., Brown,I., McGhee,G., Hart,P., Jones,A.L. and 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

Kaniga,K., Bossio,J.C. and Gal,J.E. (1994) The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. Mol *Microbiol* **13**, 555-68

Knutton,S., Rosenshine,I., Pallen,M.J., Nisan,I., Neves,B.C., Bain,C., Wolff,C., Dougan,G. and Frankel,G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.*, **17**, 2166–2176

Krause, S., Barcena, M., Pansegrau, W., Lurz, R., Carazo, J.M. and Lanka, E. (2000a) Sequence-related protein export NTPases encoded by the conjygative transfer region of RP4 and by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3067-3072

Krause, S., Pansegrau, W., Lurz, R., de la Cruz, F. and Lanka, E. (2000b) Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer systems of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. *J Bacteriol* **182**, 2761-2770

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

Leach, J.E and White, F.F. (1996) Bacterial avirulence proteins. Annu. Rev. Phytopathol., 34, 153–179

Lee, J. *et al.* (2001a) HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 289–294

Lee, J., Klessig, D.F. and Nurnberger, T. (2001b) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**, 1079–1093

Li,C., Brown,I., Mansfield,J., Stevens,C., Boureau,T., Romantschuk,M. and 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

Liu, P.-Q. and Ames, G.F.-L. (1998) *In vitro* disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 3495-53500

Macnab,R.M. (1996) Flagella and Motility. In: Neidhardt FC et al., editors. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Washington, D. C.: ASM Press

M rd,R., Sansonetti,P., Parsot,C., Vasselon,T. (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri. Cell*, **79**, 515-25.

Michiels, T., Vanooteghem, J-C., de Rouvroit, C., Gustin, A., Boudry, P., *et al.* (1991) Analysis of *virC*, an operon involved in secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, **173**, 4994-5009.

Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubrinina, E., Bergaman, T., Gustfsson, M., Magnusson, K.E., et al. (1996) Modulation of the virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, **273**, 1231-3.

Puglsey, A.P. (1993) The complete general secretory pathway. *Microbiol Rev*, **57**, 50-108

Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. and He, S.Y. (1997a) Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 3459–3464

Roine, E., Saarinen, J., Kalkkinen, N. and Romantschuk, M. (1997b) Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reassembles into pili. *FEBS Lett.*, **417**, 168–172

Salmond GPC and Reeves PJ. (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci.*, **18**, 7-12.

Sekiya,K., Ohishi,M., Ogino,T., Tamano,K., Sasakawa,C. and Abe,A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 11638–11643

Sory,M-P., Cornelis,G.R. (1994) Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol*, **14**, 583-94

Sory,M-P., Hermand,P., Vaerman,J-P. and Cornelius,G.R. (1995) Oral immunization of mice with a live recombinant *Yersinia enterocolitica* O:9 strain that produces the cholera toxin B subunit. *Infect Immun*, **58**, 3830-6.

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

Stephens C, Shapiro L. (1996) Targetted protein secretion in bacterial pathogenesis. *Current Biology*, **6**, 927-30.

Stevens, C., Bennett, M.A., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Taylor, J.D. and Mansfield, J.W. (1998) Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol. Microbiol.*, **291**, 165–177

Tsiamis,G. *et al.* (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.*, **19**, 3204–3214

Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., *et al.* (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of type III secretion system, encodes eight proteins related to components of bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* **15**, 1095-114.

Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.-C., Marenda, M. and Boucher, C. (2000) *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA

secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol.*, **36**, 249–260

Wattiau, P., Woestyn, S., Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, **20**, 255-62

Wieler, L. H., McDaniel, T. K., Whittam, T. S. & Kaper, J. B. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.* **156**, 49-53

Yeo,H.J., Savvides,S.N., Herr,A.B., Lanka,E. and Waksman,G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**, 1462-1472