

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη των πρωτεϊνών του εκκριτικού
συστήματος τύπου IV της *Coxiella Burnetii*.**

**Μαθιουδάκη Ειρήνη
Χημικός, MSc**

Υπεύθυνος Καθηγητής: Τσιώτης Γεώργιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2016

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

General Programme of Graduate Studies

Division of Biochemistry



Master Thesis

**Study of proteins of the Secretion System Type IV of
Coxiella burnetii**

Mathioudaki Eirini

Master Thesis Supervisor: Tsiotis Georgios

HERAKLION, 2016

Στην οικογένειά μου...

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής

Τσιώτης Γεώργιος

Καθηγητής

Ψαρουλάκη Άννα

Επίκουρη καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη δυνατότητα που μου παρείχε να πραγματοποιήσω τις σπουδές μου σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο.

Ακολούθως, ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Γεώργιο Τσιώτη, επιστημονικό υπεύθυνο του εργαστηρίου Βιοχημείας στο οποίο εκπόνησα την μεταπτυχιακή μου εργασία, για την ανάθεση της παρούσας μελέτης καθώς και για την άριστη συνεργασία αλλά και εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλον αυτό τον καιρό.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον καθηγητή κ. Γανωτάκη Δημήτριο του τμήματος Χημείας, όπως επίσης και την επίκουρη καθηγήτρια κ. Ψαρουλάκη Άννα της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Ακόμη, τον καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Κουτσολέλο Αθανάσιο που μας παρείχε τον φασματογράφο μάζας MALDI- TOF/TOF MS/MS για την ανάλυση των πρωτεϊνικών μας δειγμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας, την Αρβανίτη Κατερίνα, την Νικολάκη Αντιγόνη, τον Δέδογλου Δημήτρη, την Μάρκου Παναγιώτα, την Κουρπά Κατερίνα, τον Παϊκόπουλο Γιώργο όπως επίσης και την Απλαντή Μαρία, την Μέξη Χριστίνα, την Φραγκέδη Κατερίνα και τον Βαλσαμίδα Γιάννη για την πολύτιμη βοήθειά τους και την αρμονική συνεργασία. Επίσης, τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας του κ. Γανωτάκη, τον Νάζο Θεοχάρη, τον Δρ. Στεφανάκη Δημήτρη, τον Μίχογλου Άρη και την Βαλσαμή Ελευθερία για την πολύ ευχάριστη συνεργασία καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του τμήματος Μοριακής Μembrανικής Βιολογίας (Molecular Membrane Biology) του ινστιτούτου Max

Planck of Biophysics στην Φρανκφούρτη της Γερμανίας, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκπόνηση της προκειμένης εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ βαθιά την οικογένειά μου για τη στήριξη και τη βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ειρήνη Μαθιουδάκη

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης: 07/05/1992

Διεύθυνση κατοικείας: Ανδρέα Νάθενα 21, Ηράκλειο

Τηλ. Επικοινωνίας: 2810-320659, 6979739429

E-mail: eirini.mathiou@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- | | |
|------------------|--|
| 09/ 2014- Σήμερα | Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Χημεία (Κατευθυνση Βιοχημείας) , Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Χημείας, Τμήμα Χημείας , Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Κρήτης, Επιβλέπων καθηγητής Κύριος Γεώργιος Τσιώτης. Αναμενόμενη ημερομηνία αποφοίτησης: 11/2016. |
| 2010- 2014 | Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών (Βαθμός πτυχίου 7,16) |
| 2010 | Απολυτήριο Λυκείου, 8 ^ο Γενικό Λύκειο Ηρακλείου (19,0) |

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ - ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 15/10/2015- 11/01/2016 Καθηγήτρια στο Κοινωνικό Φροντιστήριο Δήμου Ηρακλείο Διδασκαλία Χημείας Α, Β και Γ Λυκείου.
- 09/2015- 12/2015 Βοηθός διδασκαλίας στο προπτυχιακό εργαστήριο Βιοχημείας, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης, Υπεύθυνη εργαστηρίου κυρία Πόπη Καβελάκη.
- 02/2015- 05/2015 Βοηθός διδασκαλίας στο προπτυχιακό εργαστήριο Οργανικής Χημείας, τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Κρήτης, Υπεύθυνος εργαστηρίου κύριος Αγάθωνας Καταχανάκης.
- 01/10/2012- 15/06/2014 Εθελοντική εργασία στην ενορία Νέων Αλατσάτων- Διδασκαλία Μαθηματικών- Φυσικής- Χημείας Γυμνασίου.
- 16/08/2013- 30/09/2013 Πρακτική άσκηση στο Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου (Ανοσολογικό Εργαστήριο)
- 01/07/2013-15/08/2013 Πρακτική άσκηση στο Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου (Βιοχημικό Εργαστήριο)
- 01/07/2012- 31/07/2012 Εθελοντική εργασία στη Βικελαία Βιβλιοθήκη Ηρακλείου, Πρόγραμμα «Διαδρομές με πυξίδα τη βιβλιοθήκη», συμμετοχή και οργάνωση εκδηλώσεων αγωγής παιδιών.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- Western Blot
- Χρωματογραφία Συγγένειας/ Μοριακού αποκλεισμού
- Γνώσεις PCR

ERASMUS

15/01/2016- 15/06/2016 Max Planck Institute of Biophysics, Department of
Molecular Membrane Biology, Φρανκφούρτη,
Γερμανία
Θέμα: Κλωνοποίηση και απομόνωση
Μεμβρανικών πρωτεϊνών.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά Άριστη γνώση, Level 5 London tests of English,
2008

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ ΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

07/2015- 09 2015 Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Δια Βίου Μάθησης
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης με θέμα:
«Διαγνωστικές και θεραπευτικές προσεγγίσεις του
21^{ου} αιώνα στην παθολογία του καρκίνου».

04/2011 12^ο Συνέδριο Ιατρικής Χημείας, Πανεπιστήμιο
Πατρών

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

Γνώση και χειρισμός Η/Υ (Windows, internet,
excel, word).

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ- ΒΡΑΒΕΙΑ

- 17/10/2010 Έπαινος, 27^{ος} Παγκρήτιος Λογοτεχνικός Διαγωνισμός, Σύνδεσμος Φιλολόγων Νομού Χανίων.
- 16/05/2010 Έπαινος, 12^{ος} Πανελλήνιος Διαγωνισμός Ποίησης και Διηγήματος, Πανελλήνια Ένωση Λογοτεχνών.
- 19/03/2005 1^ο Βραβείο, Πανελλήνιος Λογοτεχνικός Διαγωνισμός συγγραφής Ιστορίας για το νερό, Κέντρο Γέναθλον

ΆΛΛΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Συγγραφή παιδικών βιβλίων και ενασχόληση με δημιουργικές δράσεις για παιδιά

- 10/2013 «Ο Αφρατούλης στο Λαχανόκηπο», Εκδόσεις Ίτανος , Ηράκλειο Κρήτης
- 08/2015 « Η Πριγκίπισσα του Βοτανόκηπου», Εκδόσεις Ίτανος, Ηράκλειο Κρήτης

Άλλες δράσεις:

- 2013- Σήμερα Δημιουργική απασχόληση παιδιών νηπιαγωγείου και Δημοτικού, μέσω παρουσιάσεων των παραμυθιών σε βιβλιοπωλεία και άλλους φορείς.
- 10/2015- Σήμερα Μέλος Ένωσης Ελλήνων Χημικών, Περιφερειακού Τμήματος Κρήτης
- 09/2015- 12/2015 Τμήμα Δημιουργικής γραφής για παιδιά, Tango Salon, Ηράκλειο Κρήτης

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Ενασχόληση με τον χορό

Μέλος του Πνευματικού Κέντρου Ενορίας Νέων Αλατσάτων Ηρακλείου

CURICULUM VITAE

Eirini Mathioudaki

PERSONAL INFORMATION

Date of birth: 07/05/1992

Address: Andrea Nathena 21, Heraklion, Crete, Greece

Telephone No: 2810-320659, 6979739429

e-mail: eirini.mathiou@gmail.com

EDUCATION

09/ 2014- Today Master of Biochemistry, University of Crete,
Faculty of Sciences and Engineering,
Department of Chemistry.

2010- 2014 Bachelor of Chemistry, University of Crete,
Faculty of Sciences and Engineering,
Department of Chemistry (7,16).

WORK EXPERIENCE

15/10/2015- 11/01/2016 Volunteer Chemistry teacher in school of
Remedial teaching, Heraklion, Crete.

09/2015- 12/2015 Laboratory assistant of postgraduate
Biochemistry Lab University of Crete,
Department of Chemistry.

02/2015- 05/2015 Laboratory assistant of postgraduate Organic
Chemistry Lab, University of Crete, Department
of Chemistry.

01/10/2012- 15/06/2014	Volunteer Chemistry teacher in school of Remedial teaching, Heraklion, Crete.
16/08/2013- 30/09/2013	Practical course in Venizeleio Hospital of Heraklion. (Immunological Laboratory)
01/07/2013- 15/08/2013	Practical course in Venizeleio Hospital of Heraklion, (Biochemical Laboratory)

LABORATORY EXPERIENCE

- Bacterial cell culture
- Centrifugation
- Media preparation
- SDS-PAGE Electrophoresis
- Agarose Gel Electrophoresis
- Western Blot
- Affinity Chromatography/ Size exclusion Chromatography
- Introduction in PCR

ERASMUS

15/01/2016- 15/06/2016	Max Planck Institute of Biophysics, Department of Molecular Membrane Biology, Frankfurt, Germany <u>Topic:</u> Cloning and characterization of Membrane proteins.
------------------------	--

FOREIGN LANGUAGES

English	Level 5 London tests of English, 2008
---------	---------------------------------------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Coxiella burnetii* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο, το οποίο προκαλεί τον πυρετό Q στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά ζώα. Μελέτες στο συγκεκριμένο βακτήριο έχουν δείξει πως, για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του στο κύτταρο ξενιστή, εξειδικευμένες μοριακές μηχανές συμβάλουν μέσω μεταφοράς συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία επεμβαίνουν στις κυτταρικές διεργασίες του ξενιστή με αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση της μόλυνσης.

Μία τέτοια μοριακή μηχανή είναι το εκκριτικό σύστημα τύπου IVB (T4BSS), γνωστό και ως σύστημα Dot/Icm, που μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτήριο στη κύτταρο ξενιστή. Το συγκεκριμένο εκκριτικό σύστημα έχει μελετηθεί σε βάθος στο βακτήριο *Legionella pneumophila* και έχει βρεθεί πως απαρτίζεται από 27 πρωτεΐνες, 24 από τις οποίες ταυτοποιούνται σε στέλεχος της *C.burnetii*.

Στην συγκεκριμένη εργασία, μελετώνται 4 πρωτεΐνες από το εκκριτικό σύστημα T4BSS της *C.burnetii*, όπως επίσης και το υποσύμπλοκο του πυρήνα που απαρτίζεται από τις DotC, DotD, IcmG (DotF), IcmE (DotG) και IcmK (DotH). Οι πρωτεΐνες που μελετώνται είναι η IcmK της εξωτερικής μεμβράνης, η IcmE του περιπλάσματος, η DotC και η DotD.

Αρχικά, ελέγχθηκε η ικανότητα έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών στα στελέχη *E.Coli* C43(DE3) χρησιμοποιώντας τους πλασμιδιακούς φορείς pttQ18A2 και pttQ18C3. Ο πρώτος πλασμιδιακός φορέας έφερε το γονίδιο της εκάστοτε πρωτεΐνης με σήμανση την ουρά 6 ιστιδινών στο κάρβοξυ-τελικό άκρο, ενώ ο δεύτερος έφερε ως σήμανση ένα μικρό πεπτίδιο 8 αμινοξέων (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys), που ονομάζεται strep-tag, επίσης στο κάρβοξυ-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με τον τρόπο αυτό, ήταν εφικτή η απομόνωση της εκάστοτε πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγενείας και πιο συγκεκριμένα με τη χρήση στήλης νικελίου και στρεπταβιδίνης, για κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις αντίστοιχα. Στη συνέχεια, ακολούθησε καθαρισμός της πρωτεΐνης στόχου με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Η επιτυχής απομόνωση,

καθαρισμός και η ταυτοποίηση των επιθυμητών πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας, ανοίγει τον δρόμο για το δομικό τους χαρακτηρισμό με την μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας ή της κρυσταλλογραφίας.

Η μελέτη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του παθογόνου βακτηρίου *Coxiella burnetii* έχει πολύ μεγάλη σημασία με ενδεχόμενες εφαρμογές στην ιατρική, δεδομένου πως τα συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια συμβάλουν στην ανάπτυξη του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο ξενιστή, αποτελώντας μόρια-στόχους για την ανάπτυξη φαρμάκων.

Λέξεις κλειδιά: *Coxiella Burnetii*, πυρετός Q, εκκριτικό σύστημα τύπου IVB, μεμβρανικές πρωτεΐνες, χρωματογραφία συγγένειας, χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, ηλεκτροφόρηση, φασματομετρία μάζας.

ABSTRACT

Coxiella Burnetii is an obligatory intracellular bacterial pathogen and is the causative agent of Q fever in human and other mammalian animals. Studies about *Coxiella*, have shown that, specific molecular machines contribute by transferring protein molecules, which interfere in the cellular processes of the host, resulting in the establishment of the infection. In that way, the bacteria manages its survival and proliferation inside the host cell.

Such a molecular machine is the IVB secretion system (T4BSS), known as Dot/Icm system that transports proteins from the bacterium to the host cell. This secretion system has been studied with details in the bacterium *Legionella pneumophila* and it was found to be composed of 27 proteins, 24 of which were present in *C.burnetii* strains.

In this particular study, we examined four proteins from the secretion T4BSS system of *C.burnetii*, as well as the core subcomplex, composed of DotC, DotD, IcmG (DotF), IcmE (DotG) and IcmK (DotH). Proteins being studied are IcmK an outer membrane protein, the periplasmic protein IcmE , DotC and DotD proteins.

First of all, the expression ability of the above proteins in *E.Coli* strains C43 (DE3) was tested by using pttQ18A2 and pttQ18C3 as plasmid vectors . The first plasmid vector contained the gene for each protein marked by the His-tag (six histidines residues) at the C-terminus, while the second vector contained as a tag, a small peptide of 8 amino acids (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) called strep-tag, also at the C- terminus of the protein. In this way, it was possible to isolate the respective protein by affinity chromatography and more particularly, by using a nickel and a streptavidin column for each of these cases respectively. Further purification of the target protein was achieved by Molecular Exclusion Chromatography. Successful isolation, purification and identification by mass spectrometry of the desired proteins, opens the way for their structural characterization by the method of Electron Microscopy and Crystallography.

The study of the secreted proteins of pathogenic bacteria *Coxiella Burnetii* is very important to potential medical applications, provided that the specific protein molecules contribute to the growth of the bacterium inside the host cell, being target molecules for drug development.

Keywords: *Coxiella Burnetii*, Q fever, IVB secretorion system, membrane proteins, affinity chromatography, molecular exclusion chromatography, electrophoresis, mass spectrometry.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	<u>Σελ. 23-40</u>
1.1	Coxiella Burneti	23-25
1.2	Αναπτυξιακός κύκλος- Μεταβολή φάσης	26-27
1.3	Coxiella Burnetii και μόλυνση κυττάρου- ξενιστή/ Ενδοκυττάριος κύκλος ζωής	28-33
1.4	Εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS)	33-34
1.5	Εκκριτικό σύστημα τύπου IVB (T4BSS), Icm/Dot	34-36
1.6	Υπομονάδες εκκριτικού συστήματος τύπου Icm/Dot	36-39
1.7	Σκοπός	39-40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	<u>Σελ. 41-74</u>
2.1	Κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου	
2.1.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	41-42
2.1.2	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης	43-44
2.1.3	Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation)	44
2.1.4	Περιοριστική πέψη	44-45
2.2	Αναλυτικές τεχνικές	
2.2.1	Παρασκευή θρεπτικού υλικού για καλλιέργειες	45-46
2.2.2	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	46-48
2.2.3	Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων	48-49
2.2.4	Επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης	49-50
2.2.5	Συλλογή κυττάρων	50
2.2.6	Λύση κυττάρων	50-51
2.2.7	Φυγοκέντριση- συλλογή μεμβρανών	51-52
2.2.8	Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford	52-53
2.2.9	Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο BCA	53
2.2.10	Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS- PAGE)	53-57
2.2.11	Western Blot	57-59
2.2.12	Διαλυτοποίηση μεμβρανών με τη χρήση απορρυπαντικού n-dodecyl-β, maltoside (DDM)	59-60
2.2.13	Καθαρισμός επιθυμητής πρωτεΐνης-	

	Χρωματογραφία συγγένειας	60-64
2.2.14	Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση- Microrotofor	64-66
2.2.15	Κατακρίμνηση πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA)	66
2.2.16	Καθαρισμός επιθυμητής πρωτεΐνης- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography- SEC)	66-68
2.2.17	Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση- Blue Native Page	68-70
2.2.18	Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών	70-71
2.2.19	Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας	71-74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	<u>Σελ. 75-131</u>
3.1	Προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης της IcmK	
3.1.1	Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQA2+K	75-82
3.1.2	Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+K	82-87
3.2	Έκφραση της IcmE	
3.2.1	Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+E	88-93
3.2.2	Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+E	94-95
3.3	Έκφραση της DotD	
3.3.1	Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+D	96-99
3.3.2	Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+D	99-107
3.4	Έκφραση της DotC	
3.4.1	Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+C	108-110
3.4.2	Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+C	110-118
3.5	Προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης του συμπλόκου pKEGCD	118-131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	<u>Σελ. 132-141</u>
4.1	Απομόνωση και καθαρισμός της IcmK	132-134
4.2	Απομόνωση και καθαρισμός της IcmE	134-135
4.3	Απομόνωση και καθαρισμός της DotD	135-136
4.4	Απομόνωση και καθαρισμός της DotC	136-138
4.5	Απομόνωση και καθαρισμός του συμπλόκου pKEGCD	138-140
4.6	Μελλοντικές προοπτικές	140-141
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	142-144
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	145-147

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

APS: υπερθειϊκό αμμώνιο

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

HEPES: 4- (2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφοκινικό οξύ

IPTG: ισοπροπύλιο- β- D-1- thiogalactopitanosite

PAGE: ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου

PI: ισοηλεκτρικό σημείο

PMSF: φαίνυλο- μέθυλο- σουλφόνυλο- φθόριο

SDS: δωδεκυλοθειϊκό οξύ

TCA: τριχλωρικό οξύ

TEMED: N,N, 'N, 'N – τετραμεθυλοδιαμίνη

TFA: τριφθορικό οξύ

Tris: τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Coxiella Burnetii*

Η *Coxiella burnetii* είναι ένα αρνητικό κατά gram βακτήριο, το οποίο μεταδίδεται μέσω αερολύματος και είναι η κύρια αιτία της εκδήλωσης του λοιμώδους νοσήματος πυρετού Q στον άνθρωπο αλλά και σε άλλα θηλαστικά ζώα. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι παθογόνο και υποχρεωτικά ενδοκυττάριο, παρουσιάζοντας πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικά αντίξοες συνθήκες όπως είναι το χαμηλό pH, η υψηλή θερμοκρασία, η υψηλή πίεση, η υπεριώδης ακτινοβολία κ.α. [Voth και Heinzen, 2007]. Με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA, ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ανήκει σε ένα ξεχωριστό γένος *Coxiella*, μιας υποκατηγορίας των Γάμμα (Gamma) Πρωτεοβακτηρίων, ενώ τα γένη *Legionella*, *Franciscella* και *Rickettsiella* αποτελούν τους πλησιέστερους συγγενείς του [Kazar, 2005].

Ο πυρετός Q είναι μία παγκόσμια ζωνόσος η οποία προκαλείται από το παράσιτο *Coxiella Burnetii* σε μυρικαστικά και κατοικίδια ζώα. Τις περισσότερες φορές, η εκδήλωση της νόσου στα θηλαστικά είναι ασυμπτωματική, όμως η ασθένεια αυτή αποτελεί μία σημαντική αιτία αποβολών και στειρότητας σε βοοειδή και πρόβατα [Roy και Luhrmann, 2007], πράγμα που έχει αρκετές οικονομικές συνέπειες για την αγροτική παραγωγή. Ο άνθρωπος μολύνεται πιο δύσκολα σε σχέση με τα άλλα θηλαστικά και μόνο αν έρθει σε επαφή με το περιβάλλον του μολυσμένου ζώου. Το παθογόνο βακτήριο μεταδίδεται κυρίως με εισπνοή μολυσματικού υλικού ή με άμεση επαφή με τα σωματικά υγρά του ζώου όπως γάλα κ.α. [Angelakis και Raoult, 2010].

Ο πυρετός Q στον άνθρωπο, μπορεί να εκδηλωθεί με δύο κλινικές μορφές: την οξεία και τη χρόνια λοίμωξη. Στην πρώτη περίπτωση έχουμε την άμεση εκδήλωση των συμπτωμάτων που θυμίζουν γρίπη, και κατά συνεπεία αντιμετώπιση με την κατάλληλη ιατρική βοήθεια. Μερικές φορές μπορεί να οδηγήσει σε πνευμονία ή άτυπη ηπατίτιδα. Αντίθετα, η χρόνια μορφή της πάθησης μπορεί να βρίσκεται σε λανθάνουσα μορφή από βδομάδες έως και χρόνια και όταν εκδηλωθεί να είναι αρκετά επικίνδυνη για τον ασθενή. Τα χαρακτηριστικά της είναι σχεδόν ταυτόσημα με αυτά της ενδοκαρδίτιδας και

αν δεν αντιμετωπισθεί γρήγορα μπορεί να γίνει μοιραία. Στις μέρες μας , τα ποσοστά θνησιμότητας από χρόνια μορφή του πυρετού Q έχουν περιοριστεί στο 2%, με την κατάλληλη θεραπεία. [Roy και Luhmann, 2007].

Η επικινδυνότητα του πυρετού Q για την ανθρώπινη υγεία σε συνδυασμό με την μεγάλη περιβαλλοντική ανθεκτικότητα που διαθέτει το υπαίτιο βακτήριο, οδήγησε το Αμερικάνικο Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων να κατατάξει την *C.Burnetii* στους παράγοντες που αποτελούν πιθανό βιολογικό όπλο [Madariaga et al., 2003].

Μελέτες σχετικά με τον μοριακό μηχανισμό δράσης της *Coxiella* μέσα στο κύτταρο ξενιστή, μπορούν να δώσουν πολλές απαντήσεις σε θέματα που αφορούν την παθογένεια του βακτηρίου.

Τα μακροφάγα εξουδετερώνουν τους εισβολείς

Η φυσιολογική άμυνα του οργανισμού περιλαμβάνει τα επαγγελματικά μακροφαγικά κύτταρα (μακροφάγα και ουδετερόφιλα), τα οποία είναι σε θέση να εντοπίζουν και στη συνέχεια να καταστρέφουν παθογόνους μικροοργανισμούς που επιχειρούν να εισβάλουν μέσα στον οργανισμό. Τα μακροφάγα ανήκουν στην κατηγορία των λευκών αιμοσφαιρίων και η λειτουργία τους είναι να εγκολπώνουν και ακολούθως να εξολοθρεύουν τους εισβολείς, σε μία διαδικασία που ονομάζεται φαγοκυττάρωση [Onchinnikov και Dimitry A., 2008], [Elhelu, 1983]. Όταν ένα μακροφάγο παγιδεύει ένα παθογόνο, τότε αυτό εγκολπώνεται μέσα σε μία δομή που ονομάζεται φαγόσωμα. Το φαγόσωμα, στη συνέχεια συμπύσσεται με διάφορα άλλα ενδομεμβρανικά τμήματα του κυττάρου, όπως τα λυσοσώματα, σε μία δομή που ονομάζεται φαγολυσοσώμα. Εντός του φαγολυσοσώματος, επικρατούν βακτηριοκτόνες ιδιότητες όπως χαμηλό pH και υδρολυτικά ένζυμα, οι οποίες είναι σε θέση να εξουδετερώνουν τους εισβολείς [Kinchen και Ravichandran, 2008].

Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένοι μικροοργανισμοί όπως το *Mycobacterium tuberculosis*, που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στις συγκεκριμένες μεθόδους πέψης. Στην περίπτωση της τυφοειδούς *Salmonella*, το βακτήριο αναστέλλει τη δράση του λυσοσώματος *in vivo* και χρησιμοποιεί το

μακροφάγο προκειμένου να αναπαραχθεί. Άλλα ενδοκυττάρια παράσιτα, όπως η *Legionella Pneumophila* και η *Coxiella Burnetii*, χρησιμοποιούν περίπλοκες στρατηγικές επιβίωσης, οι οποίες περιλαμβάνουν τη δημιουργία ενός οργανιδίου, μέσα στο οποίο επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται.

Η *C.burnetii* είναι το μοναδικό βακτήριο, γνωστό μέχρι σήμερα, που επιβιώνει και αναπαράγεται μέσα στα φαγολυσοσώματα. Πρόκειται για βάκιλο μεγέθους 0,3-1μm, ο οποίος περιβάλλεται από την εξωτερική και την πλασματική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη (κυτταρικό τοίχωμα) πάχους 70-100nm αποτελείται από 3 στοιβάδες. Κάτω από αυτές, βρίσκεται η πλασματική μεμβράνη με πάχος 60-80nm. Στην εξωτερική μεμβράνη ανήκουν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με το ευκαρυωτικό κύτταρο στόχο αλλά και με το συνολικό περιβάλλον του βακτηρίου, ενώ στην πλασματική μεμβράνη ανήκουν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την μεταφορά ιόντων, μεταβολιτών και άλλων θρεπτικών ουσιών [Samoilis, 2007].

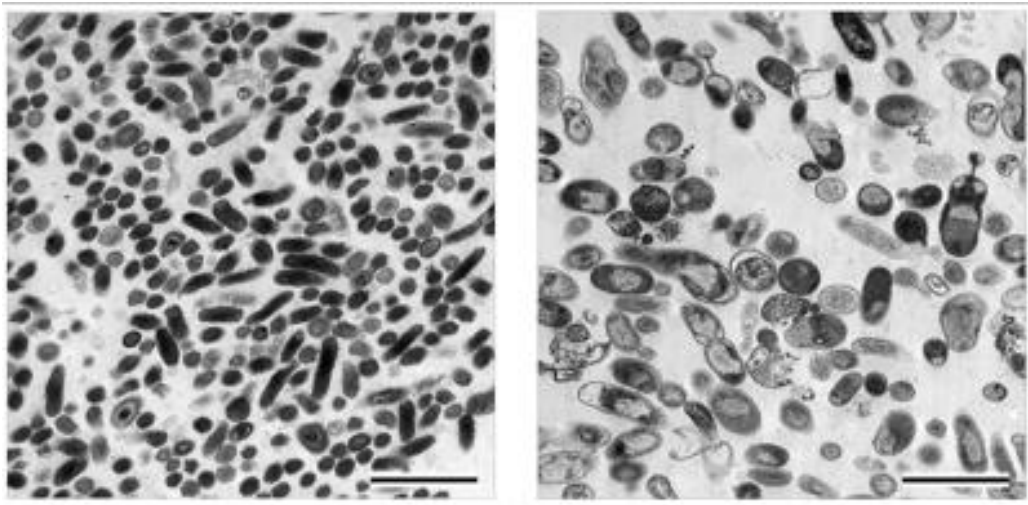
Μία χαρακτηριστική ιδιότητα είναι ότι ο λιποσακχαρίτης (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος μπορεί να βρεθεί σε δύο παραλλαγές, τη λεία και την αδρή, κάτι το οποίο δημιουργεί δύο διαφορετικές αντιγονικές φάσεις του βακτηρίου, τη φάση I και τη φάση II. Η φάση I, που χαρακτηρίζεται και ως παθογόνος, μπορεί να απομονωθεί από μολυσμένα θηλαστικά ζώα και ανθρώπους ενώ η φάση II, που είναι μη λοιμογόνος, προκύπτει στο εργαστήριο, μέσω της σειριακής διέλευσης σε κυτταροκαλλιέργειες ή καλλιέργειες γονιμοποιημένων αυγών [Hotta et al, 2002].

Μελέτες των Nagasaki και Toman το 2012, έδειξαν πως ο LPS της μολυσματικής φάσης I παρουσιάζει μεγάλη διαφορά ως προς τον LPS της μη λοιμογόνου φάσης II, όσον αφορά τη χημική σύνθεση, τη δομή και τις βιολογικές ιδιότητες. Μία βασική διαφορά είναι η αξιοσημείωτη ποσότητα δύο ασυνήθιστων σακχάρων, της virenose (Vir) και της dihydrohydroxystreptose (Strep), τα οποία δεν βρίσκονται σε άλλα όμοια συστήματα LPS, αποτελώντας τον μοναδικό βιοδείκτη του βακτηρίου [Nagasaki και Toman, 2012].

1.2 Αναπτυξιακός κύκλος- Μεταβολή φάσης

Η *C. burnetii* απαντάται σε δύο διαφορετικές κυτταρικές μορφές. Έτσι έχουμε τα small-cell-variant (SCV) και τα large-cell-variant (LCV), αμφότερα μολυσματικά με σημαντικές δομικές και μορφολογικές διαφορές. Τα LCV έχουν έντονη μεταβολική δραστηριότητα και παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στις περιβαλλοντικές συνθήκες, γι' αυτό είναι αποκλειστικά ενδοκυττάρια. Αντίθετα, τα SCV έχουν μικρότερο μέγεθος, είναι σταθερά στο περιβάλλον ενώ περιέχουν παχύτερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα, πράγμα που τους προσφέρει εξαιρετική σταθερότητα [Howe και Mallavia, 2000].

Το 2004, οι Coleman et al έδειξαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία πως τα SCV είναι ραβδιόμορφα, μήκους 0,2-0,5μm, με χαρακτηριστικά πακεταρισμένη χρωμάτινη. Αντίθετα, τα LCV διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος (>1μm) και είναι πιο πλειομορφικά με διασκορπισμένη και νηματοειδή χρωματίνη (εικόνα 1.1)



Εικόνα 1.1: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αρνητικής χρώσης των δύο μορφών της *C. burnetii*. Η μπάρα αντιστοιχεί στα 2μm και παρουσιάζει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των A) SCV και B) LCV. (Coleman et al, 2007)

Με βάση τις μελέτες της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, έχει προταθεί ότι, η *C. burnetii* μέσα στο κύτταρο ξενιστή περνά από τα συνηθισμένα στάδια της βακτηριακής ανάπτυξης, τα οποία περιλαμβάνουν την λανθάνουσα, την εκθετική και τη στατική φάση. Στη λανθάνουσα φάση, η οποία διαρκεί 2 ημέρες, έχουμε την μετάβαση από τα SCV στα LCV. Στη συνέχεια ακολουθεί

η εκθετική αύξηση των LCV, που έχει διάρκεια 6 ημερών. Καθώς προσεγγίζεται η στατική φάση, λαμβάνει χώρα η μετάβαση από τα LCV στα SCV. Τα SCV αποτελούν τον μολυσματικό χαρακτήρα των κυττάρων στη φύση, γι' αυτό και δεν πολλαπλασιάζονται, όπως φανερώνει και η απουσία τους στην εκθετική φάση του κυτταρικού κύκλου. Αντίθετα, τα LCV πολλαπλασιάζονται μέσα στο φαγολυσόσωμα του κυττάρου- ξενιστή με αποτέλεσμα τον κορεσμό και την λύση του. Με τον τρόπο αυτό, τα βακτήρια απελευθερώνονται και μολύνουν άλλα, υγιή κύτταρα- ξενιστές [Coleman et al, 2007].

Η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων της *C. Burnetii* σχετίζεται με τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το βακτήριο, ενώ έχει βρεθεί πως υπάρχουν πρωτεΐνες ειδικές για τις δύο μορφές. Για παράδειγμα, οι ScvA και HQ1 είναι πρωτεΐνες ειδικές για τα SCV, δεσμεύονται με το DNA και αποτελούν συστατικό της συμπυκνωμένης χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές αποικοδομούνται κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας και της στατικής φάσης, ενώ αρχίζουν να αυξάνονται με την είσοδό τους στη στατική [Coleman et al, 2004]. Αντίθετα, τα LCV εκφράζουν ειδικά την πορίνη P1, η οποία δρα προσαρμοστικά για τα κύτταρα και βοηθά στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από το φαγολυσόσωμα. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, αυξάνεται η παραγωγή της συγκεκριμένης πορίνης όπως επίσης και η έκφραση ενζύμων μεταβολισμού αλλά και ριβοσωμάτων, πράγμα που συμβαδίζει με τον μεταβολικό χαρακτήρα των LCV [Coleman et al, 2004, 2007].

Παρατηρούμε λοιπόν ότι, οι δύο διαφορετικές μορφές του βακτηρίου επιτελούν ξεχωριστές διεργασίες, πράγμα το οποίο φαίνεται από το διακριτό πρωτεϊνικό τους περιεχόμενο και τον διαφορετικό ρόλο της κάθε παραγόμενης πρωτεΐνης.

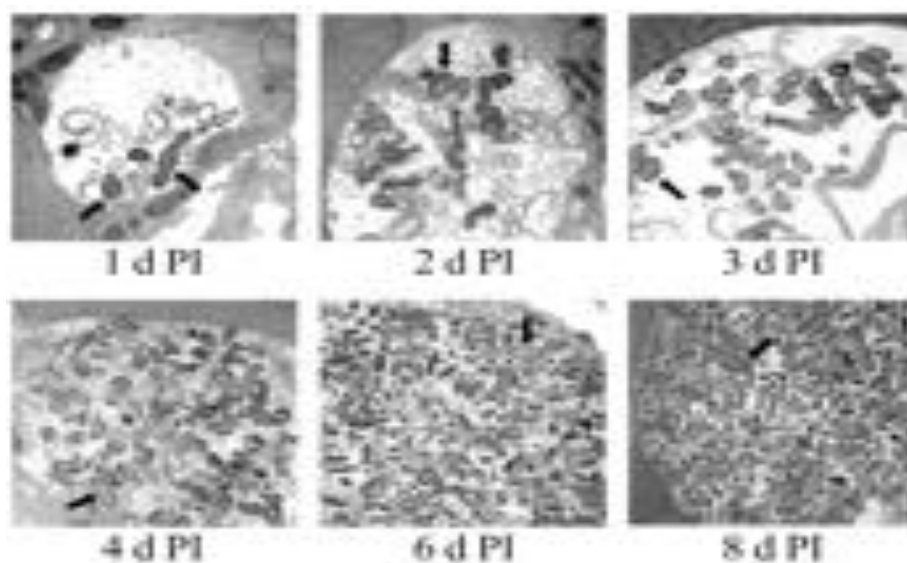
1.3 *Coxiella Burnetii* και μόλυνση κυττάρου- ξενιστή/ Ενδοκυττάριος κύκλος ζωής

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, το βακτήριο προσβάλλει τα κύτταρα- στόχους, στα οποία εισάγεται μέσω φαγοκυττάρωσης και στη συνέχεια αναπτύσσεται μέσα σε ένα κενοτόπιο [van Schaik et al, 2013]. Τα κενότοπια συνδέονται με τα λυσοσώματα, παρουσιάζοντας τα ίδια επιθετικά χαρακτηριστικά, δηλαδή όξινο pH (4,5) και αναρίθμητες λυσοσωμικές υδρολάσες. Ωστόσο, τα κύτταρα της *C. Burnetii* μπορούν τόσο να επιβιώσουν όσο και να πολλαπλασιαστούν κάτω από αυτές τις τόσο αντίξοες συνθήκες [Moffatt et al, 2015], πράγμα που κάνει τον μικροοργανισμό ιδιαίτερα επικίνδυνο. Στην πραγματικότητα, η *Coxiella* είναι το μόνο γνωστό ενδοκυττάριο βακτήριο που μπορεί να επιβιώνει και να αναπτύσσεται μέσα σε ένα σχηματισμένο φαγολυσώμα [Voth και Heinzen, 2007].

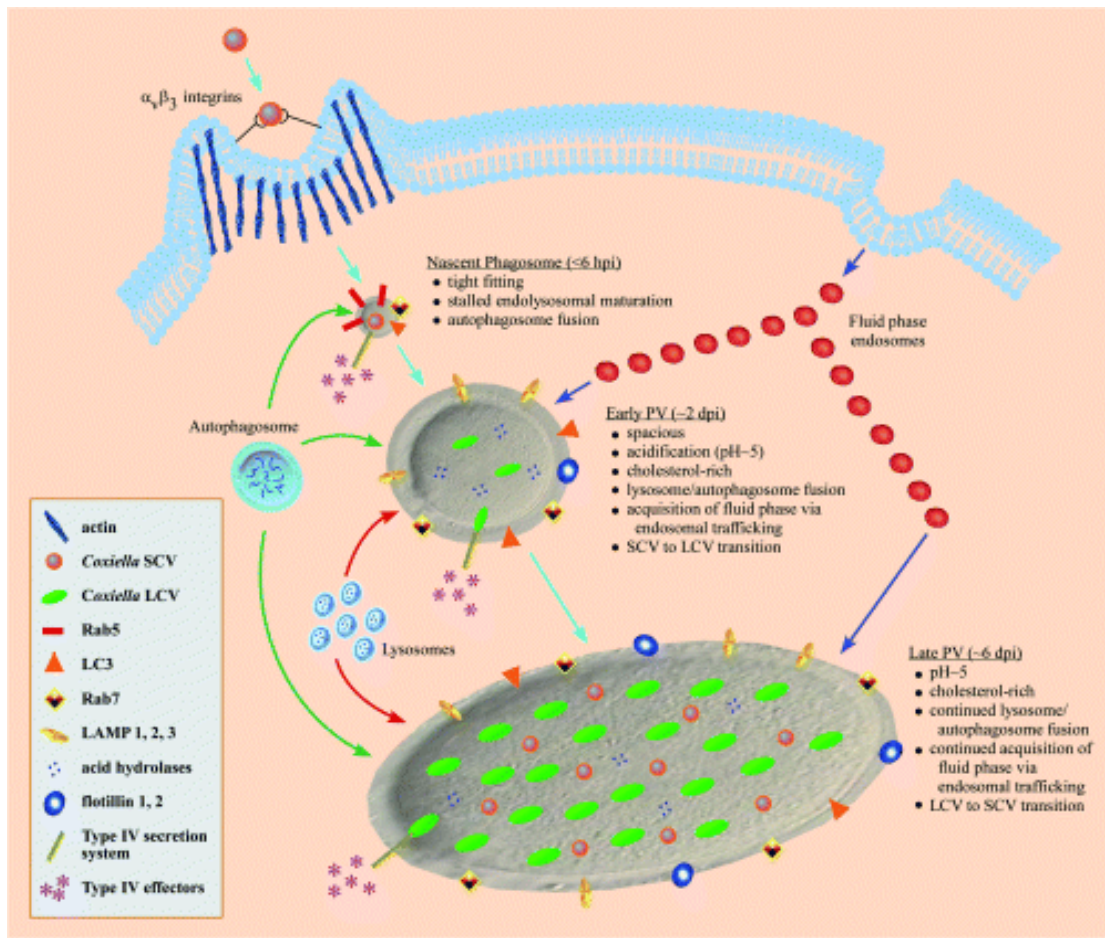
Η ικανότητα αυτή του βακτηρίου οφείλεται στην αντοχή που παρουσιάζει στα υδρολυτικά ένζυμα και στις πολύ χαμηλές τιμές pH. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι, σχεδόν τα 2/3 των γονιδίων της *C. Burnetii* απαιτούν όξινο περιβάλλον προκειμένου να εκφραστούν [Seshadri et al, 2003] ενώ το 60% του θεωρητικού πρωτεόματος της *Coxiella Burnetii* παρουσιάζει για όλες τις προβλεπόμενες πρωτεΐνες pI κοντά στο 8,25 ενώ το 45% των πρωτεϊνών προβλέπεται να έχει τιμή pI πάνω από 9. Αυτό δείχνει πως, ο βασικός χαρακτήρας του πρωτεόματος ενδέχεται να προσφέρει προστασία ενάντια του όξινο λυσοσωμικού περιβάλλοντος.

Αρχικά, τα SCV προσδένονται στην επιφάνεια του κυττάρου- ξενιστή, μέσω άγνωστου υποδοχέα, προκαλώντας την αναδιοργάνωση της ακτινής στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα την εγκόλπωσή τους και τη δημιουργία του φαγοσώματος. Στη συνέχεια, η ωρίμανση του φαγοσώματος διακόπτεται σε αυτή τη φάση, προκειμένου να αποκτήσει τους απαραίτητους δείκτες κυρίως από τα πρώιμα ενδοκυττάρια (δείκτης Rab 5), τα ώριμα ενδοκυττάρια (δείκτης Rab 7) και τα αυτοφαγώματα (δείκτης LC3). Η προσέλκυση αυτών των δεικτών είναι απαραίτητη για την περαιτέρω απόκτηση των λυσοσωμικών δεικτών, που θα δώσουν στο PV όξινο pH και υδρολυτικά ένζυμα. Η κατάσταση αυτή επέρχεται δύο μέρες μετά την μόλυνση

και συνοδεύεται από την εκθετική φάση ανάπτυξης της *Coxiella*. Στο σημείο αυτό, το παρασιτοφόρο κενοτόπιο έχει λυσοσωμικά χαρακτηριστικά ενώ στην επιφάνειά του φέρει τους νέους λυσοσωμικούς δείκτες, LAMP 1, 2 και 3, διατηρεί τους παλιούς LC3 και Rab 7, ενώ απουσιάζει ο Rab 5. Το ώριμο πλέον κυστίδιο συνεχίζει να αναπτύσσεται μέσω ροής κυστιδίων από το αυτοφαγοσωμικό και ενδοκυστιδιακό σύστημα, ώστε να καταλάβει όλο το κυτταρόπλασμα του κυττάρου- ξενιστή, μπαίνοντας τότε στη στατική φάση ανάπτυξης.



Εικόνα 1.2: Στάδια ωρίμανσης του παρασιτοφόρου κενοτοπίου (PV) της *Coxiella Burnetii* σε κύτταρα VERO. Στο αρχικό στάδιο της μόλυνσης (1dpi-2dpi) το μέγεθος του φαγοσώματος είναι μικρό και περιέχει χαμηλό αριθμό βακτηρίων. Με την πάροδο του χρόνου όμως (3dpi- 6dpi) ο αριθμός των βακτηρίων στο εσωτερικό του φαγοσώματος αυξάνεται σημαντικά, έτσι ώστε την ημέρα 6 το παρασιτοφόρο κενοτόπιο να καταλαμβάνει σχεδόν όλη την έκταση του κυττάρου. Στο σημείο αυτό αρχίζουν να επανεμφανίζονται τα SCV ενώ την 8dpi, αυτά αποτελούν την κυρίαρχη μορφή της στατικής φάσης. Τα SCV και τα LCV παρουσιάζονται με λευκά και μαύρα βέλη αντίστοιχα. [Coleman et al, 2004].

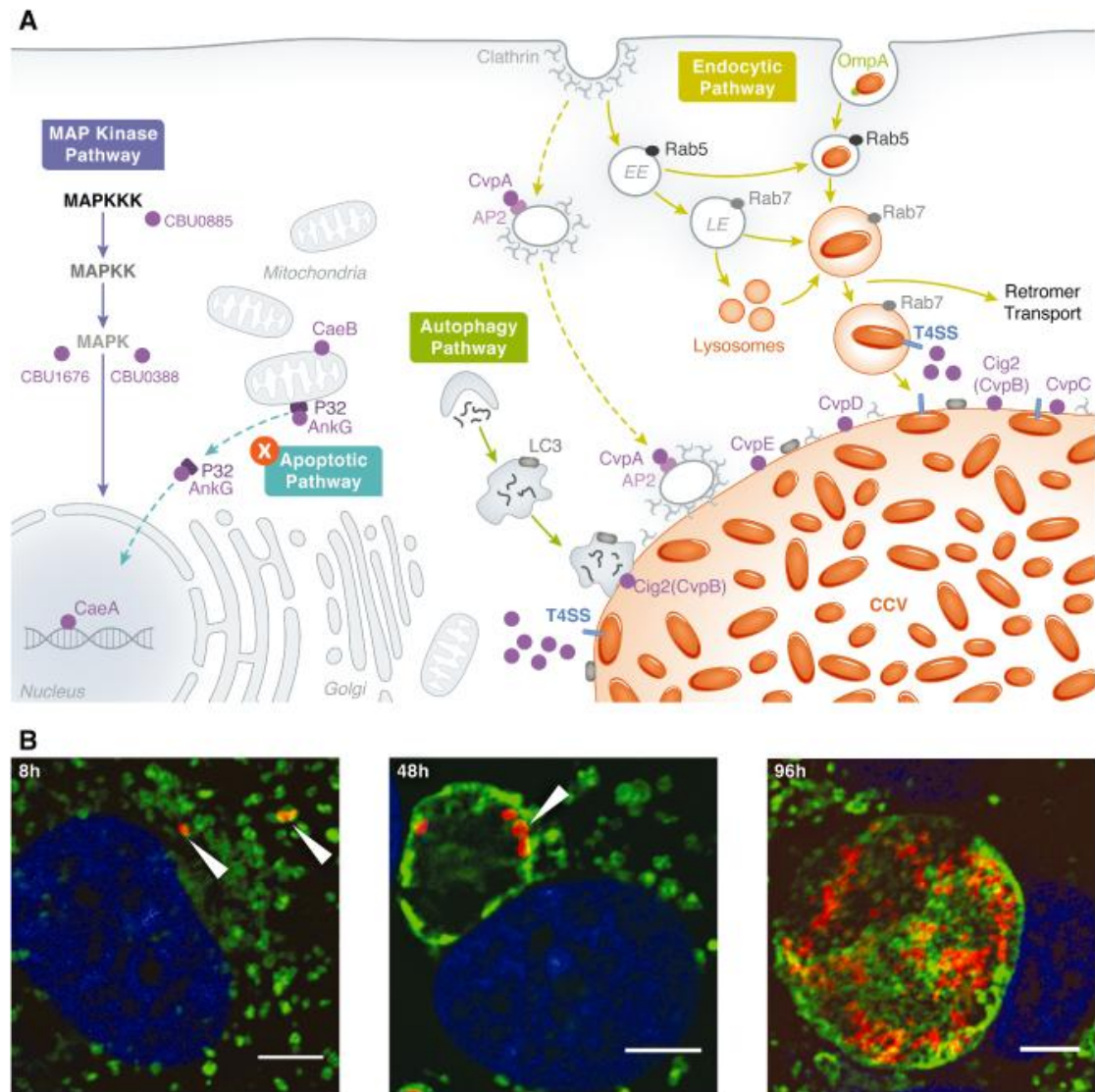


Πολλά ενδοκυττάρια βακτήρια χρησιμοποιούν ως μηχανισμό παθογένειας την έκκριση πρωτεϊνικών μορίων- τελεστών προς το περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή, προκειμένου να εξασφαλίσουν την εγκαθίδρυσή τους μέσα σε αυτό, διαφοροποιώντας τις λειτουργίες του. Υπάρχει η θεώρηση ότι, η έκφραση πρωτεϊνών από την *C. Burnetii*, είναι συνεχής και απαραίτητη σε όλα τα στάδια ωρίμανσης του φαγολυσοσώματος και ουσιαστικά αντικατοπτρίζει την ανάγκη για έκφραση και έκκριση πρωτεϊνών- τελεστών έξω από το βακτηριακό κύτταρο [Voth και Heinzen, 2007], [Moffat et al, 2015]. Σε γενικές γραμμές, τα εκκριτικά συστήματα υπάρχουν στα βακτήρια για την μεταφορά ουσιών από το ένα βακτηριακό κύτταρο στο άλλο, όμως πολλές φορές παθογόνοι μικροοργανισμοί τα χρησιμοποιούν για την έκκριση λοιμογόνων παραγόντων. Ένα τέτοιο εκκριτικό σύστημα, που χρησιμοποιείται σαν μηχανισμός παθογένειας είναι το T4SS, το οποίο φέρεται από το ενδοκυττάριο βακτήριο *Legionella Pneumophila*, στενό συγγενή της *C. Burnetii*. Αυτό το σύστημα έκκρισης έχει την ικανότητα να μετατοπίζει βακτηριακές πρωτεΐνες –τελεστές από το βακτηριακό κυτοσόλιο απευθείας

μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου- ξενιστή, διασχίζοντας τόσο τις βακτηριακές όσο και τις κενοτοπικές μεμβράνες [Moffat et al, 2015]. Μάλιστα, το 1998, δύο ερευνητικές ομάδες, οι Segal et al και Vogel et al, εντόπισαν ομάδες γονιδίων του εκκριτικού συστήματος Dot/Icm, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προώθηση του ενδοκυττάρου πολλαπλασιασμού αλλά και για την επίλυση προβλημάτων στην διακίνηση των οργανιδίων. Πράγματι, απουσία ενός λειτουργικού συστήματος Dot / Icm, η *L. pneumophila* είναι μη λοιμογόνα και ανίκανη να σχηματίσει το κενοτόπιο προκειμένου να αποφύγει την επίθεση του λυσοσώματος [Moffat et al, 2015].

Η μελέτη των Moffat et al, αναφέρει ότι στην περίπτωση της *C. burnetii*, το εκκριτικό σύστημα Dot/Icm είναι απαραίτητο για την ενδοκυττάρια αντιγραφή του βακτηρίου, όμως διαγραφές σε συγκεκριμένα γονίδια δεν παρεμποδίζουν τη βιωσιμότητά του μέσα στο λυσόσωμα. Αρχικά, μερικές ώρες μετά την μόλυνση του κυττάρου- ξενιστή από τον παθογόνο, ξεκινά η μεταφορά των εκκρινόμενων πρωτεϊνών-τελεστών. Όταν σταματά η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τους πρωτεϊνικούς δείκτες Rab 5 και Rab 7, απαραίτητων για την ενδοκυτταρική ωρίμανση του παθογόνου, σταματά και η μεταφορά των τελεστών. Έτσι λοιπόν, γίνεται φανερό πως η ενδοκυττάρια αντιγραφή της *C. burnetii* εξαρτάται άμεσα από το εκκριτικό σύστημα Dot/Icm, το οποίο ουσιαστικά αναπαράγει το λυσόσωμα του κυττάρου- ξενιστή, προκειμένου να διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό του παθογόνου [Moffat et al, 2015].

Παρακάτω φαίνεται σχηματικά η βιογένεση της *C. Burnetii* μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, σύμφωνα με τους Moffat et al.



Είκονα 1.3: Α Σχηματική αναπαράσταση της βιογένεσης της *Coxiella* μέσα σε ένα μοναδικό κενοτόπιο, προερχόμενο από το λυσόσωμα, επηρεασμένη από τη δράση των εκκρινόμενων τελεστών (μωβ χρώμα). Το βακτήριο εισάγεται στο κύτταρο του οργανισμού- ξενιστή μέσω φαγοκυττάρωσης και πιθανώς υποβοηθούμενο από την πρωτεΐνη OmpA. Το πρώιμο PV διακινείται δια μέσου της ενδοκυτταρικής οδού κατόπιν προοδευτικών αλληλεπιδράσεων με τα EE και LE. Κατά την ανάπτυξη σε ένα οξιτισμένο κενοτόπιο με χαρακτηριστικά φαγολυσοσώματος, το σύστημα έκκρισης Dot/Icm είναι ενεργοποιημένο και έχουμε πολλαπλασιασμό του LCV. Πάνω από 130 πρωτεΐνες- τελεστές μεταφέρονται μέσω του συστήματος Dot/Icm στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή ενώ στοχεύουν ειδικές διαδικασίες του ευκαρυωτικού κυττάρου, οδηγώντας στην μετατροπή του PV σε ένα ιδιαίτερα συντηξογονικά κενοτόπιο, που υποστηρίζει τη βακτηριακή αντιγραφή. Επίσης,

τα PV μπορεί να συντήκονται με σωματίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη, αυτοσωμικά και ενδοσωμικά σωματίδια, όπως επίσης και με τελεστές που μπορεί να εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες. Επιπλέον, ειδικοί τελεστές αλληλεπιδρούν με οδούς σηματοδότησης και μερικοί από αυτούς εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα, προκειμένου να δημιουργήσουν ένα ισχυρό αντι-αποπτωτικό φαινότυπο, όπως φαίνεται κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.

Το γονιδίωμα της *C. burnetii* περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται σε πολλαπλές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου ξενιστή. Μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου IV, οι πρωτεΐνες τελεστές απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου- ξενιστή για να αρχίσουν να δρουν [Voth et al, 2009]. Ο εντοπισμός τους σε διάφορα σημεία του κυττάρου- ξενιστή μπορεί να συνδεθούν με τον ρόλο τους. Έτσι, η παρουσία τους στους μικροσωληνίσκους μπορεί να συσχετισθεί με την κίνηση του παρασιτοφόρου κενοτοπίου προς την περιπυρηνική περιοχή ενώ η εντόπισή τους στην μεμβράνη του PV μπορεί να δηλώνει την συμμετοχή τους στην σύντηξη κυστιδίων με αυτό, με σκοπό την αύξηση και διατήρησή του. Τέλος, η ύπαρξη πρωτεϊνών- τελεστών στα μιτοχόνδρια μπορεί να δηλώνει την δράση τους στην απόπτωση του ξενιστή [Voth et al, 2009].

1.4 Εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS)

Τα εκκριτικά συστήματα τύπου IV υπάρχουν εξελικτικά στα βακτήρια και σχετίζονται άμεσα με την μόλυνση του ευκαρυωτικού κυττάρου ξενιστή, μεταφέροντας λοιμογόνους παράγοντες μέσα σε αυτά [Harry H. et al, 2013]. Πρωτεΐνες των παθογόνων μικροοργανισμών μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου ξενιστή, μέσω εξειδικευμένων νανομηχανών που σχηματίζονται στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων.

Το εκκριτικό σύστημα τύπου IV είναι ένα είδος μίας τέτοιας μοριακής νανομηχανής, ικανής να μεταφέρει πρωτεΐνες τελεστές απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή [Fronzes et al, 2013]. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν, ότι το εκκριτικό σύστημα διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην παθογένεση του βακτηριακού κυττάρου.

Πολλά παθογόνα βακτήρια, είτε gram θετικά είτε gram αρνητικά, χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα T4SS προκειμένου να εισάγουν πρωτεΐνες τελεστές στο κύτταρο ξενιστή. Ένα από τα παλαιότερα εκκριτικά συστήματα τύπου IV ανήκει στο βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* (σύστημα VirB), το οποίο αποτελείται από 12 πρωτεΐνες. Το βακτήριο μεταφέρει T-DNA και πρωτεΐνες τελεστές σε φυτικά κύτταρα με αποτέλεσμα να τα μολύνει. Μέσα στα ενδοκυττάρια παθογόνα βακτήρια που φέρουν το συγκεκριμένο εκκριτικό σύστημα, ανήκει τόσο η *Coxiella Burnetii* όσο και η *Legionella pneumophila*. Πρόκειται για δύο συγγενείς μικροοργανισμός στην περίπτωση των οποίων, το εκκριτικό σύστημα T4SS της *C. Burnetii* παρουσιάζει ομολογία με εκείνο της *L. pneumophila* [Kubori et al, 2014]. Μάλιστα, τα δύο αυτά παθογόνα βακτήρια είναι τα μοναδικά γνωστά μέχρι σήμερα, τα οποία χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου IVB, γνωστό και ως Icm/Dot [Segal, 2005], ονομασία η οποία προήλθε από τα αρχικά των λέξεων «Intracellular Multiplication» (ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός) και «Defect in Organelle Trafficking» (ατέλεια στη διακίνηση οργανιδίων) [Hoffman et al, 2008].

1.5 Εκκριτικό σύστημα τύπου IVB (T4BSS), Icm/Dot

Στην περίπτωση της *L. pneumophila*, τα γονίδια του συστήματος Icm/Dot μελετήθηκαν προκειμένου να γίνει γνωστή η συμμετοχή τους στην παθογένεια του μικροοργανισμού. Αντίθετα, τα γονίδια του εκκριτικού συστήματος της *C. burnetii* εντοπίστηκαν λόγω της ομολογίας τους με αυτά της *L. pneumophila*, ενώ ο ακριβής τους ρόλος στην παθογόνο δράση του βακτηρίου παραμένει υπό μελέτη.

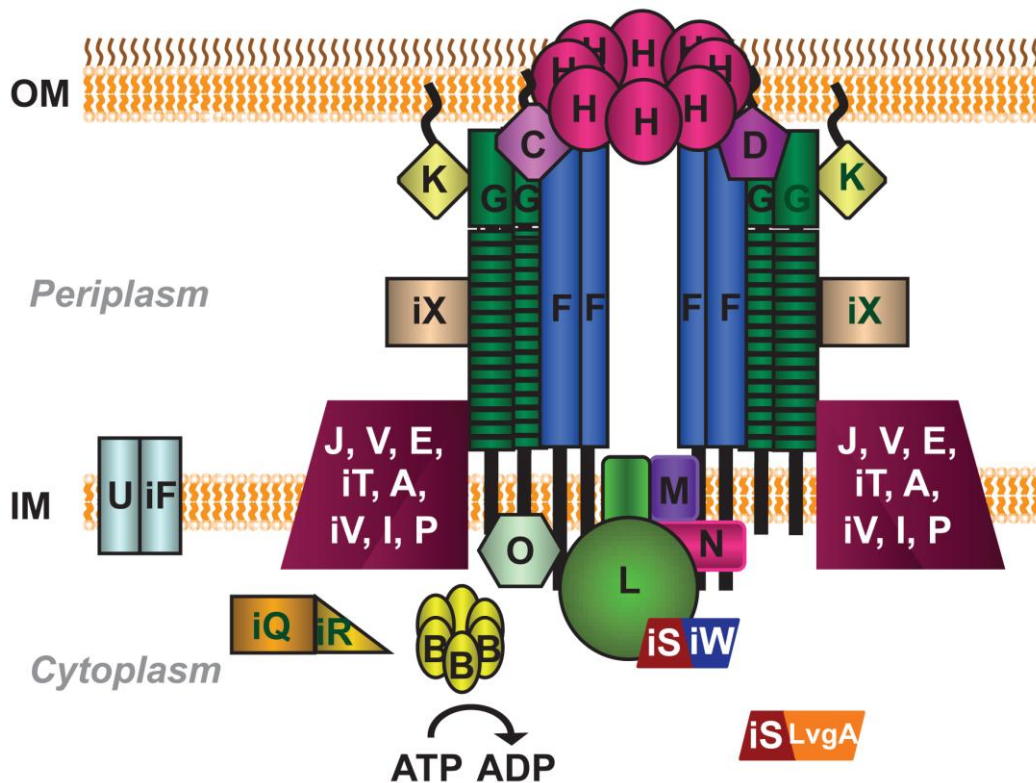
Το T4BSS της *L. pneumophila* έχει βρεθεί ότι αποτελείται από 27 πρωτεΐνες, ενώ το αντίστοιχο εκκριτικό σύστημα της *Coxiella* βρίσκεται σε μεγάλη ομολογία με αυτό, κωδικεύοντας 24 από τις 27 ομόλογες πρωτεΐνες του συστήματος Icm/Dot της *L. pneumophila* [Molly C. et al, 2013], τα γονίδια των οποίων βρίσκονται σε μία παρακείμενη περιοχή 35Kbp του χρωμοσώματος της *C. Burnetii* [Zamboni et al, 2003]. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως, οι McGrath et al, το 2003 διαπίστωσαν ότι πολλές από τις Dot/Icm πρωτεΐνες εκφράζονται κατά τη διάρκεια μόλυνσης του κυττάρου

ξενιστή και μάλιστα, η έκφρασή τους προηγείται της δημιουργίας του φαγοσώματος. Αυτό μας δείχνει ότι το εκκριτικό σύστημα είναι απαραίτητο για τον σχηματισμό του παρασιτοφόρου κενοτοπίου και την τελικά για την επιβίωση του μικροοργανισμού. Επιπλέον, άλλες έρευνες [Hoffman et al, 2008] σημειώνουν τη σπουδαία χρήση του εκκριτικού συστήματος στην ενδοκυτταρική αντιγραφή και την παρεμπόδιση του θανάτου του κυττάρου-ξενιστή.

Σύμφωνα με τους Kelsey A. et al, πολλές από τις πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου Icm/Dot της *L.pneumophila*, οργανώνονται σε δύο επιμέρους υποσύμπλοκα (subcomplexes), με διαφορετικό ρόλο το κάθε ένα. Αυτά είναι τα εξής:

- Το υποσύμπλοκο σύζευξης πρωτεϊνών τύπου IV (type IV coupling protein subcomplex), είναι σύμπλοκο της εσωτερικής μεμβράνης και αποτελείται από τις πρωτεΐνες DotL (IcmO), DotM (IcmP), DotN (IcmJ) και το ετεροδιμερές IcmS / IcmW. Ρόλος του συγκεκριμένου υποσυμπλόκου είναι η πρόσδεση των υποστρωμάτων και η μεταφορά τους στην βακτηριακή μεμβράνη, προκειμένου να απελευθερωθούν στο κυτταρόπλασμα του μακροφάγου.
- Το διαμεμβρανικό υποσύμπλοκο πυρήνα (core transmembrane subcomplex), το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες DotC, DotD, DotF(IcmG), DotG(IcmE) και την DotH(IcmK). Το συγκεκριμένο υποσύμπλοκο γεφυρώνει την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου της *L.pneumophila*. Το 2014 οι Kubori et al, έδειξαν πως το υποσύμπλοκο αυτό έχει δομή δαχτυλιδιού, διαμέτρου 40nm.

Παρακάτω, φαίνεται σχηματικά το εκκριτικό σύστημα τύπου IV της *L.pneumophila*, ομολογία με το οποίο παρουσιάζει το αντίστοιχο εκκριτικό σύστημα της *Coxiella Burnetii*.



Εικόνα 1.4: Οι πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος T4SS της *Legionella Pneumophila*. Φαίνονται οι πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης, εσωτερικής μεμβράνης και περιπλάσματος ενώ οι πρωτεΐνες Dot είναι επισημασμένες με το τελευταίο γράμμα του ονόματός τους. [Sutherland et al, 2013]

1.6 Υπομονάδες εκκριτικού συστήματος τύπου Icm/Dot

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το εκκριτικό σύστημα τύπου Icm/Dot της *L.pneumophila*, αποτελείται από 27 επιμέρους πρωτεΐνες, κάθε μία από τις οποίες συμβάλει με τον δικό της τρόπο στη δράση του παθογόνου βακτηρίου. Παρά τις εκτενείς μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με την πάροδο του χρόνου για το συγκεκριμένο σύστημα έκκρισης, μόνο υποθέσεις μπορούν να γίνουν σχετικά με τον ρόλο που διαδραματίζει η καθεμιά, στη δράση του βακτηρίου.

Αρχικά, η DotA είναι μία πολυτοπική πρωτεΐνη εσωτερικής μεμβράνης, η οποία μπορεί να διαδραματίζει τον ρόλο ικριώματος. Από την άλλη πλευρά, η DotB είναι μία κυτοπλασματική, εξαμερής πρωτεΐνη που συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη και δρα ως ATPάση, μία λειτουργία

θεμελιώδης για τη δραστηριότητα του εκκριτικού συστήματος τύπου Icm/Dot, καθώς η DotB συμπεριφέρεται σαν μοριακή αντλία εξαγωγής υποστρωμάτων δια μέσου του συστήματος έκκρισης [Hoffman et al, 2008].

Οι πρωτεΐνες DotF (IcmG) και DotG (IcmE) βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη και αλληλεπιδρούν με την DotH (IcmK) – πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης- και τις μικρές, βοηθητικές λιποπρωτεΐνες DotC και DotD, σχηματίζοντας το διαμεμβρανικό σύμπλοκο πυρήνα που αναφέρθηκε παραπάνω [Segal et al, 2005], [Kubori et al, 2014], [Hoffman et al, 2008].

- **DotF (IcmG):** Πειράματα των Kubori et al σχετικά με το υποσύμπλοκο πυρήνα, έδειξαν πως ελλείψη της πρωτεΐνης DotF, το επίπεδο της DotG (IcmE) είναι εξαιρετικά χαμηλό σε σχέση με την ποσότητα των DotC, DotD και DotH, πράγμα που αποδεικνύει τον πολύ σημαντικό ρόλο της DotF στη σύνθεση και τη σταθερότητα του λειτουργικού υποσυμπλόκου πυρήνα. Εκτός από τη συμβολή της στη δομή του διαμεμβρανικού υποσυμπλόκου πυρήνα (core transmembrane subcomplex), η πρωτεΐνη DotF (IcmG) φαίνεται να επιτελεί δύο επιπλέον εναλλακτικές λειτουργίες. Αρχικά, προτάθηκε πως η δομή της είναι ικανή να αναστείλει την σύμπτυξη της μεμβράνης, όταν εμπλέκονταν σε *in vitro* δοκιμές. Επίσης, παρατηρήθηκε μία αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα υποστρώματα του συστήματος Icm/Dot, πράγμα που σημαίνει ότι η DotF συνδέεται απευθείας με υποστρώματα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας έκκρισης. Λαμβάνοντας υπόψιν την θέση της DotF και των υποστρωμάτων, μπορούμε να πούμε πως πιθανόν η πρωτεΐνη να λειτουργεί σαν κυττοπλασματικός υποδοχέας του εκκριτικού συστήματος τύπου IV [Molly et al, 2013].
- **DotH (IcmK):** Η πρωτεΐνη DotH (IcmK) βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μαζί με την DotO (IcmB) έχουν βρεθεί στην επιφάνεια των κυττάρων της *L.pneumophila* μετά από την αλληλεπίδρασή τους με τα μακροφάγα [Lamont, 2004], πράγμα που σημαίνει πως η ύπαρξή τους έχει μεγάλη σημασία για την θανάτωσή τους. Εφόσον η έκφραση των

πρωτεϊνών αυτών σχετίζεται με την ύπαρξη μίας πορώδους δομής στην επιφάνεια των κυττάρων, καταλαβαίνουμε πως η δομή αυτή μπορεί να παίζει πολύτιμο ρόλο στη λειτουργία του συστήματος Icm/Dot [Lamont, 2004].

Επίσης, στην εργασία των Kubori et al, αποδείχθηκε πόσο σημαντικός είναι ο ρόλος της DotH στην δημιουργία του υποσυμπλόκου πυρήνα. Ελλείψη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, αλλά και των πρωτεϊνών DotC και DotD αντίστοιχα, φάνηκε πως, τα επίπεδα των υπόλοιπων πρωτεϊνών παρουσιάζουν σημαντική μείωση, με αποτέλεσμα την απώλεια του λειτουργικού συμπλόκου.

Άλλη μία περίπτωση στην οποία η DotH είναι αρκετά σημαντική, είναι η διατήρηση της σωστής δομής του εκκριτικού συστήματος Icm/Dot. Σε γενικές γραμμές, οι πρωτεΐνες DotU και IcmF είναι υπεύθυνες για την παραπάνω λειτουργία, όμως έχει δειχθεί πως απουσία αυτών των δύο, η σταθερότητα του συστήματος T4SS διαταράσσεται, μιας και χάνεται η λειτουργικότητα του υποσυμπλόκου DotF/DotG/DotH. Στην περίπτωση αυτή, η υπερέκφραση της DotH είναι αρκετή να καταστείλει την αποσταθεροποίηση του συστήματος Icm/Dot, αποκαθιστώντας τα φυσιολογικά επίπεδα των DotF και DotG. Με αυτό τον τρόπο γίνεται αντιληπτό πως η DotH κατέχει έναν βασικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του εκκριτικού συστήματος [Hoffman et al, 2008].

- **DotG (IcmE):** Η πρωτεΐνη DotG είναι περιπλασματική και βασικό συστατικό του υποσυμπλόκου πυρήνα. Μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στο γονίδιο της, έδειξαν πως το σύμπλοκο εξακολουθεί να σχηματίζεται και να λαμβάνει την μορφή δακτυλίου, η διάμετρος του οποίου όμως, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του συμπλόκου άγριου τύπου. Παρά το γεγονός σχηματισμού του συμπλόκου, αυτό παραμένει ανενεργό καθώς η DotG είναι ένας σημαντικός παράγοντας για την ενδοκυττάρια ανάπτυξη του βακτηρίου εντός ευκαρυωτικών μονοκυττάρων [Kubori et al, 2014].
- **DotC, DotD:** Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι μικρές, λιποπρωτεΐνες, αγκυροβολημένες στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, οι οποίες

παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη συγκρότηση και τη λειτουργικότητα του υποσυμπλόκου πυρήνα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η έλλειψη κάθε μίας από τις DotC, DotD και DotH, μπορεί να επιφέρει σημαντική μείωση στα επίπεδα των υπόλοιπων πρωτεϊνών, και τελικά μη λειτουργικό σύμπλοκο πυρήνα [Kubori et al, 2014].

Πέρα από τις προαναφερθείσες, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός Icm/Dot πρωτεϊνών, οι οποίες φαίνεται να είναι, οι περισσότερες, εσωτερικής μεμβράνης. Μέσα σε αυτές βρίσκεται και η DotL, πρωτεΐνη σύζευξης τύπου IV η οποία είναι πολύ πιθανό να αποτελεί τον T4SS υποδοχέα για τα κυτταροπλασματικά υποστρώματα [Hoffman et al, 2008].

Συνοψίζοντας, μπορούμε να πούμε πως η πολυπλοκότητα του εκκριτικού συστήματος Icm/Dot είναι εμφανής, ειδικότερα στον τρόπο σχηματισμού και λειτουργίας του υποσυμπλόκου πυρήνα (core transmembrane complex). Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει αρκετές μελέτες πάνω στον τομέα αυτό, πολλές από τις λειτουργίες των επιμέρους υπομονάδων παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες. Μελλοντικές εργασίες σχετικά με τη δομή των πρωτεϊνών αλλά και τον τρόπο έκκρισης των τελεστών, θα μπορέσουν να ρίξουν περισσότερο φως στην παθογένεια του βακτηρίου.

1.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του βακτηρίου σε πρωτεϊνικό επίπεδο, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη λειτουργική δομή και τη δράση των μεμβρανικών πρωτεϊνών IcmE, IcmK, των λιποπρωτεϊνών DotC και DotD αλλά και του υπο-συμπλόκου πυρήνα. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, χρειάστηκε να κλωνοποιηθούν τα αντίστοιχα γονίδια, να μελετηθούν οι συνθήκες έκφρασης και απομόνωσης των παραπάνω πρωτεϊνών, να διεξαχθεί ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας και να μελετηθούν με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. Η έρευνα πάνω στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, μπορεί να έχει πιθανές εφαρμογές στην Ιατρική, δεδομένου ότι αυτές αποτελούν μόρια- στόχους για τη δημιουργία φαρμάκων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου

2.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία *in vitro* διαδικασία που σκοπό έχει τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA με τη χρήση της DNA- πολυμεράσης στο εργαστήριο. Για την PCR είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός των εκκινητών (primers), ολιγονουκλεοτιδίων που είναι συμπληρωματικά στα άκρα του δίκλωνου DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί.

Η PCR αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια τα οποία συντελούν έναν πλήρη κύκλο, στον οποίον η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Τα στάδια αυτά είναι τα εξής:

1) Αποδιάταξη του DNA (denaturation): Λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (94°C- 98°C) έτσι ώστε να επιτευχθεί η αποδιάταξη της διπλής έλικας.

2) Προσαρμογή των εκκινητών (Annealing): Λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερη θερμοκρασία (50° C- 65° C) και επιτρέπει την εισαγωγή των εκκινητών, με τη δημιουργία ιοντικών δεσμών με την μονόκλωνη μήτρα. Στο νεοσύστατο, μικρό δίκλωνο τμήμα DNA ανακάθεται η DNA- πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση.

3) Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension): Λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 75°C- 80°C και η διάρκειά του εξαρτάται από το μέγεθος του DNA, δεδομένου πως η DNA πολυμεράση τοποθετεί 1.000 βάσεις ανά 15-30sec.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους θερμοκυκλωτές (thermal cycler) και στην παρούσα εργασία έγινε χρήση του θερμοκυκλωτή της Biometra.

Αντίδραση πολυμεράσης:

- 44μL Mastermix (διάλυμα που αποτελείται από dNTPs, phusion DNA polymerase, MgCl₂, ddH₂O)

- 2,5μL primer Fw (10pmol/μL)
- 2,5μL primer Rev (10pmol/μL)
- 1μL cDNA

Τελικός όγκος: 50μL.

Τα βήματα της PCR που λαμβάνουν χώρα, παρουσιάζονται παρακάτω:

- 1) 94°C (3min): αποδιάταξη
- 2) 94°C (40sec): αποδιάταξη
- 3) 56°C (30sec): υβριδισμός
- 4) 72° C (15-30sec/kb): πολυμερισμός
- 5) Επανάληψη βημάτων 2-4 για 30 φορές
- 6) 72°C (5min): πολυμερισμός
- 7) 4°C : διατήρηση

Εκκινητές (Primers):

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')	
DotD	CD- strep_Fw	CCCGCAGTTCGAAAAATAAGCTTGGCACTGGCCGT CGTTTTAC
	D-strep_rev	TGGCTCCAAGCGCTACTCGGATAATAACGTAGCTC AATGATC
DotC	CD- strep_Fw	CCCGCAGTTCGAAAAATAAGCTTGGCACTGGCCGT CGTTTTAC
	C-strep_rev	TGGCTCCAAGCGCTTGGCGAACTAGCCCCATCCGT CAAACG
IcmK	K-DelHis-F	AGTAAAGTGAGAAAGATGGTGATTC
	EGK- DelHis-R	CATCGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG
IcmE	E-DelHis-F	AAGGGTTGTAAAATGGCAGAGTTTTTC
	EGK- DelHis-R	CATCGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG

Πίνακας 2.1: Αλληλουχία εκκινητών για τις αντιδράσεις PCR.

2.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία τεχνική που επιτρέπει τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων με βάση το μοριακό τους βάρος. Ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται κατά μήκος ενός πηκτώματος αγαρόζης και τα νουκλεϊκά οξέα κινούνται προς τον θετικό πόλο, μιας και φέρουν αρνητικό φορτίο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή επωάζεται σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, και παρουσιάζει φθορισμό στην υπεριώδη ακτινοβολία. Με τον τρόπο αυτό, είναι εύκολο να διακριθούν οι ζώνες DNA σε συσκευή με UV light.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Υλικά:

- 50x TAE Buffer
 - 2M Tris acetate
 - 0,05M EDTA
 - ρύθμιση pH στο 8,2- 8,4
- Αγαρόζη σε μορφή σκόνης

Διάλυμα καθόδου

- TAE Buffer (1x)

Πειραματική πορεία:

Παρασκευάζεται διάλυμα αγαρόζης 1,5%w/v σε ρυθμιστικό TAE 50x. Το μείγμα θερμαίνεται στον φούρνο μικροκυμάτων για 2 περίπου λεπτά, μέχρι να διαλυθεί όλη η ποσότητα της αγαρόζης. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται χτενάκι, το οποίο δημιουργεί τις θέσεις για το φόρτωμα των δειγμάτων. Μόλις η πηκτή πολυμεριστεί, το χτενάκι απομακρύνεται και τα δείγματα φορτώνονται, αφού πρώτα έχει προστεθεί σε αυτά αντίστοιχη ποσότητα 6x gel loading buffer. Η συσκευή

συνδέεται στο τροφοδοτικό και η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα στα 150V για περίπου 1 ώρα.

2.1.3 Αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation)

Το ένζυμο T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μίας 5' φωσφορικής ομάδας και μίας 3' ομάδας -OH, μεταξύ δύο δίκλωνων άκρων DNA, με αποτέλεσμα τη συνένωσή τους.

Η ποσότητα των μορίων DNA που συμμετέχουν στην αντίδραση μοριακής συγκόλλησης υπολογίζεται με τον εξής τύπο:

$ng \text{ φορέα} \times bp \text{ insert} = ng \text{ insert} \times bp \text{ φορέα}$

Η αναλογία φορέα:insert είναι ίση με 1:3.

- x μL insert
- y μL φορέα
- 1,5 μL ligase Buffer (10x)
- 1 μL T4 ligase
- 0,75 μL ATP
- ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 15 μL

Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30min και μετά για 15min στους 70°C. Το προϊόν της αντίδρασης είναι έτοιμο για μετασχηματισμό σε επιδεκτικά (competent) κύτταρα, DH₅α. Τα αντίστοιχα πλασμίδια βρίσκονται στο παράρτημα της εργασίας.

2.1.4 Περιοριστική πέψη

Στο μόριο του DNA υπάρχουν αλληλουχίες οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν και να διασπαστούν από συγκεκριμένα περιοριστικά ένζυμα. Αυτό δίνει την δυνατότητα να γίνει ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μετά από μετασχηματισμό ή για την προετοιμασία φορέων και ενθετών για την μεταξύ τους συγκόλληση (ligation).

Το περιοριστικό ένζυμο εξαρτάται από την αλληλουχία πέψης που φέρει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και η ποσότητά, υπακούει στον κανόνα, σύμφωνα με τον οποίο, μία μονάδα περιοριστικού ενζύμου (1unit) είναι η ποσότητα που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1μgr DNA στους 37°C, σε 1 ώρα.

Για να ελεγχθεί η εισαγωγή ή όχι του ενθέματος στον φορέα, η αντίδραση περιέχει:

- 0,5-1μgr/μL DNA
- 1μL buffer, κατάλληλο για το ένζυμο (10x)
- 1μL περιοριστικού ενζύμου (10U/μL)
- ddH₂O , μέχρι τελικό όγκο 10μL

Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 15-20min, εκτός αν το ένζυμο απαιτεί άλλες συνθήκες.

2.2 Αναλυτικές τεχνικές

2.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού για καλλιέργειες

Υλικά

- Αντιβιοτικό stock carbenicillin 50mg/mL (σε 50% γλυκερόλη)
- Tryptone
- NaCl
- Yeast Extract
- Agar
- Απιονισμένο νερό
- Τρυβλία Petri
- Κλίβανος αποστείρωσης

Πειραματική πορεία

Θρεπτικό υλικό LB (Luria Broth)- 1L

- 10gr Tryptone
- 5gr Yeast extract

- 10gr NaCl
- 15 gr Agar (χρησιμοποιείται μόνο για τις στερεές καλλιέργειες)

Για την προετοιμασία του υγρού θρεπτικού υλικού LB, διαλύουμε όλες τις στερεές ουσίες σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 7, με την προσθήκη της αντίστοιχης βάσης. Ογκομετρούμε στον επιθυμητό όγκο και τέλος αποστειρώνουμε το θρεπτικό υλικό σε κλίβανο αποστείρωσης, στους 120° C.

Για την προετοιμασία της στερεής καλλιέργειας, χρησιμοποιούμε 100mL από αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό, LB + agar (αφού έχει έλθει σε θερμοκρασία δωματίου), στο οποίο προσθέτουμε το αντιβιοτικό carbenicillin, σε τελική συγκέντρωση 50μgr/mL (αναλογία 1:1000). Το stock του αντιβιοτικού φυλάσσεται στους -20° C και προκειμένου να χρησιμοποιηθεί μεταφέρεται και διατηρείται σε πάγο. Στη συνέχεια, το θρεπτικό αναδεύεται ελαφρά και μοιράζεται στα τρυβλία, καθένα από τα οποία χωράει περίπου 25mL. Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου να πήξει το θρεπτικό και τέλος φυλάσσονται στους 4° C.

Θρεπτικό υλικό 2yt- 1L

- 16gr Tryptone
- 10gr Yeast extract
- 5 gr NaCl

Για την προετοιμασία του υγρού θρεπτικού υλικού 2yt, διαλύουμε όλες τις στερεές ουσίες σε απιονισμένο νερό και στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 7, με την προσθήκη της αντίστοιχης βάσης. Ογκομετρούμε στον επιθυμητό όγκο και τέλος αποστειρώνουμε το θρεπτικό υλικό σε κλίβανο αποστείρωσης, στους 120° C.

2.2 .2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε κατάλληλα επεξεργασμένα Competent cells έγινε με την μέθοδο του θερμικού σοκ. Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην βαθμιαία διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Η υψηλή θερμοκρασία δημιουργεί

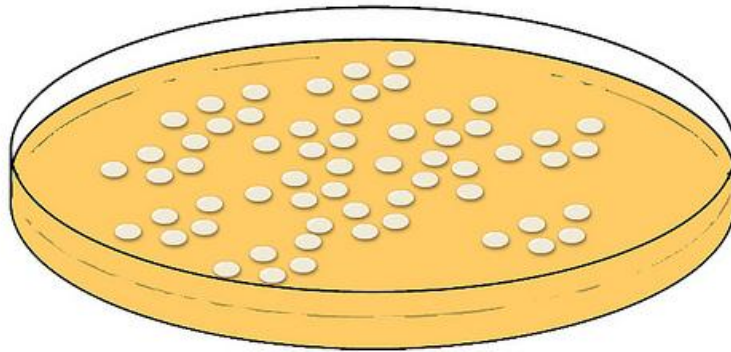
πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίοι επιτρέπουν στο ξένο DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Στη συνέχεια, η μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στην επαναφορά του κυτταρικού τοιχώματος, κλείνοντας του πόρους που έχουν δημιουργηθεί. [Guisbert E et al, 2008]

Υλικά

- Competent cells C₄₃(DE₃)
- Πλασμιδιακό DNA
- SOC Medium
- Τρυβλίο στερεής καλλιέργειας με 50μgr/mL

Πειραματική πορεία

50μL κυττάρων C₄₃(DE₃) μεταφέρονται από τους -80° C στον πάγο. Για τον μετασχηματισμό, προσθέτονται 0,5μ L πλασμιδιακού DNA και ακολουθεί επώσαση στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το erpedorf που περιέχει τα κύτταρα και το πλασμιδίο, επωάζεται για 1,5 λεπτό στους 42° C και κατόπιν ξανά στον πάγο για 10 λεπτά. Προστίθεται 1mL SOC Medium και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37° C υπό ανάδευση (220rpm). Μετά το πέρας της μίας ώρας, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 5000rpm έτσι ώστε να πέσουν ως ίζημα. Στη συνέχεια αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκειμένου και το pellet επαναδιασπείρεται σε αυτό που έχει απομείνει (περίπου 80μ L). Τέλος, τα μετασχηματισμένα κύτταρα διασπείρεται με τη βοήθεια μίας γυάλινης ράβδου σε τρυβλίο με στερεή καλλιέργεια που περιέχει την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού. Το τρυβλίο επωάζεται αναστρεμένο στους 37° C ολονύκτια. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως, εφόσον το τρυβλίο περιέχει αντιβιοτικό, θα επιβιώσουν μόνο τα κύτταρα εκείνα που έχουν λάβει το πλασμιδίο, το οποίο φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (carbenicillin). Μετά το πέρας της ολονύκτιας επώασης θα έχουν σχηματιστεί αποικίες στο τρυβλίο.



Εικόνα 2.1: Τρυβλίο στερεού θρεπτικού υλικού με αποικίες βακτηρίων.

Καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας, τηρούνται αποστειρωμένες συνθήκες με τη χρήση φλόγας και 80% αιθανόλης.

2.2.3 Καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων βακτηριακών κυττάρων E. Coli χρησιμοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες δύο τύπων. Αρχικά καλλιέργεια μικρής κλίμακας (100mL) για δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης και στη συνέχεια μεγάλης κλίμακας (2L, 5L, 12L) για την υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Υλικά

- Αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB
- Carbenicillin stock 50mg/mL (σε 50% γλυκερόλη)
- 1 αποικία ανασυνδυασμένων κυττάρων από το τρυβλίο
- Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες υγρών καλλιιεργειών
- Αποστειρωμένα falkon των 15mL και των 50mL

Πειραματική διαδικασία

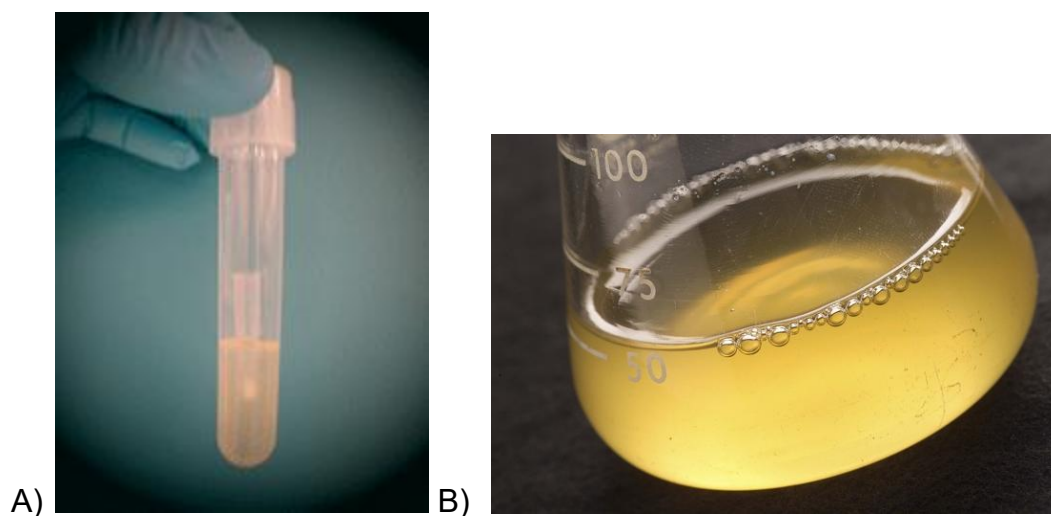
Προκαλλιέργεια:

Αρχικά, το αντιβιοτικό μεταφέρεται από τους -20° C στον πάγο όπου και διατηρείται μέχρι να ολοκληρωθεί η χρήση του. Με τη χρήση φλόγας γίνεται η

ασηπτική μεταφορά 3mL θρεπτικού υλικού σε αποστειρωμένα φιαλίδια (falkon) των 15mL (ή των 50mL αν πρόκειται για προκαλλιέργεια που θα χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας). Στη συνέχεια προστίθεται το αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL και μία μεμονωμένη αποικία από το τρυβλίο εμβολιάζεται στο falkon με το θρεπτικό υλικό. Οι υγρές προκαλλιέργειες επωάζονται ολονύκτια στους 37° C υπό ανάδευση (220rpm).

Καλλιέργεια:

Το θρεπτικό υλικό έχει αποστειρωθεί μέσα στις κατάλληλες φιάλες, και αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτό κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 50μg/mL. Έπειτα, εμβολιάζεται με την προκαλλιέργεια βακτηρίων που έχει επωαστεί ολονύκτια στους 37° C. Οι καλλιέργειες επωάζονται στην κατάλληλη θερμοκρασία μέχρι η απορρόφηση στα 600nm (OD₆₀₀) να είναι κοντά στο 0,5, τιμή που αντιστοιχεί στην εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 2.2: A) Ολονύχτια προκαλλιέργεια των 3mL. B) Καλλιέργεια μικρής κλίμακας των 50mL.

2.2.4 Επαγωγή έκφρασης πρωτεΐνης

Η επαγωγή έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιείται με την προσθήκη IPTG, ουσία η οποία αποτελεί ένωση – μιμητή της λακτόζης. Απουσία λακτόζης στο κύτταρο, ο καταστολέας lac προσδένεται ισχυρά στον προαγωγέα του γονιδίου, με αποτέλεσμα η RNA- πολυμέραση να μην μπορεί να προσδεθεί και να αποτρέπεται με αυτό τον τρόπο η έκφραση της πρωτεΐνης. Όταν στο περιβάλλον του βακτηρίου βρεθεί ο IPTG που δομικά μοιάζει με την λακτόζη, τότε προσδένεται στον καταστολέα, αλλάζοντας τη διαμόρφωσή του. Με τον τρόπο αυτό, αφήνει ελεύθερο τον προαγωγέα και η RNA- πολυμεράση μπορεί πλέον να πραγματοποιήσει την έκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Υλικά

- IPTG, 1M
- Βακτηριακή καλλιέργεια ($OD_{600} = 0,5$)

Πειραματική πορεία

Stock διάλυμα IPTG, 1M παρασκευάζεται με τη χρήση αποστειρωμένου, απιονισμένου νερού και φυλάσσεται στους $-20^{\circ}C$. Λίγο πριν τη χρήση, βγαίνει από τους $-20^{\circ}C$ και διατηρείται στον πάγο. Όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600nm είναι 0,5, γίνεται επαγωγή με την προσθήκη ποσότητας IPTG (τελική συγκέντρωση 0,02mM - 1mM ανάλογα την πρωτεΐνη που θέλουμε να εκφραστεί) και ακολουθεί επώαση στην επιθυμητή θερμοκρασία υπό αναδύση (από 3 μέχρι 8 ώρες ανάλογα την πρωτεΐνη).

2.2.5 Συλλογή κυττάρων

Μετά το πέρας του επιθυμητού χρόνου επώασης της καλλιέργειας, γίνεται η συλλογή των κυττάρων στην φυγόκεντρο Avanti J-26XP της Beckman. Οι καλλιέργειες μεταφέρονται σε tube φυγοκέντρισης χωρητικότητας 1L και φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά στα 6.500 rpm στους $4^{\circ}C$. Κατόπιν, το ίζημα των κυττάρων, συλλέγεται σε αποστειρωμένα falkon των 50mL και αφού ζυγιστούν φυλάσσονται στους $-20^{\circ}C$.

2.2.6 Λύση κυττάρων

Υλικά

- NaCl, 1M
- HEPES, 1M, pH= 7,5
- EDTA, 0,5M
- PMSF, 200mM – αναστολέας πρωτεασών
- DNAase

Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα από τους -20° C τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν σε υδατόλουτρο. Εφόσον έχουν ζυγιστεί, προσθέτουμε σε αυτά όγκο ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (Lysis Buffer: 300mM NaCl, 20mM HEPES και 1mM EDTA), ίσο με το 6πλάσιο της μάζας τους. Τα κύτταρα επαναδιασπείρονται και ομογενοποιούνται στο ρυθμιστικό, ενώ λίγο πριν την θραύση τους προστίθεται σε αυτά 1mM PMSF και λίγα mgr DNAάσης.

Θραύση κυττάρων με τη χρήση French Press

Η French Press είναι ένα μηχανικό εργαλείο που σκοπό έχει τη θραύση κυττάρων, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, το βιολογικό δείγμα κυττάρων εισάγεται μέσα σε μία στένη κοιλότητα. Στη συνέχεια, η πρέσσα μέσω μίας υδραυλικής αντλίας οδηγεί ένα έμβολο μέσα στην κοιλότητα με σκοπό την αύξηση της πίεσης και την μηχανική σύνθλιψη των κυττάρων. Έπειτα, το δείγμα σε υγρή μορφή οδηγείται δια μέσου μιας στενής βαλβίδας, απ'όπου και συλλέγεται [Vaderheiden et al, 1970].

Όλα τα επιμέρους εξαρτήματα της French Press είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ασάλι, ενώ διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (4° C) προκειμένου να διατηρούνται οι ιδανικές συνθήκες για τη σωστή μεταχείριση των κυττάρων.

2.2.7 Φυγοκέντριση- συλλογή μεμβρανών

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας θραύσης των κυττάρων, πραγματοποιείται φυγοκέντριση (12.000rpm, 50 λεπτά, 4° C) προκειμένου να διαχωριστούν τα σπασμένα (υπερκείμενο) από τα άσπαστα κύτταρα (ίζημα). Το υπερκείμενο σύλλεγεται και υφίσταται υπερφυγοκέντριση (45.000rpm, ρότορας τύπου 45Ti, 1 ώρα και 30 λεπτά, 4° C) και γίνεται συλλογή του

ίζηματος. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιασπείρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης, παγώνονται άμεσα σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C . Παράλληλα, κρατάται δείγμα τόσο από τις μεμβράνες όσο και από το υδατοδιαλυτό κομμάτι (υπερκείμενο υπερφυγοκέντρωσης) προκειμένου να μετρηθεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση και να ελεγχθεί η έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών.

2.2.8 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία κάτω από όξινες συνθήκες έχει κόκκινο χρώμα. Όταν η χρωστική αυτή έρθει σε επαφή με πρωτεΐνη, δημιουργεί σύμπλοκο και το χρώμα της μεταβάλλεται από ερυθρό σε κυανό, παρουσιάζοντας και αντίστοιχη απορρόφηση στα 595nm , στα οποία γίνεται και η μέτρηση του δείγματος. Γνωρίζοντας την απορρόφηση, μπορούμε να μετρήσουμε την πρωτεϊνική συγκέντρωση, αφού τα δύο αυτά μεγέθη συνδέονται γραμμικά. Κάνοντας χρήση μίας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η γραμμική αυτή σχέση μπορεί να προσδιοριστεί και έτσι να βρεθεί η άγνωστη πρωτεϊνική συγκέντρωση στο δείγμα.

Υλικά

- Αντιδραστήριο Bradford
- Ρυθμιστικό διάλυμα (300mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM EDTA)

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιούμε eppendorf του 1,5mL. Για το τυφλό, τοποθετούμε 100μL ρυθμιστικού και προσθέτουμε 900μL διαλύματος Bradford (τελικός όγκος δειγμάτων: 1mL). Τα άγνωστα δείγματα είναι οι μεμβράνες και το υπερκείμενο. Σε αυτά πραγματοποιούμε 2 διαδοχικές αραιώσεις (1:20, 1:40) και προσθέτουμε πόσότητα πρωτεΐνης (5μL – 10μL) στο φιαλίδιο eppendorf. Στη συνέχεια συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα μέχρι τα 100μL και τέλος προστίθενται 900μL του αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα αναδεύονται ελαφρώς και αφού η απορρόφηση στα

595nm μηδενιστεί μέσω του τυφλού, μετρώνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων άγνωστης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης.

2.2.9 Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο BCA

Η μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα δείγμα με την μέθοδο BCA βασίζεται σε δύο αντιδράσεις αναγωγής, που εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Το διάλυμα BCA που προστίθεται στα υπό μελέτη δείγματα, αποτελείται από διάλυμα δικιγχονινικού οξέος (Bicinchoninic acid) και διάλυμα θειϊκού χαλκού σε αναλογία 50:1. Όταν αυτό βρεθεί μέσα στο πρωτεϊνικό δείγμα, οι πεπτιδικοί δέσμοι ανάγουν τα μόρια χαλκού από Cu^{+2} σε Cu^{+} (η αντίδραση αυτή απαιτεί θερμοκρασία 37°C). Στη συνέχεια, δύο μόρια δικιγχονινικού οξέος σχηματίζουν σύμπλοκο με τον Cu^{+} με αποτέλεσμα προϊόν έντονου μωβ χρώματος, το οποίο απορροφά στα 562nm [Smith et al, 1985].

Η ποσότητα πρωτεΐνης που υπάρχει στο υπό μελέτη διάλυμα μπορεί να προσδιοριστεί με τη χρήση πρότυπης καμπύλης απορρόφησης.

Υλικά:

- Δικιγχονικό οξύ (Bicinchoninic acid)
- Θειϊκός χαλκός
- Ρυθμιστικό διάλυμα (300mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM EDTA)

Τα δείγματα προετοιμάζονται με αντίστοιχο τρόπο όπως στην μέθοδο Bradford και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C . Κατόπιν, λαμβάνεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 562nm και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης υπολογίζεται με τη χρήση μίας πρότυπης καμπύλης απορρόφησης.

2.2.10 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων σε ένα πήκτωμα υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των ουσιών εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο που εφαρμόζεται (κατεύθυνση κίνησης) αλλά και από το μοριακό τους βάρος (ταχύτητα κίνησης). Για πρωτεϊνικά δείγματα, ο διαχωρισμός γίνεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε αποδιατακτικές ή μη αποδιατακτικές συνθήκες. Πριν την ανάλυση, το πρωτεϊνικό δείγμα υφίσταται μία επεξεργασία κατά την οποία οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται και αποκτούν όλες το ίδιο φορτίο (αρνητικό). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η κίνηση προς μία μόνο κατεύθυνση και ο τελικός διαχωρισμός με βάση αποκλειστικά το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών και όχι το φορτίο ή το σχήμα τους.

Υλικά

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

- AB- mix buffer (49,5% T, 3%C)
- Gel Buffer (3x)
- Glycerol (100%)
- Ammonium Persulfate (APS) 10%w/v
- TEMED
- Τζαμάκια πηξίματος gel
- Βουτανόλη

Διαλύματα

Διάλυμα παρασκευής δειγμάτων (Sample Buffer), 3x

- SDS, 12%
- Glycerol, 10%
- Mercaptoethanol, 6%
- Serva blue, 0,05%
- Tris- HCl, pH= 7, 150mM

Running Buffers

- Anode Buffer, 10x

- Cathode Buffer, 10x

Διάλυμα χρώσης

- Phosphoric acid, 10%v/v
- Ammonium Sulfate, 10%w/v
- Coomassie Brilliant Blue G-250, 0,12%w/v
- Methanol, 20%

Διάλυμα αποχρωματισμού

- Acetic acid, 7%v/v
- Methanol, 5%
- Nanopure H₂O

Παρακάτω φαίνεται ένας πίνακας με τη σύσταση όλων των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ηλεκτροφόρηση.

Buffer	Tris (M)	Tricine (M)	SDS (%)	pH
Anode (10x)	1.0	-	-	8,9
Cathode (10x)	1.0	1.0	1.0	8,25
Gel Buffer (3x)	3.0	-	0,3	8,45
	Acrylamide (gr/100mL)	Bisacrylamide (gr/100mL)		
AB-mix (49,5%T, 3%C)	48	1,5		

Πίνακας 2.2: Σύσταση stock διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου- Ηλεκτροφόρηση

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που παρασκευάζεται αποτελείται από την πηκτή επιστοίβασης (Stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (Separating gel). Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο, έγκειται στην διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου που περιέχουν, πράγμα το οποίο καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής.

Σύσταση πηκτής επιστοίβασης (Stacking gel), 4%:

- 1mL AB- mix
- 4mL Gel Buffer, 3x
- H₂O για τελικό όγκο 12mL
- 90μL 10% APS
- 9μL TEMED

Σύσταση πηκτής διαχωρισμού (Separating gel), 12%:

- 6mL AB-mix
- 10mL Gel Buffer 3x
- 3gr Glycerol 100%
- H₂O για τελικό όγκο 30mL
- 150mL APS
- 15μL TEMED

Αρχικά συναρμολογείται η συσκευή πήξιματος των gel με τα γυάλινα τζαμάκια και τα διαχωριστικά πλαστικά. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού 12% και τοποθετείται μεταξύ των γυάλινων επιφανειών της συσκευής, καλύπτοντας περίπου το 70% του όγκου της. Επείτα εφαρμόζεται στην επιφάνεια μία μικρή στρώση βουτανόλης και η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί. Όταν έχει πλέον πήξει το μίγμα, η βουτανόλη αφαιρείται και ξεκινά η παρασκευή του stacking gel, το οποίο καλύπτει το υπόλοιπο μέρος μεταξύ των γυάλινων επιφανειών. Πριν πήξει το διάλυμα, τοποθετείται η υποδοχή που θα σχηματίσει τα πηγάδια φόρτωσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Όταν το πήκτωμα πολυμεριστεί, αφαιρείται η υποδοχή και το gel είναι έτοιμο προς χρήση. Τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με το cathode buffer (1x) και με το anode buffer (1x). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 20mA, ενώ μόλις τα δείγματα

περάσουν το stacking gel το ρεύμα αυξάνει στα 40mA έως ότου το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Το πρωτεϊνικό δείγμα αναμιγνύεται με το sample buffer σε αναλογία 3:1 (3 όγκοι δείγματος προς 1 όγκο sample buffer) και επωάζεται για 10 λεπτά στους 100° C με σκοπό την αναδιάταξη των πρωτεϊνών. Τέλος, κατάλληλη ποσότητα δείγματος φορτώνεται μέσα στο πηγαδάκι

Τα συστατικά του sample buffer βοηθούν το πρωτεϊνικό δείγμα να υποστεί τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης με τον εξής τρόπο:

- **SDS:** Είναι ένα ισχυρό ανιοντικό απορρυπαντικό, το οποίο διαταράσσει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών. Ανιόντα του απορρυπαντικού προσδένονται στα αμινοξέα της πρωτεΐνης, προσδίδοντάς της αρνητικό φορτίο.
- **Μερκαπτοαιθανόλη:** διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης
- **Glycerol:** Η προσθήκη μικρής ποσότητας γλυκερόλης βοηθάει το δείγμα να τοποθετηθεί σωστά μέσα στο πηγαδάκι λόγω βαρύτητας.
- **Serva Blue:** Δίνει χρώμα στο δείγμα έτσι ώστε να μπορούμε να παρατηρούμε που βρίσκεται μέσα στην πηκτή.

Παρατήρηση του πηκτώματος

Μόλις η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί, γίνεται χρώση της πηκτής με το κατάλληλο διάλυμα αφού πρώτα το gel έχει μεταφερθεί σε πλαστικό δοχείο. Η δυνατότητα του μορίου coomassie να προσδένεται στις πρωτεΐνες δημιουργώντας μπλε σύμπλοκα, μας δίνει τη δυνατότητα της εικόνας των διαχωρισμένων πρωτεϊνών πάνω στο gel. Η διαδικασία της χρώσης συνήθως διαρκεί 12-16 ώρες. Έπειτα, ακολουθεί ο αποχρωματισμός με το αντίστοιχο διάλυμα, αφού πρώτα έχει απομακρυνθεί η περίσσια της χρώσης. Οι εκπλύσεις επαναλαμβάνονται τακτικά έως ότου η πηκτή αποχρωματιστεί πλήρως.

2.2.11 Western Blot

Το western blot είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών μέσα σε ένα βιολογικό δείγμα. Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου- αντισώματος, η οποία μας επιτρέπει να αναγνωρίζουμε αν στο δείγμα βρίσκεται η επιθυμητή πρωτεΐνη ή όχι. Αρχικά, το πρωτεϊνικό δείγμα τρέχει σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου με τις πρωτεΐνες να αποδιατάσσονται και να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια ηλεκτρικού ρεύματος. Έπειτα η μεμβράνη επωάζεται με το κατάλληλο αντίσωμα, ειδικό για την πρωτεΐνη-στόχο και τέλος λαμβάνει χώρα η εμφάνιση με τη βοήθεια μορίων που μας δίνουν έγχρωμα προϊόντα σε μία συγκεκριμένη χημική αντίδραση.

Υλικά

- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης
- Διηθητικό χαρτί
- Μεθανόλη
- TBST
 - 10mM Tris/HCl pH=8
 - 150mM NaCl
 - 0,05% w/v Tween 20
- Αλκαλική φωσφατάση (ALP Buffer)
 - 100mM Tris/HCl, pH=9,5
 - 100mM NaCl
 - 5mM MgCl₂
- BSA 2% w/v σε TBST
- Αντίσωμα, anti- His tag ή anti- Strep tag, αραιώση 1:2000 σε TBST
- BCIP/NBT

Προκειμένου να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιείται ενεργοποίηση της μεμβράνης με μεθανόλη, πριν αυτή έρθει σε επαφή με την πηκτή. Στη συνέχεια, τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς αφού πρώτα έχουν καλυφθεί εξωτερικά με 5 στρώσεις διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με

TBST. Η μεταφορά πραγματοποιείται από τον θετικό προς τον αρνητικό πόλο κι έτσι η μεμβράνη τοποθετείται στην κάθοδο ενώ η πηκτική στην άνοδο. Η μεταφορά λαμβάνει χώρα για 1 ώρα και 30 λεπτά σε σταθερό ρεύμα $1\text{mA}/\text{cm}^2$. Μετά το πέρας της μεταφοράς, οι μεμβράνη επωάζεται υπό ανάδευση σε BSA 2% w/v σε TBST από 1 ώρα έως ολονύχτια (σε αυτή την περίπτωση μένει στους 4°C) προκειμένου να γίνει δέσμευση των θέσεων μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος. Έπειτα ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λέπτων με TBST και στη συνέχεια γίνεται η επώαση για 1 ώρα με το ειδικό αντίσωμα ως προς τη σήμανση που φέρει η ανασυνδυασμένη, επιθυμητή πρωτεΐνη (είτε His- tag είτε Strep- tag). Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST και 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία προσδένεται στο ειδικό αντίσωμα. Τέλος, γίνεται η εμφάνιση της μεμβράνης με τη χρήση διαλύματος BCIP/NBT μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες ιώδους χρώματος, που δηλώνουν την πρωτεΐνη- στόχο. Ο χρωματισμός των μπαντών είναι αποτέλεσμα της υδρόλυσης του BCIP από την αλκαλική φωσφατάση, απ'όπου προκύπτει ένα ενδιάμεσο προϊόν που διμερίζεται και σχηματίζει τη χρώση.

2.2.12 Διαλυτοποίηση μεμβρανών με τη χρήση απορρυπαντικού n-dodecyl-β, maltoside (DDM)

Υλικά

- NaCl, 1M
- HEPES, 1M, pH= 7,5
- EDTA, 0,5M
- PMSF, 200mM – αναστολέας πρωτεασών
- 10% n-dodecyl-β, D maltoside (DDM)

Στη διαλυτοποίηση μεμβρανών για τις πρωτεΐνες που φέρουν το strep- tag προσθέτουμε και 0,5mg/ml L avidin.

Οι μεμβράνες που συλλέχθηκαν διαλυτοποιούνται με τη χρήση διαλύματος απορρυπαντικού DDM 10%, σε αναλογία 1 μέρος πρωτεΐνης προς 2,5 μέρη DDM (τελική συγκέντρωση DDM 1-2%), αφού πρώτα η πρωτεϊνική συγκέντρωση των μεμβρανών έχει προσδιοριστεί με την μέθοδο Bradford.

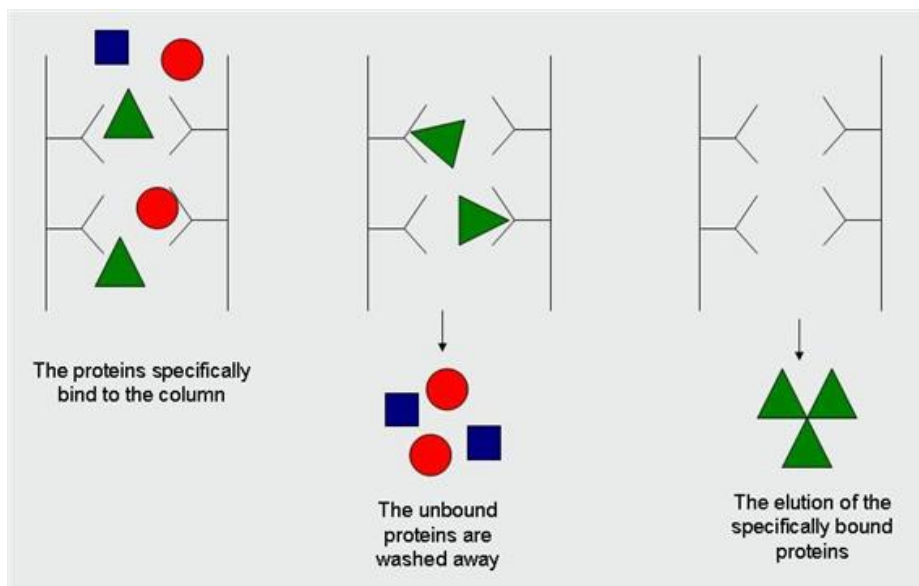
Αρχικά οι μεμβράνες μεταφέρονται από τους -80°C σε υδατόλουτρο προκειμένου να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια προστίθεται σε αυτές η κατάλληλη ποσότητα DDM και Lysis Buffer σε τελικό όγκο τέτοιον ώστε η τελική πρωτεϊνική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι ίση με 5-10mg/mL. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία της διαλυτοποίησης κατά την οποία το δείγμα αναδεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία 4°C . Ακολουθεί υπερφυγοκέντριση προκειμένου να διαχωριστούν οι διαλυτοποιημένες από τις μη-διαλυτοποιημένες μεμβράνες, στις 45.000rpm, για 1 ώρα, στους 4°C (ρότορας τύπου 70Ti). Έπειτα γίνεται συλλογή του υπερκειμένου (διαλυτοποιημένες μεμβράνες), το οποίο φιλτράρεται με τη βοήθεια σύριγγας και φίλτρου με πόρους διαμέτρου 0,2 μm . Αφού ληφθεί δείγμα 100 μL από τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες, ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας.

2.2.13 Καθαρισμός επιθυμητής πρωτεΐνης- Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μία μέθοδος διαχωρισμού της επιθυμητής πρωτεΐνης από ένα μίγμα άλλων πρωτεϊνών και στηρίζεται στις ειδικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ ενός μορίου προσδέτη (στατική φάση) και των πρωτεϊνικών μορίων στο διάλυμα (κινητή φάση). Η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να διακριθεί σε 3 μέρη:

- 1) Πρόσδεση της πρωτεΐνης στην στατική φάση
- 2) Έκπλυση μη προσδεμένων μορίων
- 3) Έκλουση της επιθυμητής πρωτεΐνης

Το ενδιάμεσο βήμα της έκπλυσης πραγματοποιείται με τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων που δεν διαταράσσουν τις συνθήκες αλληλεπίδρασης μεταξύ στατικής φάσης και πρωτεϊνικού μορίου. Αντίθετα, στην έκλουση χρησιμοποιούνται διαλύματα που αλλάζουν τις συνθήκες της αλληλεπίδρασης αυτής, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της επιθυμητής πρωτεΐνης από τον προσδέτη με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της.



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας (πηγή: Protein Biotechnology, Emri et al, 2011)

Στήλη Ιόντων μετάλλου- Στήλη Ni-NTA

Η μέθοδος καθαρισμού με τη χρήση στήλης νικελίου στηρίζεται στη χρωματογραφία συγγένειας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η στατική φάση αποτελείται από ιόντα μετάλλου και συγκεκριμένα νικελίου, στα οποία προσδένονται πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν μία αλληλουχία πολλαπλών ιστιδινών (His- tag). Η ιστιδίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο παρουσιάζει την μεγαλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το ακινητοποιημένο νικέλιο, δρώντας ως ηλεκτρονιοδότης και σχηματίζοντας δομές συντονισμού μέσω του δακτυλίου ιμιδαζολίου που φέρει. Με τον τρόπο αυτό, πρωτεϊνικά μόρια που διαθέτουν έναν αριθμό διαδοχικών ιστιδινών (6), μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ακινητοποιημένο στη στατική φάση νικέλιο και να διαχωριστούν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες στο δείγμα. Επειδή είναι σπάνιο να βρεθούν διαδοχικά κατάλοιπα ιστιδίνης στην αλληλουχία των περισσότερων πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες στις οποίες προστίθεται μία αλληλουχία έξι καταλοίπων ιστιδίνης, είτε στο άμινο- είτε στο κάρβοξυ- άκρο τους. Τέλος, η έκλουση της πρωτεΐνης από τη στήλη πραγματοποιείται με την βαθμιδωτή αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου στην κινητή φάση.

Υλικά

- Imidazole, 1M, pH = 7,42 (Mr= 68,08)
- Buffer A
 - 20mM HEPES, pH= 7,5
 - 300mM NaCl
- Buffer B
 - 20mM HEPES, pH= 7,5
 - 300mM NaCl
 - 500m M imidazole, pH= 7,42
- DDM, 10%
- Στήλη συγγενείας HisTrap 3mL (IBA)

Διαλύματα

- Wash Buffer 10mM imidazole
 - Buffer A
 - Buffer B, τελική συγκέντρωση ιμιδαζολίου 10mM
 - 0,05% DDM
- Wash Buffer 30mM imidazole
 - Buffer A
 - Buffer B, τελική συγκέντρωση ιμιδαζολίου 30mM
 - 0,05% DDM
- Elution Buffer 300mM imidazole
 - Buffer A
 - Buffer B, τελική συγκέντρωση ιμιδαζολίου 300mM
 - 0,05% DDM

Πριν τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών με στήλη νικελίου (Ni- NTA) προστίθεται στις διαλυτοποιημένες μεμβράνες ιμιδαζόλιο τελικής συγκέντρωσης 10mM, pH= 7,42. Χρησιμοποιείται στήλη νικελίου, HisTrap όγκου 3mL ενώ όλη η διαδικασία της χρωματογραφίας πραγματοποιείται στους 4° C περιλαμβάνοντας τα εξής βήματα:

- 1) Πλύση με 10 όγκους στήλης απιονισμένου νερού

- 2) Εξισσορόπηση με 10 όγκους στήλης Wash buffer 10mM imidazole
- 3) Το δείγμα περνά από τη στήλη και συλλέγεται
- 4) Πλύση με 10 όγκους στήλης Wash buffer 10mM imidazole
- 5) Πλύση με 10 όγκους στήλης Wash buffer 30mM imidazole
- 6) Έκλουση με 5 όγκους στήλης Elution Buffer 300mM imidazole
- 7) Πλύση της στήλης με 10 όγκους απιονισμένου νερού
- 8) Τοποθέτηση αιθανόλης και φύλαξη στήλης στους 4° C.

Στήλη στρεπτακτίνης (streptactin)

Μία άλλη μέθοδος καθαρισμού ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας είναι η χρήση στήλης στρεπτακτίνης. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής βασίζεται στην ιδιότητα της στρεπτακτίνης να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με την βιοτίνη. Η ιδιότητα αυτή τροφοδότησε την ιδέα δημιουργίας ενός πεπτιδίου ικανού να προσδένεται στη θέση πρόσδεσης της βιοτίνης, πάνω στα μόρια στρεπτακτίνης και κατά συνέπεια να καθιστά την πρωτεΐνη ικανή να διαχωρίζεται. Το μικρό αυτό πεπτίδιο αποτελείται από 8 αμινοξέα (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) και ονομάζεται strep-tag. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φέρει το strep-tag μπορεί να κατακρατηθεί από τα ακινητοποιημένα στη στατική φάση μόρια της στρεπτακτίνης και με αυτό τον τρόπο να διαχωριστεί. Προκειμένου να γίνει η έκλουση, χρησιμοποιείται στην κινητή φάση δισθειο-βιοτίνη (5mM), ένα σταθερό ανάλογο της βιοτίνης, η οποία αποτελεί τον φυσικό υποκαταστάτη της στρεπταβιδίνης.

Υλικά

- NaCl, 1M
- HEPES, 1M pH= 8
- EDTA, 0,5M pH=8
- Desthiobiotin (Mr= 214,26)
- DDM, 10%
- HABA (2- [4'-hydroxy-benzeneazo] benzoic acid)
- Tris , 0,1M

- Στήλη συγγενείας Streptactin column (IBA)

Διαλύματα

- Wash Buffer
 - 150mM NaCl
 - 20mM HEPES, pH= 8
 - 1mM EDTA, pH=8
 - 0,05% DDM
- Elution Buffer
 - Wash Buffer
 - 5m M disthiobiotin
- Regeneration Buffer
 - 100m M Tris
 - 150m M NaCl
 - 1m M EDTA
 - 2m M HABA

Ολόκληρη η διαδικασία απομόνωσης πρωτεϊνών με τη χρήση της στήλης στρεπτακτίνης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4° C. Για μεγάλες πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις διαλυτοποιημένων μεμβρανών χρησιμοποιείται στήλη όγκου 6mL ενώ για μικρότερες συγκεντρώσεις χρησιμοποιείται στήλη όγκου 3mL. Η χρωματογραφία συγγένειας με χρήση κολώνας στρεπτακτίνης περιγράφεται στα παρακάτω βήματα:

- 1) Πλύση της στήλης με 30- 50mL απιονισμένου νερού
- 2) Εξισσορόπηση με 2 όγκους στήλης Wash Buffer
- 3) Το δείγμα περνά από τη στήλη και συλλέγεται
- 4) Πλύση με 5 όγκους στήλης Wash Buffer
- 5) Έκλουση με 6x 0,5 όγκους στήλης
- 6) Αναγέννηση στήλης με 10x 0,5 όγκους στήλης Regeneration Buffer
- 7) Πλύση με διάλυμα Tris, 100mM προς την απομάκρυνση του HABA
- 8) Πλύση με 30-50mL απιονισμένου νερού
- 9) Φύλαξη της στήλης στους 4° C σε νερό.

2.2.14 Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση- Microrotofor

Το Microrotor είναι μία μέθοδος ισοηλεκτρικής εστίασης, σύμφωνα με την οποία ένα μείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται στα συστατικά του και κλασματοποιείται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Βασική αρχή της τεχνικής είναι η δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου και διαβάθμισης pH μεταξύ της ανόδου και της καθόδου μέσα στην οποία, το σύνολο των πρωτεϊνών του δείγματος κλασματοποιείται και η επιθυμητή πρωτεΐνη απομονώνεται με βάση το ισοηλεκτρικό της σημείο. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των πρωτεϊνών να αποκτούν μηδενικό φορτίο όταν το pH του περιβάλλοντός τους εξισώνεται με το pI τους. Με αυτόν τον τρόπο είμαστε σε θέση να απομονώσουμε την επιθυμητή πρωτεΐνη και να την χρησιμοποιήσουμε για περαιτέρω μελέτη.

Υλικά

- H_3PO_4 , 0,1M (διάλυμα ανόδου)
- NaOH, 0,1M (διάλυμα καθόδου)
- Διάλυμα αμφολύτη pH= 3,5-10 (Amersham Pharmacia Biotechn AB)

Αρχικά, οι ιονανταλλακτικές μεμβράνες ανόδου και καθόδου επωάζονται ολονύχτια σε διάλυμα H_3PO_4 και NaOH, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, συναρμολογούνται τα εξαρτήματα της συσκευής και φορτώνονται περίπου 2,5mL δείγματος με τη βοήθεια σύριγγας (εικόνα 2.3), αφού πρώτα προστεθεί στο δείγμα διάλυμα αμφολύτη τελικής συγκέντρωσης 2%w/v, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαβάθμιση pH. Ο ειδικός θάλαμος που περιέχει το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή του Microrotor και συμπληρώνονται οι ηλεκτρολύτες στον θετικό και αρνητικό πόλο για τη δημιουργία του ηλεκτρικού πεδίου.



Εικόνα 2.4: Το δείγμα εισάγεται στον θάλαμο εστίασης με τη βοήθεια σύριγγας.

Έπειτα, η συσκευή τροφοδοτείται με ρεύμα, ξεκινώντας από 150V για 15 λεπτά και αυξάνοντάς το κατά 100 περίπου volts κάθε 15-20 λεπτά, έως ότου να μηδενιστεί η τιμή των mA, ένδειξη που σημαίνει πως όλες οι πρωτεΐνες έχουν ακινητοποιηθεί στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα κλάσματα που απομονώθηκαν συλλέγονται σε eppendorfs των 1,5mL και πεχαμετρώνται.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως, καθ'όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ισοηλεκτρικής εστίασης, επικρατούν μη αποδιατακτικές συνθήκες που διατηρούν το πρωτεϊνικό δείγμα σε native συνθήκες, σε θερμοκρασία περίπου 10°C

2.2.15 Κατακρίμνηση πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA)

Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η κατακρίμνηση των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα δείγμα χαμηλής συγκέντρωσης, προκειμένου να είναι ευκολότερη η περαιτέρω μελέτη του.

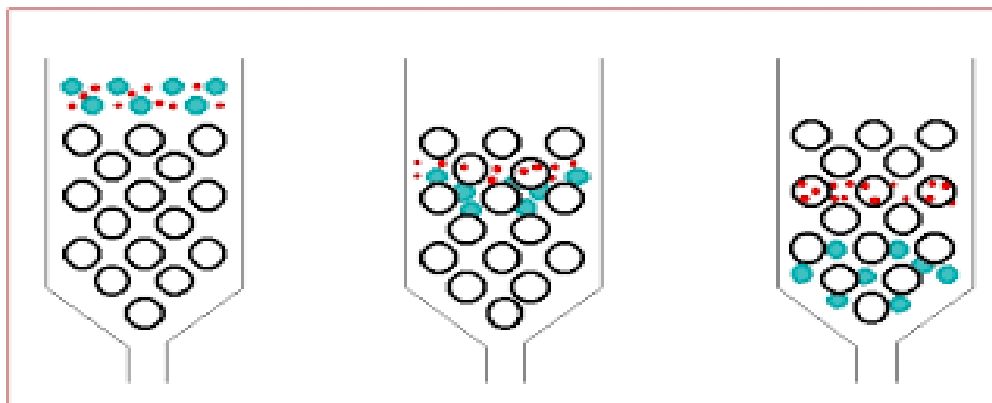
Στην εκάστοτε ποσότητα πρωτεϊνικού δείγματος προστίθεται 10% τριχλωρικού οξέως TCA (100%w/v) και αφού το διάλυμα αναδευτεί παραμένει στους 4°C καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας. Έπειτα, ακολουθεί φυγοκέντριση στα 11.500g για 10 λεπτά στους 4°C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, το ίζημα πλένεται με την προσθήκη παγωμένης ακετόνης (100%) ποσότητας ίσης με την ποσότητα του αρχικού δείγματος, και φυγοκεντρείται στα 11.500g για 10 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες 2 φορές. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνεται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για λίγη ώρα στον αέρα και επαναδιαλυτοποιείται σε sample buffer. Επωάζεται σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά περίπου και είναι έτοιμο να φορτωθεί σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

2.2.16 Καθαρισμός επιθυμητής πρωτεΐνης- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography- SEC)

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού βιολογικών μορίων με βάση το μοριακό τους βάρος. Πρόκειται για χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση (πορώδες gel) και υγρή κινητή φάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται δια μέσου

μίας πορώδους επιφάνειας που διαμορφώνεται από μόρια δεξτράνης, πολυακρυλαμιδίου, πυριτίου ή πολυμερών και έχει συγκεκριμένο μέγεθος πόρων.

Μόρια με μέγεθος μεγαλύτερο από το μέγεθος των πόρων, διατρέχουν τη στήλη χωρίς να εισέλθουν μέσα στο πορώδες υλικό και εξέρχονται πρώτα. Αντίστοιχα, μόρια μικρού μοριακού βάρους διατρέχουν τη στήλη και εισέρχονται μέσα στους πόρους της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα να εξέρχονται τελευταία. Επομένως, τα βιολογικά μόρια του δείγματος εκκλύονται από τη στήλη ανάλογα το μέγεθός τους, με τα μεγαλύτερα να εξέρχονται στην αρχή και τα μικρότερα στο τέλος.



Εικόνα 2.5: Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού: διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους.

Υλικά

- H₂O
- Διάλυμα για χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
 - 150mM NaCl
 - 20mM HEPES, pH=8
 - 0,02% DDM
- Αιθανόλη 20%v/v

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία της χρωματογραφίας, απαιτείται όλα τα διαλύματα που θα χρησιμοποιηθούν ως κινητή φάση, να έχουν φιλτραριστεί και απαερωθεί. Αρχικά πραγματοποιείται πλύση της στήλης με 2 όγκους στήλης νερό ενώ στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η εξισορρόπηση με 2 όγκους

στήλης διάλυμα χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Και στις δύο περιπτώσεις, η ροή είναι περίπου 0,5mL/min.

Πριν τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, το πρωτεϊνικό δείγμα έχει καθαριστεί με χρωματογραφία συγγένειας και έχει συμπυκνωθεί σε τελικό όγκο 500μL. Η συμπύκνωση γίνεται με τη χρήση φίλτρου υπερδιήθησης και φυγοκέντριση 15.000 x g, 15min, 4° C. Το συμπυκνωμένο δείγμα φυγοκεντρείται στα 14.000 x g, 10min, 4° C, προκειμένου να καθιζάνει τυχόν συσσωμάτωμα της πρωτεΐνης, και εισαγεται στο σύστημα χρωματογραφίας. Μετά το πέρας της έκλουσης, το σύστημα και η στήλη ξεπλένονται με διάλυμα αιθανόλης περιεκτικότητας 20%v/v, με ροή περίπου 0,3mL/min και η στήλη αποσυνδέεται και φυλάσσεται σε διάλυμα αιθανόλης 20%v/v.

Τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού συλλέγονται με βάση την απορρόφηση στα 280nm και ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακριλαμιδίου (4%- 12%). Τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συγκεντρώνονται και συμπυκνώνονται με τη χρήση φίλτρου υπερδιήθησης και φυγοκέντριση έως ότου η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι αρκετή ώστε το δείγμα να χρησιμοποιηθεί σε επόμενα πειράματα.

2.2.17 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση- Blue Native Page

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (BN Page) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού μεμβρανικών και υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών με βάση το μέγεθος, το σχήμα και το φορτίο τους. Έτσι, οι πόροι της πηκτής πολυακριλαμιδίου λειτουργούν ως ένα φυσικό κόσκινο διαχωρίζοντας διαφορετικού μεγέθους μόρια, ενώ παράλληλα οι πρωτεΐνες που είναι περισσότερο φορτισμένες στην τιμή pH της πηκτής εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα. Στην κινητικότητα των πρωτεϊνών συνεισφέρει η πρόσδεση των αρνητικά φοροτισμένων μορίων της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Με αυτό τον τρόπο, έχουμε διαχωρισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων μοριακού βάρους μεταξύ 100 και 1.000kDa.

Υλικά

Παρασκευή πηκτής με διαβάθμιση συγκέντωσης πολυακριλαμιδίου

- AB- mix buffer (49,5% T, 3%C)
- Gel Buffer (3x)
- Glycerol (100%)
- Ammonium Persulfate (APS) 10%w/v
- TEMED
- Τζαμάκια πηξίματος gel

Διαλύματα

Διάλυμα παρασκευής δειγμάτων (Gel Buffer) 4x

- 50m M Bis- Tris/ HCl, pH = 7,2
- 18,5% 6-N- HCl
- 10%w/v Glycerol
- 50mM NaCl
- 0,0001%w/v Ponceau S

Gel Buffer (3x)

- 1500mM 6-άμινο-καπρωϊκό οξύ (6-aminohexanoic acid)
- 150mM Bis-Tris/HCl, pH=7

Anode Buffer

- 50 mM BisTris/HCl, pH=7

Cathode Buffer

- 50 mM Tricine/ HCl
- 15 mM Bis-Tris
- 0,02% (w/v) Serva Blue G-250

Η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με διαβάθμιση από 4% έως 13%. Τα δύο διαλύματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυακρυλαμιδίου παρασκευάζονται ξεχωριστά και μεταφέρονται σε συσκευή ανάμειξης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των APS και TEMED με ελαφριά ανακίνηση των διαλυμάτων, έτσι ώστε ο καταλύτης και ο εκκινητής να δράσουν σε όλο τον όγκο των

διαλυμάτων και ο πολυμερισμός να γίνει ομοιόμορφα. Παράλληλα λάμβανε χώρα η διαβάθμιση της πηκτής διαχωρισμού. .

	Διάλυμα διαχωρισμού 4%	Διάλυμα διαχωρισμού 13%
AB- mix (49,5%T, 3%C)	0,404mL	1,3176mL
Gel Buffer (3x)	1,6mL	1,6mL
Glycerol (100%)	-	1,122gr
H₂O (nanopure)	2,92mL	1,12mL
APS (10%)	47,05μL	22,11μL
TEMED	4,705μL	2,21μL
Τελικός όγκος	5mL	5mL

Πίνακας 2.3: Σύσταση των διαλυμάτων των πηκτών διαχωρισμού 4% και 13% πολυακρυλαμιδίου.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού της πηκτής, προστίθεται στα δείγματα αντίστοιχη ποσότητα sample buffer και αυτά φορτώνονται στο gel. Παράλληλα στο διάλυμα καθόδου προστίθεται 0,02%w/v απορρυπαντικό n-Dodecyl-β-D-Maltoside (DDM). Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα στους 6°C και πραγματοποιείται αρχικά σε χαμηλή τάση 150V για 60 λεπτά ενώ στη συνέχεια η τάση αυξάνεται στα 250V για 30 λεπτά.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή με τα διαχωρισμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα απελευθερώνεται και τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού.

2.2.18 Πρωτεολυτική διάσπαση πρωτεϊνών

Η πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, που έχει την ιδιότητα να διασπά πεπτιδικούς δεσμούς των αμινοξέων αργινίνη και λυσίνη, στο C- τερματικό άκρο.

Υλικά

- Ακετονιτρίλιο (ACN), 50%v/v
- Διπτανθρακικό αμμώνιο (ABS), 50mM
- DTT, 10mM
- Ιωδοακεταμίδιο (IAA), 55mM

- Θρυψίνη από πάγκρεας χοίρου
- TFA, 0,1%

1) Οι πρωτεϊνικές μπάντες αποκόπτονται από την πηκτή σε μικρά κομματάκια και τοποθετούνται σε αποστειρωμένα eppendorf

2) Τα κομματάκια της πηκτής αποχρωματίζονται με διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 15min η κάθε μία, με ACN 50%v/v και ABS 50mM, τρεις φορές συνολικά.

3) Ακολουθεί αναγωγή των πηκτών με τη χρήση 10mM DTT σε 50mM ABS, με επώαση υπό ανάδευση για 45min στους 56° C.

4) Στη συνέχεια, γίνεται αλκυλίωση με 55mM ιωδοακεταμίδιο σε 50mM ABS, με επώαση υπό ανάδευση για 45min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.

5) Έπειτα, τα κομματάκια της πηκτής πλένονται επί 15min με 50mM ABS και 50% ACN διαδοχικά, για συνολικά τρεις φορές.

6) Κατόπιν, οι πηκτές αφυδατώνονται με την προσθήκη 100% ACN και επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό το βήμα λαμβάνει χώρα πριν γίνει η προσθήκη της θρυψίνης.

7) Στα αφυδατωμένα πλέον κομματάκια πηκτής, προστίθενται 25-30μL πρωτεολυτικό διάλυμα που περιέχει 20μg θρυψίνης και αφήνονται σε πάγο για 30-90min. Κατόπιν, επωάζονται στους 37° C για 14-16 ώρες.

8) Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιούνται διαδοχικές επωάσεις των δειγμάτων διάρκειας 30 λεπτών, αρχικά με διάλυμα 50% ACN/ 0,1% TFA και έπειτα με διάλυμα 100% ACN. Τα υπερκείμενα από τις διαδοχικές αυτές πλύσεις ενώνονται, ανακτώντας έτσι τα πεπτίδια από τα κομμάτια πηκτής.

9) Το συνολικό διάλυμα που προκύπτει από το βήμα 8, ξηραίνεται σε φυγοκεντρικό ξηραντήρα και τα πεπτίδια φυλάσσονται στους -20° C μέχρι να τοποθετηθούν στο στόχο.

2.2.19 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

Υλικά

- Ακετονιτρίλιο (ACN), 50%
- TFA, 0,1%
- Α-κυανο-4-υδροξυκινναμικό οξύ (8,6mg/mL)

Αρχικά, μετά τη διαδικασία πρωτεόλυσης, κάθε επιμέρους δείγμα αποξηραμένων πεπτιδίων διαλυτοποιήθηκε σε 5μL διαλύματος 50% ACN/ 0,1% TFA. Στη συνέχεια, 1μL δείγματος κρυσταλλώθηκε με 1μL διαλύματος α-κυανο-4-υδροξυκινναμικού οξέως (8,6mg/mL) σε 50% ACN/ 0,1% TFA, και τοποθετήθηκαν πάνω στην μεταλλική πλάκα του στόχου.

Ο στόχος εισήχθη σε φασματογράφο μαζας (εικόνα 2.4) και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την μέθοδο της αργής εξαγωγής και τη χρήση ανακλαστήρα με τις εξής παραμέτρους: Laser smartbeam II συχνότητας 200Hz για τα φάσματα MS με τάση επιτάχυνσης 20,15kV για την ion source 1 και 18,10kV για την ion source 2, 90ns καθυστέρηση και πύλη χαμηλού μοριακού βάρους 600KDa, για τα φάσματα MS/MS με την μεθοδολογία LIFT με τάση επιτάχυνσης 19,6kV για την ion source 1 και 3,80kV για την ion source 2. Ο ανακλαστήρας τέθηκε στην κατάσταση ανάλυσης θετικών ιόντων με κλάσμα τάσης 2,3 ενώ τα φάσματα που ελήφθησαν ήταν εύρους μαζών 700-3900KDa.



Εικόνα 2.6: Φασματογράφος μάζας Ultraflex Xtreme (Bruker Daltonics)

Οι ταυτοποιημένες πρωτεΐνες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Mascot και Biotoools 3,2 ενώ για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων UniProt για την *Coxiella* αλλά και για το *E.coli*.

Ενναλακτικά τα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με παγίδα- στήλη Acclaim PEPMAP C18 (75 μ m x 2cm, μέγεθος σωματιδίων 2 μ m, ρυθμός ροής 6 μ L/min) και μία αναλυτική στήλη Acclaim PEPMAP C18 (75 μ m x 50cm, μέγεθος σωματιδίων 2 μ m, ρυθμός ροής 300nL/min). Με το σύστημα Ultimate 3000 λεπτής ροής HPLC (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) και ηλεκτοψεκασμό εισήχθησαν σε Orbitrap Elite (Fourier Transformation-Ion Trap (FT-IT) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA), όπου και αναλύθηκαν. Η πηγή ιόντων Nanospray Flex, είχε τάση 2 kV κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία πλήρης σάρωση από m/z- 350 έως 1600 (FT-MS). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση των 120.000. Λαμβάνοντας υπόψη την μέθοδο των «κορυφαίων 15» , μόνο τα 15 πιο έντονα σήματα

ιόντων με τα φορτίο > 2 επιλέχθηκαν για σύγκριση στη γραμμική παγίδα ιόντων (IT-MS).

Τα φάσματα MS/MS που ελήφθησαν, επεξεργάστηκαν με τη βάση δεδομένων πρωτεΐνων για *Coxiella burnetti* (TaxID = 777, NCBI) και επιπλέον με μια βάση δεδομένων που περιέχει κοινές MS- μολύνσεις από τη θρυψίνη ως περιοριστικό ένζυμο, χρησιμοποιώντας το SEQUEST που βασίζεται Proteome Discoverer (Thermo Fisher, έκδοση 2.1).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι πρωτεΐνες IcmK, IcmE, DotC, DotD καθώς και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο K-E-G-C-D ανήκουν στο εκκριτικό σύστημα τύπου IV του υποχρεωτικά ενδοκυττάριου παθογόνου βακτηρίου *Coxiella Burnetii* [Daniel E. et al, 2009]. Πρόκειται για μεμβρανικές πρωτεΐνες ή λιποπρωτεΐνες, τα χαρακτηριστικά των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Όνομασία	Mr (KDa)	Αμινοξικά κατάλοιπα	Τοποθεσία	Προβλεπόμενο Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)
IcmK	37,431	351	Εξωτερικής μεμβράνης	8,95
IcmE	106,519	1.039	Περιπλασματική	9,14
DotC	30,274	274		8,58
DotD	18,680	169		10,05
pKEGCD	219,464	2.077	Σύμπλοκο πυρήνα	

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πρωτεϊνών

Για την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pttQ18A2 (His-tag στο C-τελικό άκρο) και pttQ18C3 (strep-tag στο C-τελικό άκρο), που φέρουν την ένθεση του κάθε γονιδίου ξεχωριστά ενώ η έκφραση πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *E.Coli* στέλεχος C₄₃(DE₃).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι συνθήκες έκφρασης για κάθε μία από τις πρωτεΐνες- στόχους, με στόχο την απομόνωση και τον καθαρισμό τους, ενώ δοκιμάστηκαν και οι δύο πλασμιδιακοί φορείς.

3.1 Προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης της IcmK

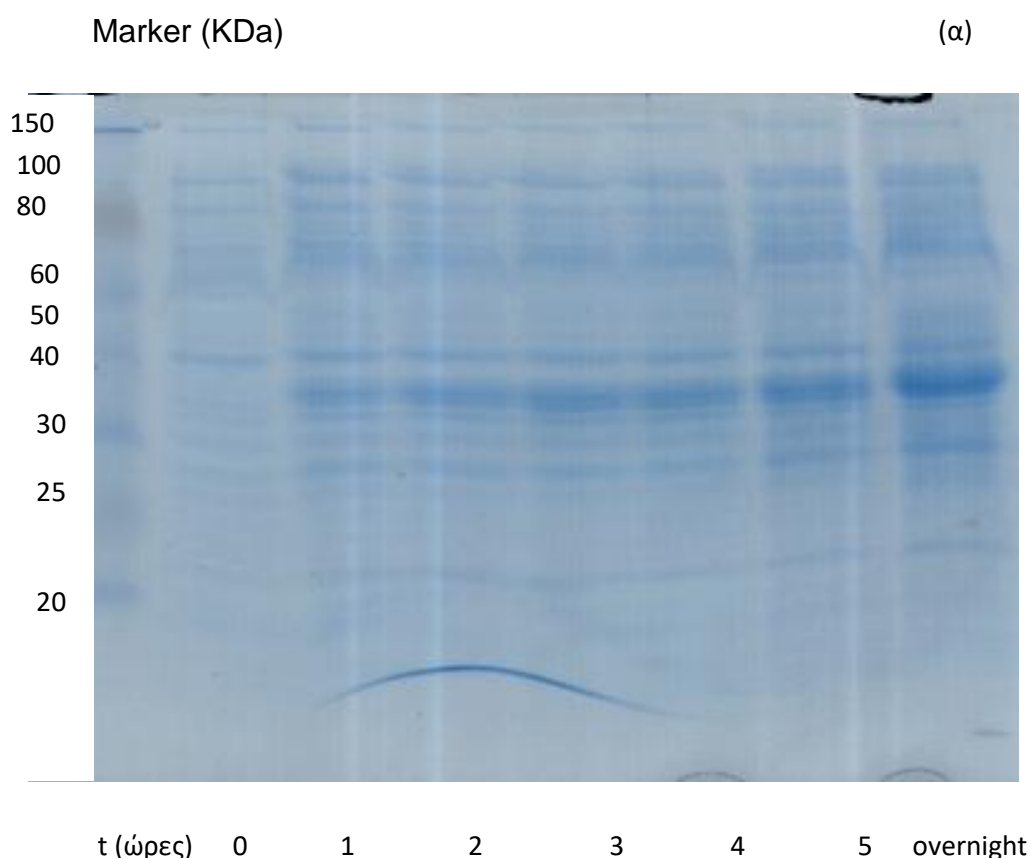
3.1.1 Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQA2+K

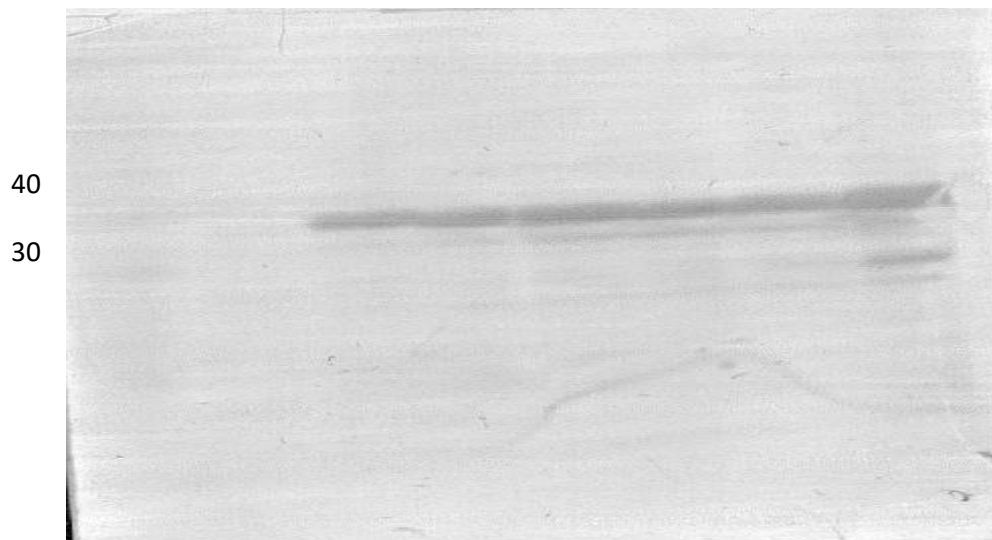
Ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα *E.Coli* με την μέθοδο του θερμικού σοκ, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.2. Για τον έλεγχο της έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν μικρές καλλιέργειες των

100mL, ενώ δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 30°C) και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG (1mM και 0,5mM).

Η λήψη δείγματος 1mL πραγματοποιήθηκε την χρονική στιγμή πριν την επαγωγή και όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν 0,5-0,7 (t=0) και κατόπιν, ανά μία ώρα μετά την επαγωγή για συνολικά 5 ώρες ενώ μία τελευταία μέτρηση πάρθηκε μετά από ολονύχτια επώαση. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα, τα οποία υπέστησαν κατεργασία με 20% SDS και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 4%-12% προκειμένου να τρέξουν σε SDS- PAGE (παράγραφος 2.2.10). Ακολούθησε η μέθοδος του Western Blot για την ανοσοανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση του anti-His αντισώματος (παράγραφος 2.2.11).

➤ 37°C, 1mM IPTG



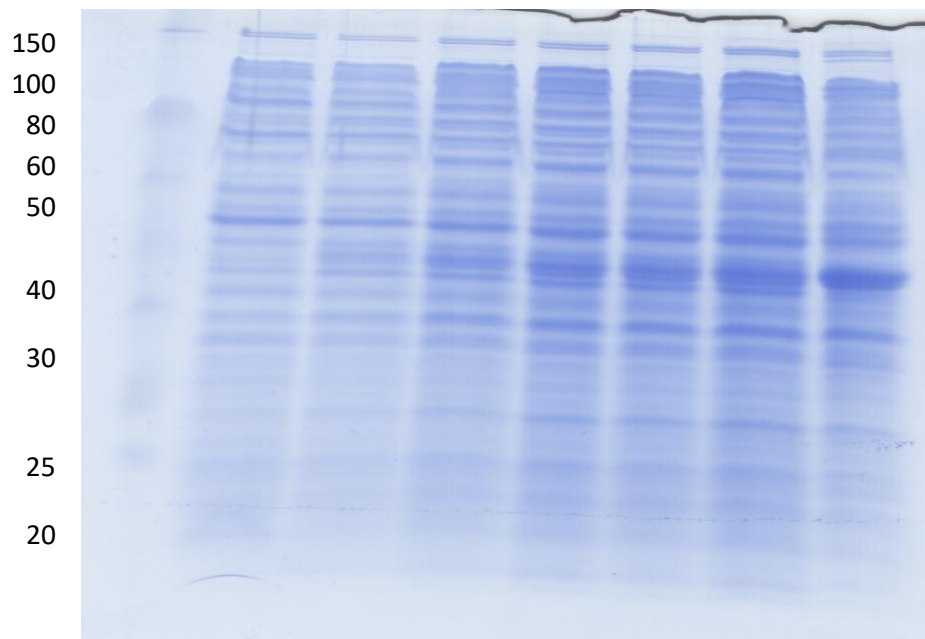


β)

Εικόνα 3.1: α) SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της IcmK στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) β) Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

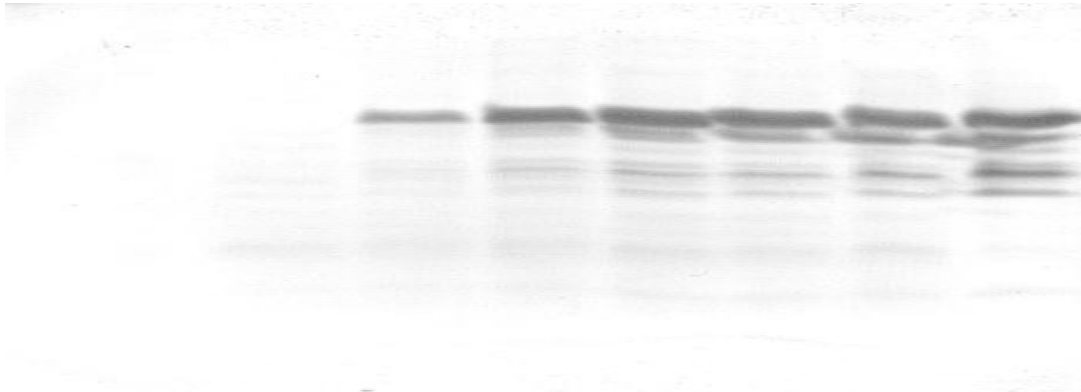
➤ 30° C, 1mM IPTG

Marker(KDa)



(α)

t(ώρες) 0 1 2 3 4 5 overnight

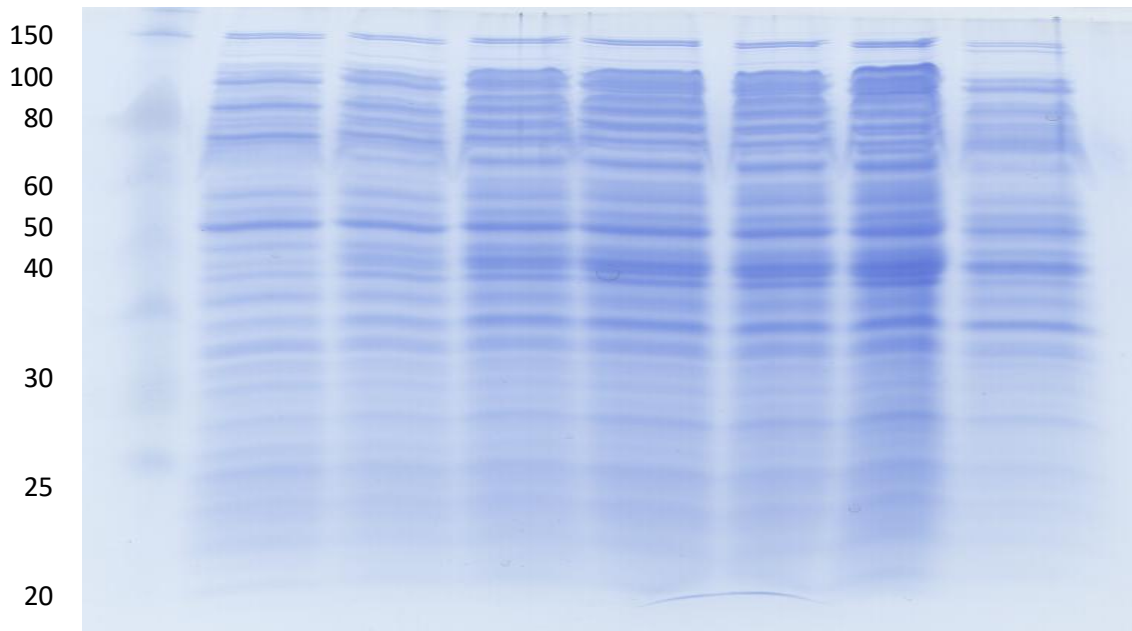


(β)

Εικόνα 3.2: α) SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της IcmK στους 30°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) β) Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

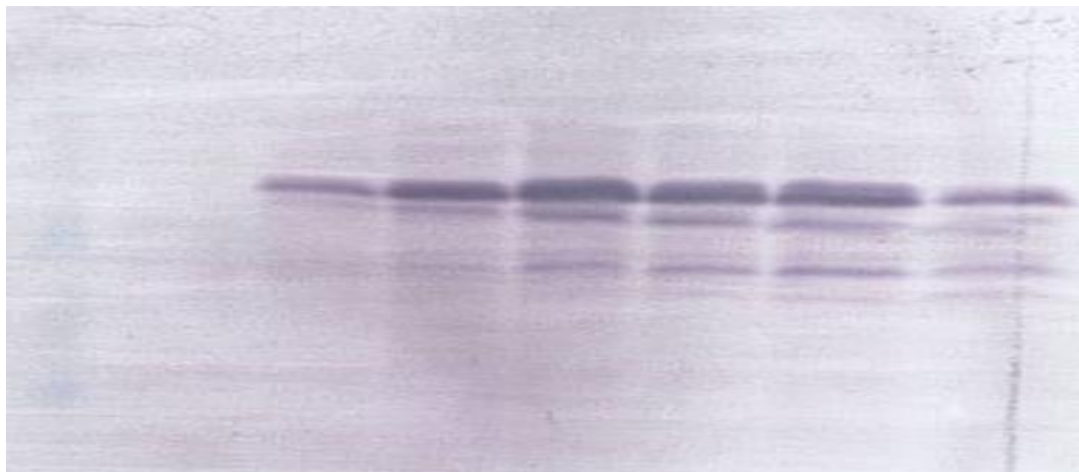
➤ 30° C, 0,5mM IPTG

Marker (KDa) t(ώρες) 0 1 2 3 4 5 overnight



(α) t(ώρες) 0 1 2 3 4 5 overnight

30



(β)

Εικόνα 3.3: SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της IcmK στους 30°C, με 0,5mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight)
β) Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

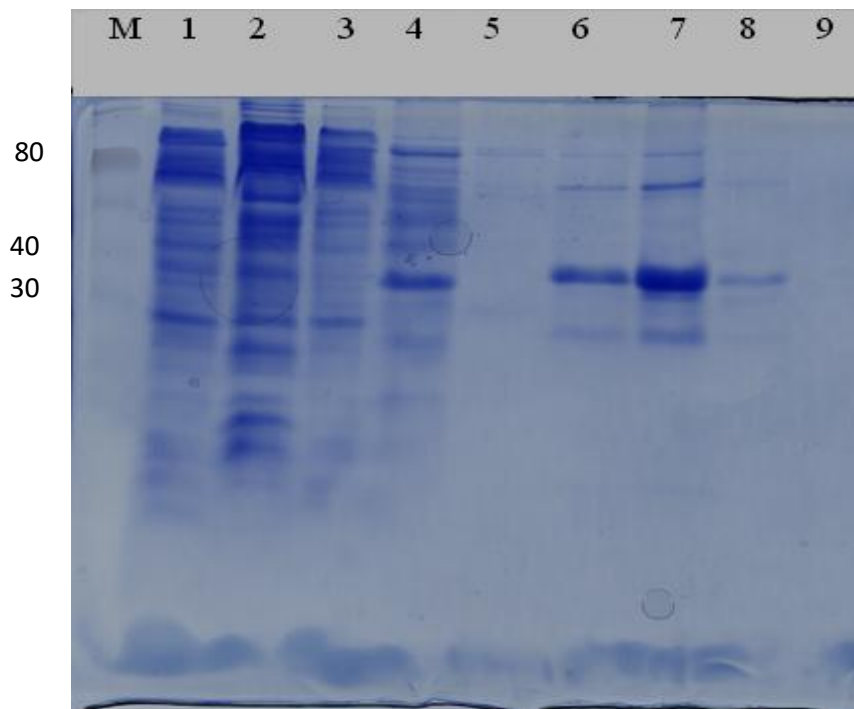
Συγκρίνοντας όλες τις παραπάνω εικόνες συμπεραίνουμε ότι η IcmK εκφράζεται σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν (ζώνη κάτω από τα 40kDa), με τις βέλτιστες να αποτελούν οι 37°C και ο IPTG σε συγκέντρωση 1mM.

Έχοντας καταλήξει λοιπόν στις καλύτερες συνθήκες έκφρασης, λαμβάνει χώρα η υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης με μεγάλη καλλιέργεια των 5L, και η προσπάθεια απομόνωσης της με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και στήλης Nickel-NTA (παράγραφος 2.2.13).

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 5L: 9,52gr

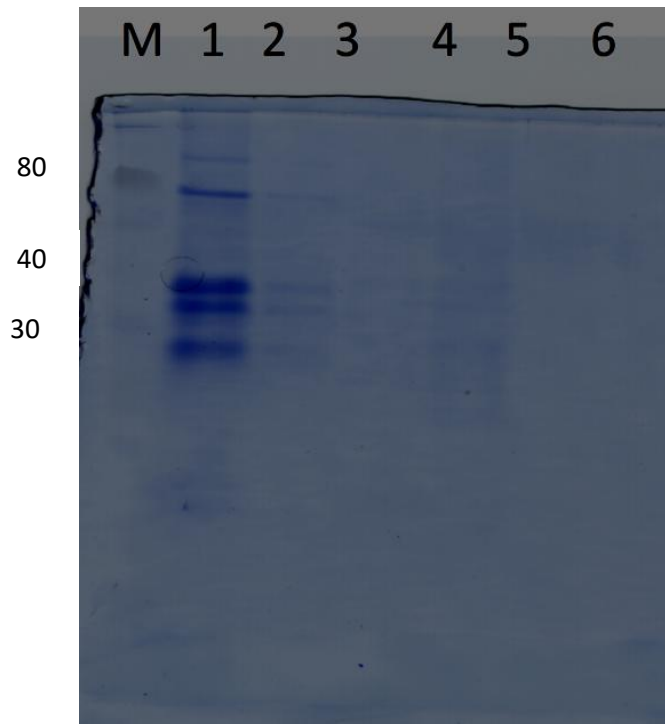
➤ Διαλυτοποίηση μεμβράνων και στήλη NTA

Marker (KDa)

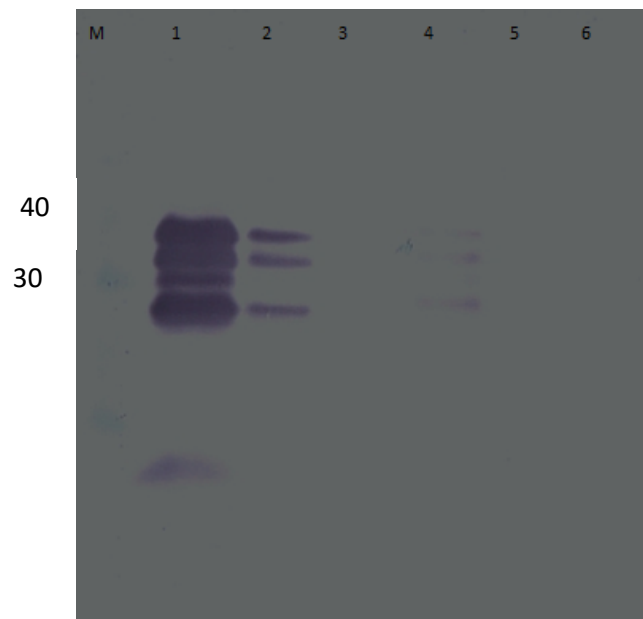


Εικόνα 3.4: SDS- PAGE 4-12% για τα δείγματα της χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση στήλης Nickel- NTA για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες που περιέχουν την IcmK. **1.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **2.** Μη διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **3.** Flow through, **4.** Wash 10mM imidazole, **5.** Wash 30mM imidazole, **6.** Elution 200mM imidazole, **7.** E200 amicon (TCA), **8.** E200 amicon (10.000Da), **9.** Elution 500mM imidazole (TCA).

- Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση (Microrotofor)



α)



β)

Εικόνα 3.5: (α) SDS-PAGE 4-12% για τα δείγματα από το Microrotofor (β) Western Blot για ανοσοανίχνευση της πτωτεΐνης στα δείγματα από το Microrotofor. **1.** E200mM imidazole amicon(10.000Da) (TCA), **2.** E200mM imidazole amicon, **3.** Microrotofor δειγμα 1 (pH= 3,5), **4.** Microrotofor δειγμα 2 (pH= 4,8), **5.** Microrotofor δειγμα 3 (pH= 7,6), **6.** Microrotofor δειγμα 4 (pH= 8,8)

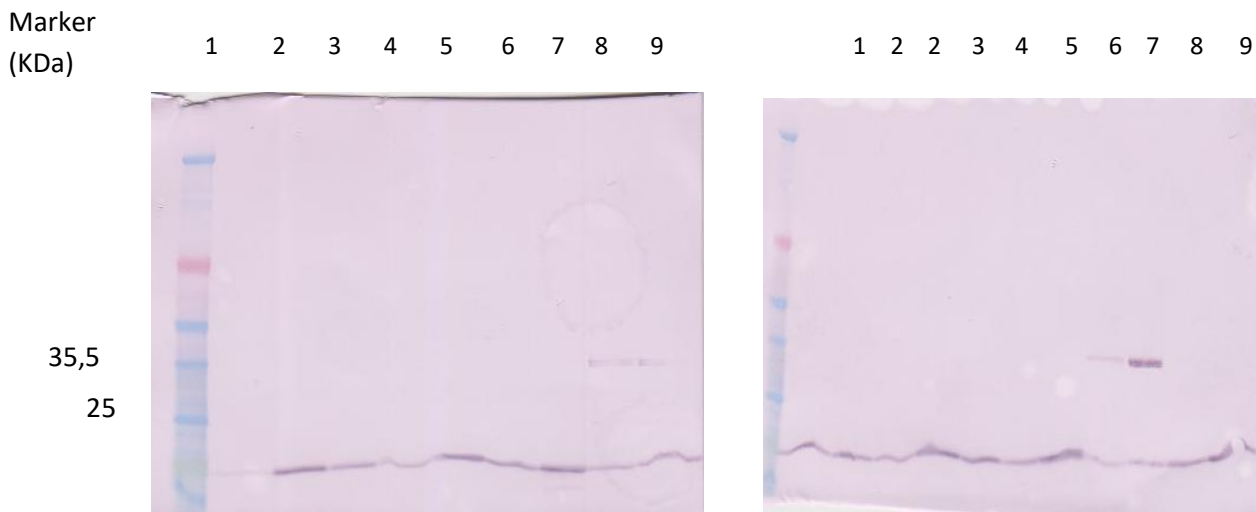
Από όλα τα παραπάνω πηκτώματα πολυακριλαμιδίου, πραγματοποιήθηκε αποκοπή των μπαντών στα μοριακά βάρη κοντά στα 40KDa προκειμένου να γίνει πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών με θρυψίνη και ταυτοποίηση της IcmK με φασματομετρία μάζας (παράγραφος 2.2.18). Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας απέδειξαν την ύπαρξη της πρωτεΐνης- στόχου σε όλα σχεδόν τα δείγματα, πράγμα που αποδεικνύει πως η πρωτεΐνη δεν χάνεται δια μέσου των πειραματικών βημάτων απομόνωσης και καθαρισμού. Παρόλα αυτά, η κατάσταση της IcmK δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καθαρή» μιας και συνοδεύεται από προσμίξεις άλλων, μη επιθυμητών πρωτεϊνών, πράγμα που φαίνεται ήδη από τις εικόνες των SDS- PAGE και Western Blot.

3.1.2 Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+K

Λόγω των άνω αναφερομένων, δοκιμάστηκε η δυνατότητα έκφρασης, απομόνωσης και καθαρισμού της IcmK στον πλασμιδιακό φορέα pttQ18C3, ο οποίος φέρει ως σήμανση το strep- tag στο καρβόξυ- τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης.

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ σε βακτηριακά κύτταρα E.Coli. Για τον έλεγχο της έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν μικρές καλλιέργειες των 100mL, ενώ δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 30°C και 37°C) ,τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG (1mM , 0,5mM και 0,02mM) και δύο διαφορετικά θρεπτικά υλικά (LB και 2yt), ενώ έγινε δοκιμή για αυτο-επαγωγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, χωρίς καθόλου προσθήκη IPTG.

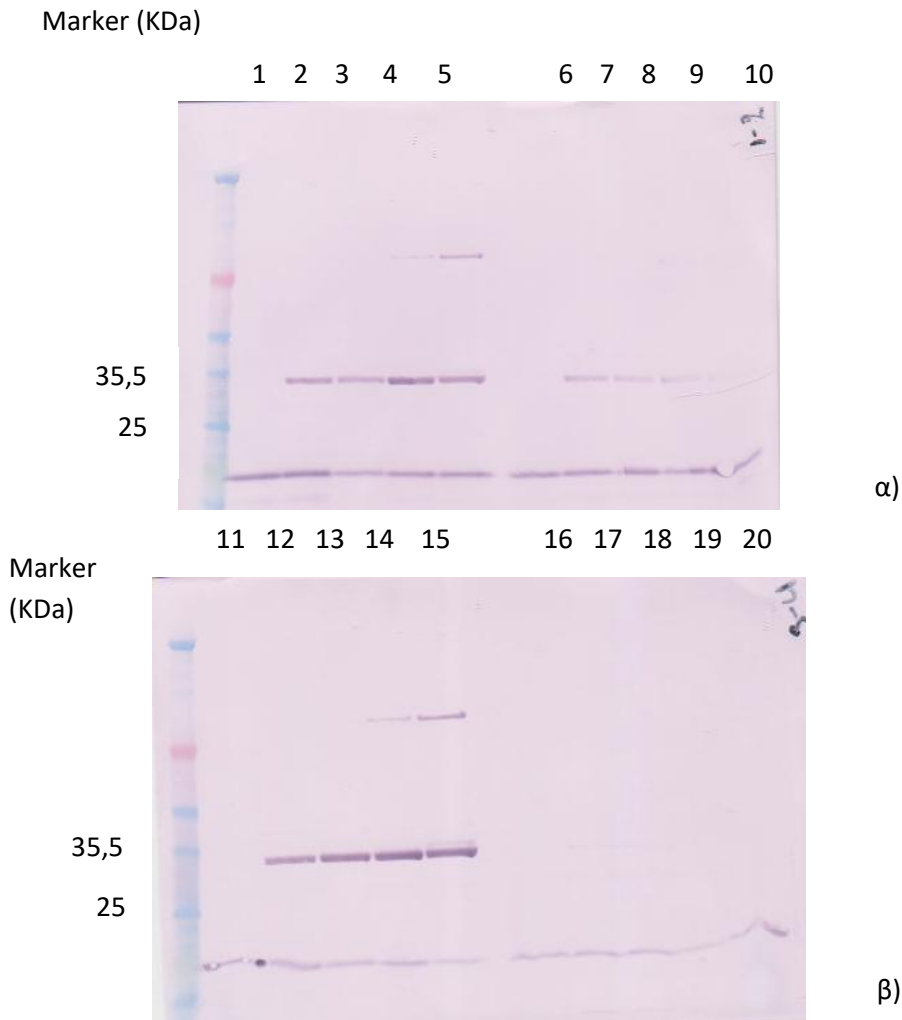
Η λήψη δείγματος 1mL πραγματοποιήθηκε την χρονική στιγμή πριν την επαγωγή και όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν 0,5-0,7 (t=0) και κατόπιν, ανά μία ώρα, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα μετά την επαγωγή (t= 3 , 4 ώρες). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα, τα οποία υπέστησαν κατεργασία με 20% SDS και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακριλαμιδίου 4%-12% προκειμένου να τρέξουν σε SDS- PAGE. Ακολούθησε η μέθοδος του Western Blot για την ανοσοανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση του anti-strep αντισώματος.



α) β)
Εικόνα 3.6 (α): Western blot για δείγματα από καλλιέργεια σε **2yt**, σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 30°C και 37°C) και σταθερή συγκέντρωση IPTG (1mM). **β)** Western blot για δείγματα από καλλιέργεια σε **LB**, σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (25°C, 30°C και 37°C) και σταθερή συγκέντρωση IPTG (1mM). **1.** 25°C, t=0, **2.** 25°C, t=3, **3.** 25°C, t=4, **4.** 30°C, t=0, **5.** 30°C, t=3, **6.** 30°C, t=4, **7.** 37°C, t=0, **8.** 37°C, t=3, **9.** 37°C, t=4.

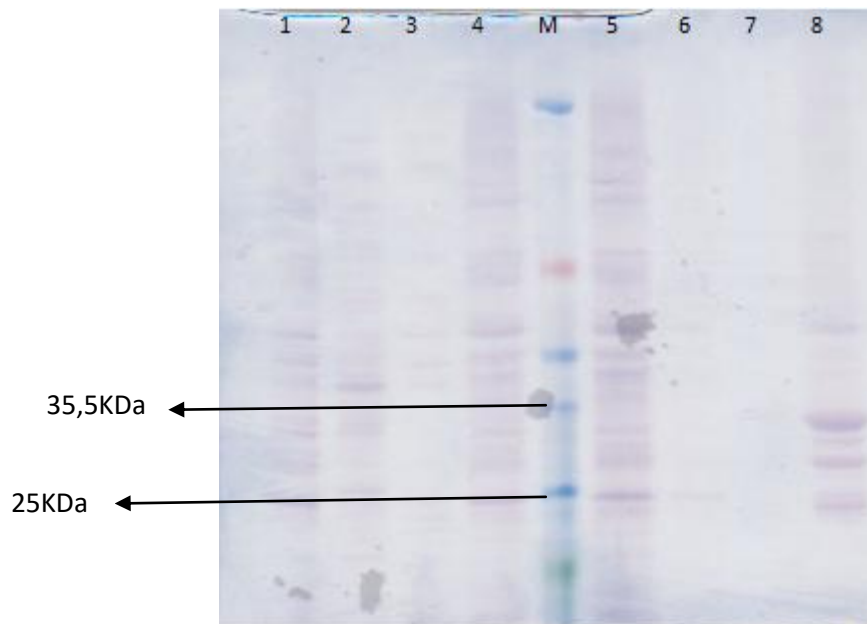
Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η ιδανική θερμοκρασία έκφρασης της IcmK με strep-tag είναι οι 37°C, το κατάλληλο θρεπτικό υλικό είναι το LB ενώ στις 4 ώρες μετά την επαγωγή η έκφραση της πρωτεΐνης είναι εντονότερη.

Με στόχο τη βελτίωση της έκφρασης της πρωτεΐνης, μελετήσαμε ως επόμενο βήμα διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG. Η θερμοκρασία παραμένει σταθερή στους 37°C, ενώ το θρεπτικό υλικό είναι το LB. Τα δείγματα ελήφθησαν σε 4 διαφορετικούς χρόνους μετά την επαγωγή (t=2, 4, 6, 8 ώρες) και ένα δείγμα control (t=0) πριν την επαγωγή.



Εικόνα 3.7 (α), (β): Western Blot για έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης με διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG αλλά και χωρίς καθόλου επαγωγή, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. **1-5.** 1mM IPTG, t=0, 2, 4, 6, 8h, **6-10.** 0,2mM IPTG, t=0, 2, 4, 6, 8h, **11-15.** 0,05mM IPTG, t=0, 2, 4, 6, 8h, **16-20.** Χωρίς επαγωγή, t=0, 2, 4, 6, 8h.

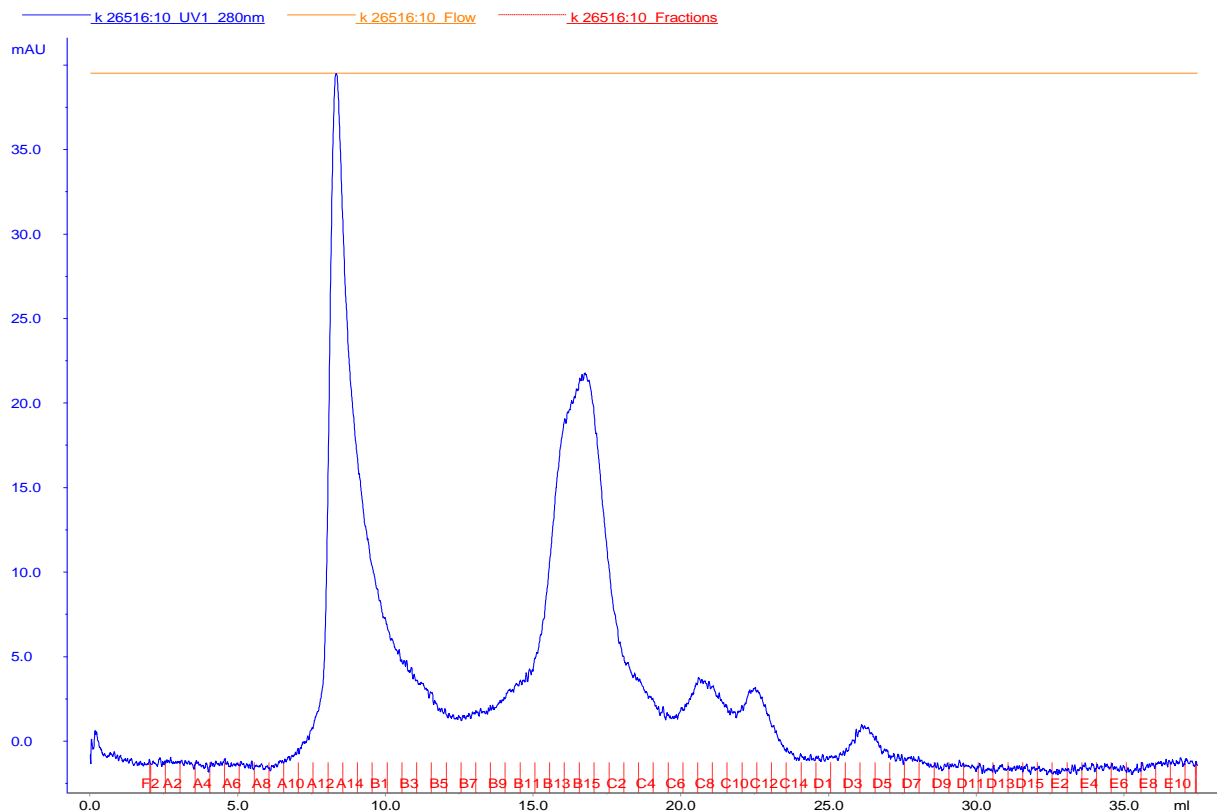
Από τα παραπάνω αποτελέσματα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η καλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρείται σε χαμηλή συγκέντρωση IPTG (0,05mM) και 6-8 ώρες μετά την επαγωγή. Με τα δεδομένα αυτά, ακολουθεί μία καλλιέργεια 2L προκειμένου να γίνει απομόνωση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συνθήκες και προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης της IcmK σε μεγαλύτερη κλίμακα.



Εικόνα 3.8: SDS-PAGE για τα κλάσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας με στήλη στρεπταβιδίνης. **1.** Αρχικές μεμβράνες, **2.** Υπερκείμενο υπερφυγοκέντρισης, **3.** Μεμβράνες επεξεργασμένες με 5m M EDTA, **4.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **5.** Flow through, **6.** Wash, **7.** Elution, **8.** El. amicon (30.000Da).

Το διάλυμα έκλουσης που προέκυψε από τη στήλη στρεπταβιδίνης συμπυκνώθηκε με τη χρήση amicon των 30.000Da σε τελικό όγκο 500μL και τελική συγκέντρωση 1mg/mL.

Έπειτα, ακολούθησε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση στήλης Superdex 200 (παράγραφος 2.2.16) για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.9: Διάγραμμα απορρόφησης- κλασμάτων έκλουσης έπειτα από καθαρισμού με στήλη μοριακού αποκλεισμού Superdex 200.

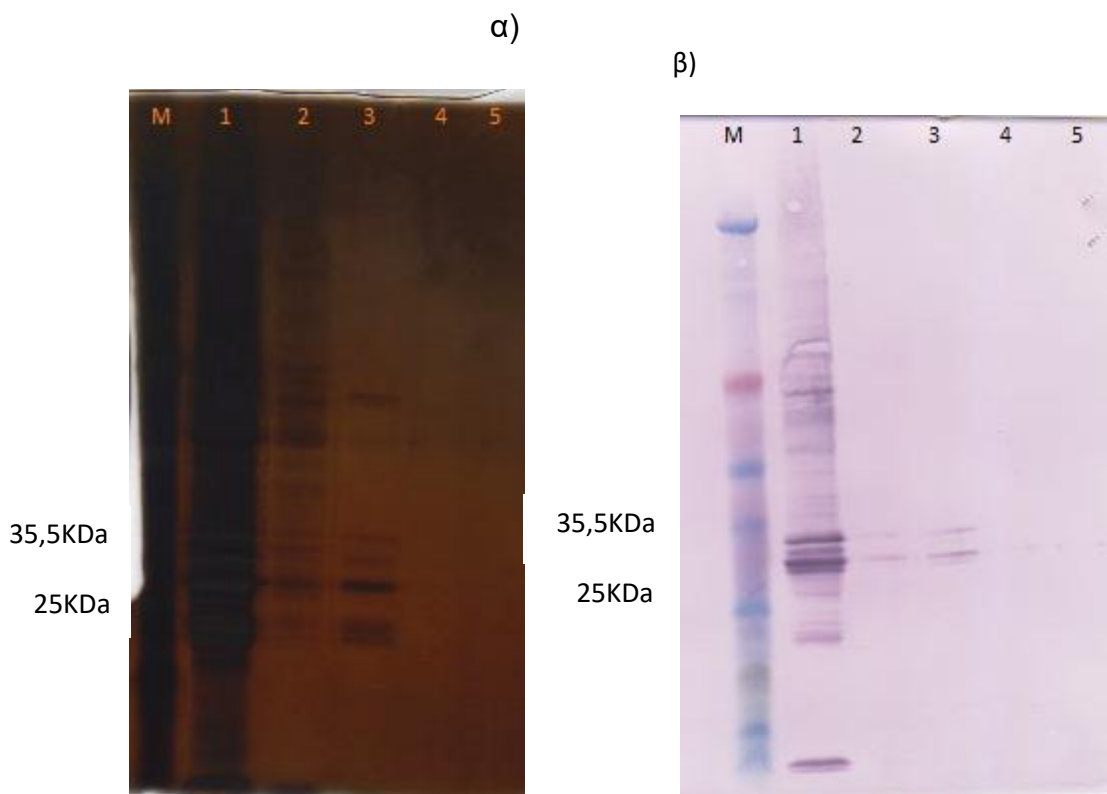
1^ο κλάσμα : A12- B2

2^ο κλάσμα: B12 – C4

3^ο κλάσμα: C6-C10

4^ο κλάσμα: C11- C13

Τα κλάσματα έκλουσης που συγκεντρώθηκαν από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού έτρεξαν σε SDS-PAGE, όπου και ανιχνεύτηκαν με νιτρικό άργυρο (Silver staining) προκειμένου να είναι ορατές οι μπάντες. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.10 (α): Silver staining για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **(β)** Western blot με τη χρήση anti-strep antibody για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **1.** Δείγμα πριν τη στήλη, **2.** Κλάσμα 1, **3.** Κλάσμα 2, **4.** Κλάσμα 3, **5.** Κλάσμα 4.

Όπως δείχνουν οι εικόνες του SDS-PAGE και του Western Blot, η IcmK βρίσκεται ως επί το πλείστον στο δεύτερο κλάσμα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού και σε σχετικά καθαρή μορφή, με την ύπαρξη λίγων προσμίξεων. Ο όγκος έκλουσης είναι περίπου 17mL. Δυστυχώς, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο κλάσμα είναι πολύ χαμηλή (0,120mg/mL σε 250μL) πράγμα που δεν μας επιτρέπει να αρχίζουμε πειράματα για κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

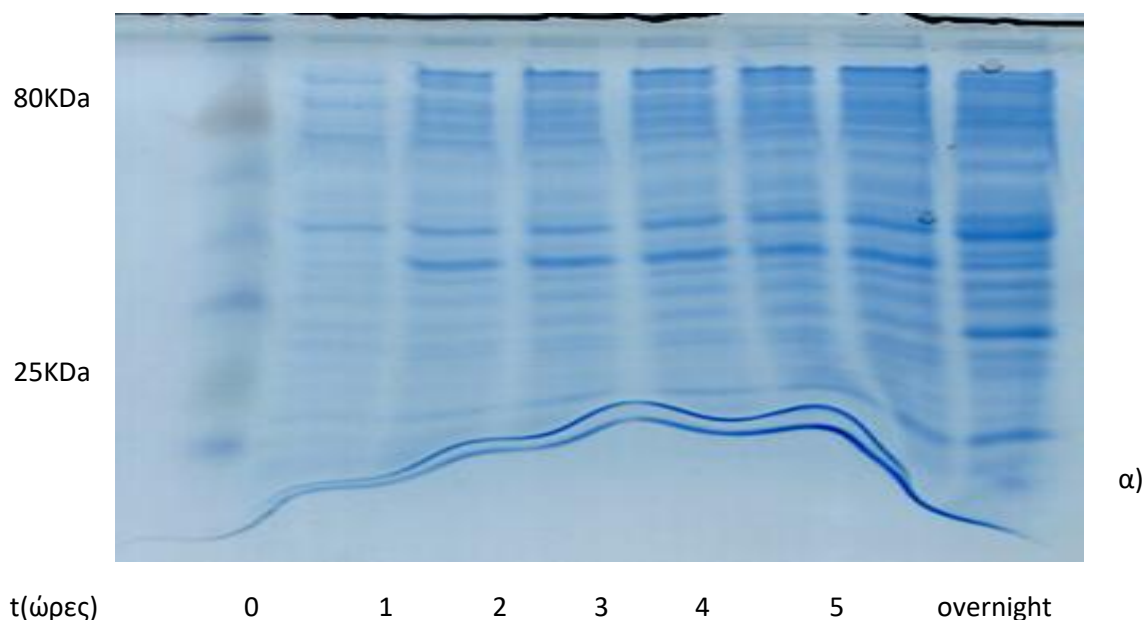
Επιπλέον, οι πρωτεϊνικές λωρίδες με μοριακό βάρος κάτω από τα 35,5KDa, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως IcmK από το Western Blot, κόπηκαν από τις πηκτές πολυακρυλαμίδιου και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρίας μάζας, ότι είναι η IcmK. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης σε μικρότερα μοριακά βάρη, είναι μία ένδειξη ότι η πρωτεΐνη έχει υποστεί πρωτεόλυση.

3.2 Έκφραση της IcmE

3.2.1 Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+E

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα E.Coli με την μέθοδο του θερμικού σοκ, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.2. Για τον έλεγχο της έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν μικρές καλλιέργειες των 100mL, ενώ δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 30°C) και δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα IPTG (1mM και 0,5mM).

Η λήψη δείγματος 1mL πραγματοποιήθηκε την χρονική στιγμή πριν την επαγωγή και όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ήταν 0,5-0,7 ($t=0$) και κατόπιν, ανά μία ώρα μετά την επαγωγή για συνολικά 5 ώρες ενώ μία τελευταία μέτρηση πάρθηκε μετά από ολονύχτια επώαση. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρίθηκαν ώστε να απομονωθούν τα κύτταρα, τα οποία υπέστησαν κατεργασία με 20% SDS και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 4%-12% προκειμένου να τρέξουν σε SDS- PAGE (παράγραφος 2.2.10). Ακολούθησε η μέθοδος του Western Blot για την ανοσοανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης με τη χρήση του anti-His αντισώματος (παράγραφος 2.2.11).

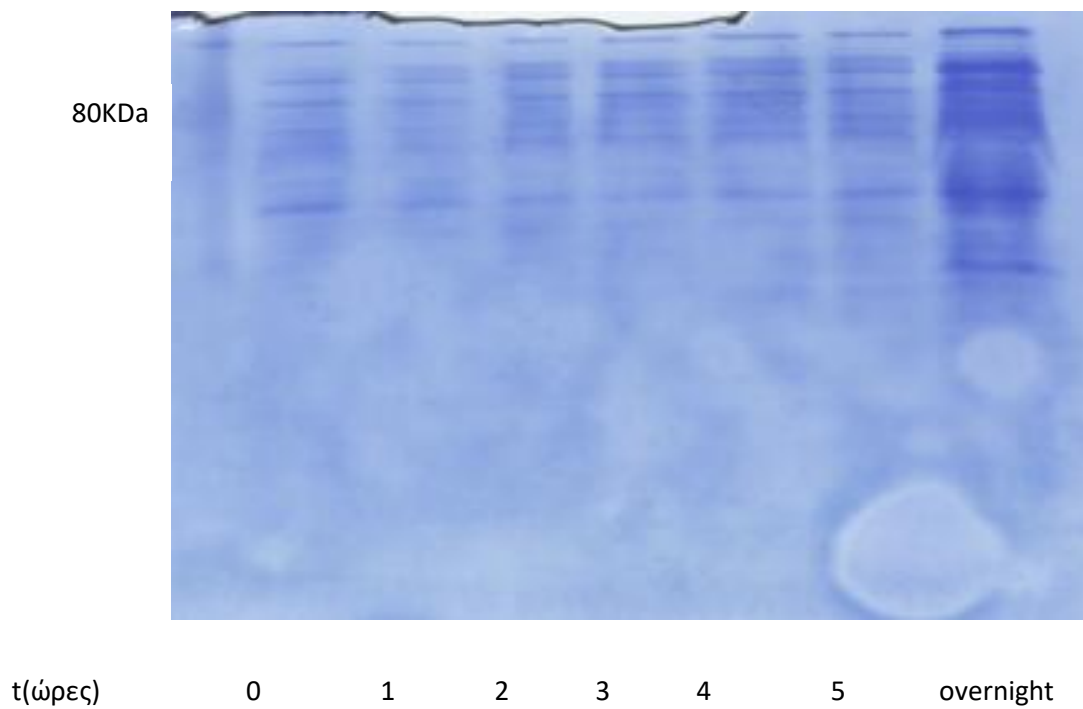


β)

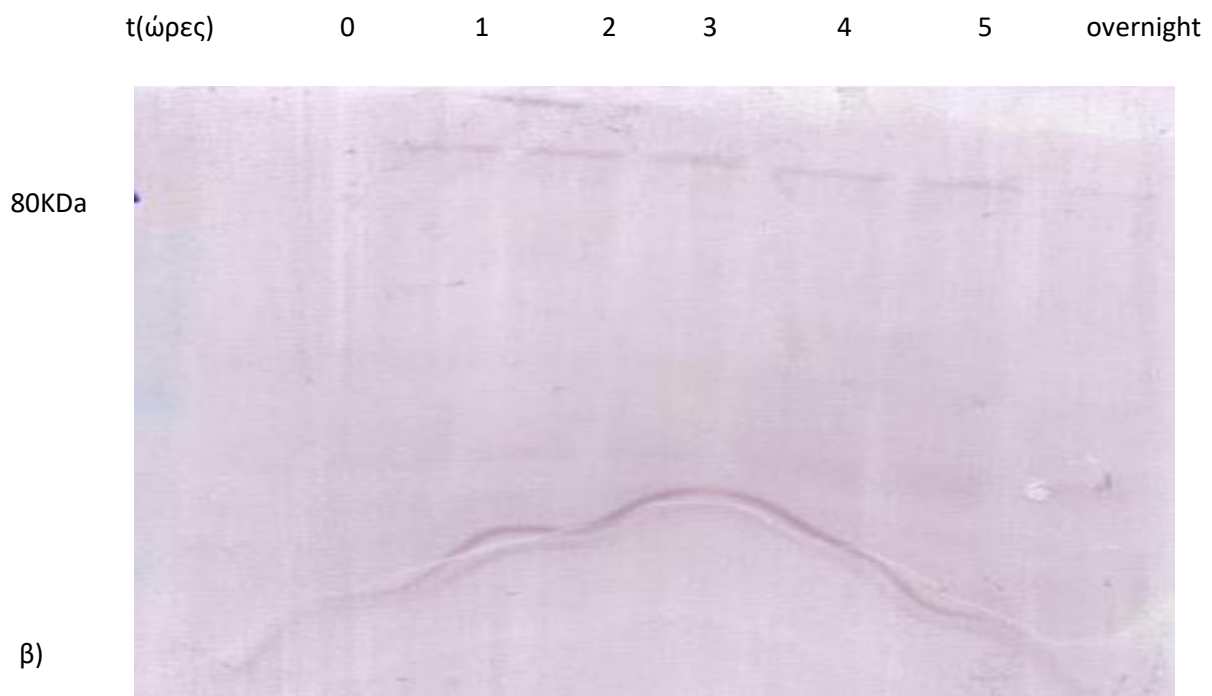


Εικόνα 3.11(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της lcmE στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

➤ 30°C, 0,5mM IPTG

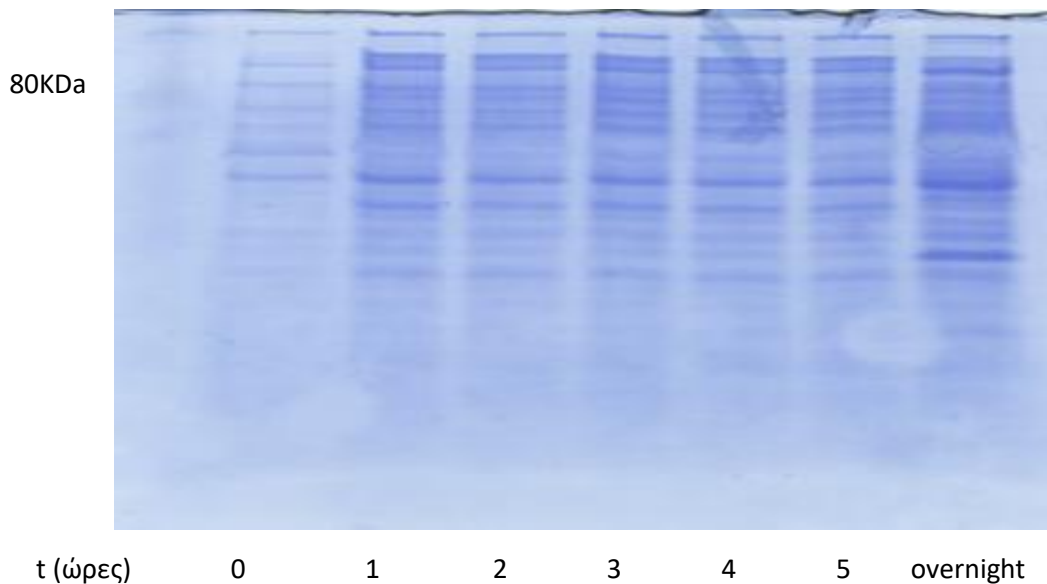


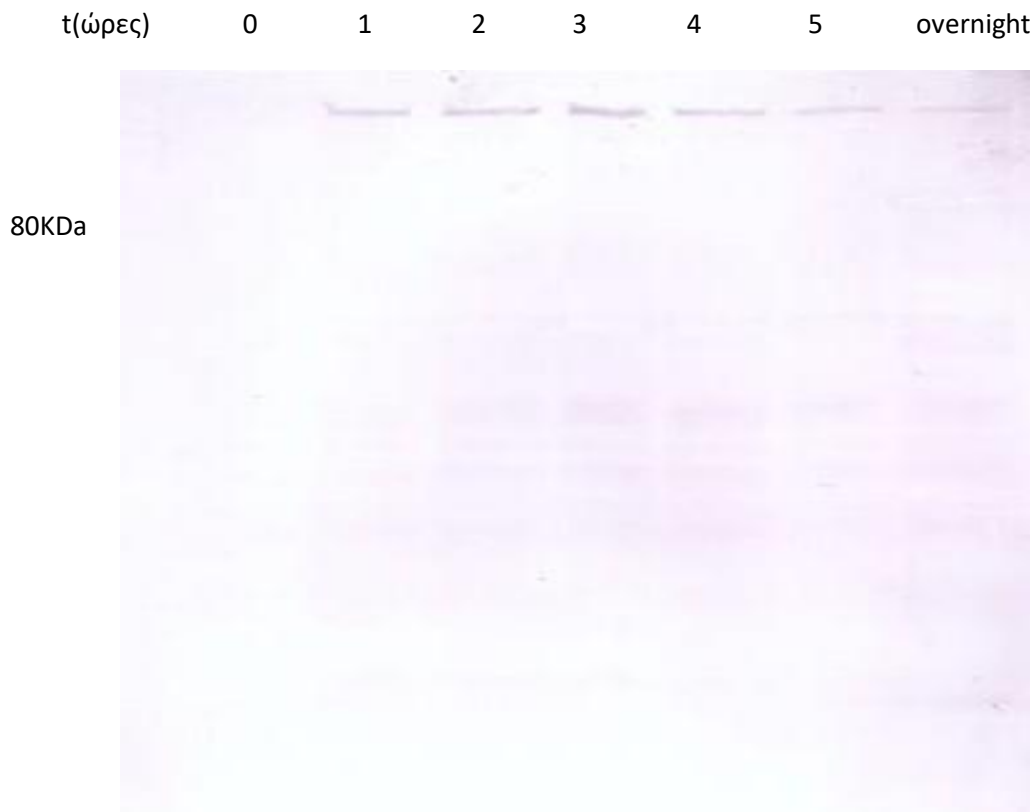
α)



Εικόνα 3.12(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της IcmE στους 30°C, με 0,5mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

➤ 30°C, 1mM IPTG



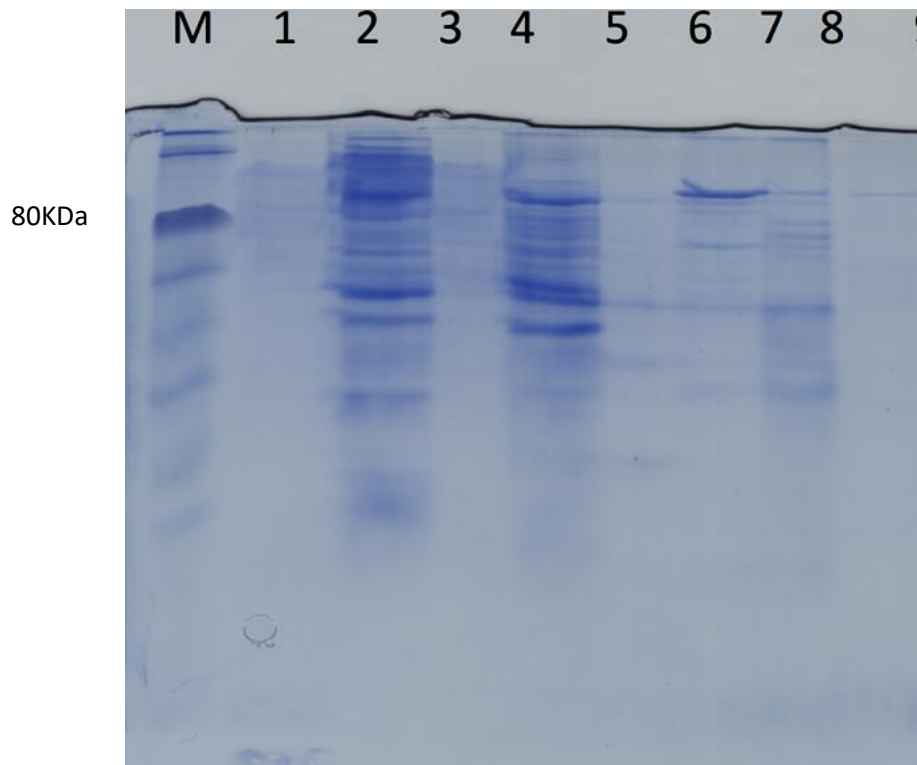


Εικόνα 3.13 (α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της IcmE στους 30°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

Συγκρίνοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η IcmE εκφράζεται σε όλες τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν (ζώνη πάνω από τα 80KDa), με τις βέλτιστες να αποτελούν οι 37°C και ο IPTG σε συγκέντρωση 1mM.

Έχοντας καταλήξει λοιπόν στις καλύτερες συνθήκες έκφρασης, λαμβάνει χώρα η υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης με μεγάλη καλλιέργεια των 5L, και η προσπάθεια καθαρισμού της με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας και στήλης Nickel-NTA (παράγραφος 2.2.13). Τελευταίο βήμα για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης αποτελεί η ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση (παράγραφος 2.2.14).

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 5L: 7,7gr



Εικόνα 3.14: SDS-PAGE 4-12% για τα δείγματα της χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση στήλης Nickel- NTA για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες που περιέχουν την IcmE. **1.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **2.** Μη διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **3.** Flow through, **4.** Wash 10mM imidazole, **5.** Wash 30mM imidazole, **6.** E200mM imidazole, **7.** E200mM imidazole amicon (10.000Da) (TCA), **8.** E500mM (TCA).

➤ Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση (Microrotofor)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

80KDa



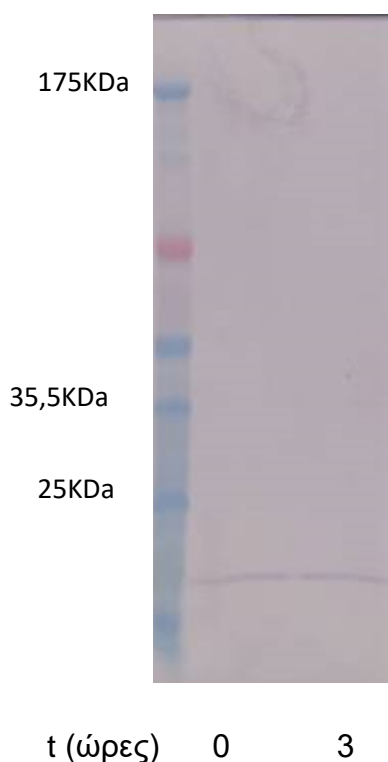
β)

Εικόνα 3.15 (α): SDS- PAGE 4-12% για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **(β)** Western Blot για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **1.** E200mM imidazole amicon(10.000Da) (TCA), **2.** Δείγμα 1 (p H= 4,3), **3.** Δείγμα 2 (p H= 4,38), **4.** Δείγμα 3 (p H= 4,5), **5.** Δείγμα 4 (p H= 4,65), **6.** Δείγμα 5 (p H= 4,70), **7.** Δείγμα 6 (p H= 7,19), **8.** Δείγμα 7 (p H= 7,37), **9.** Δείγμα 8 (p H= 7,72), **10.** Δείγμα 9 (p H= 7,72), **11.** Δείγμα 1 (p H= 7,62).

Από όλα τα παραπάνω πηκτώματα πολυακριλαμιδίου, πραγματοποιήθηκε αποκοπή των μπαντών στα μοριακά βάρη κοντά στα 80KDa προκειμένου να γίνει πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών με θρυψίνη και ταυτοποίηση της IcmE με φασματομετρία μάζας (παράγραφος 2.2.18). Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας απέδειξαν την ύπαρξη της πρωτεΐνης- στόχου σε όλα σχεδόν τα δείγματα, πράγμα που αποδεικνυει πως η πρωτεΐνη δεν χάνεται δια μέσου των πειραματικών βημάτων απομόνωσης και καθαρισμού. Παρόλα αυτά, δεν είμαστε σε θέση να πούμε πως η IcmE απομονώνεται καθαρή και λειτουργική στο μοριακό της βάρος.

3.2.2 Χρήση πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+E

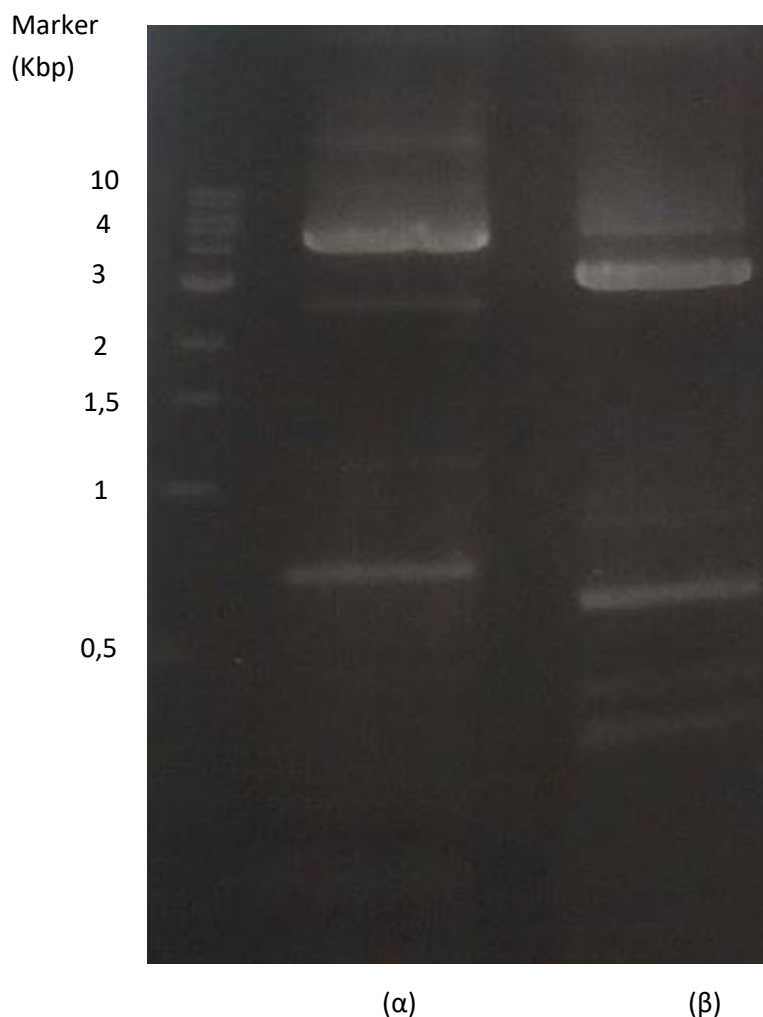
Με στόχο την απομόνωση της πρωτεΐνης, δοκιμάσαμε την έκφρασή της στον πλασμιδιακό φορέα pttQ18C3, ο οποίος φέρει ως σήμανση το strep- tag στο κάρβοξυ-τελικό άκρο, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Το πλασμίδιο κατασκευάστηκε ακολουθώντας τα βήματα για την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου, όπως περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.1. Μετά την αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation) (παράγραφος 2.1.3), πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός του επιθυμητού πλασμιδίου σε competent cells E.Coli, DH5α. Στη συνέχεια, έγινε η δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης σε μία μικρή καλλιέργεια 100mL, στους 37°C, με χρήση 1mM επαγωγέα IPTG. Δείγμα συλλέχθηκε πριν γίνει η επαγωγή (t=0) και 3 ώρες αφότου είχε προστεθεί ο IPTG. Σύμφωνα με την εικόνα του Western Blot, η πρωτεΐνη δε δείχνει καμία έκφραση.



Εικόνα 3.16: Western Blot για τη δοκιμή έκφρασης της IcmE στον πλασμιδιακό φορέα pttQ18C3.

Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η κατασκευή ενός δεύτερου πλασμιδίου, όπου σε αυτή την περίπτωση το strep-tag ήταν στο N-τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας.

Ο πλασμιδιακός φορέας (vector) έχει μέγεθος 4.520bp ενώ το εισαγόμενο γονίδιο (insert) 3.144bp. Η PCR πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε ένα από αυτά και στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης έτρεξαν σε πηκτική αγαρόζη (παράγραφος 2.1.2), προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι τα σωστά.



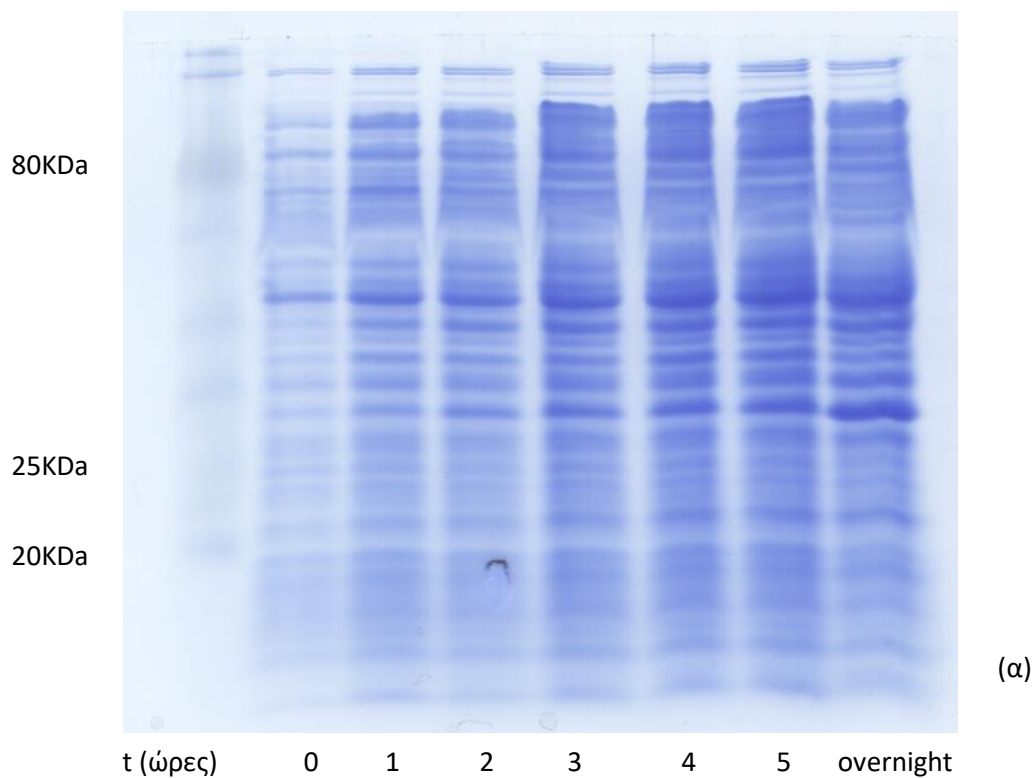
Εικόνα 3.17: Gel αγαρόζης για προϊόντα PCR. Στην λωρίδα (α) είναι ο vector (4.520bp) και στη λωρίδα (β) το εισερχόμενο γονίδιο της E (3.144bp).

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation) για τον πλασμιδιακό φορέα και το εισερχόμενο γονίδιο, το προϊόν της οποίας, μετασχηματίστηκε σε competent cells DH5α, απ'όπου όμως, δεν δημιουργήθηκαν καθόλου αποικίες.

3.3 Έκφραση της DotD

3.3.1 Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+D

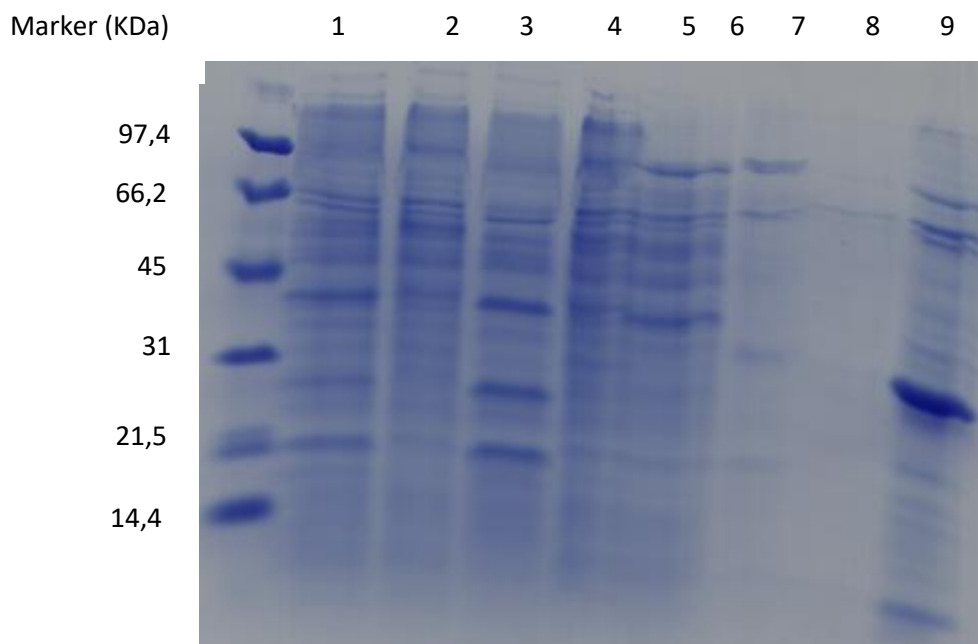
Για την προσπάθεια έκφρασης της DotD στον πλασμιδιακό φορέα pttQ18A2, έγινε μόνο μία δοκιμή με καλλιέργεια 100mL στους 37°C και συγκέντρωση επαγωγέα IPTG στο 1mM. Αρχικά, ελήφθη δείγμα πριν γίνει η επαγωγή, και κατόπιν ανά μία ώρα για 5 ώρες και ένα μετά το πέρας μίας νύχτας.



Εικόνα 3.18 (α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotD στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

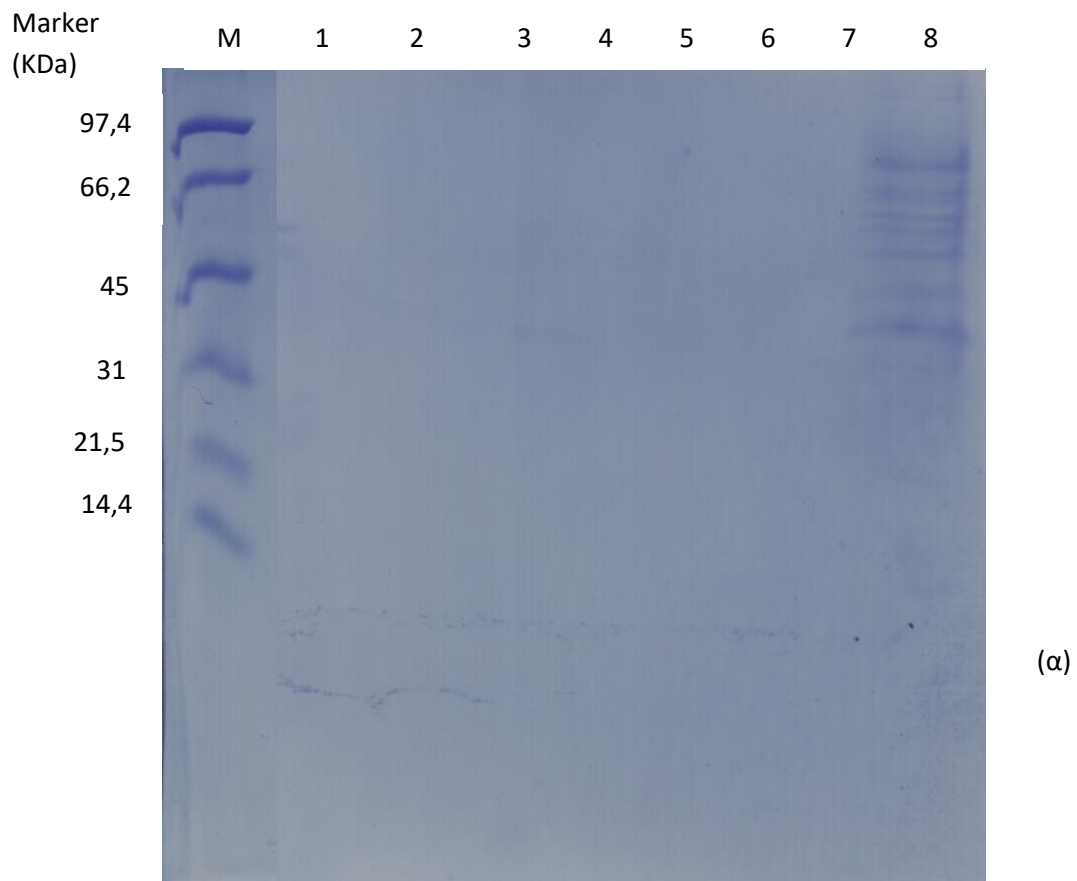
Συγκρίνοντας την ένταση των μπαντών των διαφορετικών ωρών στο Western Blot, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται μεταξύ 3 και 4 ωρών μετά την επαγωγή. Έχοντας ως δεδομένο την πληροφορία αυτή, προχωράμε σε προσπάθεια υπερέκφρασης της DotD με καλλιέργεια 5L.

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 5L: 12,33gr

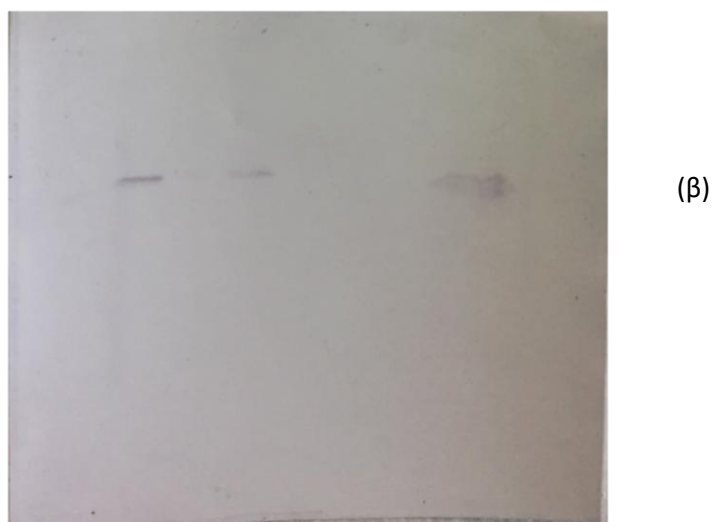


Εικόνα 3.19: SDS-PAGE 4-12% για τα δείγματα της χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση στήλης Nickel- NTA για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες που περιέχουν την DotD. **1.** Αρχικές μεμβράνες, **2.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **3.** Μη διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **4.** Flow through, **5.** Wash 10mM imidazole, **6.** Wash 30mM imidazole, **7.** E200mM imidazole, **8.** E500mM (TCA), **9.** E200mM imidazole amicon (10.000Da) (TCA).

➤ Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση (Microrotofor)



1 2 3 4 5 6 7 8



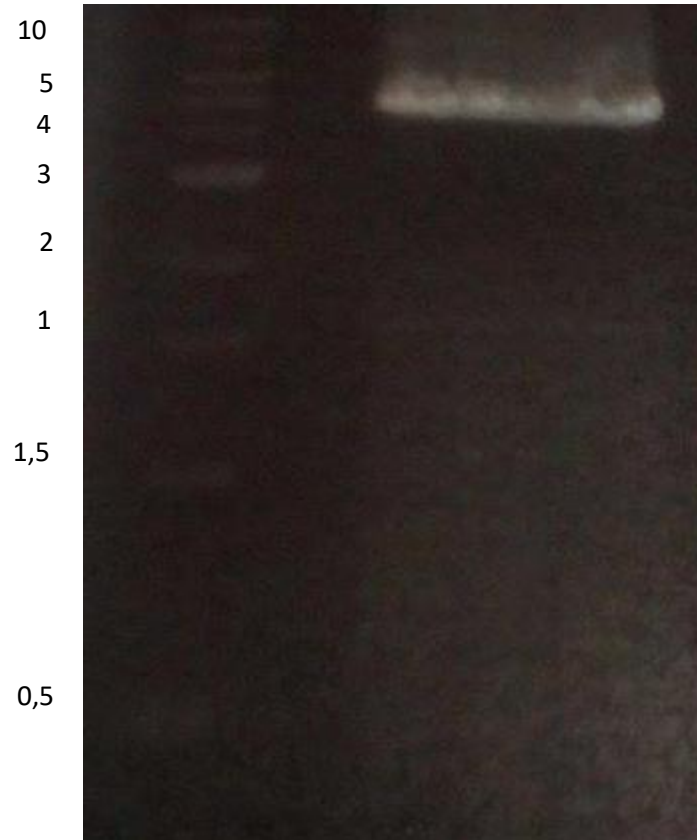
Εικόνα 3.20 (α): SDS- PAGE 4-12% για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **(β)** Western Blot για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **1.** E200mM imidazole amicon(10.000Da) (TCA), **2.** E500mM imidazole (TCA), **3.** Δείγμα 1 (pH= 1,87), **4.** Δείγμα 2 (pH= 2,5), **7.** Δείγμα 3 (pH=7,8), **8.** Δείγμα 4 (pH= 11,2),

Από όλα τα παραπάνω πηκτώματα, κόπηκαν οι μπάντες σε μοριακά βάρη κοντά στα 20KDa αλλά και μεταξύ 30-40KDa, εκεί δηλαδή που έχουμε απόκριση στα Western Blot, προκειμένου να γίνει πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών με σκοπό την ταυτοποίηση της DotD. Η πρωτεΐνη- στόχος δεν κατάφερε να ταυτοποιηθεί με φασματομετρία μάζας, κι έτσι δοκιμάστηκε η έκφραση και ο καθαρισμός της DotD σε πλασμιδιακό φορέα pttQ18C3.

3.3.2 Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+D

Για την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου για την έκφραση της DotD, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pttQ18A2, από το οποίο διαγράφηκε η ακολουθία του His-tag, και με την βοήθεια των εκκινητών (primers) εισάχθηκε το strep-tag στο C- τελικό άκρο της αμινοξυικής ακολουθίας της πρωτεΐνης. Το προϊόν της PCR έτρεξε σε πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο διαπιστώθηκε η επιτυχία της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενώ στη συνέχεια έλαβε χώρα η αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation) κατά την οποία ο πλασμιδιακός φορέας έκλεισε μαζί με το επιθυμητό γονίδιο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός σε κύτταρα DH5α και ελέγχθηκε η έκφραση της πρωτεΐνης σε μικρή καλλιέργεια 100mL, στους 37°C και χρήση 1mM επαγωγέα IPTG.

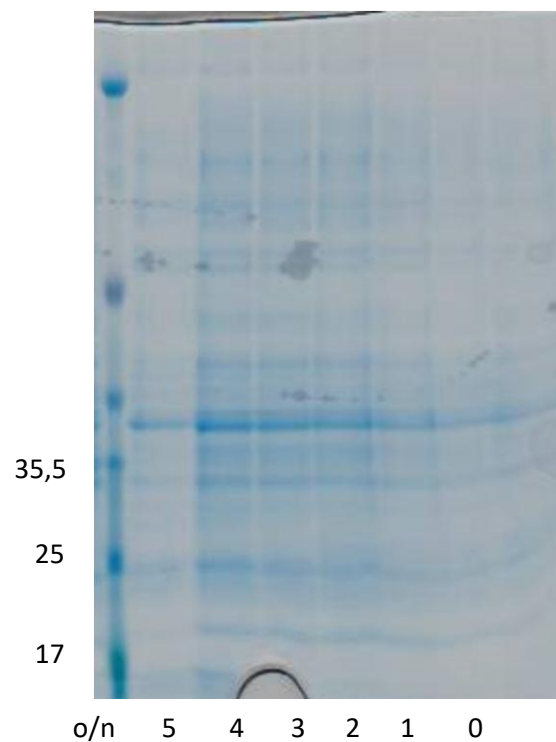
Marker (Kbp)



Εικόνα 3.21: Gel αγαρόζης για προϊόν PCR. Η μπάντα αντιστοιχεί στις 5.063bp

➤ Έκφραση της DotD στους 37°C με 1mM IPTG

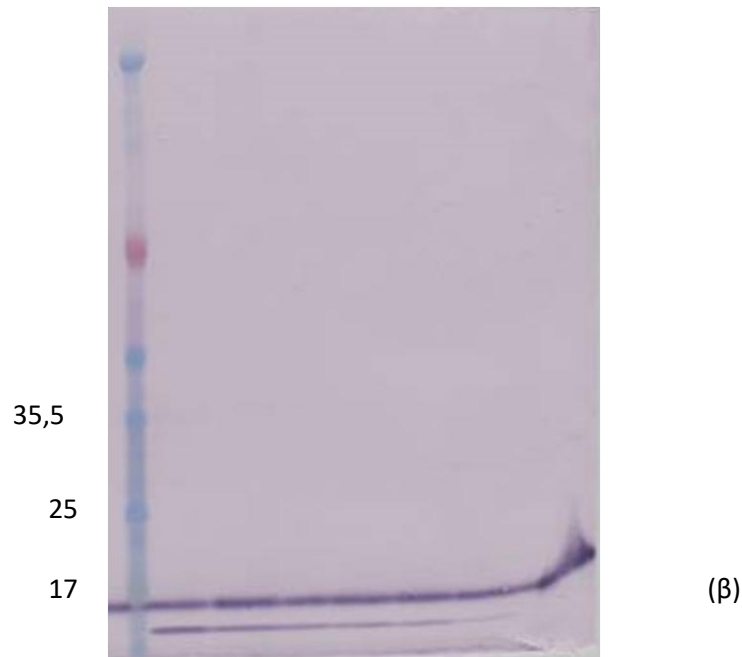
Marker (KDa)



(α)

ο/n 5 4 3 2 1 0

t (ώρες) o/n 5 4 3 2 1 0

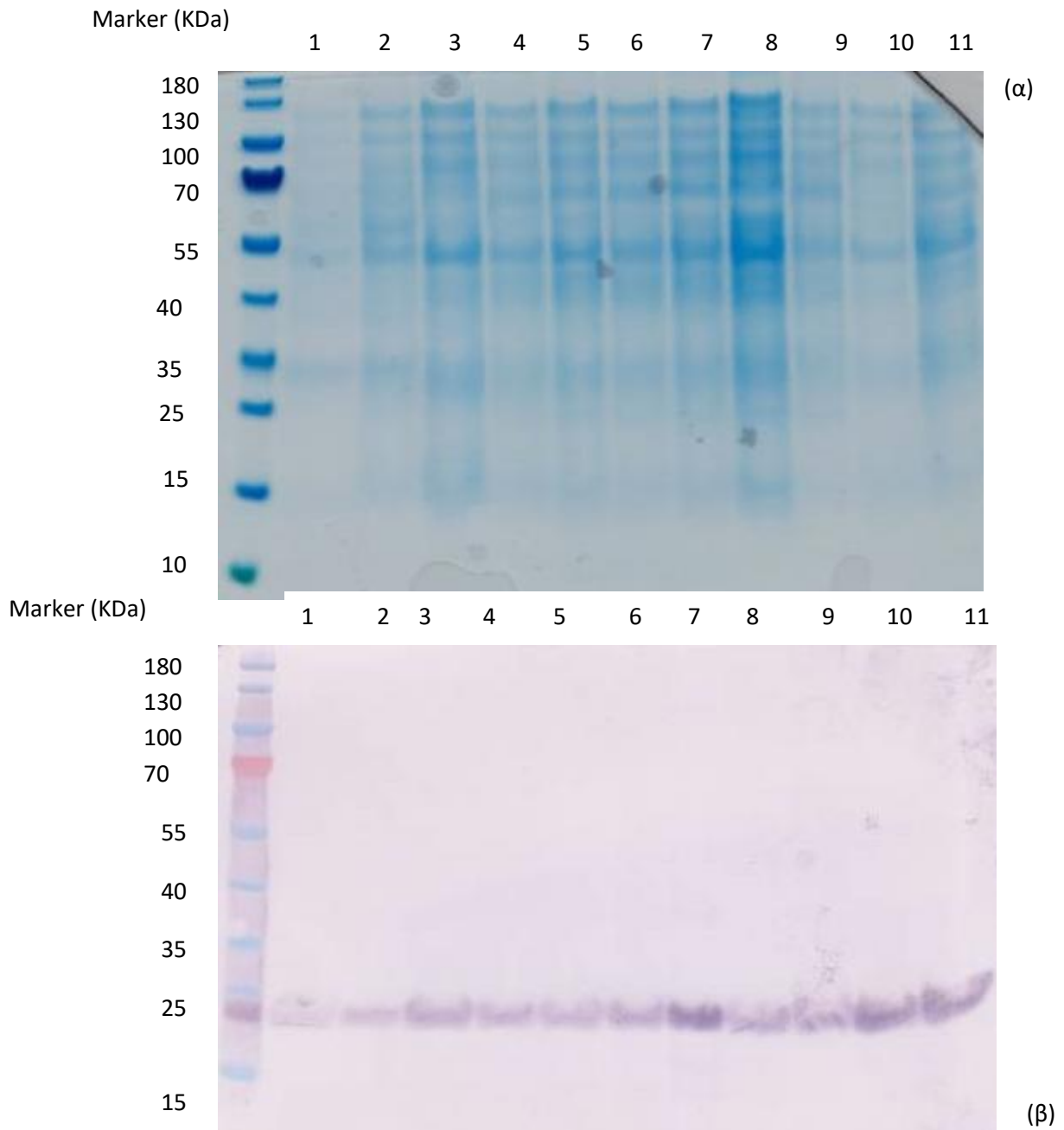


Εικόνα 3.22(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotD στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

Η πρώτη δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης, δείχνει να έχει απόκριση σε χαμηλό μοριακό βάρος (μπάντες κάτω από τα 17KDa). Για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της DotD χρησιμοποιήθηκαν τρεις νέες καλλιέργειες των 100mL, κάθε μία από τις οποίες είχε τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- **1^η** : Δείγμα control. Καλλιέργεια κυττάρων E.Coli στα οποία δεν είχε γίνει μετασχηματισμός του πλασμιδίου pttQB2 (DotD). Επώαστηκε στους 37°C έως ότου OD= 0,5-0,8, όπου έγινε η επαγωγή με 1mM IPTG. Συλλέχθηκαν δύο δείγματα, ένα πριν την επαγωγή (t=0) και ένα δεύτερο, τρεις ώρες μετά (t=3).
- **2^η**: Επώαση μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37°C έως ότου OD=0,5- 0,8, όπου έγινε η επαγωγή με 1mM IPTG. Ένα δείγμα συλλέχθηκε πριν την προσθήκη του IPTG, και έκτοτε ανά μία ώρα για 5 ώρες και ένα τελευταίο μετά από ολονύκτια επώαση.

- **3^η**: Επώαση μετασχηματισμένων κυττάρων στους 37°C έως ότου OD=0,5- 0,8, όπου και η καλλιέργεια μεταφέρθηκε στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε η επαγωγή με 1mM IPTG και η επώαση συνεχίστηκε στους 18°C. Συλλέχθηκαν δύο δείγματα, ένα πριν την επαγωγή (t=0) και ένα δεύτερο, τρεις ώρες μετά (t=3).

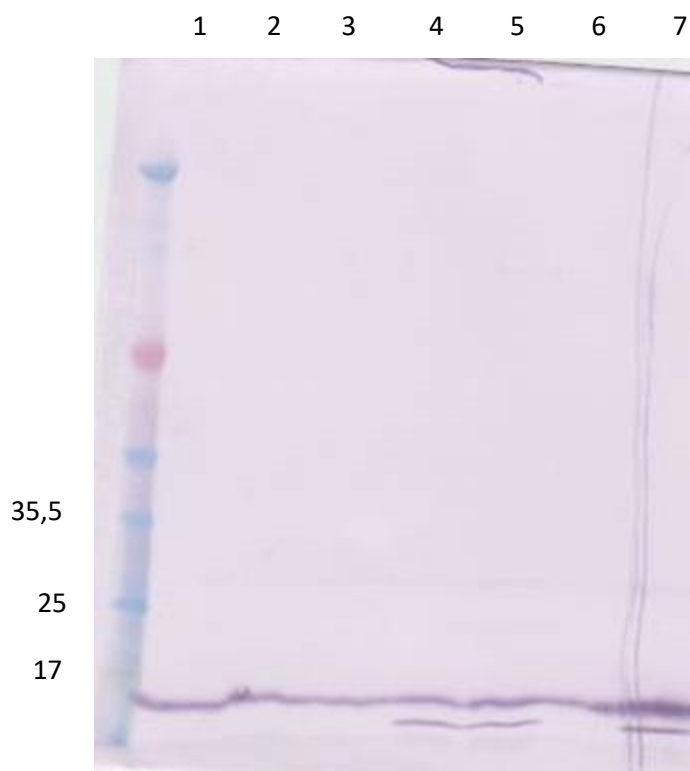


Εικόνα 3.23(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotD στους 37°C και στους 18°C με 1mM IPTG και τη χρήση δείγματος control ,για

διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής. **1.** 37°C- control (t=0), **2.** 37°C- control (t=3), **3.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=0), **4.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=1), **5.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=2), **6.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=3), **7.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=4), **8.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=5), **9.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=o/n), **10.** 18°C-3^η καλλιέργεια (t=0), **11.** 18°C-3^η καλλιέργεια (t=3).

➤ Δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης από δύο διαφορετικές αποικίες

Στο επόμενο βήμα, δοκιμάστηκε η διαφορετική ικανότητα των αποικιών να εκφράζουν την πρωτεΐνη με διαφορετική ένταση. Έτσι, επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές αποικίες και πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές καλλιέργειες στους 37°C και επαγωγή με 1mM IPTG. Έγινε επίσης χρήση καλλιέργειας control.



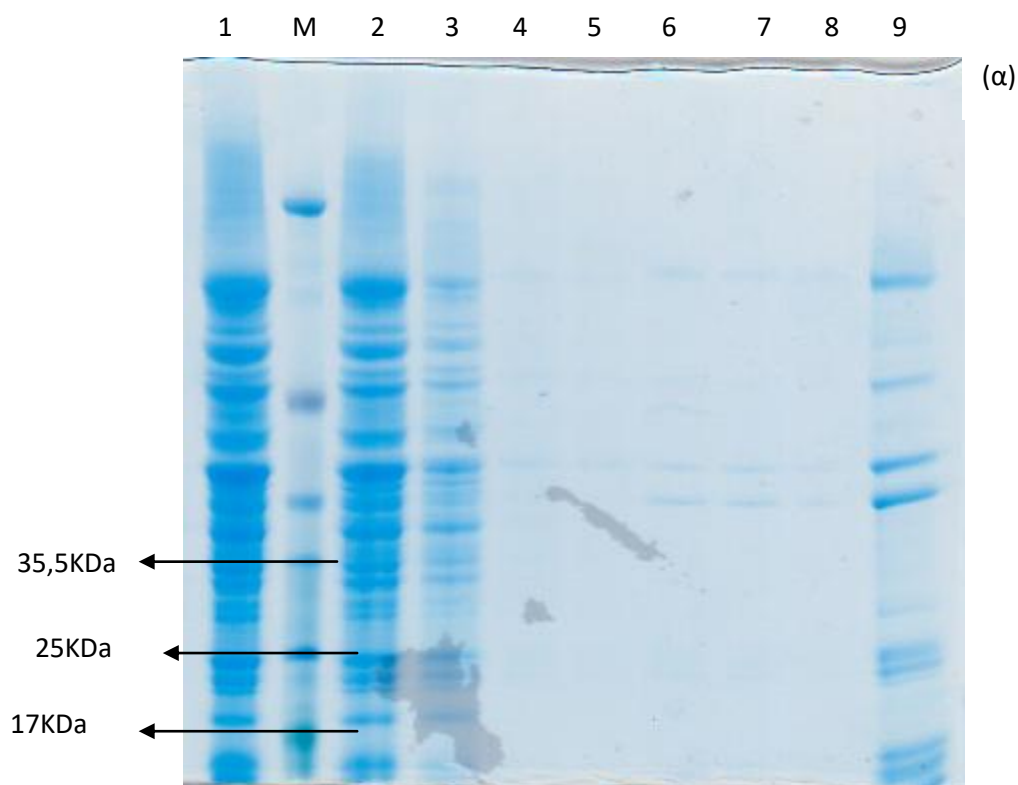
Εικόνα 3.24: Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής. Χρησιμοποιήθηκε δείγμα control (στα πρώτα δύο πηδαγάκια) και δύο διαφορετικές αποικίες. **1.** Control (t=0), **2.** Control (t=3), **3.** Αποικία 1 (t=0), **4.** Αποικία 1 (t=3), **5.** Αποικία 1 (t=4), **6.** Αποικία 2 (t=0), **7.** Αποικία 2 (t=3).

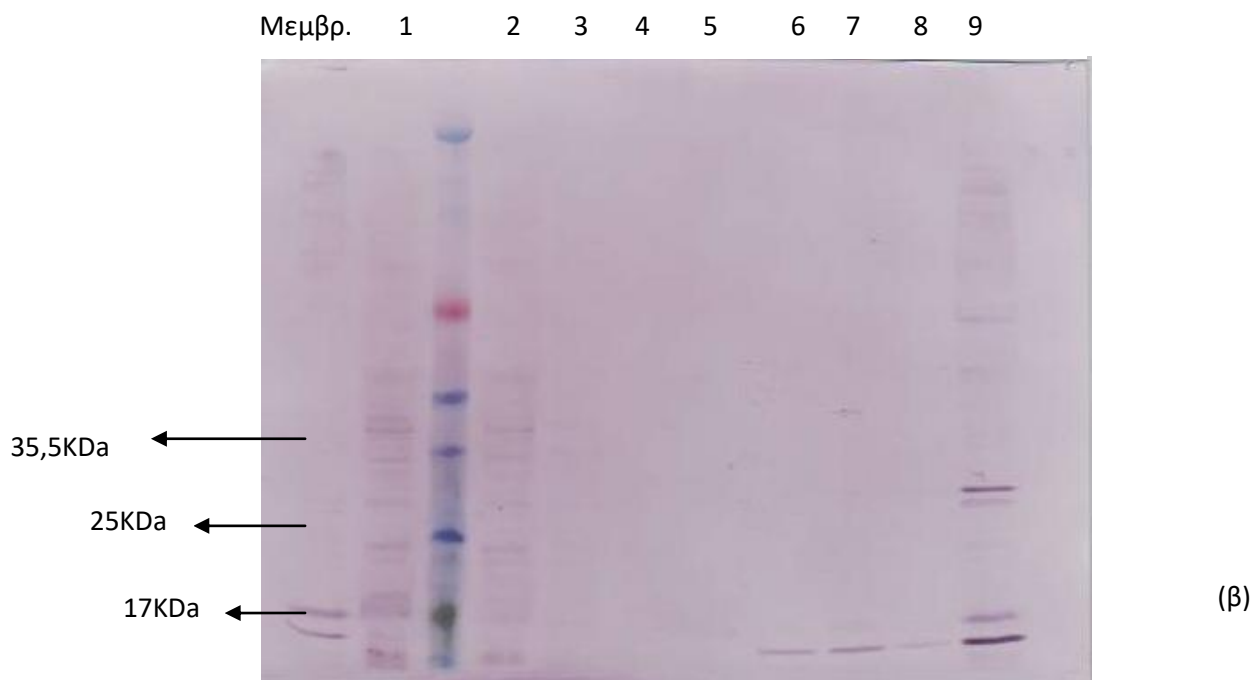
Από την εικόνα του παραπάνω western blot, φαίνεται ότι για το χρονικό διάστημα τριών ωρών μετά την επαγωγή η πρωτεΐνη εκφράζεται περισσότερο ικανοποιητικά στην αποικία 2. Έτσι, προκειμένου να αποθηκευτούν τα συγκεκριμένα κύτταρα, χρησιμοποιούνται 10μL προκαλλιέργειας για την αποικία 2, και επαναδιασπείρονται σε στερεή καλλιέργεια τριβλίου Petri που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

Ακολουθεί μία καλλιέργεια 2L προκειμένου να γίνει απομόνωση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συνθήκες και προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της DotD.

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 2L: 7,18gr

- Διαλυτοποίηση μεμβρανών και προσπάθεια απομόνωσης της πρωτεΐνης με στήλη στρεπταβιδίνης (3mL)



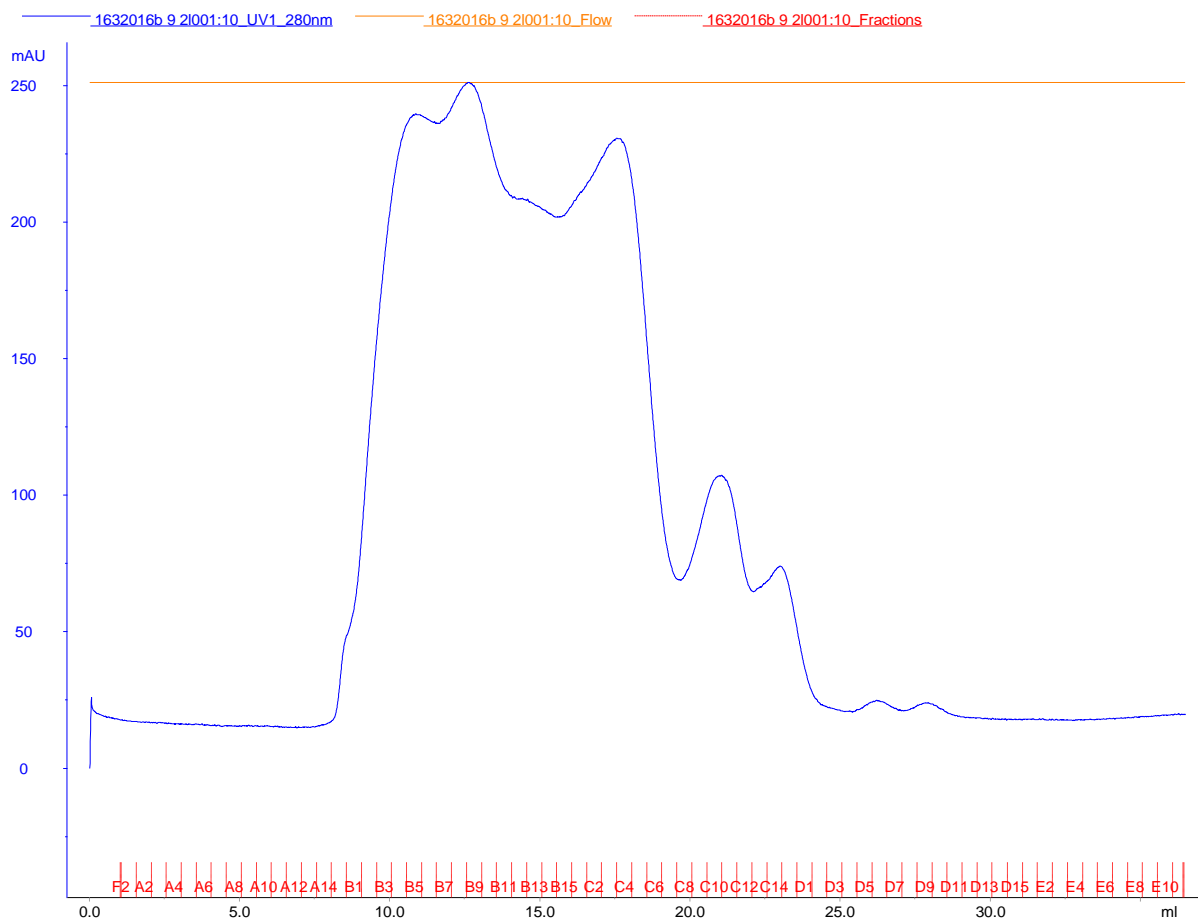


Εικόνα 3.25: (α) SDS-PAGE για τα κλάσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας με στήλη στρεπταβιδίνης. (β) Western Blot για τα ίδια δείγματα.

1. Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, 2. Flow through, 3. Wash 1, 4. Wash 2, 5. Wash 3, 6. Elution 1, 7. Elution 2., 8. Elution 3, 9. Elution amicon (10.000Da).

Το διάλυμα έκλουσης που προέκυψε από τη στήλη στρεπταβιδίνης συμπυκνώθηκε με τη χρήση amicon των 10.000Da σε τελικό όγκο 500μL και τελική συγκέντρωση 4,8mg/mL.

Έπειτα, ακολούθησε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση στήλης Superdex 200 (παράγραφος 2.2.16) για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.26: Διάγραμμα απορρόφησης- κλασμάτων έκλουσης έπειτα από καθαρισμού με στήλη μοριακού αποκλεισμού Superdex 200.

Κλάσματα που συγκεντρώθηκαν:

1^ο κλάσμα: A15-B2

2^ο κλάσμα: B3-B6

3^ο κλάσμα: B7-B10

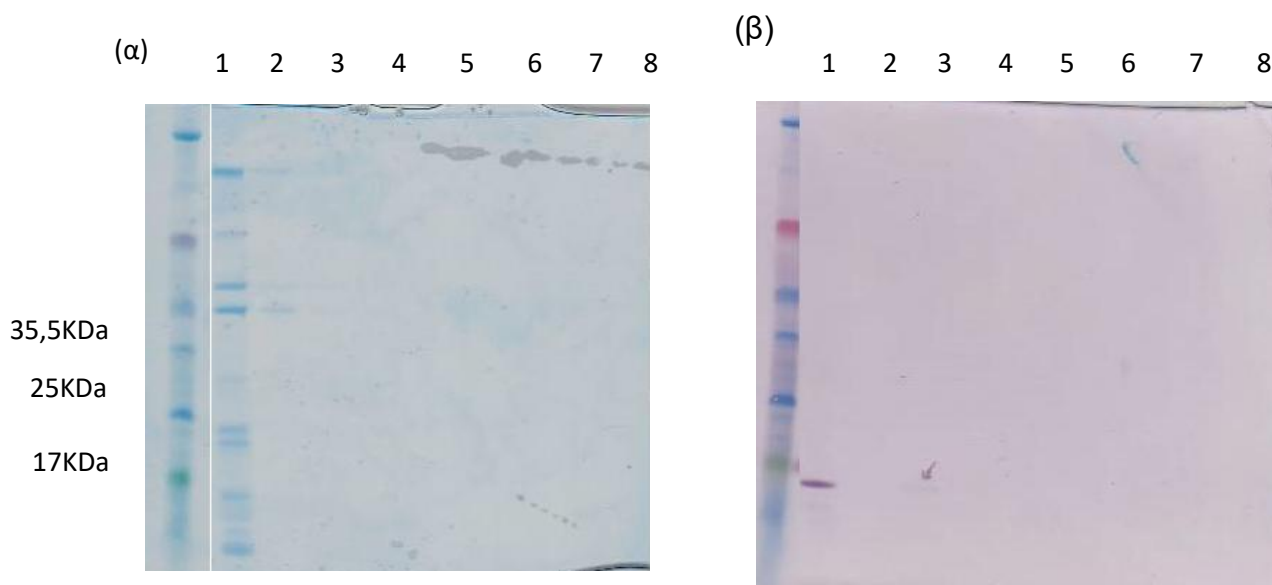
4^ο κλάσμα: B11-C1

5^ο κλάσμα: C2- C7

6^ο κλάσμα: C8- C12

7^ο κλάσμα → C13-D2

Τα κλάσματα έκλουσης που συγκεντρώθηκαν από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού έτρεξαν σε SDS-PAGE. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης με τη χρήση Western Blot.



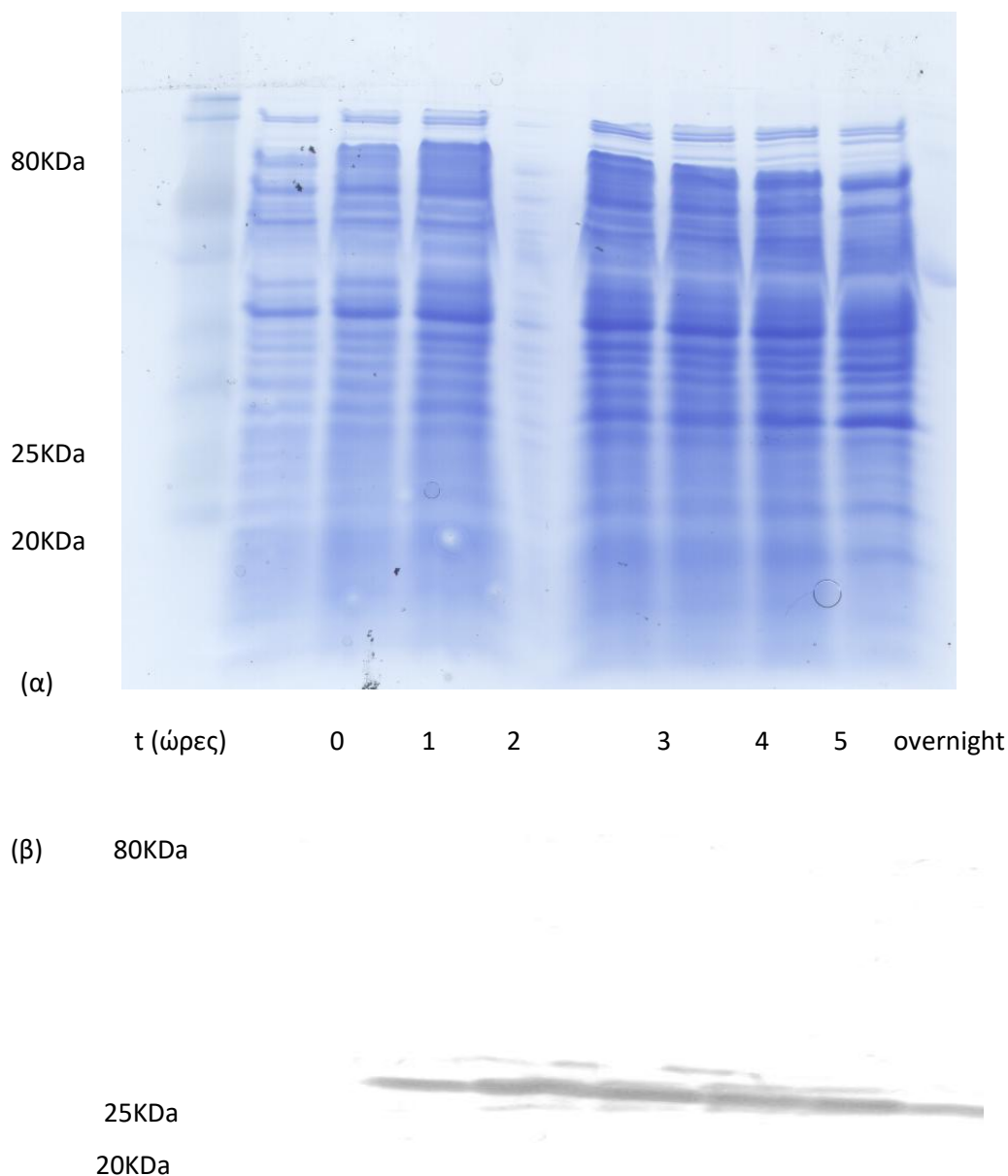
Εικόνα 3.27(α): SDS-PAGE 4-12% για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **(β)** Western blot με τη χρήση anti-strep antibody για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **1.** Δείγμα πριν από τη στήλη, **2.** 1^ο κλάσμα, **3.** 2^ο κλάσμα, **4.** 3^ο κλάσμα, **5.** 4^ο κλάσμα, **6.** 5^ο κλάσμα, **7.** 6^ο κλάσμα, **8.** 7^ο κλάσμα.

Από τα παραπάνω πηκτώματα, έγινε αποκοπή των μπαντών στις περιοχές γύρω στα 17KDa, αλλά και σε υψηλότερα μοριακά βάρη, στις οποίες πραγματοποιήθηκε επεξεργασία για πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών. Η φασματομετρία μάζας ταυτοποίησε την DotD, πράγμα που μας επιβεβαιώνει την ταυτότητά της. Περισσότερη έμφαση στην ανάλυση αποτελεσμάτων θα δοθεί στην επόμενη ενότητα της εργασίας.

3.4 Έκφραση της DotC

3.4.1 Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18A2+C

Για την προσπάθεια έκφρασης της DotC στον πλασμιδιακό φορέα pttQ18A2, έγινε μόνο μία δοκιμή με καλλιέργεια 100mL στους 37°C και συγκέντρωση επαγωγέα IPTG στο 1mM. Αρχικά, ελήφθη δείγμα πριν γίνει η επαγωγή (t=0), και κατόπιν ανά μία ώρα για 5 ώρες και ένα μετά το πέρας μίας νύχτας.



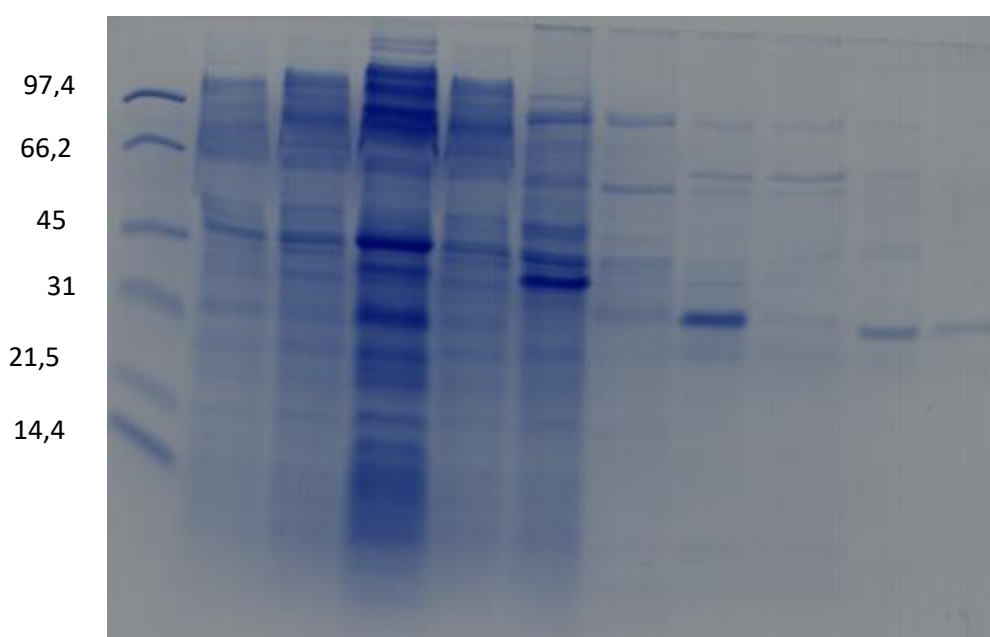
Εικόνα 3.28 (α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotC στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

Συγκρίνοντας την ένταση των μπαντών των διαφορετικών ωρών στο Western Blot, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται στις 3 ώρες μετά την επαγωγή. Έχοντας ως δεδομένο την πληροφορία αυτή, προχωράμε σε προσπάθεια υπερέκφρασης της DotC με καλλιέργεια 5L.

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 5L: 13,19gr

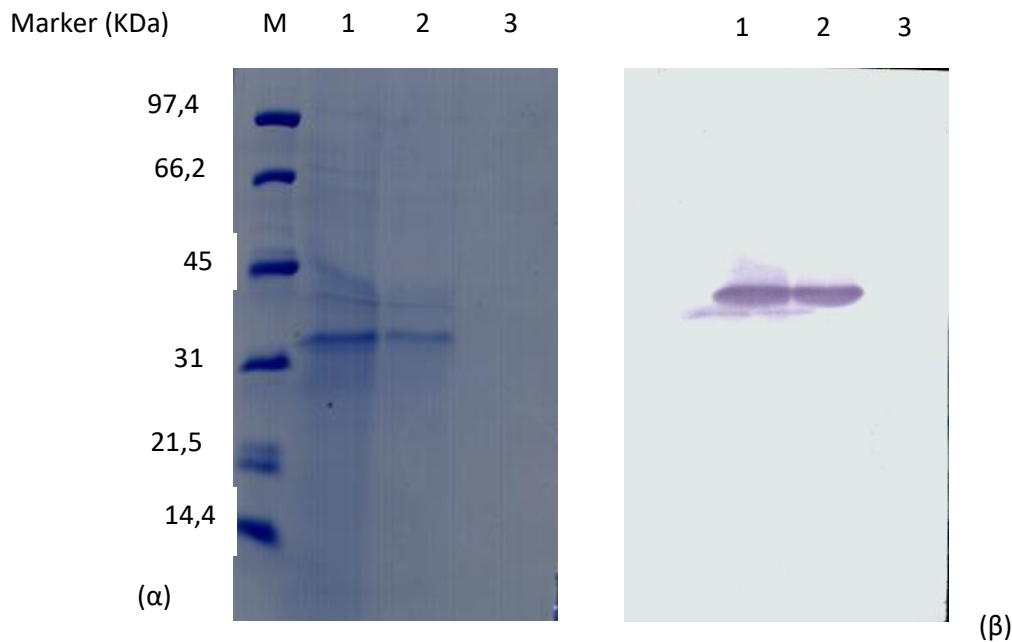
➤ Διαλυτοποίηση μεμβρανών και απομόνωση με στήλη Ni-NTA

Marker (kDa) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Εικόνα 3.29: SDS-PAGE 4-12% για τα δείγματα της χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση στήλης Nickel-NTA για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες που περιέχουν την DotC. **1.** Μεμβράνες, **2.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **3.** Μη διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **4.** Flow through, **5.** Wash 10mM imidazole, **6.** Wash 30mM imidazole, **7.** Elution 200mM imidazole, **8.** Elution 500mM (TCA), **9.** E200mM imidazole amicon (10.000Da) (TCA), **10.** E200mM imidazole amicon (10.000Da).

➤ Ισοηλεκτρική εστίαση σε υγρή φάση (Microrotofor)



Εικόνα 3.30 (α): SDS- PAGE 4-12% για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **(β)** Western Blot για τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από το Microrotofor. **1.** Δείγμα 1 (pH= 2,97), **2.** Δείγμα 2 (pH= 3,5), **3.** Δείγμα 3 (pH= 11)

Από όλα τα παραπάνω πηκτώματα, αναλύθηκαν οι πρωτεϊνικές λωρίδες σε μοριακά βάρη κοντά στα 30KDa προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση της DotC. Η πρωτεΐνη-στόχος ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας, όμως δοκιμάστηκε και η έκφραση και η απομόνωση της DotC σε πλασμιδιακό φορέα pttQ18C3.

3.4.2 Χρήση του πλασμιδιακού φορέα pttQ18C3+C

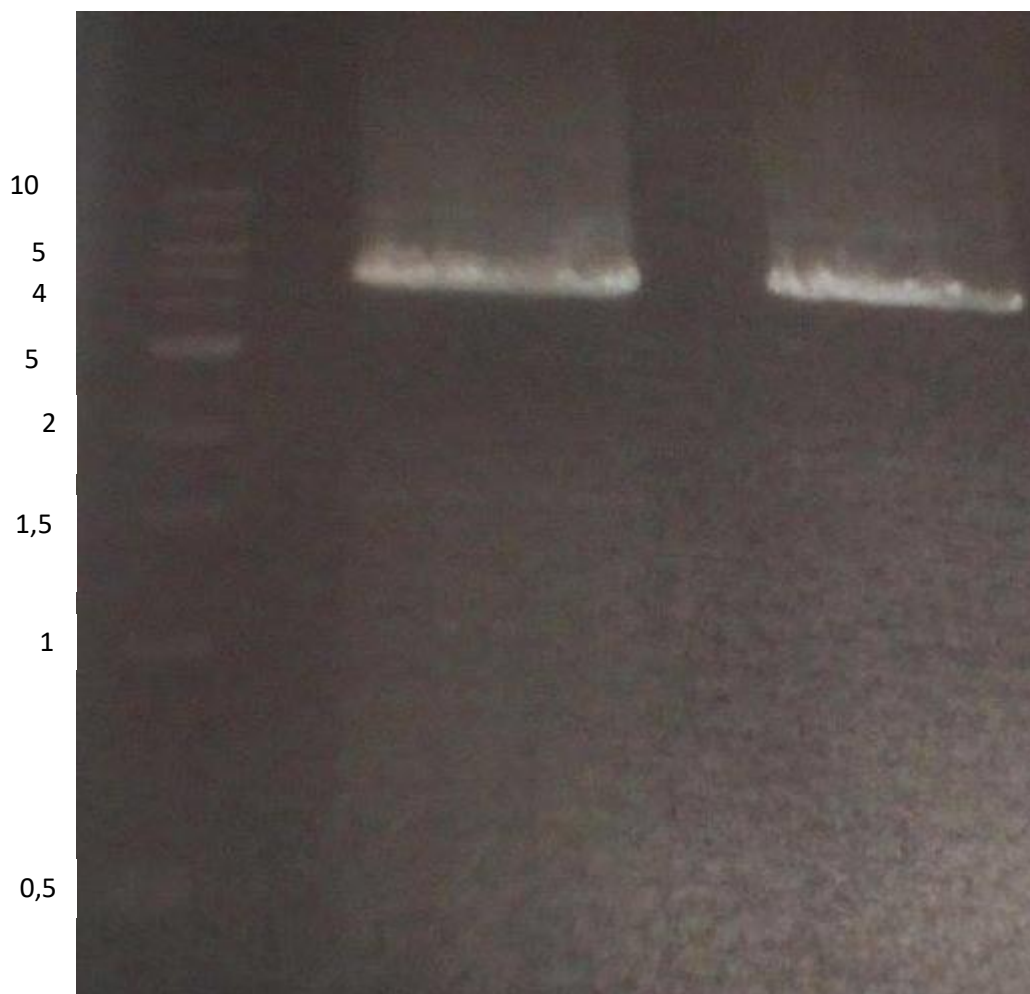
Για την κλωνοποίηση του επιθυμητού γονιδίου για την έκφραση της DotC, ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με την κατασκευή του πλασμιδίου για την DotC, χρησιμοποιώντας αρχικά το pttQ18A2 και τους αντίστοιχους primers για την DotC.

Μέγεθος επιθυμητού προϊόντος PCR: 5.378bp

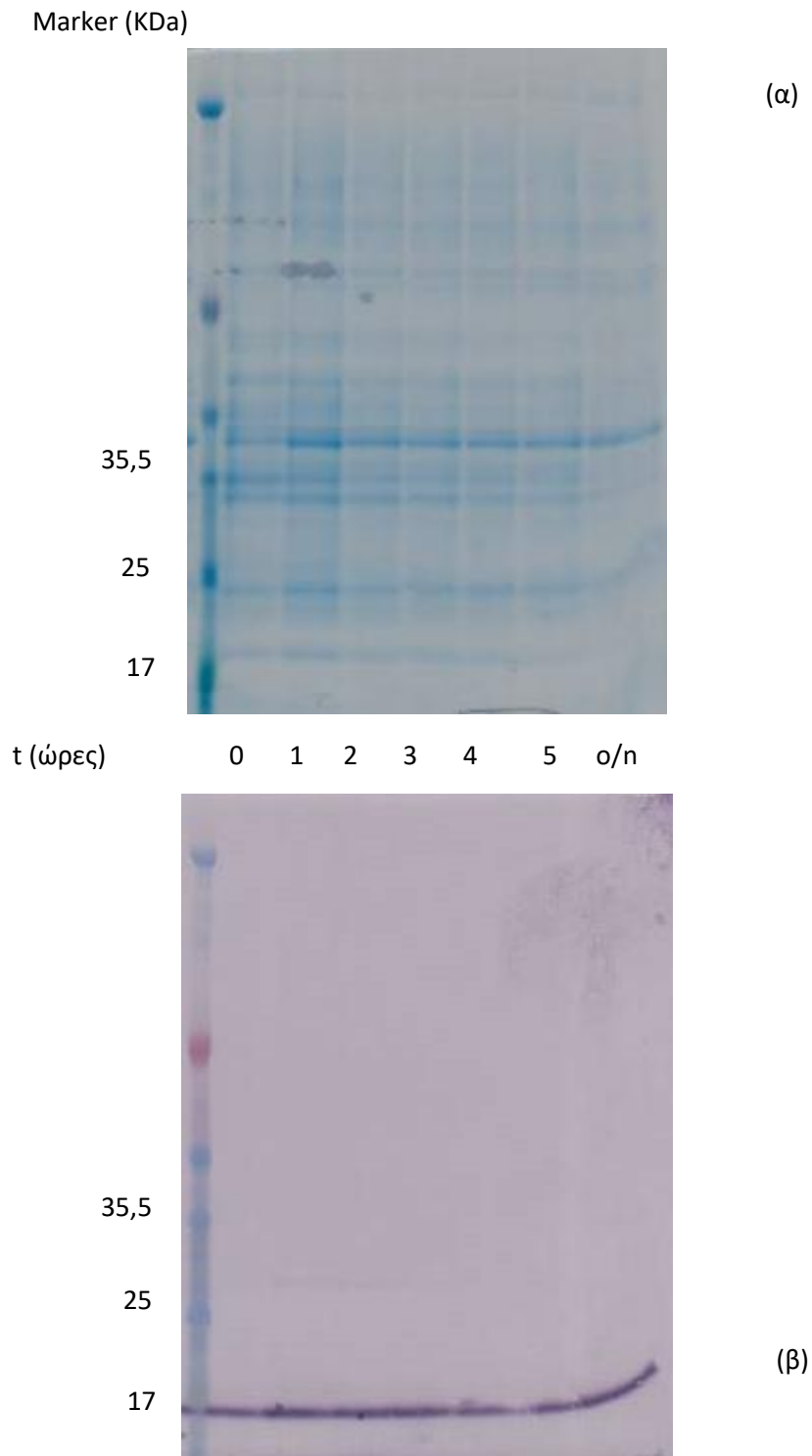
Marker (Kbp)

DotD

DotC



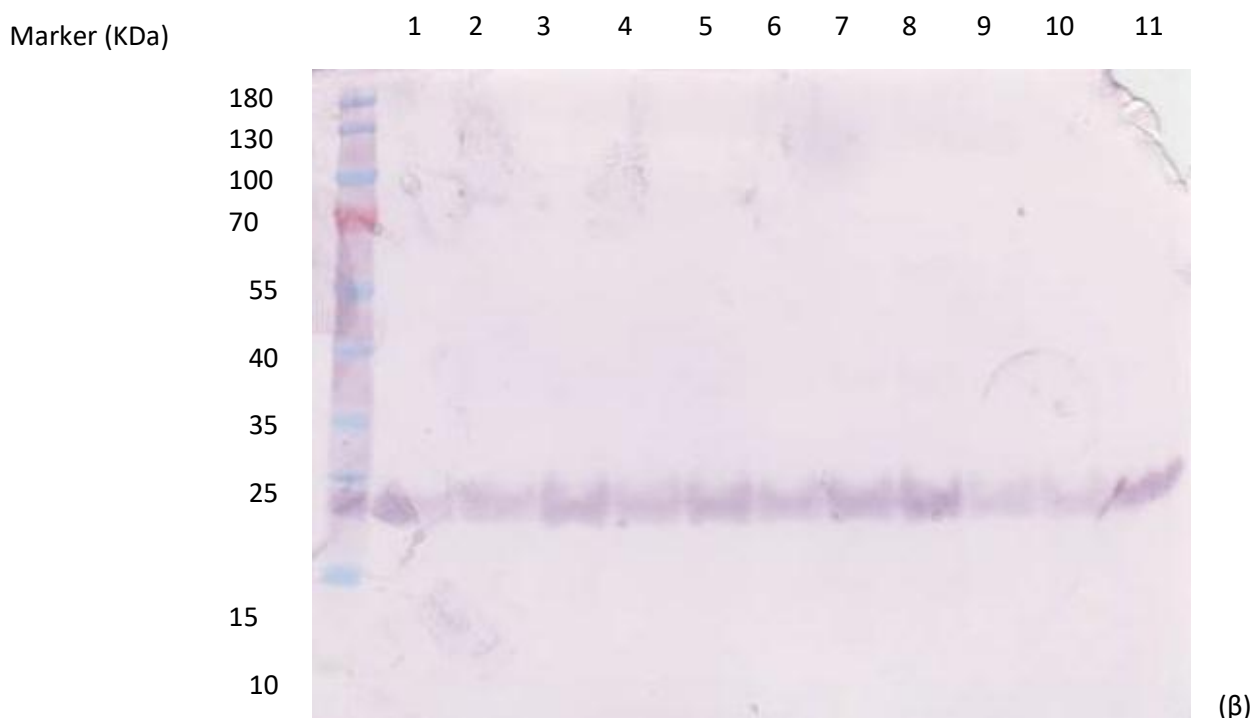
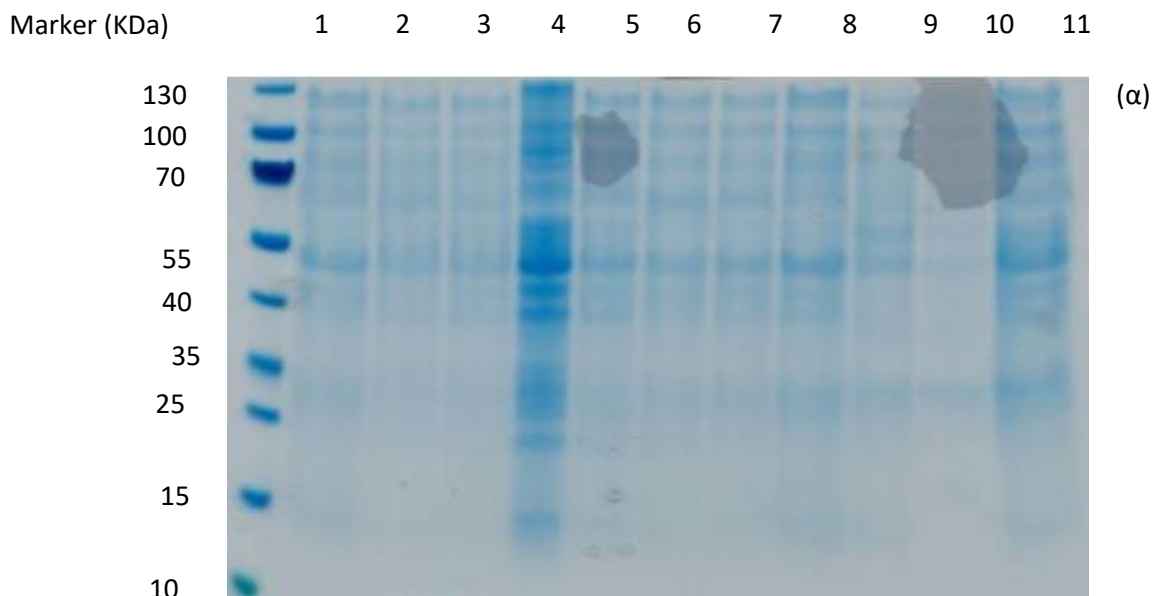
Εικόνα 3.31: Gel αгарόζης για προϊόν PCR. Η μπάντα για την DotC αντιστοιχεί στις 5.378bp.



Εικόνα 3.32(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotC στους 37°C, με 1mM IPTG , για διαφορετικές ώρες επαγωγής (t=0 – t=overnight) **β)** Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής.

Η πρώτη δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης, δεν δείχνει μεγάλη απόκριση στην έκφραση της πρωτεΐνης (αχνές μπάντες στο western blot σε μοριακό βάρος

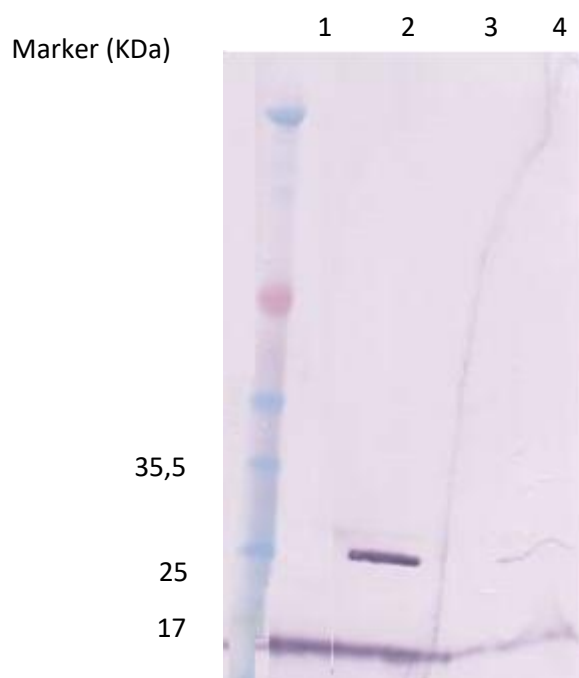
μεταξύ 25 και 25,5KDa στις χρονικές στιγμές $t=1$ και $t=2$). Για περαιτέρω μελέτη της έκφρασης της DotC, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στην DotD, με τις τρεις διαφορετικές καλλιέργειες (control, 37°C, 18°C).



Εικόνα 3.32(α): SDS PAGE 4-12% για τον έλεγχο έκφρασης της DotC στους 37°C και στους 18°C με 1mM IPTG και τη χρήση δείγματος control ,για διαφορετικές ώρες επαγωγής ($t=0$ – $t=overnight$) **β)** Western Blot για την

ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής. **1.** 37°C- control (t=0), **2.** 37°C- control (t=3), **3.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=0), **4.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=1), **5.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=2), **6.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=3), **7.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=4), **8.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=5), **9.** 37°C-2^η καλλιέργεια (t=o/n), **10.** 18°C-3^η καλλιέργεια (t=0), **11.** 18°C-3^η καλλιέργεια (t=3).

Στο επόμενο βήμα, δοκιμάστηκε η διαφορετική ικανότητα των αποικιών να εκφράζουν την πρωτεΐνη με διαφορετική ένταση. Έτσι, επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές αποικίες και πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές καλλιέργειες στους 37°C και επαγωγή με 1mM IPTG. Έγινε επίσης χρήση καλλιέργειας control, το αποτέλεσμα της οποίας φαίνεται στην εικόνα 3.23 (δύο πρώτα πηγαδάκια).

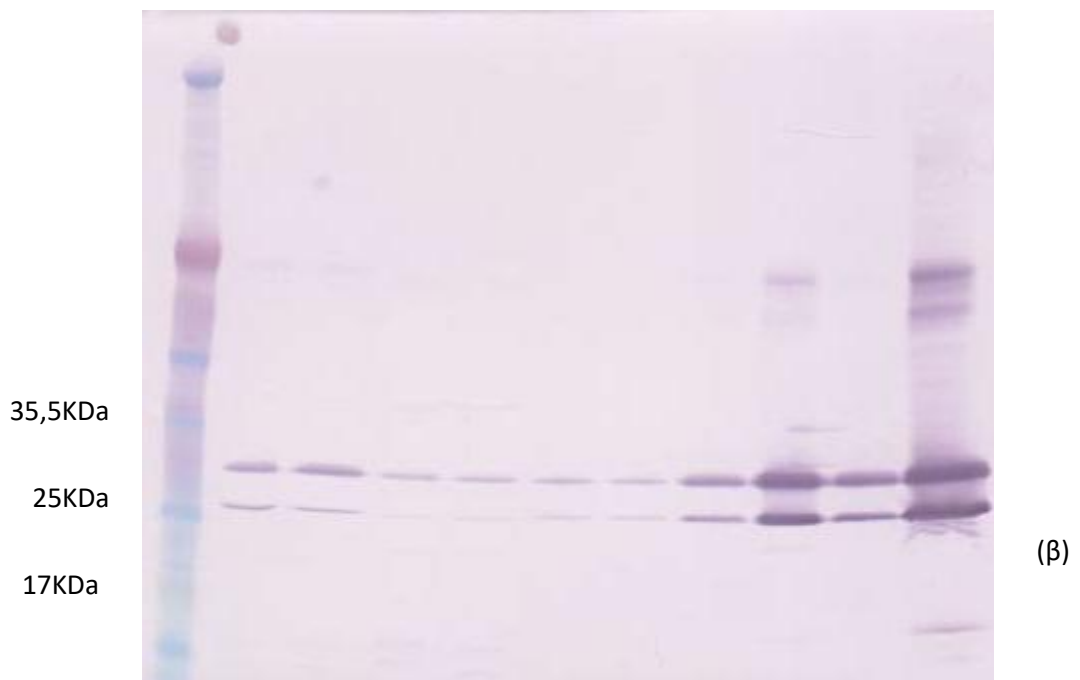
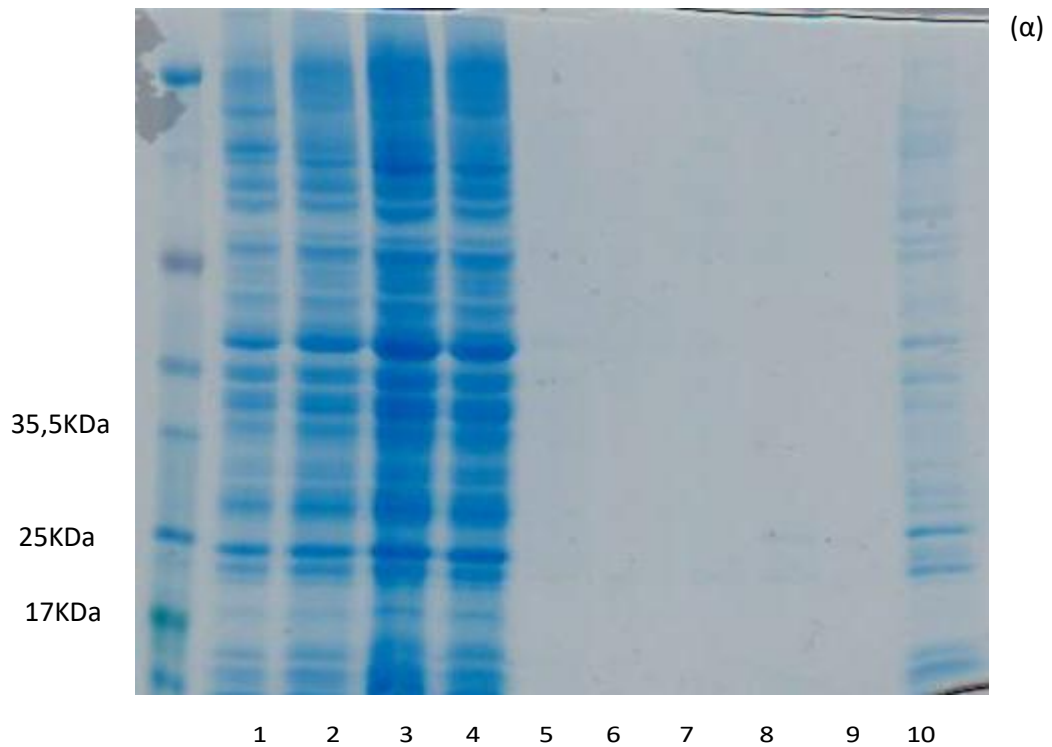


Εικόνα 3.33: Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στις διαφορετικές ώρες επαγωγής. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αποικίες. **1.** Αποικία 1 (t=0), **2.** Αποικία 1 (t=3), **3.** Αποικία 2 (t=0), **4.** Αποικία 2 (t=3).

Από την εικόνα του παραπάνω western blot, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται στην αποικία 1, τρεις ώρες μετά την επαγωγή. Έτσι, προκειμένου να αποθηκευτούν τα συγκεκριμένα κύτταρα, χρησιμοποιούνται 10μL προκαλλιέργειας για την αποικία 1, και επαναδιασπείρονται σε στερεή καλλιέργεια τριβλίου Petri που φέρει το κατάλληλο αντιβιοτικό.

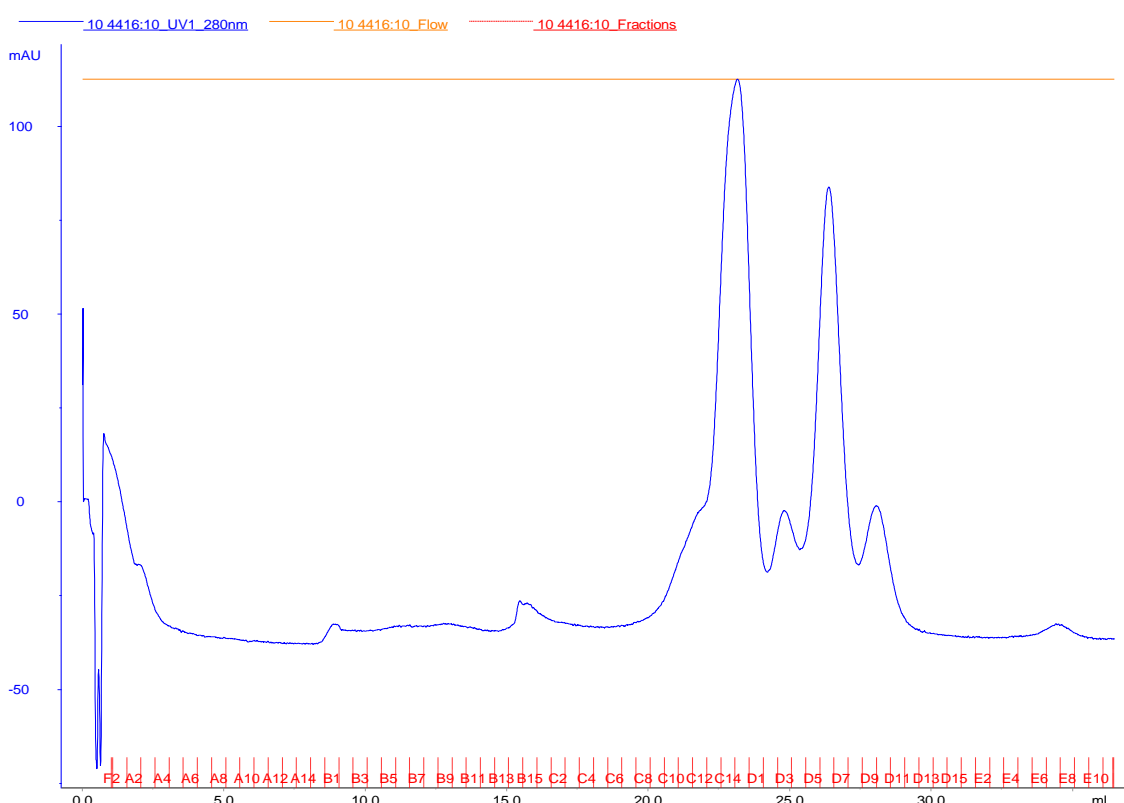
Ακολουθεί μία καλλιέργεια 2L προκειμένου να γίνει απομόνωση των κυττάρων στις προαναφερθείσες συνθήκες και προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της DotC.

Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 2L: 7,02gr



Εικόνα 3.34: (α) SDS-PAGE για τα κλάσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας με στήλη στρεπταβιδίνης. **(β)** Western Blot για τα ίδια δείγματα. **1.** Αρχικές μεμβράνες **2.** Διαλυτοποιημένες μεμβράνες, **3.** Flow through, **4.** Wash 1, **5.** Wash 2, **6.** Wash 3, **7.** Elution 1, **8.** Elution 2., **9.** Elution 3, **10.** Elution amicon (10.000Da).

Το διάλυμα έκλυσης που προέκυψε από τη στήλη στρεπταβιδίνης συμπυκνώθηκε και ακολούθησε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση στήλης Superdex 200 (παράγραφος 2.2.16) για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.35: Διάγραμμα απορρόφησης- κλασμάτων έκλυσης έπειτα από καθαρισμό με στήλη μοριακού αποκλεισμού Superdex 200.

Κλάσματα που συγκεντρώθηκαν:

1^ο κλάσμα: A15-B1

2^ο κλάσμα: B13-C2

3^ο κλάσμα: C9-C13

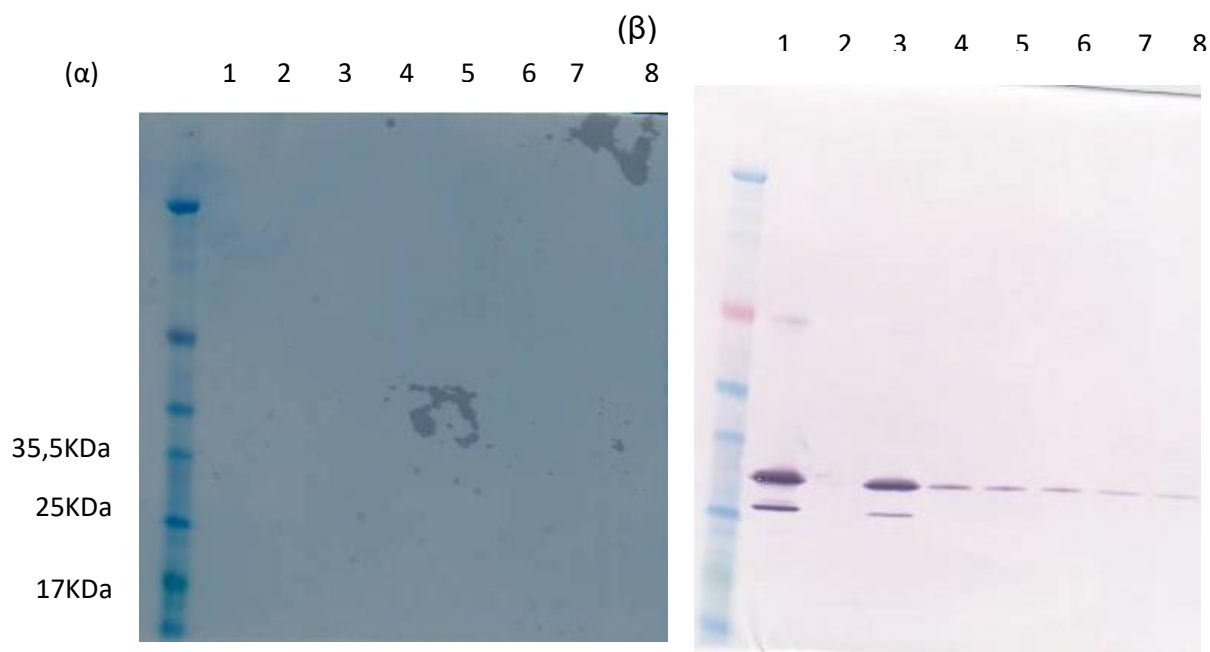
4^ο κλάσμα: C14- D2

5^ο κλάσμα: D3-D4

6^ο κλάσμα: D5-D8

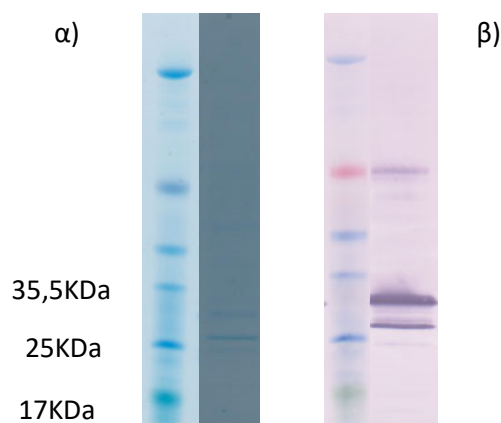
7^ο κλάσμα: D9-D10

Τα κλάσματα έκλουσης που συγκεντρώθηκαν από τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αναλύθηκαν σε SDS-PAGE. Και πραγματοποιήθηκε ανοσοανίχνευση.



Εικόνα 3.36 (α): SDS-PAGE 4-12% για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **(β)** Western blot με τη χρήση anti-strep antibody για τα κλάσματα της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **1.** Δείγμα πριν τη στήλη, **2.** 1^ο κλάσμα, **3.** 2^ο κλάσμα, **4.** 3^ο κλάσμα, **5.** 4^ο κλάσμα, **6.** 5^ο κλάσμα, **7.** 6^ο κλάσμα, **8.** 7^ο κλάσμα.

Το δεύτερο δείγμα έκλουσης από τη στήλη μοριακού αποκλεισμού συμπυκνώθηκε στα 500μL με τη χρήση amicon (10.000Da) και διαδοχικών φυγοκεντρίσεων. Έπειτα, το συμπυκνωμένο δείγμα έτρεξε σε SDS-PAGE και Western Blot.



Εικόνα 3.37 (α): SDS-PAGE 4-12% για το δεύτερο κλάσμα (συμπυκνωμένο) της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού με τη χρήση Superdex 200. **(β)** Western blot με τη χρήση anti-strep antibody για το ίδιο κλάσμα.

Από τα παραπάνω πηκτώματα, έγινε αποκοπή των μπαντών στις περιοχές ανάμεσα στα 25 και 35,5 KDa, στις οποίες πραγματοποιήθηκε επεξεργασία για πρωτεολυτική διάσπαση των πρωτεϊνών, όμως η φασματομετρία μάζας δεν κατάφερε να ταυτοποιήσει την DotC.

3.5 Προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης του συμπλόκου ρKEGCD

Εκτός από την μελέτη των ατομικών πρωτεϊνών, έγινε προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσης του υποσυμπλόκου- πυρήνα του εκκριτικού συστήματος τύπου IV της *Coxiella Burnetii*, το οποίο έχει βρεθεί ότι δημιουργείται στην περίπτωση της *Legionella Pneumophila*. Το σύμπλοκο αυτό είναι το ρKEGCD και περιλαμβάνει τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες (IcmG, IcmK, IcmE) και δύο λιποπρωτεΐνες (DotC, DotD), όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην υποενότητα 1.5. Παρακάτω φαίνεται ο γονιδιακός χάρτης για το DNA της *C.Burnetii*, στον οποίο παρουσιάζεται η διεύθυνση των γονιδίων για της επιθυμητές πρωτεΐνες πάνω στο γενετικό υλικό του βακτηρίου.



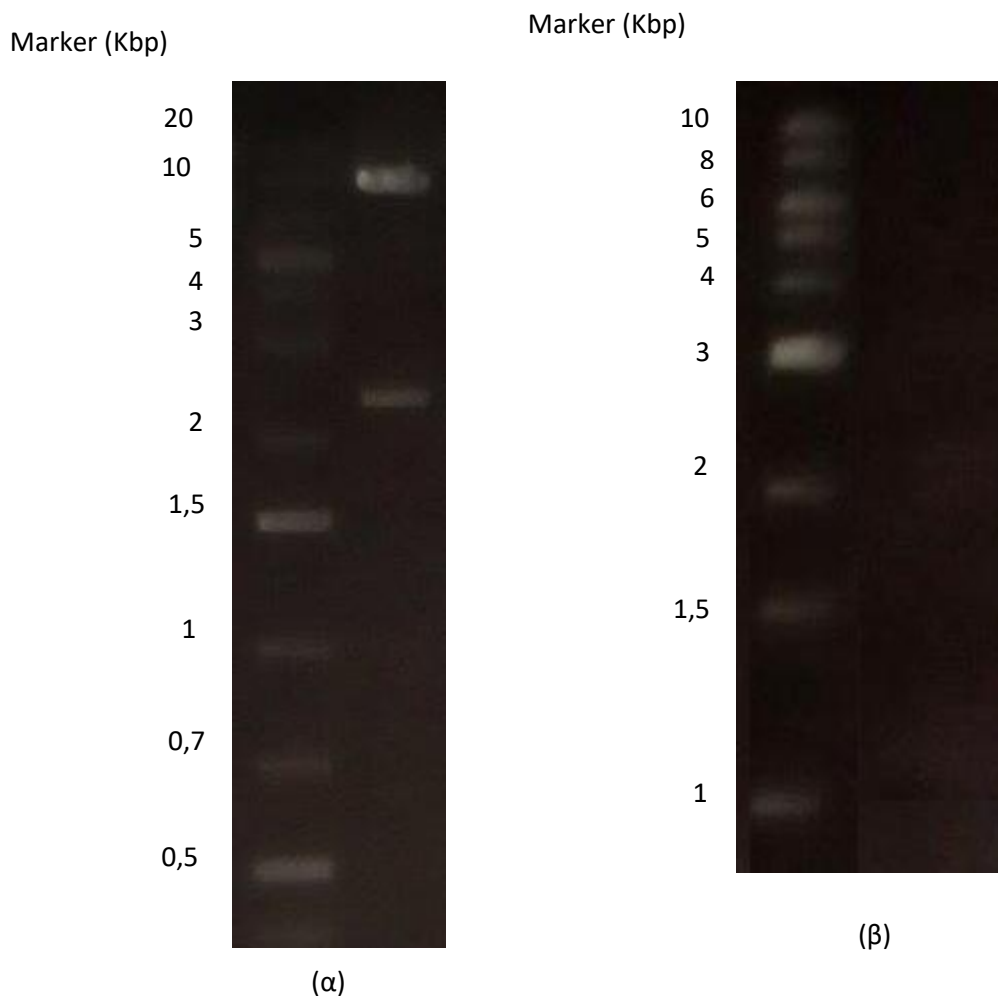
Εικόνα 3.38: Γενετική τοποθέτηση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος T4BSS της *C.Burnetii*. Με τα έντονα

βέλη φαίνονται τα γονίδια των Dot πρωτεϊνών ενώ με τα πιο ελαφρά αυτά των Icm πρωτεϊνών.

Ο σκοπός λοιπόν των πειραμάτων που ακολουθούν, είναι να διαπιστώσουμε αν το σύμπλοκο pKEGCD εκφράζεται στην *C.Burnetii* με τον ίδιο τρόπο όπως στη *L.Pneumophila* και αν μπορεί να απομονωθεί σε λειτουργική μορφή. Έτσι πραγματοποιήθηκε η κατασκευή του πλασμιδίου που φέρει τόσο τα πέντε επιθυμητά γονίδια, όσο και σήμανση με strep και με His-tag. Ακολούθησε μετασχηματισμός σε κύτταρα *E.coli* και έπειτα έγιναν προσπάθειες για την έκφρασή του.

Για την δημιουργία του επιθυμητού πλασμιδίου, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πλασμίδια (pKEGCD και pttQ18C3+G), τα οποία κόπηκαν με δύο ίδια περιοριστικά ένζυμα, το *SacI* και το *HpaI*. Σκοπός της πέψης αυτής ήταν η δημιουργία 4 διαφορετικών τμημάτων DNA, τα οποία μετά την αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation) θα δημιουργούσαν το επιθυμητό πλασμίδιο, το οποίο φέρει τόσο το His-tag (στο C-τελικό άκρο της DotC) όσο και το strep-tag (στο C-τελικό άκρο της IcmG).

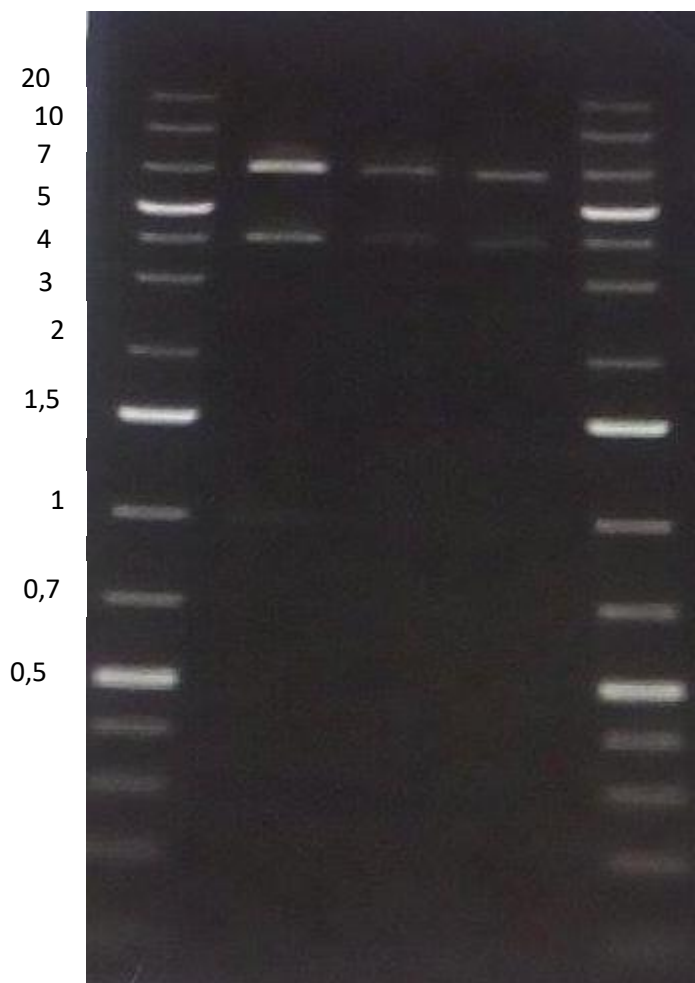
Από την περιοριστική πέψη του pKEGCD από τα *SacI* και *HpaI* δημιουργούνται δύο πλασμιδιακά τμήματα με μέγεθος 9185 και 2325bp έκαστο. Αντίστοιχα από την πέψη του pttQ18C3+G δημιουργούνται τα πλασμιδιακά τμήματα μεγέθους 2495 και 2787bp αντίστοιχα. Για την κατασκευή του νέου πλασμιδίου χρειάζεται, από το πρώτο πλασμίδιο, το κομμάτι DNA με μέγεθος στα **9185bp** και από το δεύτερο το πλασμιδιακό τμήμα μεγέθους **2495bp**, τα οποία συγκολλήθηκαν μεταξύ τους με τη δράση της λιγάσης και δημιούργησαν το επιθυμητό πλασμίδιο.



Εικόνα 3.38 (α): Gel αγαρόζης για τα προϊόντα πέψης του pKEGCD από τα περιοριστικά ένζυμα SacI και HpaI. Διακρίνονται οι αναμενόμενες μπάντες, στις 9185bp και στις 2325bp. **(β)** Gel αγαρόζης για τα προϊόντα πέψης του pttQ18C3+G από τα περιοριστικά ένζυμα SacI και HpaI. Διακρίνονται οι αναμενόμενες μπάντες, στις 2787bp και στις 2495bp

Μετά την αντίδραση της λιγάσης, το πλασμίδιο μετασχηματίζεται σε κύτταρα DH5α και οι αποικίες χρησιμοποιούνται για μικρές καλλιέργειες (5mL) και απομόνωση του DNA προκειμένου να ελεγχθεί αν τα κύτταρα έχουν λάβει το σωστό πλασμίδιο (επιλέχθηκαν 3 διαφορετικές αποικίες από τις οποίες απομονώθηκε το DNA). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με περιοριστική πέψη του πλασμιδίου που έχει απομονωθεί, χρησιμοποιώντας το ένζυμο BstBI (ή Bsp119I). Τα αναμενόμενα τμήματα DNA που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου είναι στις 6764, 3947 και 969bp. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα προϊόντα της πέψης, πραγματοποιείται μία ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης.

Marker (Kbp)

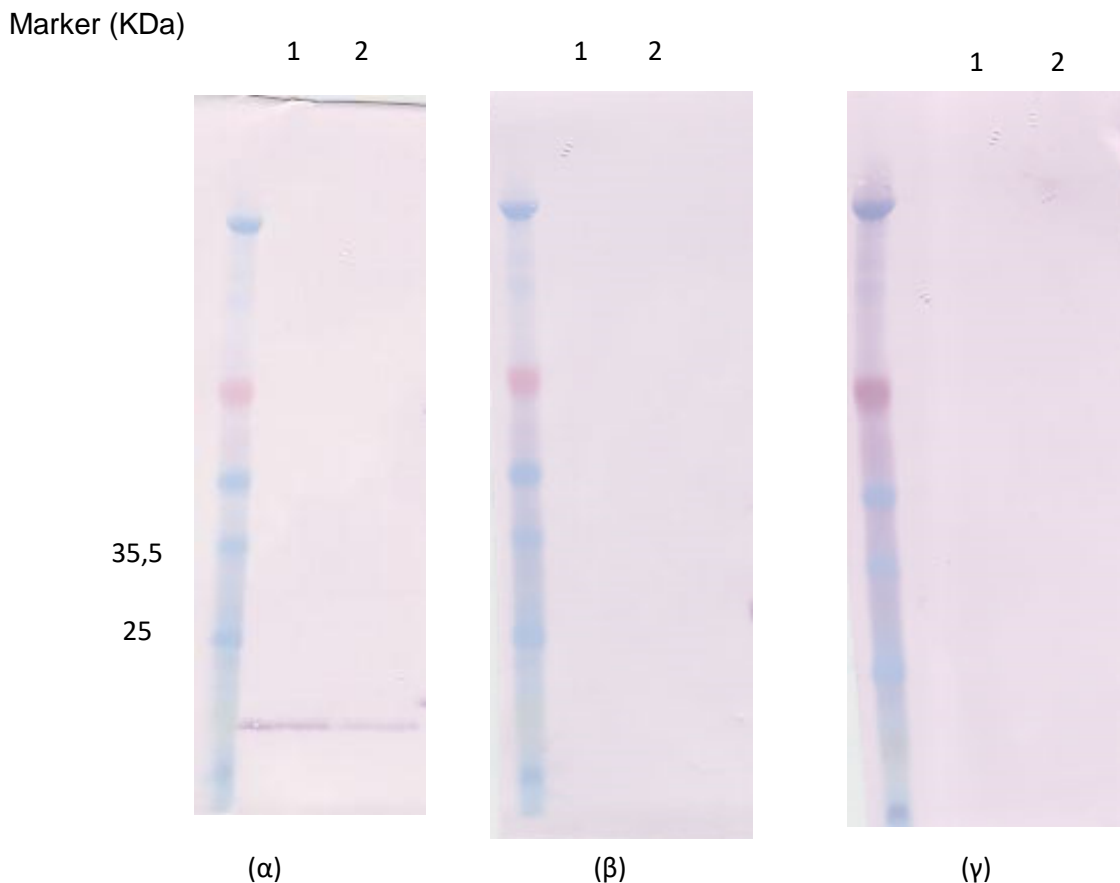


Εικόνα 3.39: Gel αγαρόζης για τα προϊόντα πέψης του πλασμιδίου που δημιουργήθηκε από την αντίδραση λιγάσης, από το περιοριστικό ένζυμο BstBI. Διακρίνονται οι αναμενόμενες μπάντες, στις 6764, 3947 και 969bp.

Εφόσον το μέγεθος των μπαντών είναι το επιθυμητό, το πλασμιδιο στέλνεται για sequencing της περιοχής που φέρει το strep-tag, το αποτέλεσμα του οποίου μας αποδεικνύει την επιτυχή αντίδραση μοριακής συγκόλλησης (ligation).

➤ Έλεγχος έκφρασης του συμπλόκου στους 37°C με χρήση 1mM IPTG

Εφόσον και οι 3 αποικίες που απομονώθηκαν φέρουν το σωστό πλασμίδιο, επιλέχθηκε μία από αυτές (η αποικία 1) για καλλιέργεια 100mL και έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου στις προαναφερθείσες συνθήκες. Η καλλιέργεια επωάστηκε στους 37°C έως ότου η OD να φτάσει 0,5-0,8 όπου και έγινε επαγωγή με 1mM IPTG. Συλλέχθηκαν δύο δείγματα, ένα πριν την επαγωγή (t=0) και ένα 3 ώρες μετά την επαγωγή (t=3).



Εικόνα 3.40 (α): Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-strep antibody** (αναγνωρίζει την IcmG). **(β)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-His antibody** (αναγνωρίζει την DotC). **(γ)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-D antibody** (αναγνωρίζει την DotD). **1.** t= 0, **2.** t=3h.

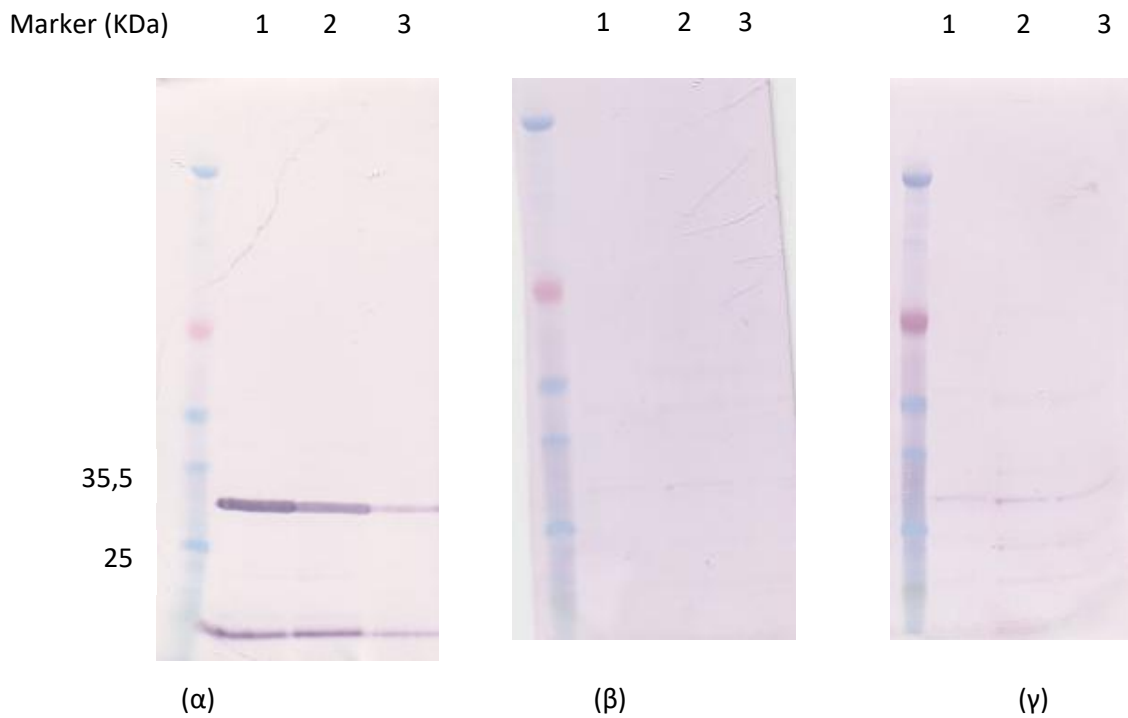
➤ Έκφραση του συμπλόκου στους 30°C με και χωρίς την ύπαρξη IPTG

Στο επόμενο στάδιο δοκιμάστηκε η έκφραση του συμπλόκου στους 30°C, ελέγχοντας αυτή τη φορά αν τα βακτήρια μπορούν να παράγουν το πρωτεϊνικό σύμπλοκο χωρίς την περαιτέρω πίεση του επαγωγέα IPTG. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές καλλιέργειες με τα εξής χαρακτηριστικά:

- **1^η καλλιέργεια:** 100mL, 30°C, επαγωγή με 1mM IPTG και λήψη δειγμάτων στα χρονικά διαστήματα t=0, t=3, t=5 ώρες μετά την επαγωγή.

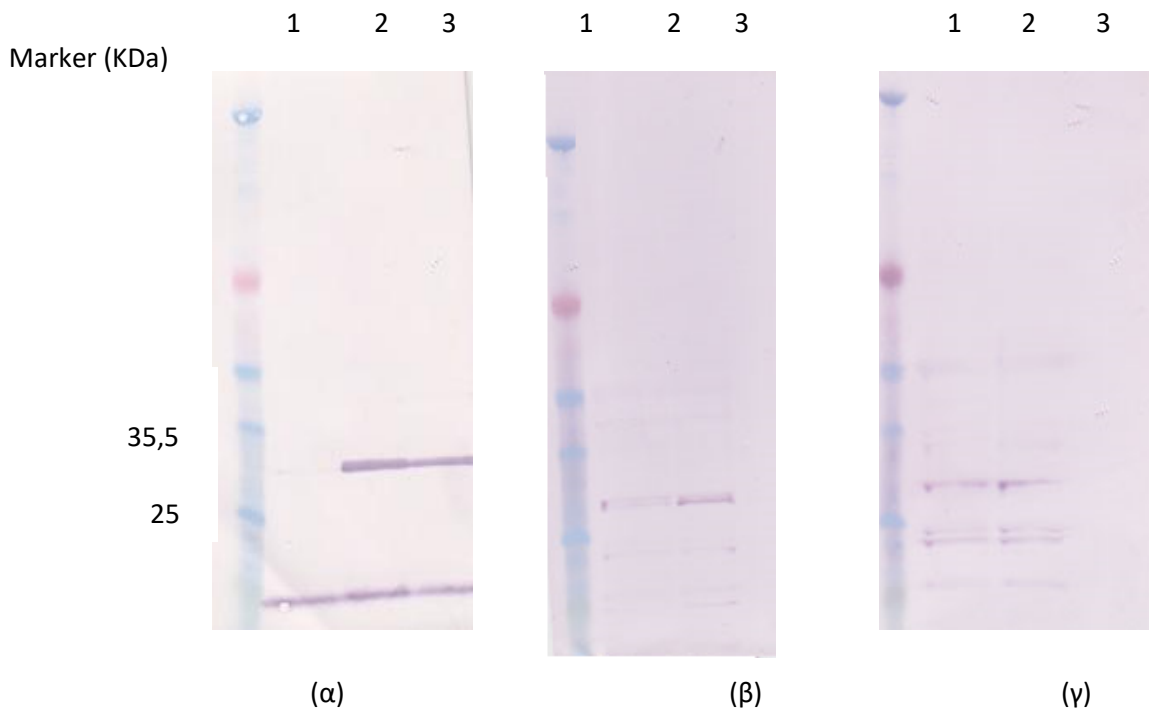
- **2^η καλλιέργεια:** 100mL, 30°C, χωρίς επαγωγή και λήψη δειγμάτων στα χρονικά διαστήματα t=8, t=12, t=24 ώρες επώασης.

➤ **Χωρίς επαγωγή**



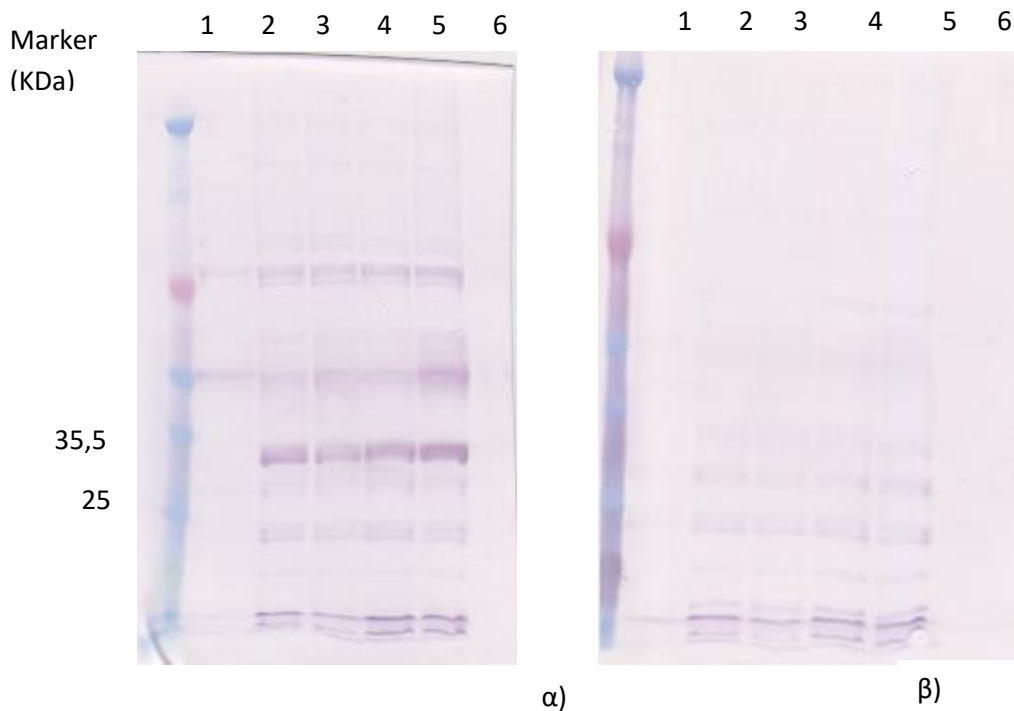
Εικόνα 3.41 (α): Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-strep antibody** (αναγνωρίζει την IcmG). **(β)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-His antibody** (αναγνωρίζει την DotC). **(γ)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-D antibody** (αναγνωρίζει την DotD). **1.** t= 8, **2.** t=12, **3.** t=24h.

➤ **Επαγωγή με 1mM IPTG**



Εικόνα 3.42 (α): Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-strep antibody** (αναγνωρίζει την IcmG). **(β)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-His antibody** (αναγνωρίζει την DotC). **(γ)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-D antibody** (αναγνωρίζει την DotD). **1.** t= 0, **2.** t=3, **3.** t=5h.

➤ **Δοκιμή αντισωμάτων anti-K και anti-C**



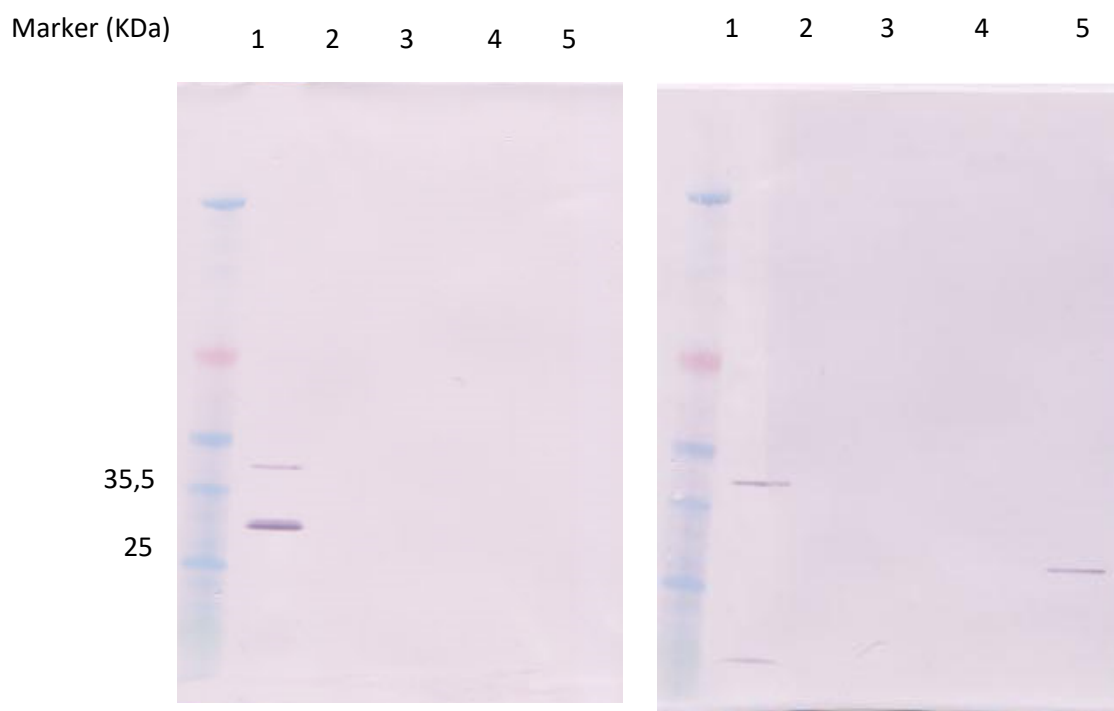
Εικόνα 3.43 (α): Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-K antibody**. **(β)** Western Blot για τον έλεγχο έκφρασης του συμπλόκου. Γίνεται χρήση του **anti-C antibody**. **1-3.** 1mM IPTG (t=0, t=3, t=5h), **4-6.** Χωρίς επαγωγή (t=8 t=12, t=24h).

Πραγματοποιείται καλλιέργεια 4L στους 30°C, χωρίς παρουσία IPTG και συλλογή κυττάρων στις 8 ώρες επώασης.

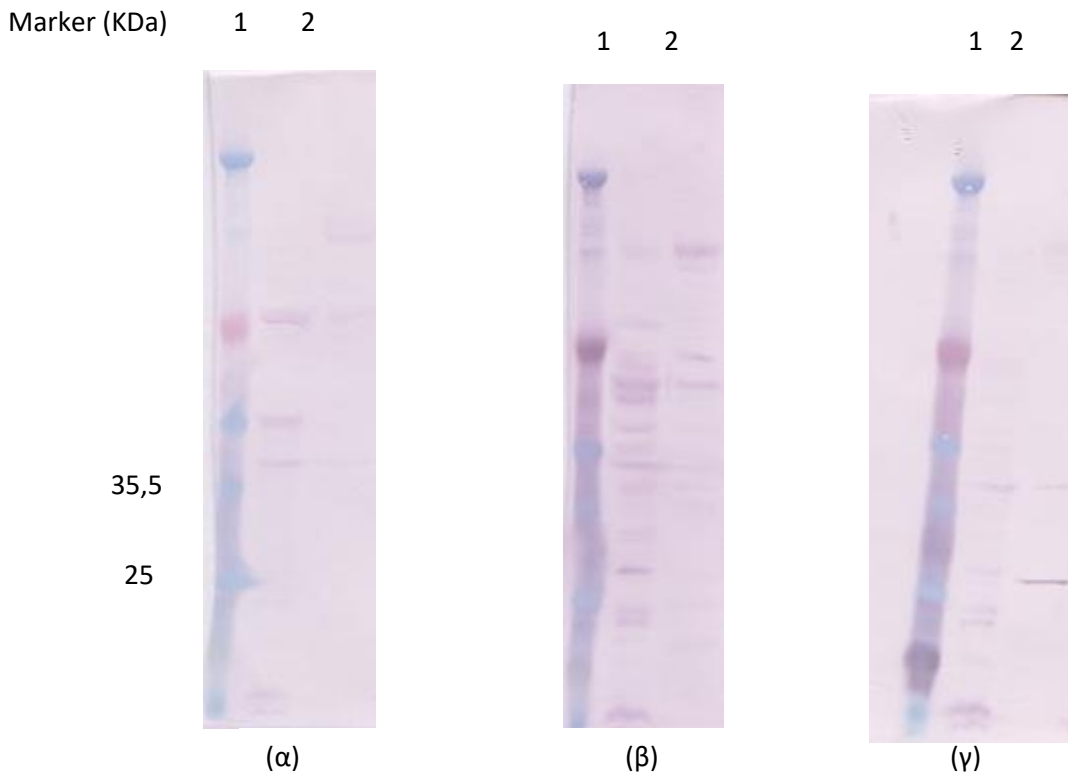
Σύνολο κυττάρων από καλλιέργεια 4L: 13,08gr

- Προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού του συμπλόκου με τη χρήση στήλης Ni-NTA όσο και στήλης στρεπταβιδίνης

- Στήλη Ni-NTA

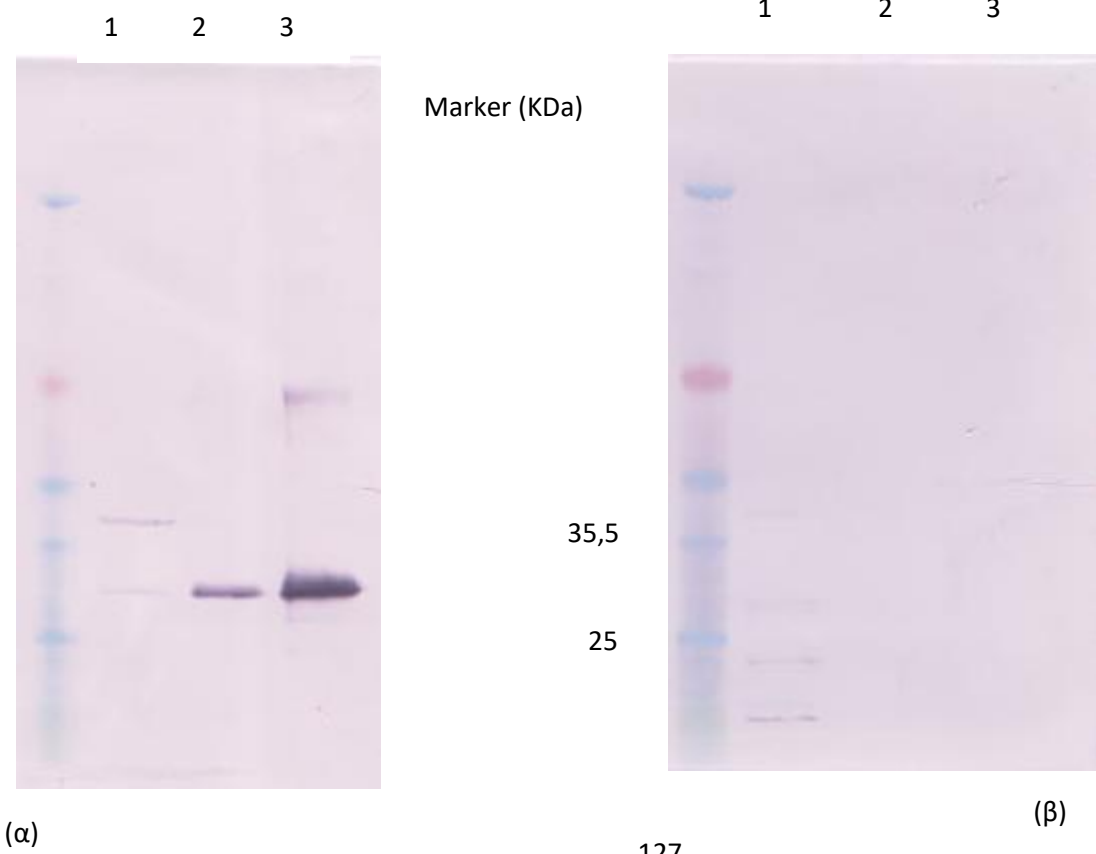


Εικόνα 3.44: (α) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης Ni-NTA. Έχει γίνει χρήση του anti-strep antibody (αναγνωρίζει την G). (β) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης Ni-NTA. Έχει γίνει χρήση του anti-His antibody (αναγνωρίζει την C). **1.** Flow through, **2.** Elution 200mM imidazole, **3.** Elution 300mM imidazole, **4.** Elution 500mM imidazole, **5.** Elution 200mM imidazole amicon (100.000Da)

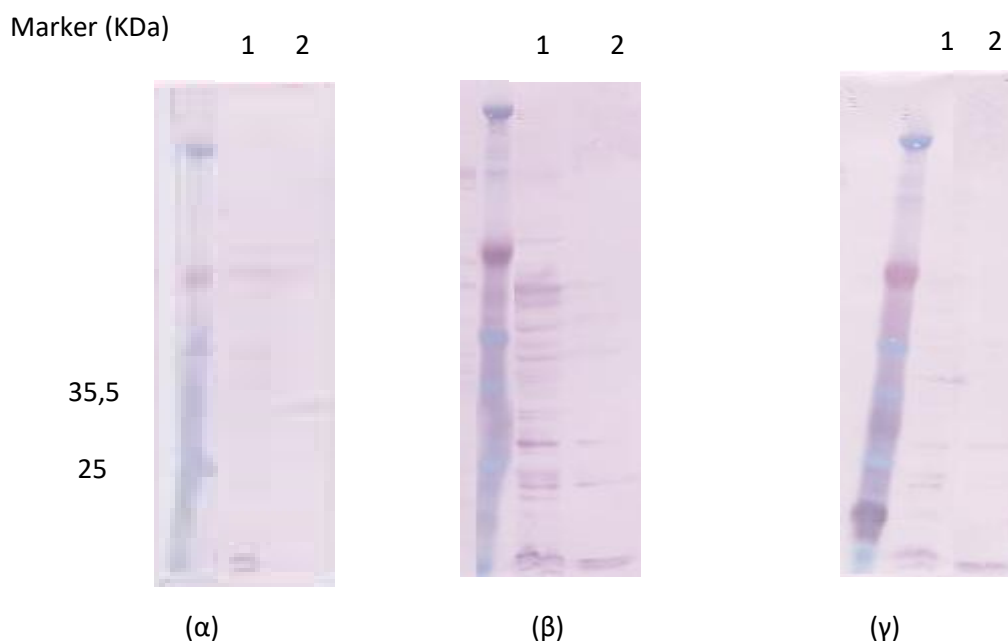


Εικόνα 3.45: (α) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης Ni-NTA. Έχει γίνει χρήση του **anti-K antibody** (αναγνωρίζει την IcmK). (β) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης Ni-NTA. Έχει γίνει χρήση του **anti-E antibody** (αναγνωρίζει την IcmE) (γ) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης Ni-NTA. Έχει γίνει χρήση του **anti-D antibody** (αναγνωρίζει την DotD). **1.** Flow through, **2.** Elution 200mM imidazole amicon (100.000Da).

• Στήλη στρεπταβιδίνης



Εικόνα 3.46: (α) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης στρεπταβιδίνης. Έχει γίνει χρήση του **anti-strep antibody** (αναγνωρίζει την IcmG). (β) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης στρεπταβιδίνης. Έχει γίνει χρήση του **anti-His antibody** (αναγνωρίζει την DotC). **1.** Flow through, **2.** Elution, **3.** Elution amicon (100.000Da)



Εικόνα 3.47: (α) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης στρεπταβιδίνης. Έχει γίνει χρήση του **anti-K antibody** (αναγνωρίζει την IcmK). (β) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης στρεπταβιδίνης. Έχει γίνει χρήση του **anti-E antibody** (αναγνωρίζει την IcmE) (γ) Western Blot για τα κλάσματα της στήλης στρεπταβιδίνης. Έχει γίνει χρήση του **anti-D antibody** (αναγνωρίζει την DotD). **1.** Flow through, **2.** Elution amicon (100.000Da).

➤ Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για το σύμπλοκο πυρήνα

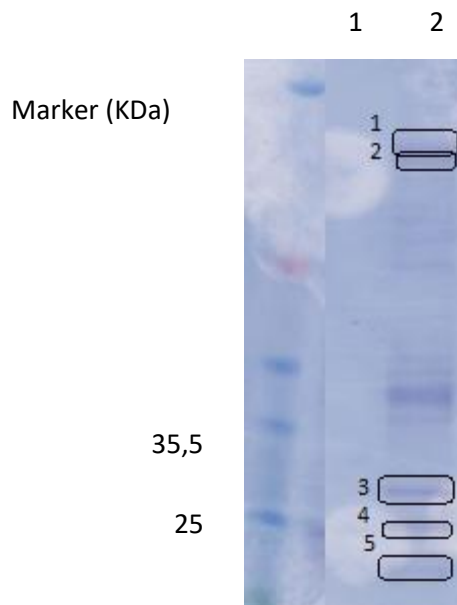
Παρακάτω φαίνεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας στον οποίο απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που φαίνεται να ανιχνεύονται στα παραπάνω western blots.

Πρωτεΐνη	Strep	NTA
DotD	?	?
DotC (His)	-	+
IcmE	?	?
IcmK	+	-
IcmG (strep)	+	-

Πίνακας 3.2: Οι πρωτεΐνες του συμπλόκου όπως αναγνωρίστηκαν από τα αντίστοιχα αντισώματα μετά την προσπάθεια καθαρισμού και απομόνωσης σε στήλη συγγενείας.

➤ Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

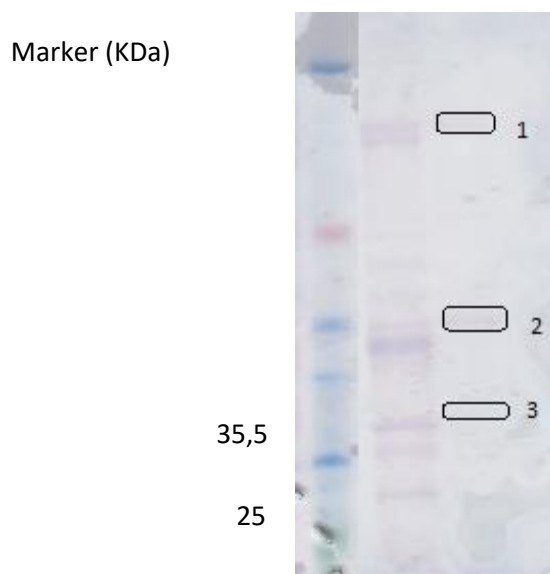
Παρακάτω παρουσιάζονται τα gel ηλεκτροφόρησης για τα κλάσματα χρωματογραφίας συγγενείας για την προσπάθεια απομόνωσης του συμπλόκου.



Εικόνα 3.48: SDS- PAGE 4-12% για τα κλάσματα από τη **στήλη στρεπταβιδίνης**. 1. Elution, 2. Elution amicon (100.000Da).

Μπάντες που κόπηκαν	Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν
1	IcmK (75), IcmG (80)
2	IcmG (40), IcmK (53)
3	IcmG (12), IcmK (34)

Πίνακας 3.3: Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας για κάθε μία από τις μπάντες που κόπηκαν. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις φανερώουν τη σειρά με την οποία ταυτοποιήθηκε κάθε πρωτεΐνη.



Εικόνα 3.49: SDS- PAGE 4-12% για τα κλάσματα από τη στήλη Ni-NTA. 1. Elution, 2. Elution amicon (100.000Da).

Μπάντες που κόπηκαν	Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν
1	IcmK (59)
2	IcmK (84)
3	DotC (12), IcmK (137)
4	DotC (196)
5	-

Πίνακας 3.4: Τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας για κάθε μία από τις μπάντες που κόπηκαν. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις φανερώνουν τη σειρά με την οποία ταυτοποιήθηκε κάθε πρωτεΐνη

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Οι υπό μελέτη πρωτεΐνες IcmK, IcmE, DotC, DotD και το πρωτεϊνικό σύμπλοκο ρKEGCD ανήκουν στο ενδοκυττάριο βακτήριο *Coxiella Burnetii*. Το συγκεκριμένο βακτήριο εκκρίνει πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου IV Dot/Icm, το οποίο είναι απαραίτητο για την παθογόνο δράση του. Απουσία λειτουργικού εκκριτικού συστήματος, το βακτήριο είναι ανίκανο να πολλαπλασιαστεί μέσα στο κύτταρο- ξενιστή.

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των παραπάνω πρωτεϊνών, θα ανοίξει το δρόμο για την μελέτη του εκκριτικού συστήματος της *C.Burnetii*. Για το λόγο αυτό, έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης όλων των παραπάνω πρωτεϊνών σε βακτηριακό οργανισμό ανασυνδυασμένων κυττάρων *E.Coli*.

Η μελέτη και ο χαρακτηρισμός του εκκριτικού συστήματος τύπου IV του παθογόνου βακτηρίου *C.Burnetii*, θα διευκολύνει την κατανόηση του τρόπου δράσης του και πιθανώς να βοηθήσει την ανάπτυξη τεχνικών για την αντιμετώπιση της μόλυνσης από το συγκεκριμένο βακτήριο.

4.1 Απομόνωση και καθαρισμός της IcmK

Η πρωτεΐνη IcmK βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου στο βακτήριο *C.burnetii*. Αρχικά έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της μέσω του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pttQ18A2, το οποίο φέρει ως σήμανση το His-tag στο C- τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας. Οι μελέτες, έδειξαν πως οι καλύτερες συνθήκες είναι οι 37°C , η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης με 1mM IPTG και η συλλογή των κυττάρων 3 ώρες μετά την επαγωγή.

Η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένιας σε στήλη Ni-NTA και καθαρίστηκε με την μέθοδο του Microrotorfor. Ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι θεωρητικά σε pH 8,95, η IcmK βρέθηκε σε pH= 4,8 (εικόνα 3,5(β)). Επίσης, παρατηρούμε πως αντί μία πρωτεϊνική μπάντα στην μεμβράνη του Western Blot υπάρχουν πολλαπλές ζώνες στα σημεία που το anti-His antibody αναγνωρίζει την πρωτεΐνη, πράγμα που σημαίνει πως πιθανώς εκείνη αποικοδομείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας απομόνωσης και

καθαρισμού, με αποτέλεσμα να δημιουργεί επιμέρους αμινοξικές αλυσίδες, οι οποίες αναγνωρίζονται από το αντίσωμα. Αν κανείς παρατηρήσει την εικόνα 3.4, θα διαπιστώσει πως, η IcmK όπως έχει έκλουσθεί από τη στήλη συγγενείας, υπάρχει μία ισχυρή μπάντα κάτω από τα 40KDa, η οποία όπως υφίσταται σχάση (εικόνα 3,5 (α)) που το ίδιο δείγμα έχει φορτωθεί ξανά στο πρώτο πηγαδάκι. Αυτό είναι μία ένδειξη ότι, η πρωτεΐνη δεν είναι σταθερή για πάνω από 24 ώρες στους 4°C και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η γρήγορη μετάβαση από την μία τεχνική στην άλλη. Την υπόθεση αυτή, επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας, που ταυτοποίησαν την IcmK σε όλες τις μπάντες που αποκόπηκαν από το αντίστοιχο πήκτωμα σε μοριακά βάρη από 40-30KDa. Παράλληλα όμως, φαίνεται να ταυτοποιείται και μία επιπλέον πρωτεΐνη μαζί με την IcmK, πράγμα που δείχνει ότι η απομόνωση της πρωτεΐνης δεν έχει το επιθυμητό επίπεδο.

Έτσι, έγινε προσπάθεια έκφρασης και καθαρισμού της IcmK σε νέο πλασμιδιακό φορέα, pttQ18C3, ο οποίος φέρει ως σήμανση το strep- tag στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας.

Μετά από δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης, φάνηκε πως οι καλύτερες συνθήκες είναι οι 37°C, επαγωγή με 0,05mM IPTG και συλλογή κυττάρων στις 6-8 ώρες μετά την επαγωγή, ενώ ως θρεπτικό υλικό χρησιμοποιείται το LB. Έπειτα, η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και στήλη στρεπταβιδίνης, στο συμπυκνωμένο έκλουσμα της οποίας φαίνεται μία έντονη μπάντα στο αντίστοιχο SDS-PAGE (εικόνα 3.8, πηγαδάκια 8) κάτω από τα 35,5KDa. Επίσης, φαίνονται να υπάρχουν και μερικές άλλες μέχρι τα 25KDa, οι οποίες όλες ταυτοποιήθηκαν ως την IcmK.

Στη συνέχεια, ακολούθησε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης. Στην εικόνα 3.9 φαίνεται το διάγραμμα έκλουσης, από το οποίο συλλέχθηκαν τα κλάσματα και αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης και του western blot (εικόνες 3.10 (α) και (β)) δείχνουν πως η επιθυμητή πρωτεΐνη εκλύεται στο δεύτερο κλάσμα, το οποίο αντιστοιχεί σε όγκο 17mL. Παρόλο αυτά, η ποσότητά της είναι αρκετά

μικρή , πράγμα που δεν επιτρέπει να γίνουν προσπάθειες για κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.

4.2 Απομόνωση και καθαρισμός της IcmE

Η πρωτεΐνη IcmE βρίσκεται στο περίπλασμα του κυττάρου της *C.burnetii*. Αρχικά έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της μέσω του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pttQ18A2, το οποίο φέρει ως σήμανση το His-tag. Οι προσπάθειες έκφρασης της πρωτεΐνης, έδειξαν πως οι καλύτερες συνθήκες είναι οι 37°C , η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης με 1mM IPTG και η συλλογή των κυττάρων 3 ώρες μετά την επαγωγή.

Στη συνέχεια η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA. Στην εικόνα 3.14 φαίνεται η ανάλυση με SDS-PAGE των κλασμάτων της στήλης Νικελίου. Διακρίνεται μία έντονη μπάντα πάνω από τα 80KDa, η οποία πιθανώς να αντιπροσωπεύει την IcmE.

Ο καθαρισμός της πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο του Microrotor. Ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι θεωρητικά σε pH 9,14, η IcmE δεν φαίνεται να υπάρχει σε κάποιο από τα κλάσματα που απομονώθηκαν (εικόνα 3.15(β)). Παρόλα αυτά, στην εικόνα 3.15 (α), φαίνεται (το κλάσμα έκλουσης της στήλης Νικελίου) να υπάρχει μία έντονη μπάντα σε μοριακό βάρος κάτω από τα 80KDa, ενώ στο κλάσμα από τη διαδικασία του Microrotor, (pH 4,38) διακρίνεται μία αχνή μπάντα στο ίδιο ακριβώς ύψος. Οι μπάντες αυτές αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας, και μόνο στην πρώτη περίπτωση ταυτοποιήθηκε η IcmE.

Τα δεδομένα αυτά, δείχνουν πως η πρωτεΐνη πιθανώς να χάνεται σε κάποιο στάδιο της ισοηλεκτρικής εστίασης υγρής φάσης, και έτσι να μην μπορεί να ανιχνευτεί. Επιπλέον, η «μετατόπιση» της μπάντας σε χαμηλότερο μοριακό βάρος (από εικόνα 3.14 σε εικόνα 3.15) είναι μία ένδειξη πως η πρωτεΐνη δεν είναι σταθερή στους 4°C για πάνω από 24 ώρες και υφίσταται πρωτεόλυση.

Για περαιτέρω μελέτη της IcmE, έγινε προσπάθεια έκφρασης και απομόνωσή της σε πλασμιδιακό φορέα, pttQ18C3, με το strep-tag στο C- τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης. Μετά τη δημιουργία του πλασμιδίου και τον μετασχηματισμό του σε κύτταρα *E.Coli*, η δοκιμή έκφρασης σε

καλλιέργεια μικρής κλίμακας, δεν έδωσε κανένα σήμα στο Western Blot. Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκε ξανά ένα νέο πλασμίδιο, το οποίο έφερε το strep-tag στο N-τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης. Ενώ το προϊόν της PCR ήταν το σωστό (εικόνα 3.16) ο μετασχηματισμός του πλασμιδίου σε κύτταρα E.Coli δεν έδωσε καθόλου αποικίες.

4.3 Απομόνωση και καθαρισμός της DotD

Αρχικά έγινε προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της DotD μέσω του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pttQ18A2, το οποίο φέρει ως σήμανση το His-tag στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας. Η δοκιμή έκφρασης της πρωτεΐνης, έδειξε πως οι καλύτερες συνθήκες είναι οι 37°C, η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης με 1mM IPTG και η συλλογή των κυττάρων 3 ώρες μετά την επαγωγή.

Στη συνέχεια η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA. Ενώ στα κλάσματα της στήλης Νικελίου, διακρίνεται μία έντονη μπάντα κοντά στα 31KDa, η οποία θεωρητικά αντιπροσωπεύει την DotD, αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι το γεγονός ότι ενώ η πρωτεΐνη ξεκινά στο SDS-PAGE από μοριακό βάρος κοντά στα 21KDa (στις αρχικές μεμβράνες-διαλυτοποιημένες και μη διαλυτοποιημένες), στο κλάσμα έκλουσης από τη στήλη Νικελίου είναι μετατοπισμένη κατά 10 περίπου KDa υψηλότερα (εικόνα 3.19).

Επιχειρήθηκε απομόνωση της πρωτεΐνης με την μέθοδο του Microrotofor. Αν και το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι θεωρητικά σε pH 10,05, η DotD ανιχνεύτηκε στα κλάσματα σε pH 1,87 και 11,2 αντίστοιχα. Και πάλι οι μπάντες που αναγνωρίζονται από το anti-His antibody βρίσκονται σε υψηλό μοριακό βάρος (πάνω από τα 31KDa- εικόνες 3.20 (α) και (β)).

Όλες οι προαναφερθείσες μπάντες αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας, η οποία όμως δεν κατάφερε να ταυτοποιήσει την επιθυμητή πρωτεΐνη.

Έτσι, έγινε προσπάθεια έκφρασης και καθαρισμού της DotD σε νέο πλασμιδιακό φορέα, pttQ18C3, ο οποίος φέρει ως σήμανση το strep-tag στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας.

Για την έκφραση της πρωτεΐνης αρχικά δοκιμάστηκαν 2 διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 18°C) και μία καλλιέργεια control. Στην εικόνα 3.23 (β), φαίνεται η απόκριση του αντισώματος να είναι μη-ειδική, εφόσον υπάρχει σήμα σε κάθε συνθήκη με την ίδια ένταση και σε μοριακό βάρος υψηλότερο από αυτό της πρωτεΐνης- στόχου. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η ικανότητα έκφρασης της DotD από 2 διαφορετικές αποικίες στους 37°C ,με προσθήκη επαγωγέα IPTG συγκέντρωσης 1mM και συλλογή των κυττάρων μετά από 3 ώρες επαγωγής. Σύμφωνα με την εικόνα 3.23, και οι δύο αποικίες φαίνεται να εκφράζουν την πρωτεΐνη με την ίδια ένταση. Έτσι, κρατήθηκε η αποικία 2 για υπερέκφραση της DotD.

Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και στήλη στρεπταβιδίνης, αλλά στο συμπυκνωμένο έκλουσμα φαίνονται πολλαπλές μπάντες στην SDS-PAGE και Western Blot (εικόνα 3.25) από τα 17 έως τα 35,5KDa. Η εικόνα αυτή δείχνει πως η πρωτεΐνη δεν έχει απομονωθεί σε καθαρή μορφή από τη στήλη στρεπταβιδίνης. Με φασματομετρία μάζας, όλες οι μπάντες που υπάρχουν στην εικόνα 3.25, ταυτοποιήθηκε η DotD στις τελευταίες μπάντες, μοριακού βάρους χαμηλότερου από τα 25KDa.

Η διαδικασία χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης βάση των SDS-PAGE, δείχνει πως η πρωτεΐνη δεν διαχωρίστηκε όπως θα έπρεπε από τις προσμίξεις που έφερε, πράγμα που σημαίνει πως δεν είναι σταθερή σε θερμοκρασία 4°C και ίσως να αποικοδομήθηκε ή να δημιούργησε συσσωματώματα προτού εισαχθεί στη στήλη μοριακού αποκλεισμού.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης και του western blot (εικόνες 3.27 (α) και (β)) για τα κλάσματα που συγκεντρώθηκαν, δείχνουν πως η ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι πάρα πολύ μικρή στο έκλουσμα της στήλης (0,100mg/mL στα 250μL) και επιπλέον η DotD με δυσκολία αναγνωρίζεται από το ειδικό αντίσωμα στο Western Blot. Η περαιτέρω μελέτη της πρωτεΐνης καθίσταται απαραίτητη για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

4.4 Απομόνωση και καθαρισμός της DotC

Η προσπάθεια απομόνωσης και καθαρισμού της DotC μέσω του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pttQ18A2, το οποίο φέρει ως σήμανση το His-tag στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής ακολουθίας, έδειξε πως οι καλύτερες συνθήκες είναι οι 37°C, η επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης με 1mM IPTG και η συλλογή των κυττάρων 3 ώρες μετά την επαγωγή.

Η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη Ni-NTA, όπως έδειξε το SDS-PAGE. Στα κλάσματα έκλουσης, διακρίνεται μία έντονη μπάντα κάτω από τα 31KDa, (εικόνα 3.29), η οποία ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας ως DotC.

Η προσπάθεια καθαρισμού της πρωτεΐνης με την μέθοδο του Microrotor έδειξε μία ασυμφωνία μεταξύ του ισοηλεκτρικού σημείου της σημείου και των κλασμάτων που απομονώθηκαν. Παρόλη αυτή τη διαφορά, η πρωτεΐνη που βρίσκεται στην όξινη περιοχή ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας ως DotC.

Παρόλα αυτά, δοκιμάστηκε και η έκφραση της πρωτεΐνης σε πλασμίδιο pttQ18C3, το οποίο φέρει ως σήμανση το strep-tag στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας.

Προσπάθειες για έκφραση της πρωτεΐνης για δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 18°C) σε συνδυασμό με την ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης, έδειξαν μη έκφραση αυτής, διότι η απόκριση του αντισώματος είναι μη-ειδική, εφόσον υπάρχει σήμα σε κάθε συνθήκη με την ίδια ένταση και σε μοριακό βάρος χαμηλότερο από αυτό της πρωτεΐνης-στόχου (εικόνα 3.32 β). Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η δυνατότητα έκφρασης της DotC από 2 διαφορετικές αποικίες στους 37°C, με προσθήκη επαγωγέα IPTG συγκέντρωσης 1mM και συλλογή των κυττάρων μετά από 3 ώρες επαγωγής. Σύμφωνα με την εικόνα 3.33, η πρωτεΐνη εκφράζεται μόνο στην αποικία 1, η οποία κρατήθηκε για υπερέκφραση της DotC.

Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και στήλη στρεπταβιδίνης, αλλά η ανοσοανίχνευση δείχνει πως η πρωτεΐνη δεν έχει απομονωθεί σε καθαρή μορφή από τη στήλη στρεπταβιδίνης (εικόνα 3.34 (β)).

Η χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού για τον καθαρισμό της – βάση του διαγράμματος έκλουσης, δείχνει πως η πρωτεΐνη δεν διαχωρίστηκε όπως θα έπρεπε από τις προσμίξεις που έφερε, πράγμα που σημαίνει πως δεν είναι σταθερή σε θερμοκρασία 4°C και ίσως να αποικοδομήθηκε ή να δημιούργησε συσσωματώματα προτού εισαχθεί στη στήλη μοριακού αποκλεισμού.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης και του western blot (εικόνες 3.36 (α) και (β)) για τα κλάσματα που συγκεντρώθηκαν, δείχνουν πως η ποσότητα της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι πάρα πολύ μικρή στο έκλουσμα της στήλης, εφόσον η χρώση με Coomassie δεν έδειξε κάτι και επιπλέον η DotC βρίσκεται διάχυτη μέσα στα δείγματα που απομονώθηκαν, μιας και το ειδικό αντίσωμα την αναγνωρίζει σε όλα τα κλάσματα.

Τέλος, η φασματομετρία μάζας για όλες τις παραπάνω πρωτεϊνικές λωρίδες, ταυτοποίησε την πρωτεΐνη DotC, πράγμα που σημαίνει πως οι προσπάθειες απομόνωσης και καθαρισμού της ήταν ανεπιτυχείς.

4.5 Απομόνωση και καθαρισμός του συμπλόκου pKEGCD

Εκτός από την έκφραση και απομόνωση των υπομονάδων του εκκριτικού συστήματος τύπου IV της *C.Burnetii*, έγινε προσπάθεια μελέτης του πυρήνα του εκκριτικού συστήματος, που πιθανώς να δημιουργείται από τις IcmG,E,K και DotC,D.

Αρχικά, κατασκευάστηκε το πλασμίδιο, το οποίο φέρει ένα His-tag στο C-τελικό άκρο της DotC και ένα strep-tag στο C-τελικό άκρο της IcmG. Η διάταξη των γονιδίων πάνω στο πλασμίδιο είναι η εξής:

Pro-D, C-His- term-pro-K, E, G-strep- term.

Για το παραπάνω πλασμίδιο, κατά τη μεταγραφή θα δημιουργηθεί ένα mRNA που θα μεταφραστεί σε DotD-DotC και ένα δεύτερο mRNA που θα μεταφραστεί σε K-E-G.

Βασικός στόχος είναι η έκφραση ενός λειτουργικού πρωτεϊνικού συμπλόκου και η δομική ανάλυση αυτού.

Αρχικά ελέγχθηκαν οι συνθήκες έκφρασης του θεωρητικού συμπλόκου. Για την ύπαρξη ή όχι και των πέντε πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα διαδοχικά βήματα απομόνωσης χρησιμοποιούνται, εκτός από το anti-His antibody και το anti-strep antibody, τα anti-K, anti-D, anti-C, anti-E και anti-G.

Ως κατάλληλες συνθήκες έκφρασης του συμπλόκου βρέθηκαν να είναι οι 30°C χωρίς καθόλου προσθήκη επαγωγέα IPTG και συλλογή των κυττάρων στις 8 ώρες επώασης. Τα αντίστοιχα western blots δείχνουν την πιθανότητα να εκφράζονται και οι 5 πρωτεΐνες.

Για την απομόνωση του συμπλόκου, έγινε χρήση της στήλης Νικελίου αλλά και τη στήλη στρεπταβιδίνης. Από τη στήλη Νικελίου, συγκρατείται η DotC, η οποία φέρει το His-tag ενώ από τη στήλη στρεπταβιδίνης η IcmG, που φέρει το strep-tag. Τόσο από την μία, όσο και από την άλλη στήλη, συλλέχθηκαν το flow through και φυσικά το έκλουσμα, προκειμένου να ελεγχθεί με western blot αν και οι 5 πρωτεΐνες βρίσκονται μαζί στο έκλουσμα (πράγμα που θα επιβεβαίωνε και την ύπαρξη του συμπλόκου) ή αν είναι ξεχωριστά.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως οι πρωτεΐνες δεν είναι μαζί στα εκλούσματα από τη χρωματογραφία συγγένειας. Αυτό σημαίνει είτε ότι δεν δημιουργούν σύμπλοκο ή ότι οι συνθήκες διαλυτοποίησης των μεμβρανών είναι ικανές να το διασπάσουν. Από μία πρώτη ανάλυση των συγκεκριμένων western blots, υπάρχει η εντύπωση πως η IcmG είναι μαζί με την IcmK (εικόνα 3.44 (α) και 3.45 (α)) ενώ η DotD και η DotC βρίσκονται μαζί με την IcmE (εικόνα 3,42 (α) και 3.43 (β), (γ)). Συγκεντρωτικά τα συμπεράσματα αυτά φαίνονται στον πίνακα 3.2.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αρχική υπόθεση, έγινε ταυτοποίηση των μπαντών με φασματομετρία μάζας (εικόνες 3.48 και 3.49) ενώ τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 3.3 και 3.4. Όπως φαίνεται στους πίνακες, ενώ σε όλες τις μπάντες ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες του ενδιαφέροντός μας, η ταυτοποίηση αυτή έγινε με πολύ χαμηλή απόδοση, δίνοντας τις πρώτες θέσεις σε άλλες πρωτεΐνες. Η κατάληξη αυτή προκαλεί αμφιβολίες για την ύπαρξη ή όχι του σύμπλοκου και γεννάει περισσότερα ερωτήματα για τον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες του πυρήνα.

Από τις μπάντες που κόπηκαν και αναλύθηκαν (εικόνες 3.48 και 3.49) επιπλέον ταυτοποιούνται σε υψηλή απόδοση οι εξής πρωτεΐνες:

Πρωτεΐνη	Μοριακό βάρος (kDa)
2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	56 (μονομερές), 115 (πολυμερές)
Pyruvate dehydrogenase E1 component	99,6
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	48,75
Multidrug efflux pump subunit AcrB	113,57

Πίνακας 4.1: Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα στις μπάντες των SDS-PAGE ηλεκτροφόρων που έτρεξαν τα δείγματα για την απομόνωση του συμπλόκου.

4.6 Μελλοντικές προοπτικές

Με την παρούσα εργασία, έγινε ένα παραπάνω βήμα στην μελέτη των πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος του βακτηρίου *C. Burnetii*. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλά επιπλέον πράγματα που μπορούν να γίνουν και άλλα που χρίζουν άμεσης βελτίωσης, προκειμένου να μπορέσουμε να έχουμε μία ολοκληρωμένη εικόνα του ρόλου των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στη δράση του βακτηρίου.

Αρχικά, μπορούν να γίνουν ορισμένα πειράματα έτσι ώστε να εξαχθεί ένα πρωτόκολλο απομόνωσης των πρωτεϊνών, με βάση το οποίο θα έχουμε τη δυνατότητα να λαμβάνουμε την εκάστοτε πρωτεΐνη καθαρή, σε μεγάλη ποσότητα έτσι ώστε να είναι εφικτή η κρυστάλλωσή της. Πιο συγκεκριμένα, για τις DotD και DotC, είναι απαραίτητο να γίνουν επιπλέον πειράματα δοκιμής της έκφρασής της σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης IPTG και ωρών επαγωγής προκειμένου να καταλήξουμε με ασφάλεια σε αυτές τις παραμέτρους.

Επιπλέον, η λήψη εικόνων ηλεκτρονικού μικροσκοπίου θα ήταν πολύ χρήσιμη για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά τη δομή της εκάστοτε

πρωτεΐνης, γιατί έτσι θα μπορέσουμε να δούμε αν υπάρχει ως μονομερές ή ως σύμπλοκο και να κατανοήσουμε τη δομή της λειτουργικής της μορφής. Παρόλα αυτά, περισσότερες δομικές πληροφορίες θα είμαστε σε θέση να εξάγουμε αν πραγματοποιηθεί κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Η μέθοδος της κρυσταλλογραφίας θα μας βοηθήσει να απαντήσουμε στο μεγάλο αίνιγμα της δομής και του τρόπου αλληλεπίδρασης.

Άλλη μία πολύ ενδιαφέρουσα μελλοντική προοπτική, είναι η καλλιέργεια του ίδιου του βακτηρίου (*C. Burnetii*) προκειμένου να μπορέσουμε να μελετήσουμε το εκκριτικό σύστημα του οργανισμού, χωρίς να χρησιμοποιείται το *E. Coli* ως βακτήριο έκφρασης των πρωτεϊνών. Η προοπτική φαντάζει ιδανική για τη λύση της δομής του εκκριτικού συστήματος τύπου IV Dot/Icm και φαίνεται πολύ ελπιδοφόρα σχετικά με τα συμπεράσματα που μπορεί να βγουν για τη δράση του βακτηρίου αλλά και τη λειτουργία των εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε αυτή.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akitoyo Hotta, Midori Kawamura, Ho To, Masako Andoh, Tsuyoshi Yamaguchi, Hideto Fukushi, Katsuya Hirai. (2002). Phase Variation Analysis of *Coxiella burnetii* during Serial Passage in Cell Culture by Use of Monoclonal Antibodies. *Infection and Immunity* , 4747–4749.
- Angelakis E, Raoult D. (2010). Q fever. *Vet Microbiology* , 297-309.
- Anja Lührmann, Craig R. Roy. (2007). *Coxiella burnetii* Inhibits Activation of Host Cell Apoptosis through a Mechanism That Involves Preventing Cytochrome c Release from Mitochondria. *Infection and Immunity* , 5282–5289.
- Christopher M Stead, Anders Omsland, Paul A Beare, Kelsi M Sandoz, Robert A Heinzen. (2013). Sec-mediated secretion by *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology* , 213-222.
- Craig T. Narasaki, Rudolf Toman. (2012). *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*. U.S.A.: Springer.
- Dale Howe, Louis P. Mallavia. (2000). *Coxiella burnetii* Exhibits Morphological Change and Delays Phagolysosomal Fusion after Internalization by J774A.1 Cells. *Infection and Immunity* , 3815–3821.
- Daniel E. Voth, Robert A. Heinzen. (2009). *Coxiella* Type IV Secretion and Cellular Microbiology. *Curr Opin Microbiol.* , 74-80.
- Daniel E. Voth, Robert A. Heinzen. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cellular Microbiology* , 829–840.
- Dario S. Zamboni, Susan McGrath, Michel Rabinovitch, Craig R. Roy. (2003). *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Molecular Microbiology* , 965-976.
- Elhelu, M. A. (1983). The Role of Macrophages in Immunology. *Journal of the National Medical Association* , 314-317.
- Eric Ghigo, Lionel Pretat, Benoît Desnues, Christian Capo, Didier Raoult, Jean-Louis Mege. (2007). Intracellular Life of *Coxiella burnetii* in Macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences.* , 55-66.
- Gil Segal, Michal Feldman, Tal Zusman. (2005). The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* . *FEMS Microbiology Reviews* , 65-81.
- Harry H. Low, Francesca Gubellini, Angel Rivera-Calzada, Nathalie Braun, Sarah Connery, Annick Dujeancourt, Fang Lu, Adam Redzej, Rémi Fronzes, Elena V. Orlova & Gabriel Waksman. (2014). Structure of a type IV secretion system. *NATURE* , 550–553.
- Hoffman Paul, Friedman Herman, Bendinelli Mauro. (2008). *Legionella Pneumonophila: Pathogenesis and Immunity*. New York, USA: Springer.

- J. Kazar. (2005). Coxiella burnetii infection. *Ann N Y Acad Sci* , 105-14.
- Jason M. Kinchen, Kodi S. Ravichandran. (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* , 781-795.
- József Tózsér, Tamás Emri, Éva Csósz. (2011). *Protein Biotechnology*. Debrecen: University of Debrecen.
- József Tózsér, Tamás Emri, Éva Csósz. (2011). *Protein Biotechnology*. Debrecen: University of Debrecen.
- Kazar. (2005). Coxiella burnetii infection. *Ann N Y Acad Sci.* , 105-114.
- Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa S, Nagai H. (2014). Native structure of a type IV secretion system core complex essential for Legionella pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 11804-9.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M., and Weinstein, R.A. . (2003). Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect* , 709-721.
- Mary M. Webera, Chen Chena, Kristina Rowina, Katja Mertensa, Gloria Galvana, Hui Zhia, Christopher M. Dealanga, Victor A. Romanb, Simran Bangab, Yunhao Tanb, Zhao-Qing Luob and James E. Samuela. (2013). Identification of Coxiella burnetii Type IV Secretion Substrates Required for Intracellular Replication and Coxiella-Containing Vacuole Formation. *Journal of Bacteriology* , 3914-3924.
- Moffatt JH, Newton P, Newton HJ. (2015). Coxiella burnetii: turning hostility into a home. *Cell Microbiol.* , 621-31.
- Molly C. Sutherland, Kelsey A. Binder, Phillip Y. Cualing, Joseph P. Vogel . (2013). Reassessing the Role of DotF in the Legionella pneumophila Type IV Secretion System. *PLOS ONE* , e65529.
- Noboru Nakano, Tomoko Kubori, Miki Kinoshita, Katsumi Imada , Hiroki Nagai . (2010). Crystal Structure of Legionella DotD: Insights into the Relationship between Type IVB and Type II/III Secretion Systems. *PLOS Pathogens* , e1001129.
- Ovchinnikov, Dmitry A. (2008). Macrophages in the embryo and beyond: Much more than just giant phagocytes. *Genesis* , 447-462.
- Rémi Fronzes, Peter J. Christie, Gabriel Waksman. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol.* , 703-714.
- Richard J. Lamont. (2004). *Bacterial Invasion of Host cells*. United States of America: University of Cambridge.
- Samoilis G, Psaroulaki A, Vougas K, Tselentis Y, Tsiotis G. (2007). Analysis of whole cell lysate from the intercellular bacterium Coxiella burnetii using two gel-based protein separation techniques. *J Proteome Res* , 3032-41.

Sherry A. Coleman, Elizabeth R. Fischer, Dale Howe, David J. Mead, and Robert A. Heinzen. (2004). Temporal Analysis of *Coxiella burnetii* Morphological Differentiation. *Journal of Biotechnology* , 7344-7352.

Sherry A. Coleman, Elizabeth R. Fischer, Diane C. Cockrell, Daniel E. Voth, Dale Howe, David J. Mead, James E. Samuel, Robert A. Heinzen. (2007). Proteome and Antigen Profiling of *Coxiella burnetii* Developmental Forms. *Infection and Immunity* , 290-298.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* , 76-85.

Tissot-Dupont H., Raoult D. (2008). Q fever. *Infectious Disease Clinics of North America* , 505-514.

van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology* , 561-573.

Winchell CG, Graham JG, Kurten RC, Voth DE. (2014). *Coxiella burnetii* type IV secretion-dependent recruitment of macrophage autophagosomes. *Infect Immun.* , 2229-38.

Παράρτημα 1: Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν

