

Ελευθερία Βρόντου

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ
ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΕΝΔΟΜΟΡΙΑΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ
ΣΤΗ SecA ΠΡΩΤΕΙΝΗ

Υπεύθυνος καθηγητής: Α. Οικονόμου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 1998

Ολοκληρώνοντας την εργασία μου για τον μεταπτυχιακό τίτλο ειδίκευσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν και με ενθάρρυναν κατά την διάρκεια του προηγούμενου χρόνου.

Ευχαριστώ ειλικρινά τον επιβλέποντα Καθηγητή Αναστάσιο Οικονόμου για την βοήθεια του, την υπομονή του, τις χρήσιμες συμβουλές του, αλλά και για τον ενθουσιασμό με τον οποίο με ενέπνευσε όσον αφορά το θέμα της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Λίλη Καραμάνου για την αμμέριστη βοήθεια της σε κάθε είδους επιστημονικό πρόβλημα που αντιμετώπισα στο εργαστήριο, αλλά και για την ηθική συμπαράσταση και το ενδιαφέρον της.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά στο εργαστήριο και ιδιαίτερα τον Γιώργο Σιανίδα, τον Brian Shilton, τον Thon de Boer, την Catherine Baud, καθώς και τους Rotators Μανόλη Πολίτη και Αλεξάνδρα Μπούτλα.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον Μπάμπη Ποζίδα για τις πολύτιμες συμβουλές του καθώς και τον Δημήτρη Διαλεκτάκη για την προθυμία με την οποία με βοήθησε στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων των διαφόρων πρωτεϊνών που χρησιμοποίησα.

Ευχαριστώ τον Δημήτρη Τζαμαρία για τους πρωτεϊνικούς μάρτυρες που μου έδωσε για την πιο ολοκληρωμένη εικόνα των πειραμάτων μου.

Επίσης ευχαριστώ όλα τα μέλη του IMBB για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ενταχθώ στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Ευχαριστώ πολύ ακόμα, την Γραμματέα, Γεωργία Χουλάκη για την βοήθεια της στο γράψιμο της παρούσας διατριβής.

Τέλος ευχαριστώ την πραγματική φίλη Ελένη Τζωρτζακάκη για την βοήθεια της σε κάθε μου πρόβλημα και πάνω απ' όλους την αδερφή μου Σοφία για την υποστήριξη και την εμπύχωση της σε κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των ενδομοριακών επιδράσεων στη SecA ATPάση, την πρωτεΐνη-κινητήρα που μαζί με την μεμβρανική πρωτεΐνη SecY, καταλύουν την έκκριση πρωτεϊνών στα βακτήρια. Η SecA πρωτεΐνη αποτελείται από δύο πρωτοταγείς περιοχές: η N- περιοχή (70 KDa) υδρολύει ATP και η C-περιοχή(34 KDa) χρειάζεται για την πρόσδεση και εισχώρηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Η SecA καταλύει την έκκριση πρωτεϊνών κατά την διάρκεια κύκλων εισχώρησης και οπισθοχώρησης της από την μεμβράνη. Δείχθηκε ότι οι δύο πρωτοταγείς περιοχές σχηματίζουν φυσικό σύμπλοκο αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Αυτή η αλληλεπίδραση είναι σημαντική όχι μόνο από δομικής άποψης αλλά και διότι έχει λειτουργικές συνέπειες. Χρησιμοποιώντας SecA πρωτεΐνες με μεταλλαγές στη C-περιοχή τους εντοπίστηκε μία αλληλουχία μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 780 έως 800 που είναι ρυθμιστής της δράσης ATPάσης της N-περιοχής. Ειδικότερα βρέθηκε ότι αυτή η αλληλουχία αν και δεν είναι απαραίτητη για μονούς κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης ATP από την ελεύθερη SecA, καταστέλει εντούτοις πολλαπλούς κύκλους της παραπάνω διαδικασίας, μέσω της φυσικής επαφής της N- με τη C- περιοχή. Επιπλέον, βρέθηκε ότι όταν η SecA είναι προσδεμένη στη μεμβράνη, η αλληλουχία 780 έως 800 είναι σημαντική για την μεμβρανική και την ATPάση μετατόπισης της SecA. Τέλος διαπιστώθηκε ότι η αλληλουχία 780 έως 800, είναι απαραίτητη για την μετατόπιση πρωτεϊνών αυτή καθ' αυτή τόσο σε συνθήκες *in vivo* όσο και *in vitro*. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα και με δεδομένη τη φυσική αλληλεπίδραση της SecA με τη SecY πρωτεΐνη, μέσω τμήματος της C-περιοχής της SecA που εμπεριέχει την αλληλουχία 780-800, συμπεραίνεται ότι η αλληλουχία αυτή αποτελεί ένα μηχανιστικό κρίκο που συνδέει τις SecA και SecY πρωτεΐνες. Προτείνεται ότι η SecY, ενδεχομένως και με συμμετοχή του υποστρώματος, ρυθμίζει τη δράση ATPάσης της SecA μέσω της αλληλουχίας 780-800 επάγοντας έτσι τις κυκλικές κινήσεις της SecA στη μεμβράνη.

Discussion

The aim of the following thesis was the investigation of the intramolecular interactions of the SecA ATPase, the motor protein which together with the membrane protein SecY catalyze protein secretion in bacteria. SecA consists of two primary domains: the N-domain (70 KDa) hydrolyzes ATP and the C-domain (34 KDa) is needed for the binding and the insertion of the protein into the membrane. SecA catalyzes protein secretion during cycles of insertion and deinsertion from the membrane. It has been shown that the two primary domains create a physical complex by interacting with each other. This interaction is important not only from a structural point of view but also because it has functional significance. Using SecA proteins with mutations in their C-domain, a sequence was found between amino acyl residues 780-800 that is a regulator of the ATPase activity of the N-domain. More specifically it was shown that this sequence although not important for single cycles of binding and hydrolysis of ATP from soluble SecA, it represses multiple cycles of ATP interactions, through physical contact between the N- and C-domains. Furthermore, when SecA is bound to the membrane, the sequence 780-800 is important for both the membrane and the translocation ATPase activities. Finally the sequence 780-800 was shown to be important for the translocation of proteins both *in vivo* and *in vitro*. Previously it was established that SecA physically interacts with the SecY protein, through a part of the C-domain of SecA which encompasses the sequence 780-800. Taken together all these observations lead to the conclusion that this sequence is a mechanistic link that brings the SecA and the SecY proteins together. It is proposed that SecY, possibly acting in concert with the substrate, regulates the ATPase activity of SecA through the sequence 780-800, thereby inducing cyclic movements of SecA in the membrane during protein secretion.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1-Εισαγωγή	3
1.1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	10
1.2 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΙΣ ΤΡΕΙΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΖΩΗΣ: ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΠΑΝΩ Σ'ΕΝΑ ΘΕΜΑ	11
1.2.1 Το Sec61/SecYEG σύμπλοκο	14
1.2.2 Η ενέργεια κατά την μετατόπιση πρωτεϊνών	14
1.2.3 Εναρξη της μετατόπισης πρωτεϊνών	15
1.2.4 Άλλες μεμβρανικές υπομονάδες του συστήματος μετατόπισης πρωτεϊνών	16
1.3 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ: ΥΠΑΡΞΗ ΔΙΑΥΛΟΥ	17
1.3.1 Δυναμική του συμπλόκου της μεταθετάσης	21
1.4 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΦΑΚΕΛΛΟΥ ΤΩΝ GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	22
1.5 ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΗΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΑΣΗ.	24
1.5.1 Στόχευση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στην μεμβρανική μεταθετάση	25
1.5.2 Υπομονάδες της προπρωτεϊνικής μεταθετάσης	25
α. Μεμβρανικές πρωτεΐνες της μεταθετάσης	26
β. Η περιφερειακή SecA πρωτεΐνη της μεταθετάσης	28
1.5.3 Ενέργεια στην τρoσλοκάση: ATP και η κινητήρια δύναμη των πρωτονίων PMF (Proton Motive Force)	30
1.5.4 Μηχανισμός δράσης της μεταθετάσης.	31
Κεφάλαιο 2-Αποτελέσματα	25
2.1 ΦΥΣΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ Ν-ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ C- ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ SECA ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	25
Α) με δέσμευση ³⁵ S-P70-SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34	26

B.) με δέσμευση ³⁵ S-P34-SecA σε ακινητοποιημένη HIS-P70-SecA.	28
---	----

Κεφάλαιο 3- Αποτελέσματα 30

3.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ Ν-ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ C-ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΗΣ SECA. 30

I. HIS-P34-SecAΔ782-796 και HIS-P34-SecA::788-789 πρωτεΐνες .	32
---	----

II. SecAT109N/Δ782-796 , SecAR509K/Δ782-796 και SecAD209N/Δ782-796 πρωτεΐνες	33
--	----

III. HIS-P70-SecAD209N,HIS-P70-SecAR509K και HIS-P70-SecAT109N πρωτεΐνες	35
--	----

Κεφάλαιο 4- Αποτελέσματα 36

4.1 ΤΙ ΣΥΜΒΑΙΝΕΙ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗΣ(TRANSLOCATION) ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ; 36

Κεφάλαιο 5-Συζήτηση 41.

Κεφάλαιο 6-Υλικά και μέθοδοι 52

1.Απομόνωση ProOmpA από σωματίδια έγκλεισης (Inclusion bodies)	52
--	----

2.Καθαρισμός αγρίου τύπου SecA, SecA Δ782-746 και SecA::788-789	53
---	----

3.Καθαρισμός πρωτεϊνών με πολλαπλές ιστιδίνες στο αμινοτελικό τους άκρο	54
---	----

4.Απομάκρυνση ουρίας από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια <i>E. coli</i>	55
--	----

5.Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από αντισώματα (Western blots)	55
---	----

6.Δέσμευση ³⁵ S-P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34SecA	56
---	----

7.Μετατόπιση <i>in vitro</i> ραδιενεργούς ProOmpA σε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια <i>E.Coli</i> 5791	
--	--

8. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	59
---	----

9.Δραστικότητα ΑΤΡάσης της SecA και των μεταλλαγμένων μορφών της.	60
---	----

(ο ελεύθερος φώσφορος προσδιορίζεται από το αντιδραστήριο malachite green)	60
10.Μοριακές τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	61
11. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDSPAGE)-Χρώση με Coomassie	61

ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin Resistance
AmpS	Ampicillin Sensitivity
ATP	Adenosinotriphosphate
BSA	Bovine Serum Albumin
Cm	Chloroamphenicol
CmR	Chloroamphenicol Resistance
cs	cold/cryo-sensitive
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
C-terminal	Carboxy-terminal
DNA	Deoxyribonucleinicacid
dNTP	Deoxynucleoside-triphosphate
ddNTP	Dideoxynucleoside-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	double-stranded DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetic Acid
EtOH	Ethanol
E.coli	Escherichia coli
Gst	Glutathione s-transferase
IMV	Inverted Membrane Vesicles
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranoside
LB medium	Luria-Bertaini medium
LB/amp/tet/Cm	LB medium containing the corresponding antibiotic
mRNA	messenger RNA
NBD	Nucleotide Binding Site
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optical Density
o/n	overnight
PCR	Polymerase Chain Reaction

pAEX1	pALTER-EX1
pOA	proOmpA
PMF	Proton Motive Force
RNA	Ribonucleicacid
RT	Room Temperature
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel
Electrophoresis	
SRP	Signal Recognition Particle
ssDNA	single-stranded DNA
TetR	Tetracycline Resistance
TetS	Tetracycline Sensitivity
ts	temperature-sensitive
w/o	without

Κεφάλαιο 1-Εισαγωγή

Η ομαλή λειτουργία ενός κυττάρου εξαρτάται από την σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών του που με τη σειρά της εξαρτάται από την σωστή τοποθέτηση τους μέσα στο κύτταρο. Γι' αυτό το λόγο τα κύτταρα έχουν αναπτύξει περίπλοκα συστήματα για να διατηρούν διαμερίσματα που περιβάλλονται από μεμβράνη, με συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Περίπου το 1/3 των πρωτεϊνών του κυττάρου είναι μεμβανικές, ενώ και πολλές διαλυτές πρωτεΐνες πρέπει να διαπεράσουν μία ή δύο μεμβράνες για να φτάσουν στην τελική τους θέση, είτε στο εξωτερικό κύτταρο, είτε μέσα σ' ένα ενδοκυτταρικό διαμέρισμα. Κατά συνέπεια, οι μισές περίπου πρωτεΐνες ενός κυττάρου μεταφέρονται στη ή κατά μήκος της μεμβράνης.

Συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι συστημάτων μεταφοράς πρωτεϊνών. Ο ένας τύπος εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών. Στην περίπτωση αυτή αναφερόμαστε στο σύστημα εξαγωγής πρωτεϊνών, αφού πρωτεΐνες εξάγονται από το κυτταρόπλασμα σε εξωκυτταροπλασματικά διαμερίσματα, όπως είναι το βακτηριακό περίπλασμα, η κοιλότητα (lumen) του ενδοπλασματικού δικτύου, η κοιλότητα των θηλακοειδών, ή η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Ο άλλος τύπος συστήματος μεταφορά πρωτεϊνών εντοπίζεται στην εξωτερική και εσωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών και στην μεμβράνη των υπεροξεισωμάτων. Πρόκειται για σύστημα εισαγωγής πρωτεϊνών, αφού αυτές μεταφέρονται σε διαμερίσματα που είναι λειτουργικά ισοδύναμα ή έχουν προέλθει εξελικτικά από το κυτταρόπλασμα, όπως τα εξωτερικά διαμερίσματα των μιτοχονδρίων των χλωροπλαστών και των υπεροξεισωμάτων.

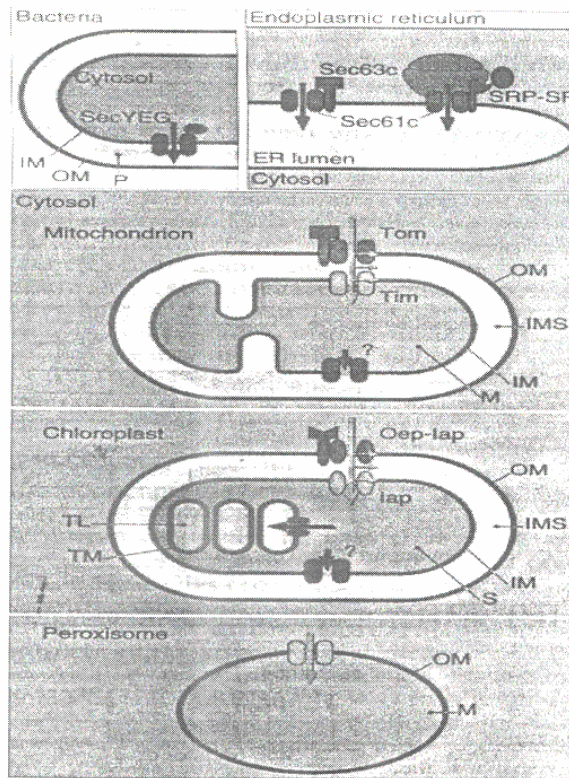
Τα παραπάνω συστήματα, εισαγωγής και εξαγωγής πρωτεϊνών (σχήμα 1) μεταφέρουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες και λειτουργούν με παρόμοιες αρχές. Έτσι η μεταφερόμενη πρωτεΐνη φέρει συνήθως μια αμινοτελική αλληλουχία οδηγό η οποία μεταφέρεται σε ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη-στόχο με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών παραγόντων , ενώ μένει συνήθως μερικώς αποδιαταγμένη κατά τη

διάρκεια της μεταφοράς. Η αλληλουχία οδηγός της πρωτεΐνης ανοίγει ένα ετερο-ολιγομερές διαμεμβρανικό κανάλι το οποίο συνδέεται περιφερικά με μία προσδεδεμένη πρωτεΐνη κινητήρα (motor protein) η οποία χρησιμοποιεί ενέργεια από την υδρόλυση τριφωσφορικών νουκλεοσιδίων, για να μεταφέρει την προπρωτεΐνη κατά μήκος της μεμβράνης. Τέλος, η πρωτεΐνη αποκτά την τελική της διαμόρφωση στην trans πλευρά της μεμβράνης. Στη συνέχεια θα ασχοληθούμε αποκλειστικά με τα συστήματα εξαγωγής πρωτεϊνών.

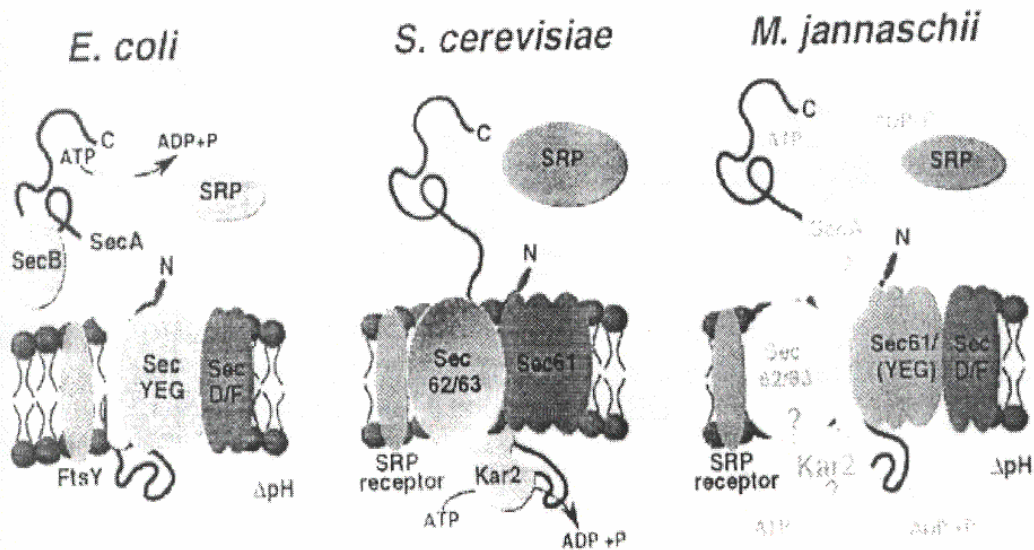
Μετατόπιση πρωτεϊνών στις τρεις μορφές της ζωής: Ποικιλίες πάνω σ' ένα θέμα .

Όλοι οι οργανισμοί κατατάσσονται σ' έναν από τους τρεις χώρους της ζωής: βακτήρια, ευκαρυωτικοί οργανισμοί και αρχαία. Η διαίρεση αυτή προτάθηκε με βάση της 16S ριβοσωμικές RNA αλληλουχίες και αργότερα επιβεβαιώθηκε ενμέρει και από τη σύγκριση πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Μολονότι τα αρχαία μοιάζουν μορφολογικά με τα βακτήρια (και τα δύο είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί) είναι διακριτά εξελικτικά και από τα βακτήρια και από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έτσι, ενώ μερικές κυτταρικές διαδικασίες στα αρχαία μοιάζουν πολύ με τις αντίστοιχες στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (μεταγραφή, μετάφραση) πολλά μεταβολικά μονοπάτια, η κυτταρική μορφολογία και η οργάνωση του γονιδιώματος προσεγγίζουν περισσότερο τα βακτηριακά συστήματα.

Η ολοκλήρωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος πολλών οργανισμών και από τις τρεις μορφές ζωής δίνει τη δυνατότητα για πιο λεπτομερείς συγκρίσεις των αρχαίων, των βακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών (σχήματα 2 και 3) καθώς και για την εξαγωγή περισσότερων συμπερασμάτων σχετικά με την μετατόπιση των πρωτεϊνών σε όλα τα κύτταρα. Παλαιότερα, η μετατόπιση των πρωτεϊνών μελετούνταν μόνο στα βακτήρια και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μόλις όμως έγινε η ολοκλήρωση της αλληλουχίας του γονιδιώματος σε οργανισμούς των αρχαίων, έγιναν συγκρίσεις μεταξύ και των τριών μορφών ζωής. Έτσι, το *Methanococcus jannaschii* (αρχαίο), ο *Saccharomyces cerevisiae* (ευκαρυωτικός οργανισμός) και πάνω από δέκα βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου της *Escherichia Coli* και του *Helicobacter pylori* συγκρίθηκαν



Σχήμα 1: Συστήματα μετατόπισης πρωτεϊνών. Στα συστήματα εξαγωγής, πρωτεΐνες εξάγονται από το κυτταρόπλασμα σ' ένα εξωκυτταρικό διαμέρισμα. Στα συστήματα εισαγωγής, πρωτεΐνες εσάγονται από το κυτταρόπλασμα σ' ένα ενδοκυτταρικό διαμέρισμα.



Σχήμα 2: Μοντέλλα μετατόπισης πρωτεϊνών στα βακτήρια (*E.coli*), στους ευκαρυωτικούς (*S.cerevisiae*) και στα αρχαία (*M.jannaschii*).

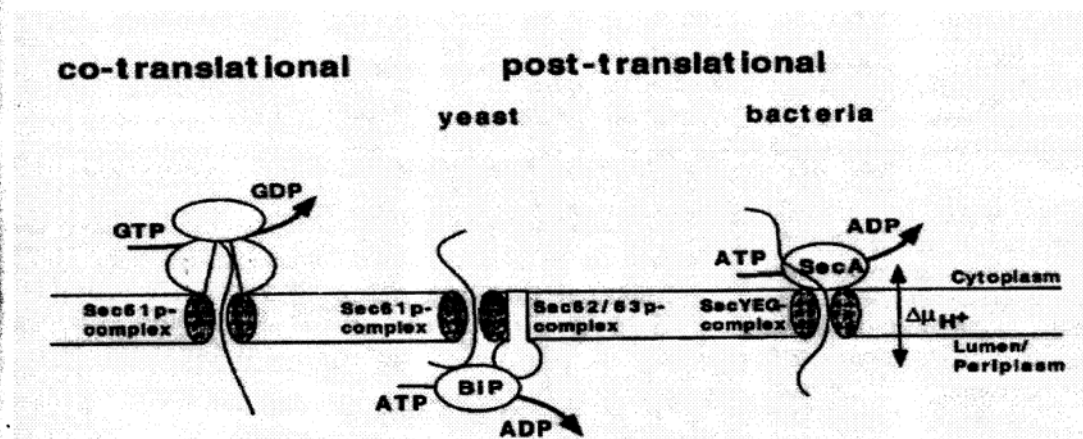
Table 1. Components of the Protein Translocation Systems in *S. cerevisiae*, *E. coli*, and *M. jannaschii*

Species	Targeting Molecules		Membrane-Embedded Translocation Complexes			Translocation ATPases	
	SRP	SecB	SecYEG/SecE1	SecE2/63	SecD/F	SecA	BIP
<i>S. cerevisiae</i>	+	-	+	+	-	+	
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	+	+	-
<i>M. jannaschii</i>	+	-	+	-	+	-	-

^a Homologous components or processes identified.

^b Homologous components or processes not identified.

Σχήμα 3: Συστατικά των συστημάτων μετατόπισης σε αντιπροσώπους βακτηρίων, ευκαρυωτικών και αρχαία.



Σχήμα 5: Τρεις μηχανισμοί με τους οποίους οι παραπάνω μεμβρανικοί μεταφορείς χρησιμοποιούν ενέργεια για την μετατόπιση πρωτεϊνών μέσω του καναλιού Sec61p/SecYEG.

όσον αφορά τα συστατικά της μετατόπισης πρωτεϊνών και βγήκαν ορισμένα συμπεράσματα.

Το Sec61/SecYEG σύμπλοκο

Η μετατόπιση των πρωτεϊνών διαμέσου των υδρόφοβων μεμβρανών συμβαίνει κυρίως μέσα από ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο. Ο πυρήνας αυτού του συμπλόκου θεωρείται ότι είναι ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο περιβαλλομένων μεμβρανικών πρωτεϊνών που σχηματίζει ένα “κανάλι” μέσα από το οποίο περνούν οι πρωτεΐνες έξω από το κυτταρόπλασμα (Martoglio, Dobberstein, 1996) . Το σύμπλοκο αυτό είναι το SecYEG στα βακτήρια και το ομόλογο του Sec61 στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Δύο υπομονάδες του παραπάνω συμπλόκου (απαραίτητες για την μετατόπιση των πρωτεϊνών *in vivo* και *in vitro*) παρουσιάζουν συντήρηση αλληλουχίας σε ορισμένες περιοχές τους και συγκεκριμένα οι SecY/SecE και οι Sec61α/Sec61γ πρωτεΐνες στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς αντίστοιχα. Όσον αφορά τα αρχαία, βρέθηκαν ομολογίες με τις παραπάνω υπομονάδες SecY/Sec61α και SecE/Sec61γ που όμως είναι πιο κοντά στα ευκαρυωτικά παρά στα βακτηριακά μέλη των παραπάνω οικογενειών.

Το τρίτο συστατικό του SecYEG/Sec61 συμπλόκου, SecG στα βακτήρια και Sec61β στα κύτταρα των θηλαστικών, δεν παρουσιάζει συντηρημένες περιοχές μεταξύ βακτηρίων και ευκαρυωτικών οργανισμών. Στα αρχαιοβακτήρια το τρίτο συστατικό του αρχαιοβακτηριακού SecYEG/Sec61 συμπλόκου, όπως και τα άλλα μέλη του πιθανά να είναι πιο κοντά στο ευκαρυωτικό, απ’ ότι στο βακτηριακό τμήμα του, αφού βρέθηκε ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης στα αρχαιοβακτήρια, που παρουσιάζει ομοιότητα στην αλληλουχία με την Sec61β υπομονάδα, ενώ δεν βρέθηκε ομόλογη αλληλουχία της SecG.

Η ενέργεια κατά την μετατόπιση πρωτεϊνών

Η ενέργεια που απαιτείται για την μετατόπιση πρωτεϊνών προμηθεύεται από διαφορετικούς μηχανισμούς σε διάφορους οργανισμούς. Οι ATPάσες δίνουν ενέργεια για την μετατόπιση στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επιπλέον, τα βακτήρια χρησιμοποιούν και την ηλεκτροχημική δύναμη της διαβάθμισης πρωτονίων

κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (PMF=Proton Motive Force) για να οδηγήσουν πρωτεΐνες κατά μήκος της μεμβράνης.

Η ΑΤΡάση στα βακτήρια είναι η SecA που είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και με την οποία θα ασχοληθούμε διεξοδικότερα.. Στη ζύμη η ΑΤΡάση εντοπίζεται στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου και είναι η Kar2p, ομόλογη πρωτεΐνη με την σαπερόνη του θερμικού πλήγματος Hsp70. Στα θηλαστικά παρομοίως έχει θεωρηθεί ότι η ΑΤΡάση που πιθανά να βοηθάει στη μετατόπιση των πρωτεϊνών κατά μήκος της μεμβράνης είναι η BiP (ομόλογη της Kar2p). Παράλληλα όμως πιστεύεται πως στα θηλαστικά ίσως δεν χρειάζεται ούτε ΑΤΡάση ούτε PMF για την μετατόπιση των πρωτεϊνών, αλλά η ίδια η διαδικασία της μετάφρασης οδηγεί την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από τα μεμβρανοσυνδεδεμένα ριβοσώματα, κατά μήκος της μεμβράνης στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου.

Στην περίπτωση των αρχαίων δεν έχει βρεθεί ομόλογη πρωτεΐνη ούτε της Hsp70 (κάτι το οποίο δεν εντυπωσιάζει αφού η εξωκυτταροπλασματική Hsp70 χρειάζεται ATP που είναι δύσκολο να βρεθεί εκτός κυττάρου) αλλά ούτε και της SecA (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη). Ίσως λοιπόν στα αρχαιοβακτήρια να χρησιμοποιείται μια διαφορετική ΑΤΡάση, ίσως να χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο η PMF ή μπορεί η μετατόπιση να γίνεται μαζί με την μετάφραση και να μην χρειάζεται επιπλέον ενέργεια όπως προτάθηκε και στην περίπτωση των κυττάρων των θηλαστικών.

Εναρξη της μετατόπισης πρωτεϊνών

Οι περισσότερες εξωκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες διαθέτουν –όπως είχαμε αναφέρει και προηγουμένως- μια αμινοτελική αλληλουχία οδηγό που τις σηματοδοτεί για έξοδο. Η λειτουργία και η δομή, αλλά όχι η πρωτοταγής αλληλουχία αυτών των οδηγών αλληλουχιών, είναι συντηρημένες σε όλες τις μορφές της ζωής. Έτσι, αυτές οι αλληλουχίες οδηγοί διαθέτουν ένα θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο, ένα κεντρικό τμήμα τουλάχιστον 6 υδρόφοβων αμινοξέων και μια περισσότερο πολική καρβοξυτελική περιοχή που δεν διαθέτει φορτισμένα αμινοξέα και όπου λαμβάνει χώρα πέψη από την πεπτιδάση οδηγό. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι οι αλληλουχίες οδηγοί είναι σε μεγάλο βαθμό αλληλοανταλλάξιμες μεταξύ διαφορετικών οργανισμών.

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους οι αλληλουχίες οδηγού οδηγούν τις πρωτεΐνες στις κατάλληλες περιοχές για έξοδο, στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έτσι, στα θηλαστικά μόλις η αλληλουχία οδηγός βγαίνει από το μεταφραστικό ριβόσωμα, δεσμεύεται από ένα 16S ριβονουκλεοπρωτεϊνικό κομμάτι, το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος (SRP = Signal Recognition Particle).

Το SRP επιβραδύνει το ρυθμό μετάφρασης και οδηγεί το ριβόσωμα στο σύστημα μετατόπισης στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ένα δεύτερο γεγονός αναγνώρισης της αλληλουχίας οδηγού, από ένα πρωτεϊνικό συστατικό του παραπάνω συστήματος και ακολουθεί η διαδικασία της μετατόπισης.

Στη ζύμη το SRP δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου και είναι πολύ πιθανό οι εξωκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες να οδηγούνται στο κατάλληλο σύστημα μετατόπισης, χωρίς αυτό να λαμβάνει μέρος αλλά να συμμετέχει το ετεροτετραμερές σύμπλοκο μεμβρανικών πρωτεϊνών SecG2/G3p.

Στην *E. coli* και σ' άλλα βακτήρια υπάρχει το SRP το οποίο εδώ είναι λιγότερο περίπλοκο από το ευκαρυωτικό, αλλά δεν φαίνεται πάλι να συμβάλλει στην ενσωμάτωση στη λιπιδική στοιβάδα μερικών από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η στόχευση για έξοδο πολλών πρωτεϊνών στα βακτήρια πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη SecB (έξοδο-ειδική πρωτεΐνη συνοδός, chaperone). Επιπλέον και η SecA πρωτεΐνη αναγνωρίζει αλληλουχίες οδηγούς όταν είναι δεσμευμένη στη μεμβράνη.

Άλλες μεμβρανικές υπομονάδες του συστήματος μετατόπισης πρωτεϊνών

Εκτός από το SecYEG/Sec61 σύμπλοκο και άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες χρειάζονται για την μετατόπιση πρωτεϊνών στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι οποίες όμως δεν είναι κοινές και για τις δύο αυτές μορφές ζωής. Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν την SecD και την SecE (στα βακτήρια) την TRAM (στα κύτταρα των θηλαστικών) και το ετεροτετραμερές σύμπλοκο Sec62/63p (στη ζύμη). Μολονότι οι λειτουργίες των παραπάνω πρωτεϊνών δεν είναι πλήρως εξακριβωμένες, το πιο πιθανό είναι ότι ρυθμίζουν την λειτουργία του SecYEG/Sec61 συμπλόκου. Έτσι, μπορεί να ρυθμίζουν το άνοιγμα και το κλείσιμο του πόρου, την πρόσβαση στον πόρο, ή

την συγκρότηση του πόρου. Δηλαδή, μολονότι δεν παρουσιάζουν ομοιότητα στις αλληλουχίες τους, οι παραπάνω πρωτεΐνες των βακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών, ίσως να έχουν ανάλογες λειτουργίες.

Στα αρχαία έχουν βρεθεί ομόλογες αλληλουχίες μ' αυτές των SecD και SecF πρωτεϊνών. Μια και τα αρχαία δεν έχουν SecA, οι SecD και SecF τους ίσως αλληλεπιδρούν με μια άλλη ATPάση εκτός της SecA ή μπορεί να έχουν τελείως διαφορετικό ρόλο από τον μέχρι τώρα γνωστό στα βακτήρια και που ίσως να μοιράζονται με τις βακτηριακές SecD και SecF. Ομολογία με την TRAM ή συστατικά του Sec62/63p υποσυμπλόκου δεν έχει βρεθεί στα αρχαία αλλά δεν αποκλείεται να βρεθεί στο μέλλον, καθώς το 56% των γονιδίων του αρχαιοβακτηρίου *M. jannaschii* δεν έχουν ομολογία με άλλα γνωστά γονίδια.

Η σύγκριση λοιπόν των πρωτεϊνικών μηχανισμών μετατόπισης μεταξύ των τριών μορφών ζωής μπορεί να βοηθήσει στην εύρεση συστατικών με ανάλογες λειτουργίες σε κάθε μία από τις παραπάνω μορφές ζωής, όπως και στην εύρεση της λειτουργία συστατικών του συστήματος μετατόπισης, των οποίων ο ρόλος δεν είναι ακόμα γνωστός.

Στη συνέχεια θα ασχοληθούμε με το υδρόφιλο «κανάλι» μέσα από το οποίο γίνεται η μετατόπιση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, το οποίο όπως αναφέρθηκε είναι εξελικτικά πολύ παλιό και αποτελεί τμήμα της μηχανής μετατόπισης πρωτεϊνών.

Μετατόπιση πρωτεϊνών: Υπαρξη υδρόφιλου διαύλου

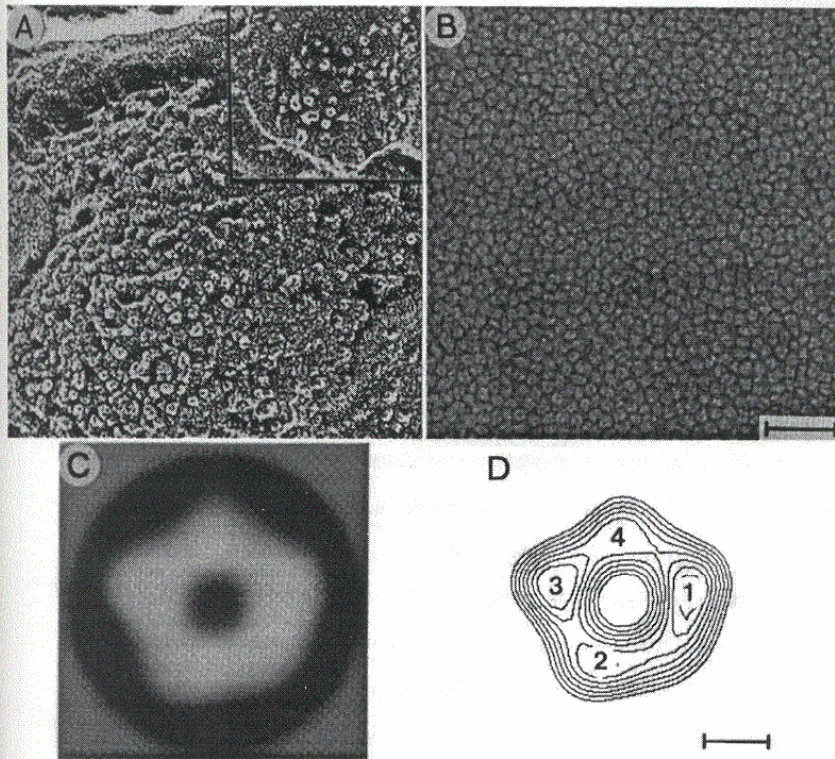
Το «κανάλι» αυτό δεν μετατοπίζει μόνο εκκρινόμενες πρωτεΐνες αλλά μεσολαβεί στην εισχώρηση και μεμβρανικών πρωτεϊνών στην λιπιδική διπλοστοιβάδα. Το κύριο συστατικό του καναλιού μετατόπισης είναι όπως είπαμε και προηγουμένως, ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο μεμβρανικών πρωτεϊνών που καλείται Sec61p σύμπλοκο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και SecYEG σύμπλοκο στους προκαρυωτικούς. Οι α υπομονάδες του συμπλόκου (Sec61a στα θηλαστικά, Sec61p στη ζύμη και SecY στα βακτήρια) έχουν 10 τμήματα που διαπερνούν τις μεμβράνες με παρόμοιες τοπολογίες. Οι γ υπομονάδες (Sec61γ στα θηλαστικά, Sss1p στη ζύμη και SecG στα βακτήρια) έχουν μόνο μια μεμβρανική περιοχή. Όσον αφορά τις β υπομονάδες των ευκαρυωτικών οργανισμών (Sec61β στα θηλαστικά, Sbh στη ζύμη) διαφέρουν από την τρίτη υπομονάδα στα βακτήρια (SecG). Ο ρόλος του παραπάνω συμπλόκου στην μετατόπιση πρωτεϊνών

έχει επιβεβαιωθεί από *in vitro* πειράματα στα οποία έγινε ανασύσταση των καθαρισμένων ετεροτριμερικών συμπλόκων, από τα θηλαστικά, τη ζύμη και τα βακτήρια, σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ακόμα ότι το παραπάνω σύμπλοκο είναι το μόνο συστατικό που απαιτείται για όλα τα προς μετατόπιση υποστρώματα.

Η πρώτη απόδειξη ότι το Sec61p σύμπλοκο σχηματίζει ένα πραγματικό κανάλι ήρθε από πειράματα χημικήςδιασύνδεσης (cross-linking experiments) με τα οποία φάνηκε ότι η α υπομονάδα του παραπάνω συμπλόκου είναι η μοναδική πρωτεΐνη που ορίζει το μονοπάτι της μετατοπιζόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας από την μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη. Η ύπαρξη του καναλιού υποστηρίζεται και από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, όπου καθαρισμένα σύμπλοκα και από τα θηλαστικά και από τη ζύμη δημιουργούν δομές δακτυλίων με μέγεθος πόρων περίπου 20\AA^0 , (σχήμα 4). Ο όγκος και η μάζα αυτών των τμημάτων δηλώνει ότι αποτελούν πιθανά συγκροτήματα 3-4 μορίων του Sec61p συμπλόκου. Τέλος, λειτουργική απόδειξη ότι τα καθαρισμένα σύμπλοκα από τη ζύμη και τα βακτήρια σχηματίζουν κανάλια περιορισμένου μεγέθους πόρου, ήρθε από πειράματα στα οποία η μετατόπιση ενός υποστρώματος σταματά από την παρουσία μιας ογκώδους προσδεδεμένης ομάδας στο C άκρο του υποστρώματος.

Το κανάλι μετατόπισης προκειμένου να μετατοπίζει πρωτεΐνες πρέπει να επιτελεί και να συντονίζει μια σειρά διαφορετικών λειτουργιών. Έτσι πρέπει να αναγνωρίζει τις αλληλουχίες οδηγούς των υποστρωμάτων, να ανοίγει προς ανταπόκριση σ' αυτές, να μεταφέρει το υπόστρωμα προς τη μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη και τελικά να κλείνει χωρίς να επιτρέπει να περάσει από το κανάλι τίποτε άλλο πλην του υποστρώματος που μετατοπίζεται.

Το Sec61p/SecYEG κανάλι όμως δεν μπορεί από μόνο του να μετατοπίζει πρωτεΐνες. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο γίνεται σύνδεση του με άλλες υπομονάδες. Έτσι, στην περίπτωση της ταυτόχρονης μετάφρασης και μετατόπισης (σχήμα 5) που συμβαίνει στα θηλαστικά, συνδέεται με το ριβόσωμα. Με τη δέσμευση του, το ριβόσωμα στο Sec61p κανάλι, δημιουργεί ένα συνεχές διάδρομο μεταφοράς, από την θέση πεπτιδουλ στο ριβόσωμα προς την κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Επειδή ακριβώς η αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα έχει μια μόνο έξοδο από το κανάλι, δεν χρειάζεται άλλη ενέργεια για την μεταφορά πλην της πρωτεϊνοσύνθεσης, ενώ



Σχήμα 4: Χαμηλής ανάλυσης δομή του Sec61p καναλιού. A. δομή του παραπάνω καναλιού σε μεμβράνες ενδοπλασματικού θηλαστικών όπως φαίνονται μετά από ψυκτοεξάχνωση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. B. Δομή του παραπάνω συμπλόκου θηλαστικών διαλυτοποιημένου σεαπορρυπαντικό όπως φαίνεται με αρνητικ χρώση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. C. Χάρτης προβολής της προσεγγιστικής δομής μη χρωματισμένων παρασκευασμάτων σε γκρι κλίμακα . D. Χάρτης ισουψών μέρους του C όπου φαίνονται οι τέσσερις κορυφές πυκνότητας που περιβάλλουν το άνοιγμα που προσομοιάζει με πόρο.

προσδίδεται και συγκεκριμένη κατεύθυνση στην μετατόπιση. Επιπλέον η αλληλεπίδραση ριβοσώματος και Sec61p σφραγίζει το κυτταροπλασματικό άκρο του καναλιού και αποτρέπεται έτσι η έξοδος μικρών μορίων από αυτό. Τέλος, το ριβόσωμα φαίνεται να συμβάλλει στην συγκρότηση του ίδιου του καναλιού μέσω της παραπάνω αλληλεπίδρασης. Μολονότι σύνδεση ριβοσώματος καναλιού όπως στα θηλαστικά δεν έχει ανιχνευθεί στα βακτήρια, εντούτοις στην *E. coli* υπάρχουν δεδομένα για την χρησιμοποίηση ενός SRP-εξαρτώμενου μονοπατιού στόχευσης για την εισαγωγή μερικών μεμβρανικών πρωτεϊνών που διαπερνούν πολλές φορές την μεμβράνη. Επειτα, αφού η μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ SecY και SecE1p εντοπίζεται στις κυτταροπλασματικές θηλιές δεν μπορεί να αποκλειστεί το ότι το SecYEG σύμπλοκο δεσμεύει ριβοσώματα.

Στην περίπτωση της μεταμεταφραστικής μετατόπισης κατά μήκος του ενδοπλασματικού δικτύου στη ζύμη το Sec61p σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το ετεροτετραμερές σύμπλοκο Sec62/63p. Το σύμπλοκο αυτό περιέχει δύο σημαντικές για τη ζωή μεμβρανικές πρωτεΐνες, την Sec62p και την SecE63p που διαπερνούν την μεμβράνη δύο και τρεις φορές αντίστοιχα, αλλά και άλλες δύο πρωτεΐνες, σημαντικές για τη ζωή κάτω από ορισμένες συνθήκες, την Sec71p και την Sec72p. Ομόλογες πρωτεΐνες με τις Sec62p και Sec63p έχουν βρεθεί και στους ανώτερους οργανισμούς αλλά η λειτουργία τους δεν είναι γνωστή. Η δέσμευση του καναλιού με το Sec62/63p σύμπλοκο προσφέρει θέση δέσμευσης για την ATPάση Bir που βρίσκεται στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Από την άλλη μεριά όπως και στην περίπτωση του ριβοσώματος, το Sec62/63p σύμπλοκο διεγείρει την συγκρότηση του Sec61p συμπλόκου.

Τέλος, η μεταμεταφραστική μετατόπιση στα βακτήρια απαιτεί αλληλεπίδραση του SecYEG καναλιού με την κυτταροπλασματική ATPάση SecA. Η SecA αλληλεπιδρά και με λιπίδια, και με το υπόστρωμα και με την συνοδό πρωτεΐνη SecB. Η δέσμευση αυτή της SecA μ' όλα τα παραπάνω συστατικά καθιστούν δυνατή τη μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από το SecYEG κανάλι. Η SecA πιστεύεται συγκεκριμένα ότι επιτελεί με την δέσμευση και υδρόλυση ATP, κύκλους εισαγωγής και εξαγωγής από τη μεμβράνη. Έτσι, θεωρείται ότι «τρέφει» το κανάλι με πρωτεΐνη πιάνοντας ένα τμήμα του πολυπεπτιδίου στην κυτταροπλασματική πλευρά, σπρώχνοντας το και ελευθερώνοντας

το στο κανάλι και εν συνεχεία βγαίνει έξω από τη μεμβράνη για να επαναλάβει τον κύκλο μετατόπισης.

Το μεμβρανικό δυναμικό είναι εκείνο που εμποδίζει την επαναφορά της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα έπειτα από την απελευθέρωση της από την SecA.

Εν συνεχεία θα αναφερθούμε στις παρεμβαλλόμενες στη μεμβράνη μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η πλειονότητα των παραπάνω πρωτεϊνών, είτε διαπερνούν μια φορά είτε περισσότερες φορές τη μεμβράνη χρησιμοποιούν το κανάλι μετατόπισης για την εισαγωγή τους στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η διαφορά όμως με τη χρήση του καναλιού από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες, είναι ότι όταν συντίθεται μια μεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά πολλές φορές τη μεμβράνη, το κανάλι πιθανά ανοίγει και κλείνει κατά μήκος της μεμβράνης όχι μια φορά, αλλά επαναλαμβανόμενα και σε συγκεκριμένα σημεία μέσα στην αλληλουχία της πρωτεΐνης. Φαίνεται επίσης ότι η μετατόπιση στην περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι σύγχρονη με την μετάφραση ακόμα και στα βακτήρια.

Δυναμική του συμπλόκου της μεταθετάσης .

Το «κανάλι» ανοίγει προς τον εξωκυτταρικό χώρο ή προς την κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου, όταν προκαλεσθεί από την αλληλουχία οδηγό του μετατοπιζόμενου υποστρώματος. Το γεγονός αυτό είναι κοινό και για την ταυτόχρονη αλλά και για την μεταμεταφραστική μετατόπιση. Το πρώτο βήμα όμως για το άνοιγμα του καναλιού είναι η συγκρότηση του που αποτελεί διακριτή διαδικασία που προηγείται της δέσμευσης της αλληλουχίας οδηγού και κατά συνέπεια του ανοίγματος του καναλιού. Το πως ακριβώς η αλληλουχία οδηγός ανοίγει το κανάλι δεν είναι γνωστό. Είναι πιθανό ότι η αλληλουχία αυτή αποσταθεροποιεί τις αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων του κλειστού καναλιού και δημιουργείται έτσι πόρος στον οποίο μπορούν να εισέλθουν υδρόφιλα τμήματα του υποστρώματος. Θεωρείται ακόμα ότι η συνεχής παρουσία της αλληλουχίας οδηγού δεν είναι απαραίτητη προκειμένου το κανάλι να μένει ανοιχτό, από τη στιγμή που η νεοσυντιθεμένη αλυσίδα εισαχθεί σ' αυτό. Η αλληλουχία οδηγός συνδέεται πιθανά στη διάφραση του Sec61p συμπλόκου και λιπιδίων παρεμβαλλόμενη μεταξύ των υπομονάδων του καναλιού.

Αντίθετα ενώ το άνοιγμα του καναλιού κατά την σύγχρονη και μεταμεταφραστική μετατόπιση συμβαίνει με τον ίδιο περίπου μηχανισμό (βασικό ρόλο παίζει η αλληλουχία

οδηγός) το κλείσιμο του καναλιού πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο. Έτσι ενώ στην μεταμεταφραστική μετατόπιση το κλείσιμο συμβαίνει μόλις το κανάλι πάψει να καταλαμβάνεται από το μετατοπιζόμενο υποστρώμα, στην σύγχρονη με τη μεταφραστική μετατόπιση η απώλεια του υποστρώματος δεν είναι αρκετή για να κλείσει το κανάλι. Στην περίπτωση αυτή είναι απαραίτητη και η διάσταση του ριβοσώματος στις υπομονάδες του για το κλείσιμο του καναλιού.

Το κανάλι αυτό της μετατόπισης πρωτεϊνών είναι διακριτό από άλλα κανάλια στη μεμβράνη, στο ότι είναι δομικά ευέλικτο και παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που αλληλεπιδρούν μαζί του προς μετατόπιση. Το μέγεθος του πόρου ποικίλλει όχι μόνο με το χρόνο αλλά και από σημείο σε σημείο μέσα στο κανάλι. Η δε δυναμική κατάσταση του καναλιού εξηγεί και την έκθεση των διαμεμβρανικών τμημάτων νεοσυντιθέμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών σ' ένα υδρόφοβο περιβάλλον για να επιτραπεί η πλευρική τους έξοδος στη διλιπιδική στοιβάδα .

Στη συνέχεια θα ασχοληθούμε αποκλειστικά και μόνο με τα βακτήρια (έχουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη και στη βιοποικιλότητα) και με την βιογένεση του φακέλλου των gram αρνητικών βακτηρίων στη δημιουργία του οποίου βασικό ρόλο παίζει ο μηχανισμός μετατόπισης πρωτεϊνών κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης τους. Είναι γνωστή η ανάγκη που υπάρχει για την εύρεση νέων στόχων δράσης των αντιβιοτικών και ο φάκελλος των Gram αρνητικών βακτηρίων σαν ιδιαίτερη δομή όπως και ο μηχανισμός μετατόπισης πρωτεϊνών που τον δημιουργεί, αποτελούν κεντρικό αντικείμενο μελέτης.

Βιογένεση του φακέλλου των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Ο φάκελλος των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι μία δομή που αποτελείται από τρεις στοιβάδες, σχήμα 6. Την διπλοστοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, το περίπλασμα και την εξωτερική μεμβράνη με πρωτεΐνες και λιπίδια μοναδικής δομής.

Η εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων είναι χαρακτηριστική στο ότι οι πιο άφθονες πρωτεΐνες της είναι είτε λιποπρωτεΐνες που συνδέονται με πεπτιδογλυκάνη, είτε πορίνες (ολιγομερείς δομές β-βαρελιού). Έπειτα, η λιπιδική τους διπλοστοιβάδα είναι ασύμμετρη με την εσωτερική μεριά να διαθέτει τα ίδια τρία γλυκεροφωσφολιπίδια όπως η πλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεριά πλούσια σε λιποπολυσακχαρίτες.

Εξάλλου, δομές όπως ινίδια και μαστίγια εκβάλλουν από την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων.

Το περίπλασμα είναι ένας υδατικός χώρος μεταξύ της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης, με ολισακχαρίτες προερχόμενους από τη μεμβράνη, διαλυτές πρωτεΐνες δέσμησης συστατικά συστημάτων μεταφοράς, πρωτεΐνες συνοδούς, ολιγονουκλεοτιδικές-πεπτιδικές, -σακχαρικές υδρολάσες και δίκτυο πεπτιδογλυκάνης.

Η πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων αποτελείται από φωσφοτιδυλοαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλογλυκερόλη και διφωσφατιδυλογλυκερόλη. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες αντίθετα από την εξωτερική μεμβράνη είναι α έλικες. Η πλασματική μεμβράνη έχει την ικανότητα εκλεκτικής μεταφοράς θρεπτικών συστατικών όπως η ευκαρυωτική πλασματική μεμβράνη, έχει τις λειτουργίες μετατόπισης πρωτεϊνών και βιοσύνθεσης λιπιδίων του ενδοπλασματικού δικτύου και την λειτουργία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Από εδώ και πέρα θα ασχοληθούμε αποκλειστικά με την ικανότητα μετατόπισης πρωτεϊνών της εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης που αποτελεί και τον σημαντικότερο μηχανισμό για την βιοσύνθεση του βακτηριακού φακέλλου. Αφού περάσουν την εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη (ή μείνουν σ' αυτήν ως διαμεμβρανικές πρωτεΐνες) οι πρωτεΐνες, είτε μένουν στο περίπλασμα, είτε προσωρούν μέσω ειδικών μηχανισμών στην εξωτερική μεμβράνη, είτε εκκρίνονται απ' αυτή μέσω των πορινών.

Μετατόπιση πρωτεϊνών κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων. Βακτηριακή προπρωτεϊνική μεταθετάση.

Η κατανόηση που έχουμε σήμερα για τον μηχανισμό μετατόπισης πρωτεϊνών κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων και για το μηχανισμό της βακτηριακής προπρωτεϊνική μεταθετάσης είναι αρκετά υψηλή. Αυτό οφείλεται κατ' αρχήν στην μεγάλη ισχύ της βακτηριακής γενετικής (με την οποία βρέθηκαν τα γονίδια που μετέχουν στην έκκριση πρωτεϊνών) αλλά και στην μεταμεταφραστική φύση της ίδιας της βακτηριακής μετατόπισης (που επέτρεψε το βιοχημικό «τεμαχισμό» της διαδικασίας).

Στόχευση των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στην μεμβρανική μεταθετάση.

Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες φέρουν αλληλουχίες οδηγούς στο αμινοτελικό τους άκρο με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Μέσω αυτού του πεπτιδίου οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από το κύτταρο, φτάνουν στο σύστημα μετατόπισης της μεμβράνης και αποκόπτεται τελικά το πεπτίδιο οδηγός στην *trans* πλευρά της μεμβράνης.

Η στόχευση των προπρωτεϊνών στην μεμβράνη γίνεται με τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών (chaperones) που είτε είναι γενικής δράσης (GroEL, DnaK, κλπ) είτε ειδικές για την έκκριση όπως είναι η SecB και το SRP. Έτσι, οι πρωτεΐνες συνοδοί δεσμεύονται στην αλληλουχία οδηγό (SRP) και εμποδίζουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών αλλά και την συσσωμάτωσή τους. Οι διαδικασίες αυτές είναι πολύ σημαντικές αν αναλογιστεί κανείς ότι στα βακτήρια η μετατόπιση των πρωτεϊνών έπεται της μετάφρασης. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι με την δέσμευση της SecB στην προπρωτεΐνη δημιουργείται σύμπλοκο μεταξύ τους το οποίο μετακινείται στη μεμβράνη στην κατάλληλη περιοχή για μετατόπιση, λόγω της συνάφειας που παρουσιάζει με την μεμβρανική τρανσλοκάση και συγκεκριμένα με την SecA υπομονάδα που διαθέτει μια καρβοξυτελική θέση δέσμευσης για SecB.

Υπομονάδες της προπρωτεϊνικής μεταθετάσης

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά του κεντρικού μονοπατιού έκκρισης πρωτεϊνών στα βακτήρια βρέθηκαν με τρεις διαφορετικές γενετικές στρατηγικές.

Με τη δημιουργία πρωτεϊνών συγχώνευσης (fusion proteins) που αποτελούνται από το κυτταροπλασματικό ένζυμο LacZ και την αμινοτελική περιοχή μιας πρωτεΐνης έχουμε ποικιλία στο επίπεδο δραστηριότητας της LacZ αφού ανάλογα με το μήκος της ώριμης περιοχής της προπρωτεΐνης έχουμε είτε εντοπισμό της πρωτεΐνης συγχώνευσης στο κυτταρόπλασμα, είτε ακινητοποίηση της στη μεμβράνη και χαμηλή κατά συνέπεια δραστηριότητα LacZ. Έτσι, ένα βακτηριακό στέλεχος με την παραπάνω πρωτεΐνη συγχώνευσης δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει λακτόζη σαν μοναδική πηγή άνθρακα (Lac⁻) και επομένως επιλογή για Lac⁺ φαινότυπο έδωσε υπολειπόμενα κατά συνθήκη θνησιγόνα

μεταλλάγματα που δεν μπορούν να τοποθετήσουν την πρωτεΐνη συγχώνευσης στη μεμβράνη προς μετατόπιση. Έτσι, βρέθηκαν τα γονίδια *secA*, *secB*, *secD* και *secF*. Τα παραπάνω γονίδια ονομάζονται *sec* επειδή μεταλλαγή σ' αυτά μπλοκάρει την έκκριση πρωτεϊνών (Secretion).

Η δεύτερη στρατηγική στηρίχθηκε στο γεγονός ότι αλλαγές στις αλληλουχίες οδηγούς των εκκρινόμενων πρωτεϊνών εμποδίζει την έκκρισή τους και άρα την σωστή τοποθέτησή τους στο κύτταρο, όχι όμως και την σύνθεσή τους. Έτσι, έγινε προσπάθεια απομόνωσης εξωγονιδιακών καταστολέων (extragenic suppressors) για προπρωτεΐνες με αλλαγμένες αλληλουχίες οδηγούς που είχαν σαν αποτέλεσμα την έκκρισή τους. Οι επικρατείς αυτές μεταλλαγές ονομάστηκαν *prf* επειδή επηρεάζουν τον εντοπισμό πρωτεϊνών (Protein Localization) και βρέθηκαν συγκεκριμένα οι εξής καταστολείς *prfA*, *prfG* και *prfD* που είναι αλληλόμορφοι με τα γονίδια *secY*, *secE* και *secA* αντίστοιχα.

Η τρίτη στρατηγική στηρίχθηκε στο ότι το *secA* γονίδιο αποκαταστέλλεται όταν υπάρχει πρόβλημα στην έκκριση πρωτεϊνών. Έτσι, με την χρησιμοποίηση *secA-lacZ* γονιδίου αναφοράς, έγινε προσπάθεια απομόνωσης μεταλλαγών σε γονίδια που μετέχουν στην έκκριση πρωτεϊνών. Τα γονίδια αυτά διαπιστώνονται από την αύξηση της έκφρασης της *SecA-LacZ* πρωτεΐνης και κατά συνέπεια της δραστηριότητας *LacZ*, όταν δημιουργείται πρόβλημα στην έκκριση πρωτεϊνών λόγω βλάβης των παραπάνω γονιδίων. Με αυτό τον τρόπο μεταλλαγές εντοπίστηκαν στα *secA*, *secD*, *secY* και *secE* γονίδια. Η *SecA* βρέθηκε με όλες τις παραπάνω στρατηγικές και οι *SecY*, *SecE* και *SecD* με δύο. Επομένως τα κεντρικά συστατικά του μονοπατιού έκκρισης έχουν πιστοποιηθεί.

Εν συνεχεία επινοήθηκαν και άλλες στρατηγικές και έγινε χρήση διαφόρων ειδών προπρωτεϊνικών υποστρωμάτων προκειμένου να βρεθούν τα μέχρι σήμερα γνωστά συστατικά του μηχανισμού μετατόπισης πρωτεϊνών στα βακτήρια.

α. Μεμβρανικές πρωτεΐνες της μεταθετάσης

Η τρανσλοκάση αποτελείται από τις παρεμβαλλόμενες μεμβρανικές πρωτεΐνες *SecY*, *SecE* και *SecG* και την περιφερειακή πρωτεΐνη *SecA* και απαιτεί όξινα φωσφολιπίδια για την δράση της. Αυτή η σύσταση διαπιστώθηκε από μετατόπιση προπρωτεΐνης σε υψηλή απόδοση (περίπου 25-50% της απόδοσης και του ρυθμού μετατόπισης που παρατηρείται με άθικτες εσωτερικές μεμβράνες των βακτηρίων) από

ανασυστημένα με SecYEGA πρωτεολιποσώματα. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η SecY, SecA και SecE πρωτεΐνες είναι απαραίτητες *in vivo*, ενώ η SecG απαιτείται για την βιωσιμότητα μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες. Επίσης, έχει βρεθεί, με πειράματα χημικής διασύνδεσης ότι η SecY και SecA είναι οι μόνες πρωτεΐνες της τρανσλοκάσης που βρίσκονται κοντά στις μετατοπιζόμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Από την άλλη, μεμβράνες χωρίς SecE είναι ικανές για μετατόπιση μερικών τουλάχιστον πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Συμπεραίνει λοιπόν κανείς ότι ο ελάχιστος καταλυτικός πυρήνας της βακτηριακής πρωτεϊνικής τρανσλοκάσης συνίσταται από τις SecY, SecE και SecA πρωτεΐνες ή ίσως και μόνο από τις SecY και SecA πρωτεΐνες.

Οι SecY, SecE και SecG πρωτεΐνες συνδέονται στενά μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα σταθερό τριμερές σύμπλοκο το οποίο μπορεί να απομονωθεί και χρωματογραφικά αλλά και με ανοσοκατακρήμιση. Ακόμη, σταθερή υπερέκφραση της SecY απαιτεί παράλληλη υπερέκφραση της SecE. Τονίζεται ότι στην μεμβράνη, εκτός από το SecYEG σύμπλοκο, μπορεί να υπάρχουν και SecY/SecE καθώς και SecY/SecG σύμπλοκα.

Ο πυρήνας της τρανσλοκάσης όμως μπορεί να συνδέεται και με άλλα μεμβρανικά πολυπεπτίδια. Βρέθηκε λοιπόν ότι διαλυτοποίηση του SecYEG συμπλόκου με το μη ιοντικό απορρυπαντικό digitonin, οδηγεί στην ανοσοκατακρήμισή του μαζί με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες SecD, SecF και YajC. Οι τρεις παραπάνω πρωτεΐνες δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου αφού έλλειψη των αντίστοιχων γονιδίων οδηγεί σε μικρή (SecD, SecF) ή καθόλου (yajC) μείωση της μετατόπισης πρωτεϊνών. Τονίζεται επιπλέον ότι η υπερέκφραση της SecF σταθεροποιεί την υπερεκφρασμένη SecY.

Είναι πιθανό λοιπόν ότι οι SecDF και YajC συνδέονται με τον πυρήνα της τρανσλοκάσης. Είναι δυνατόν ακόμα οι SecDF (YajC) να βρίσκονται στην μεμβράνη σαν διακριτό σύμπλοκο (μπορούν να ανοσοκατακρημινιστούν μαζί απουσία του SecYEG) και επομένως η βακτηριακή τρανσλοκάση μπορεί να υπάρχει σε δύο μορφές στη μεμβράνη. Είτε σαν τετραμερές (SecYEGA) είτε σαν επταμερές (SecYEGADFYajC) όπως η ευκαρυωτική τρανσλοκάση που είδαμε προηγουμένως στην εισαγωγή. Στο γεγονός αυτό συντείνει και το ότι το SecYEG βρίσκεται σε 10 φορές περισσότερη ποσότητα απ' ότι το SecDFYajC σύμπλοκο.

Η SecY είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διαπερνά την μεμβράνη 10 φορές, ενώ η SecG και η SecE είναι μικρές μεμβρανικές πρωτεΐνες. Ο ρόλος της SecY και SecE πρωτεΐνης δηλώθηκε προηγουμένως σαν συστατικά του πυρήνα της τρανσλοκάσης (συνιστούν το κανάλι της τρανσλοκάσης) και φαίνεται και από την συντήρηση σε περιοχές τους, που παρουσιάζουν και στις τρεις μορφές ζωής. Όσον αφορά τώρα τις SecDF(YajC) και SecG πρωτεΐνες, αυτές φαίνεται να αποτελούν ρυθμιστικές υπομονάδες της τρανσλοκάσης. Είναι γνωστό ότι ούτε η SecDF ούτε η SecG είναι απαραίτητες για τον καταλυτικό ρόλο της τρανσλοκάσης, αλλά ούτε για την δέσμευση της SecA στην SecYE. Ακόμα δε και όταν και η SecG και οι SecDF λείπουν ταυτόχρονα, η υπερέκφραση του καταλυτικού πυρήνα είναι αρκετή για να ξεπεράσει το πρόβλημα της μετατόπισης πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά τόσο η *in vivo* όσο και η *in vitro* μετατόπιση είναι πιο αποδοτικές παρουσία τους.

Συγκεκριμένα, η SecG φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα μετατόπισης της τρανσλοκάσης αφού αλλαγές που υφίσταται στη διαμόρφωσή της όπως θα δούμε παρακάτω κατά την διαδικασία της μετατόπισης, προφανώς επηρεάζουν τις διάφορες υπομονάδες της τρανσλοκάσης, τις μεταξύ τους συνδέσεις και άρα την ικανότητα μετατόπισης του συμπλόκου της.

Οι SecDF σταθεροποιούν την εισαγόμενη στη μεμβράνη μορφή της SecA και υπερέκφρασή τους αυξάνει το ποσοστό της SecA που συνδέεται στη μεμβράνη. Φαίνεται ότι το SecDFyajC σύμπλοκο μέσω της σταθεροποίησης της μορφής της SecA στη μεμβράνη καθυστερεί την μετακίνηση της προπρωτεΐνης και προς τα εμπρός και προς τα πίσω κατά την μετατόπιση με συνέπεια την συσσώρευση συγκεκριμένων ενδιάμεσων μετατόπισης που ολοκληρώνουν την μετατόπιση τους μέσω του PMF. Επομένως, το SecDFyajC σύμπλοκο ελέγχει τους κύκλους εισαγωγής και εξαγωγής της SecA στη μεμβράνη για να ρυθμίζει την μετακίνηση της μετατοπιζόμενης προπρωτεΐνης.

β. Η περιφερειακή SecA πρωτεΐνη της μεταθετάσης.

Η SecA πρωτεΐνη εν αντιθέσει με την παγκοσμιότητα της SecY πρωτεΐνης υπάρχει μόνο στα βακτήρια. Αποτελεί το κεντρικό συστατικό του βακτηριακού μονοπατιού έκκρισης πρωτεϊνών μολονότι άργησε να εμφανισθεί στο πεδίο της μετατόπισης, επειδή

ακριβώς προσφέρει ανεξάρτητη από την μετάφραση μετατόπιση μεγάλων υδροφιλικών πρωτεϊνών με την υδρόλυση ATP.

Η SecA πρωτεΐνη είναι υδρόφιλη, έχει μέγεθος 101 KDa και είναι ομοδιμερές. Βιοχημικά διακρίνεται σε δύο διακριτές πρωτοταγείς περιοχές (domains), την N-τελική 70 KDa περιοχή και την C-τελική 30 KDa περιοχή (σχήμα 8). Η 70 KDa περιοχή παρουσιάζει ομολογία με RNA ελικάσες και περιέχει δύο θέσεις δέσμησης νουκλεοτιδίων (NBDs = nucleotide binding sites).

Η NBD1 είναι θέση υψηλής συγγένειας για ATP, εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 100 και 220 της πρωτεΐνης και περιέχει χαρακτηριστικά μοτίβα δέσμησης ATP (Walker box A και B).

Η NBD2 θέση έχει προταθεί ότι περιέχει μια μη κανονική θέση δέσμησης νουκλεοτιδίου τύπου Walker box A μεταξύ των καταλοίπων 500-520 και ένα μοτίβο Walker box B πιο μακριά. Μπορεί λοιπόν κανείς να συμπεράνει ότι η SecA πολύ πιθανά δημιουργήθηκε από την συγχώνευση ενός αρχαίου ενζύμου που έμοιαζε με RNA-ελικάση αμινοτελικά σ' ένα πολυπεπτιδίο (30 KDa περιοχή) που έδωσε στην νέα πρωτεΐνη καινούργια χαρακτηριστικά, όπως την ικανότητα να διμερίζεται, να αλληλεπιδρά με όξινα φωσφολιπίδια, με SecY, αλλά και να εισέρχεται στην μεμβράνη στην περιοχή του SecYEG συμπλόκου. Δώθηκε ακόμα η δυνατότητα στη SecA να αλληλεπιδρά με SecB και να αλληλεπιδρά ακόμα απευθείας όχι μόνο με RNA αλλά και με αμινοακυλοπολυμερή.

Πριν προχωρήσουμε στον μηχανισμό της μετατόπισης, αξίζει να αναφερθούμε στις πέντε βασικές λειτουργίες της SecA. Συγκεκριμένα, η SecA αποτελεί τον φυσικό σύνδεσμο όλων των συστατικών της αντίδρασης, αφού αλληλεπιδρά με την προπρωτεΐνη με την SecB, με το SecYEG, με λιπίδια, με ATP και με το mRNA της SecA. Αποτελεί ακόμη τον υποδοχέα των εκκρινόμενων υποστρωμάτων και των συνοδών πρωτεϊνών τους και πιθανά κατευθύνει το υπόστρωμα στο κανάλι έκκρισης. Είναι βασική δομική μονάδα για τον αγωγό έκκρισης αφού προφυλάσσει από τα φωσφολιπίδια, μαζί με την SecYEG, τα πολικά τμήματα των υποστρωμάτων. Προσφέρει την ενέργεια για την μετατόπιση των πρωτεϊνών μετατρέποντας την ελεύθερη ενέργεια του ATP και αντιλαμβανόμενη την κατάσταση έκκρισης στο κύτταρο, ρυθμίζει την μετάφρασή της, δεσμευόμενη στο mRNA της.

Ενέργεια στην μεταθετάση: ATP και η κινητήρια δύναμη των πρωτονίων PMF (Proton Motive Force)

Η βακτηριακή προπρωτεϊνική τρανσλοκάση χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές πηγές ενέργειας προκειμένου να λειτουργήσει. Αυτές είναι το ATP και η κινητήρια δύναμη πρωτονίων (PMF). *In vitro* μελέτες έδειξαν ότι οι δύο παραπάνω πηγές ενέργειας δρουν σε διακριτά στάδια της αντίδρασης μετατόπισης. Το ATP χρησιμοποιείται πρώτο από την SecA (ATPάση), ενώ η PMF μολονότι πανταχού παρούσα σε όλα τα στάδια της μετατόπισης (είναι το ηλεκτροχημικό δυναμικό $\Delta\mu_{H^+}=220$ mV της πλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων που συνίσταται από δύο συστατικά το ηλεκτρικό ($\Delta\psi$, αρνητικό εσωτερικά) με τη μεταλύτερη συνεισφορά και το χημικό ($\Delta\mu_{H^+}$, αλκαλικό εσωτερικά) και δημιουργείται στα αερόβια βακτήρια, όπως η *E. coli* από την έξοδο πρωτονίων από την αναπνευστική αλυσίδα) η συνεισφορά της βιοχημικά μπορεί να φανεί μόνο όταν οι προπρωτεΐνες έχουν μετατοπιστεί κατά το μισό, οπότε και η PMF ολοκληρώνει την μετατόπισή τους απουσία ATP και μόνο αν η SecA έχει προηγουμένως αδρανοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Πειράματα έχουν δείξει ότι αρχικά υπάρχει συναγωνισμός μεταξύ της χρήσης ATP και PMF από την τρανσλοκάση αλλά από ένα σημείο και μετά (όταν ένα συγκεκριμένο μήκος προπρωτεΐνης έχει μετατοπιστεί) ο συναγωνισμός σταματά να υφίσταται και επικρατεί η PMF πηγή ενέργειας. Πειραματικά δεδομένα στηρίζουν ακόμα την συντονισμένη σύνδεση της SecA/ATP και των PMF συστατικών της αντίδρασης, αφού υπεραφθονία της SecA πρωτεΐνης επιτρέπει την μετατόπιση προπρωτεΐνης που διαφορετικά μετατοπίζεται μόνο μέσω PMF. Είναι γνωστό ακόμα ότι η PMF εξαρτώμενη μετατόπιση (μετά την αδρανοποίηση της SecA) καθυστερεί όταν SecA επαναπροστίθεται στο σύστημα. Πως ακριβώς το ATP συμβάλλει στον μηχανισμό της μετατόπισης, θα αναφερθεί παρακάτω.

Όσον αφορά την PMF, αυτή φαίνεται ότι επηρεάζει πολλά μεμβρανικά συστατικά της αντίδρασης ταυτόχρονα και πιθανά χαλαρώνει τις συνδέσεις μεταξύ τους επιτρέποντας την διέλευση των προπρωτεϊνών. Είναι δυνατόν ακόμα να επηρεάζει και άμεσα την τρανσλοκάση βελτιώνοντας τον ρυθμό υδρόλυσης του ATP από την SecA ή χαμηλώνοντας την K_m της για το ATP 100 φορές και προσδίδοντας προσανατολισμό

στην μετατόπιση της προπρωτεΐνης. Μια απλή αντικατάσταση σ' ένα αμινοξύ της SecY πρωτεΐνης καθιστά την μετατόπιση τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* ανεξάρτητη από PMF, γεγονός που υποδηλώνει απ' ευθείας εμπλοκή της SecY στην μετατόπιση ενώ αντίθετα όπως θα δούμε αμέσως παρακάτω οι υποαντιδράσεις που προκαλεί το ATP είναι εντελώς απαραίτητες.

Μηχανισμός δράσης της μεταθετάσης

Καθώς η SecA δεσμεύεται στα όξινα λιπίδια και στον SecYE πυρήνα του SecYEGDFyajc συμπλόκου ενεργοποιείται για αναγνώριση, (1) της SecB, (2) της αλληλουχίας οδηγού, και (3) της ώριμης περιοχής των προπρωτεϊνών. Έτσι, τα σύμπλοκα SecB προπρωτεΐνης οδηγούνται στην τρανσλοκάση μέσω τριών ξεχωριστών γεγονότων αναγνώρισης, μολονότι μόνο η αναγνώριση της αλληλουχίας οδηγού ή της ώριμης περιοχής της προπρωτεΐνης μπορεί να είναι αρκετή.

Η δέσμευση όμως της προπρωτεΐνης στη SecA την ενεργοποιεί για δέσμευση και υδρόλυση ATP. Μόλις το ATP δεσμευθεί στην NBD1 θέση της SecA, αυτή υφίσταται μια σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωσή της εισάγοντας μεγάλες περιοχές 65 και 30 KDa κοντά στο N και C άκρο της αντίστοιχα, μέσα στη μεμβράνη. Η SecA εισέρχεται μέσω του SecYEGDFyajc διαμεμβρανικού συμπλόκου (το οποίο θα μπορούσε να ολιγομερίζεται γύρω από ένα κανάλι όπως στην περίπτωση της ευκαρυωτικής μεταθετάσης) προστατευόμενη έτσι από την υδρόφοβη λιπιδική στοιβάδα. Σημειώνεται εδώ ότι αυτή η αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA έχει πιστοποιηθεί όχι μόνο στην έναρξη, αλλά και κατά τη διάρκεια της μετατόπισης προχωρημένων ενδιάμεσων προπρωτεΐνης (ανιχνεύεται σαν ανθεκτικότητα σε πρωτεάση των κατά τα άλλα πρωτεολυόμενων N και C περιοχών της SecA), πράγμα που σημαίνει ότι αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της SecA κατά την μετατόπιση. Η αλλαγή αυτή στη διαμόρφωση της SecA επιτυγχάνεται μόνο και μόνο με τη δέσμευση ATP στην NBD1 θέση αφού η ίδια η αλλαγή παρατηρείται και από την δέσμευση στην NBD1 θέση μη υδρολυόμενων αναλόγων του ATP όπως το AMP-PNP. Τονίζεται ακόμα ότι η NBD1 θέση και μόνο μπορεί να στηρίξει την είσοδο της SecA στην μεμβράνη αφού χρησιμοποίηση μεταλλαγμένων μορφών της SecA με πρόβλημα πρόσδεσης στην NBD2 θέση δεν έχουν διαφορετική συμπεριφορά.

Μια τέτοια αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA περιμένει κανείς να επηρεάζει τις υπομονάδες της τρανσλοκάσης που γειτνιάζουν μαζί της. Πράγματι, ταυτόχρονα με την είσοδο της SecA στη μεμβράνη μετά από πρόσδεση ATP, παρατηρείται αναστροφή της μεμβρανικής τοπολογίας της SecG. Συγκεκριμένα, η υδροφιλική C-τελική περιοχή της SecG που βρίσκεται φυσιολογικά στο περίπλασμα εκτίθεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, ενώ η κεντρική περιοχή της SecG μετακινείται από μια κυτταροπλασματική τοποθεσία σε μια άλλη, εκτεθειμένη στο περίπλασμα (σχήμα 7) . Οι αλλαγές αυτές είναι πολύ πιθανό να επηρεάζουν την διαμόρφωση του SecYE και μπορεί να εξηγούν την δυναμική κατάσταση σύνδεσης και αποσύνδεσης της SecG με το SecYE. Είναι δυνατόν ακόμα η αναστροφή της SecG να βελτιώνει την αλληλεπίδραση της SecA με τη μεμβράνη, είτε μέσω αλληλεπίδρασης SecA/ SecG, είτε άμεσα μέσω SecY.

Καθώς η δέσμευση ATP στην SecA την εισάγει στην μεμβράνη, συμβαίνει σύγχρονη εισαγωγή στη μεμβράνη περιορισμένων τμημάτων της προπρωτεΐνης που κατά την έναρξη της μετατόπισης περιλαμβάνουν 20 με 30 αμινοξέα της N-τελικής περιοχής (αλληλουχία οδηγός) που σχηματίζουν λούπα με τα αντίστοιχα σε αριθμό επόμενα αμινοξέα. Δεν είναι ακόμη γνωστό αν σ' αυτό το σημείο η αλληλουχία οδηγός εκτίθεται στα λιπίδια. Σε πιο προχωρημένα στάδια μετατόπισης η ίδια διαδικασία εισόδου της SecA στη μεμβράνη από ATP οδηγεί σε εισαγωγή άλλων 20 με 30 αμινοξέων της προπρωτεΐνης στη μεμβράνη. Σημειώνεται εδώ ότι αρκεί ένας μόνο κύκλος εισόδου της SecA στη μεμβράνη από ATP, για να εισαχθεί αρκετό τμήμα της προπρωτεΐνης και να γίνει αποκοπή της αλληλουχίας οδηγού από την πεπτιδάση οδηγό στο περίπλασμα.

Τα σύγχρονα γεγονότα της εισόδου της SecA στη μεμβράνη από ATP και η μετατόπιση 20-30 αμινοξέων της προπρωτεΐνης στη μεμβράνη είναι φυσικά συνδεδεμένα. Αυτό προκύπτει από τη χρήση μεταλλαγμένων μορφών της SecA, αλλά και μη υδρολύμενων ATP ανάλογων που υποδηλώνουν με την σταθεροποίηση της μορφής της SecA μέσα στη μεμβράνη και με την μετατόπιση παράλληλα ενός τμήματος της προπρωτεΐνης, ότι πρόκειται για γεγονότα αλληλένδετα μεταξύ τους.

Χωρίς την υδρόλυση του ATP από την SecA σταματά η μετατόπιση των προπρωτεΐνης μετά την εισαγωγή μερικών αμινοξέων στη μεμβράνη. Στην ουσία πολλοί κύκλοι υδρόλυσης του ATP είναι απαραίτητοι για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της μετατόπισης.

Ενας ρόλος της υδρόλυσης ATP από την NBD1 θέση της SecA είναι η απελευθέρωση του υποστρώματος από την SecA (αυξάνεται η ανθεκτικότητα της προπρωτεΐνης σε πρωτεάση με την υδρόλυση του ATP, πράγμα που σημαίνει ότι δεν συνδέεται πια με την SecA στην οποία παρουσιάζει αυξημένη πρωτεόλυση). Η απελευθέρωση είναι πολύ πιθανό ότι διευκολύνεται από τις τοπολογικές αλλαγές στην SecG πρωτεΐνη, ενώ και οι αλληλεπιδράσεις της προπρωτεΐνης με την SecY φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο αφού χάρη σ' αυτές το υπόστρωμα μπορεί να διατηρηθεί στο κανάλι μετά την απελευθέρωσή του από την SecY.

Από την άλλη μεριά, η υδρόλυση του ATP οδηγεί την SecA σε έξοδο από την μεμβράνη, όπου ετοιμάζεται για έναν νέο κύκλο υδρόλυσης ATP. Σ' αυτή τη φάση η SecA μένει συνδεδεμένη στη μεμβράνη στην SecYEG θέση και μπορεί να αντικατασταθεί από κυτταροπλασματική SecA, όπως έδειξαν πειράματα αντικατάστασης ραδιοσημασμένης SecA από κρύα, όταν αυτά προστίθεται κατά την διάρκεια της μετατόπισης πρωτεϊνών. Δεν είναι γνωστό ακόμα τι ακριβώς συμβαίνει, πάντως από την στιγμή που η SecA βγαίνει από την μεμβράνη είναι έτοιμη (η ίδια ή άλλη) να ξεκινήσει έναν νέο κύκλο εισόδου στη μεμβράνη, μεταφοράς ενός επιπλέον τμήματος της προπρωτεΐνης, και τελικά νέας εξόδου από τη μεμβράνη.

Το ερώτημα είναι τώρα, πώς τα προϊόντα υδρόλυσης του ATP απομακρύνονται από την SecA όταν αυτή εξάγεται από τη μεμβράνη. Πειραματικά αποτελέσματα με διαλυτή SecA δείχνουν ότι η δέσμευση προπρωτεΐνης από την SecA προκαλεί την απομάκρυνση απ' αυτήν ADP, γεγονός που στηρίζει την πρόταση ότι η προπρωτεΐνη δρα σαν παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων, συνδέοντας τον κύκλο εισόδου και εξόδου της SecA στη μεμβράνη με την δική της μετατόπιση. Όση τώρα η πρωτεΐνη είναι παγιδευμένη στην τρανσλοκάση, θερμικές ταλαντώσεις μπορούν να προκαλέσουν πρόσδεσή της στη SecA, ενώ ταυτόχρονα η PMF επιδρώντας στο κανάλι με κάποιο τρόπο, την μετατοπίζει ακόμα περισσότερο. Ίσως από την άλλη και η ίδια η PMF να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην απελευθέρωση του ADP από την SecA με την αλλαγή που πιθανά προσδίδει στην διαμόρφωση της SecY και από εκεί στην SecA.

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την μετατόπιση προπρωτεΐνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται κάποια ενδιάμεσα μετατοπισμένα τμήματα προπρωτεΐνης όπως είναι το I₁₆ και I₂₆ (στα οποία 16 ή 26 KDa N- τελικό άκρο της προπρωτεΐνης έχει

μετατοπιστεί) λόγω της σταθεροποίησης της μορφής της SecA στη μεμβράνη από το SecDFyajC σύμπλοκο σε ορισμένα μόνο υδρόφοβα τμήματα της προπρωτεΐνης. Τα ενδιάμεσα αυτά μπορούν πολύ αποδοτικά να ολοκληρώσουν την μετατόπισή τους από το ηλεκτροχημικό δυναμικό της μεμβράνης $\Delta\mu\text{H}^+$ απουσία ATP και SecA.

Το πως ακριβώς το $\Delta\mu\text{H}^+$ συμβάλλει στην μετατόπιση της προπρωτεΐνης δεν είναι γνωστό όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Αυτό που ξέρουμε πάντως είναι ότι οι υπομονάδες της τρανσλοκάσης χρησιμοποιούν και τις δύο πηγές ενέργειας στο βακτήριο, ATP στην *cis* πλευρά της μεμβράνης και $\Delta\mu\text{H}^+$ προς το τέλος της διαδικασίας.

Τέλος, σημειώνεται ότι όχι μόνο η είσοδος της SecA στη μεμβράνη, αλλά και η έξοδος της οφείλεται στην υδρόλυση ATP στην NBD1 και μόνο θέση. Μεταλλαγές στην NBD2 θέση μπορεί να μην εμποδίζουν την επιτέλεση του γνωστού κύκλου εισόδου και εξόδου της SecA από τη μεμβράνη, εμποδίζουν όμως την μετατόπιση του υποστρώματος. Είναι λοιπόν πιθανό ότι η NBD2 θέση είναι σημαντική για την σύνδεση του κύκλου της SecA με την μετατόπιση του υποστρώματος. Είναι επίσης, πιθανή η ρυθμιστική λειτουργία της NBD2 θέσης αφού μεταλλαγές σ' αυτήν μειώνουν σημαντικά την ικανότητα υδρόλυσης ATP από την SecA.

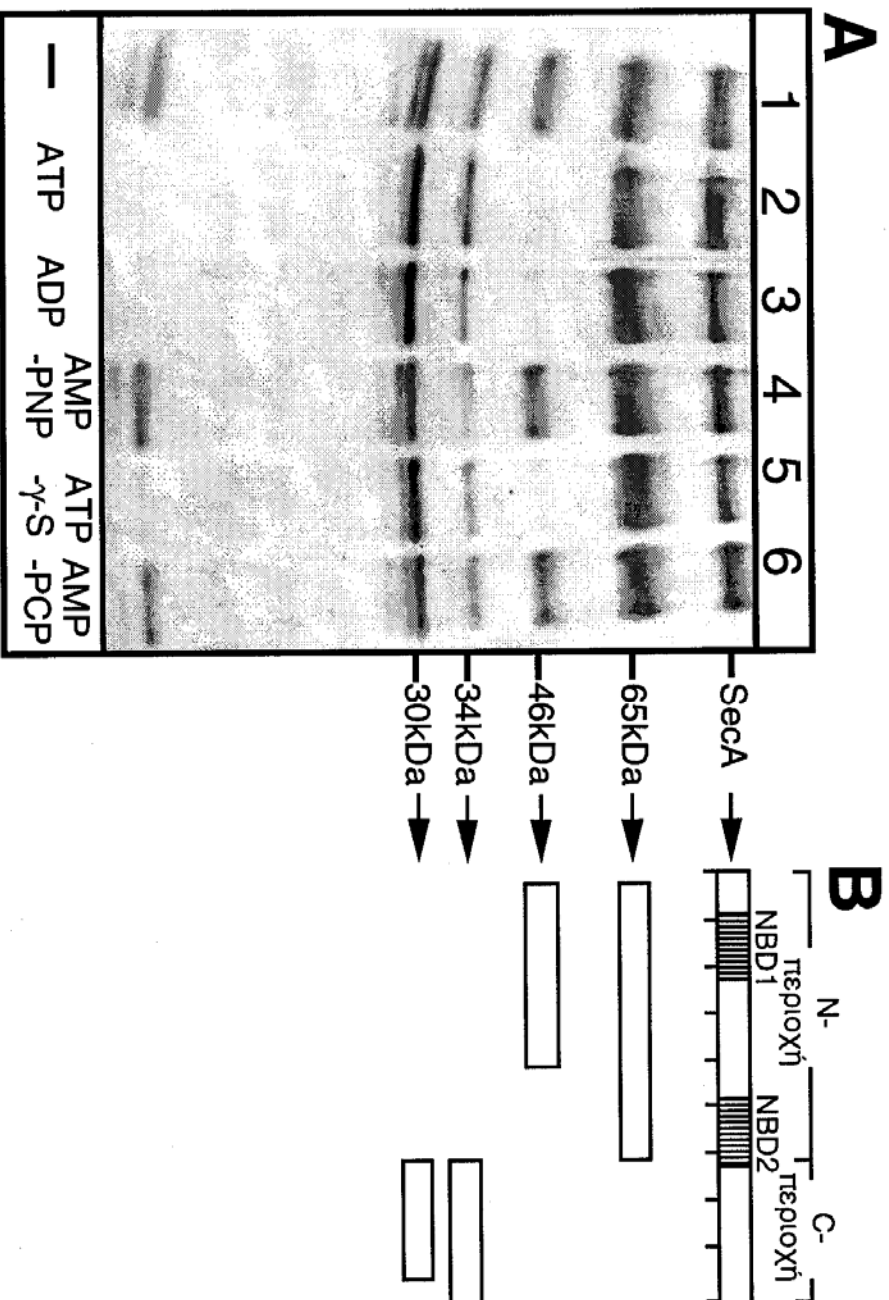
Στα αποτελέσματα και τη συζήτηση θα αναφερθούμε σε αλληλεπιδράσεις μέσα στο μόριο της SecA που έχουν όπως θα φανεί, λειτουργική σημασία και προσδίδουν στην C-περιοχή της SecA ρυθμιστικό ρόλο.

Κεφάλαιο 2

1. Φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της N-περιοχής και της C-περιοχής της SecA πρωτεΐνης

Στο εργαστήριο υπήρχαν ενδείξεις για απ'ευθείας αλληλεπίδραση της N- και της C-περιοχής της SecA. Συγκεκριμένα κατά την κινητική θρυψινόλυσης της SecA παρουσία ADP (σχήμα 8 και Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελεσματα) παρατηρείται εξαφάνιση του 48kDa πρωτεολυτικού τμήματος (προέρχεται από την N- περιοχή) και σταθεροποίηση των 65kDa (προέρχεται επίσης από τη N-περιοχή), 34kDa και 30kDa τμημάτων (προέρχονται από την C-περιοχή), (πηγάδια 2, 3, 5. Το ATP-γ-S υδρολύεται σε ADP και Pi όπως το ATP αλλά σε μικρότερο βαθμό,) . Είναι φανερό ότι το ADP συνδεδεμένο στην N-περιοχή της SecA (περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου) προκαλεί κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση της , που οδηγεί στην εξαφάνιση ενός πρωτεολυτικού τμήματος (48kDa) και στην σταθεροποίηση ενός άλλου τμήματος (65kDa) αυτής της περιοχής . Το ότι συμβαίνει σταθεροποίηση και των 34kDa και 30kDa τμημάτων που προέρχονται από την C-περιοχή της SecA , οδηγεί στην υπόθεση ότι η N- και η C-περιοχή αλληλεπιδρούν και έτσι σταθεροποίηση πρωτεολυτικών τμημάτων της μιας περιοχής οδηγεί σε σταθεροποίηση πρωτεολυτικών τμημάτων και της άλλης. Από την άλλη μεριά μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (native-PAGE) των 65kDa και 34kDa / 30kDa πρωτεολυτικών τμημάτων της SecA δείχνει ότι τα 65kDa και 34kDa /30kDa τμήματα πιθανά να συνμετακινούνται (comigrate) (Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελεσματα) . Τέλος βρέθηκε ότι σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (size exclusion chromatography) τα 65kDa και 34kDa / 30kDa πρωτεολυτικά τμήματα της SecA συνχρωματογραφούνται (Καραμάνου αδημοσίευτα αποτελεσματα) .

Γεννήθηκε λοιπόν η ανάγκη να δειχθεί με επιπρόσθετους πιο άμεσους τρόπους η αλληλεπίδραση της N- και της C-περιοχής της SecA. Αυτό έγινε με βιοχημικά πειράματα



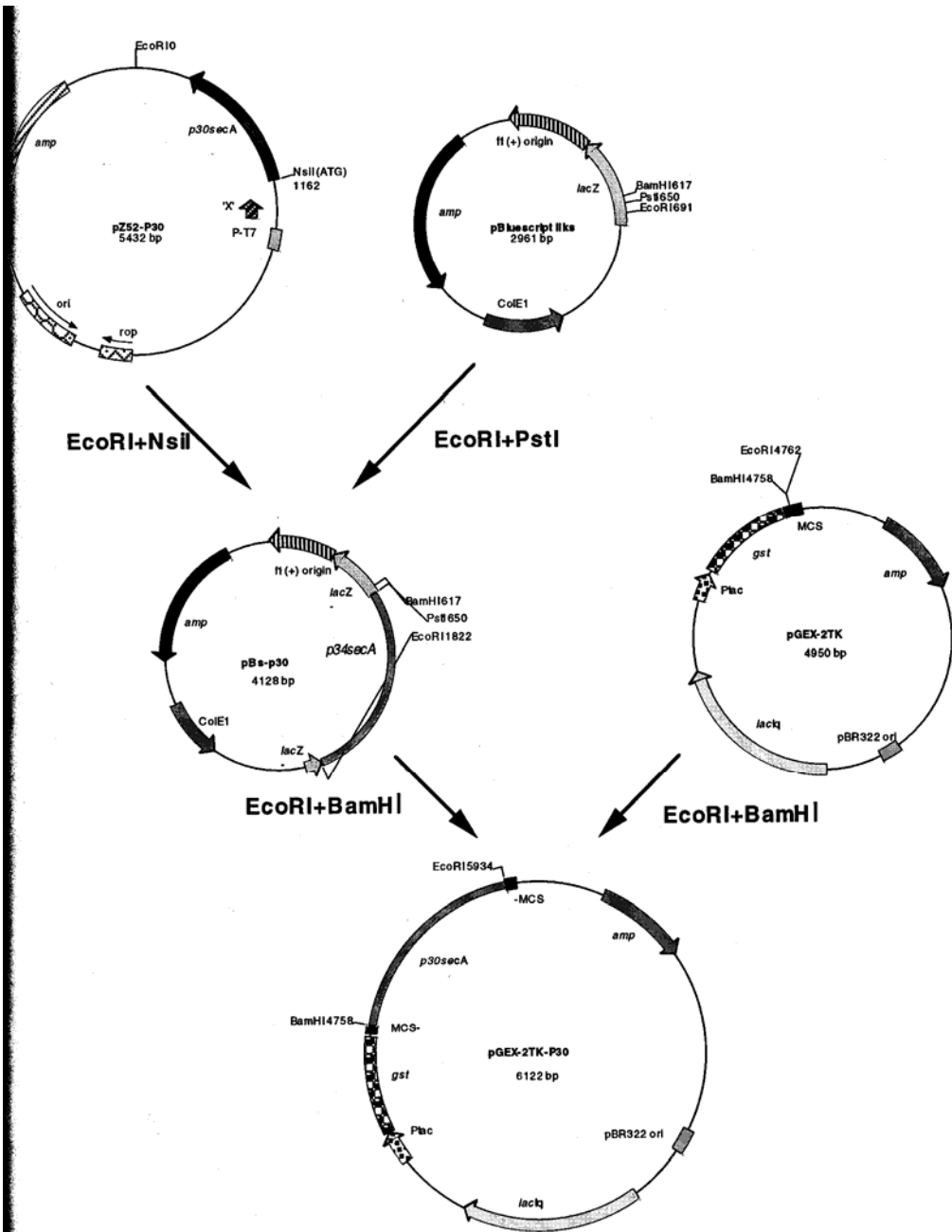
Σχήμα 8. Α. Πείραμα θρυψινόλυσης της SecA παρουσία διαφόρων τύπων νουκλεοτιδίων. Β. Σχηματική αναπαράσταση των παραγόμενων πρωτεολυτικών πεπτιδίων του Α, όπως εξακριβώθηκαν μετά από αμινοτελική αλλούχιση.

ακινητοποίησης της C-περιοχής της SecA και μελέτη πρόσδεσης της N- περιοχής στη C-περιοχή. Η ακινητοποίηση της C-περιοχής επετεύχθηκε με σύμφυση της P34-SecA στη γλουταθειονική s- τρανσφεράση (GST) που προσδέεται σε σφαιρίδια σεφαρόζης 4B. Στο αντίστροφο πείραμα ακινητοποιήθηκε η N-περιοχή της SecA και μελετήθηκε η πρόσδεση σ' αυτήν, της C-περιοχής. Η ακινητοποίηση επετεύχθηκε με σύμφυση αλληλουχίας ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της P70-SecA οι οποίες προσδέονται σε κολώνα Νικελίου. Τα πειράματα αυτά παρουσιάζονται παρακάτω. :

2.1 Με δέσμευση ³⁵S-P70-SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34

Για να πραγματοποιηθεί το παραπάνω πείραμα πρέπει να γίνει καταρχήν κατασκευή του *gst-p34-secA* γονιδίου (σχήμα. 9) . Συγκεκριμένα γίνεται υποκλωνοποίηση του *p34-secA* γονιδίου από το pZ52-P30 πλασμίδιο στον φορέα κλωνοποίησης pBluescript II KS . Το pZ52-P30 πλασμίδιο πέπτεται με τα ένζυμα EcoRI και NsiI και απομονώνεται ένα τμήμα DNA μεγέθους 1167 bp που περιλαμβάνει το *p34-secA* γονίδιο. Το pBluescript II KS πλασμίδιο πέπτεται επίσης με EcoRI και PstI (το PstI δημιουργεί συμβατά συνεκτικά άκρα με αυτά που δημιουργεί το NsiI) και στο κομμένο πλασμίδιο υποκλωνοποιείται το παραπάνω τμήμα DNA . Εν συνέχεια γίνεται υποκλωνοποίηση του *p34-secA* γονιδίου από το pBluescript-P30 πλασμίδιο στον pGEX-2TK πλασμιδιακό φορέα ο οποίος επιτρέπει το σχηματισμό συμφύσεων μεταξύ του C-άκρου της γλουταθειονικής s-τρανσφεράσης (GST) και ενός ετερόλογου πολυπεπτιδίου . Το τμήμα του DNA που περιέχει το *p34-secA* γονίδιο απομονώνεται από τον pBluescript II KS μετά από πέψη με EcoRI και BamHI και υποκλωνοποιείται στον κομμένο με τα ίδια ένζυμα pGEX-2TK πλασμιδιακό φορέα . Για να ελεγχθεί η ορθότητα της κλωνοποίησης έγινε πέψη του υπό εξέταση pGEX-2TK-P30 πλασμιδίου με EcoRI και BamHI και σε πήκτωμα αγαρόζης ανιχνεύτηκαν δύο τμήματα DNA μεγέθους 4950 bp (πλασμιδιακός φορέας) και 1167 bp (ένθεμα με το *p34-secA* γονίδιο) .

Η παραγωγή της GST-P34-SecA πρωτεΐνης ελέγχθηκε *in vivo* όπως περιγράφεται παρακάτω . Κύτταρα *E.coli* στελέχους DH5α που περιέχουν το pGEX-2TK-P30 πλασμίδιο , επώαστηκαν στους 37⁰C σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία



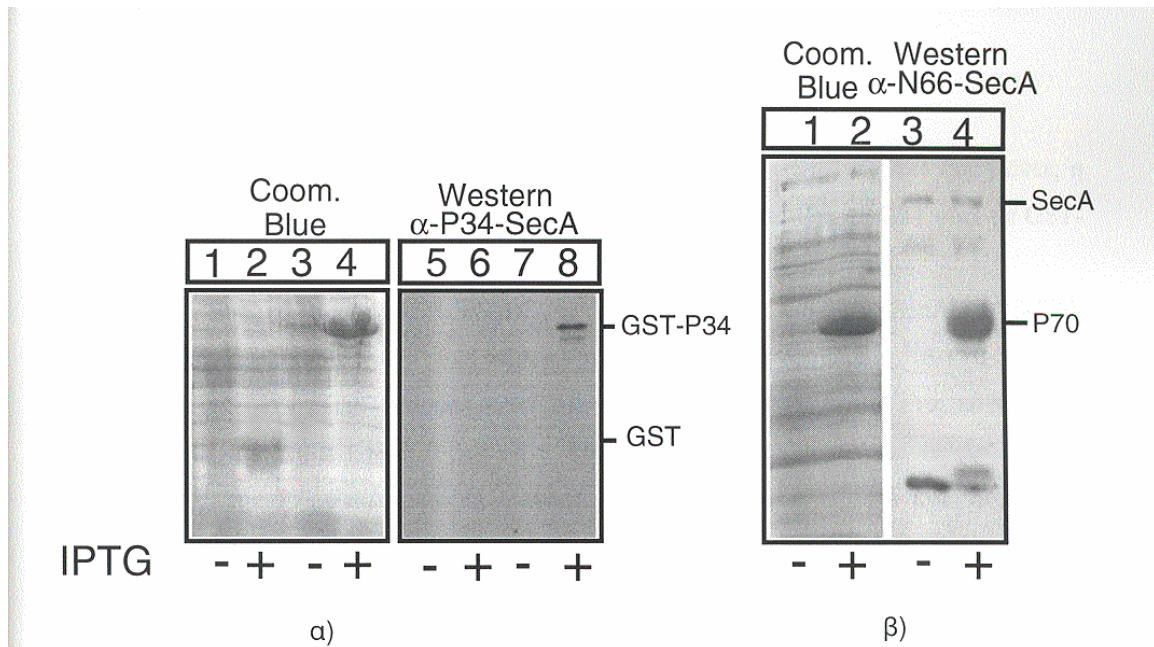
Σχήμα9: Α. Υποκλωνοποίηση του *p34-secA* γονιδίου από το πλασμίδιο *pZ52-P30* στο *pBluescript* πλασμίδιο. Β. Υποκλωνοποίηση του *p34-secA* γονιδίου από το *pBluescript-P30* πλασμίδιο στο *pGEX-2TK* πλασμίδιο.

αμικικιλίνης και αφέθηκαν να αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας . Την άλλη μέρα έγινε 1/100 αραίωση της καλλιέργειας και τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να γίνει 0.5. Έπειτα έγινε επαγωγή της έκφρασης της GST-P34-SecA του πλασμιδίου με IPTG, για τρεις ώρες . Στη συνέχεια 1 ml της καλλιέργειας , πριν και μετά τρεις ώρες από την επαγωγή με IPTG φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές για 3 λεπτά και διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα 5X SDS-PAGE (η σύσταση του οποίου δίνεται στα υλικά και μέθοδοι) . Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για κύτταρα E.Coli στελέχους DH5α που περιέχουν το pGEX-2TK πλασμίδιο , για να ελεγχθεί και η έκφραση της GST πρωτεΐνης *in vivo* . Τα παραπάνω δείγματα φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDS-PAGE) προκειμένου είτε να χρωματιστεί αυτό με Coomassie , είτε να γίνει μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθως ανίχνευση της GST-P34-SecA από anti-SecA αντίσωμα (WESTERN). Από το σχήμα 10 α) φαίνεται καθαρά ότι μετά από επαγωγή με IPTG στα κύτταρα με pGEX-2TK-P30 πλασμίδιο , ανιχνεύεται με χρώση με Coomassie και με Western GST-P34-SecA πρωτεΐνη .

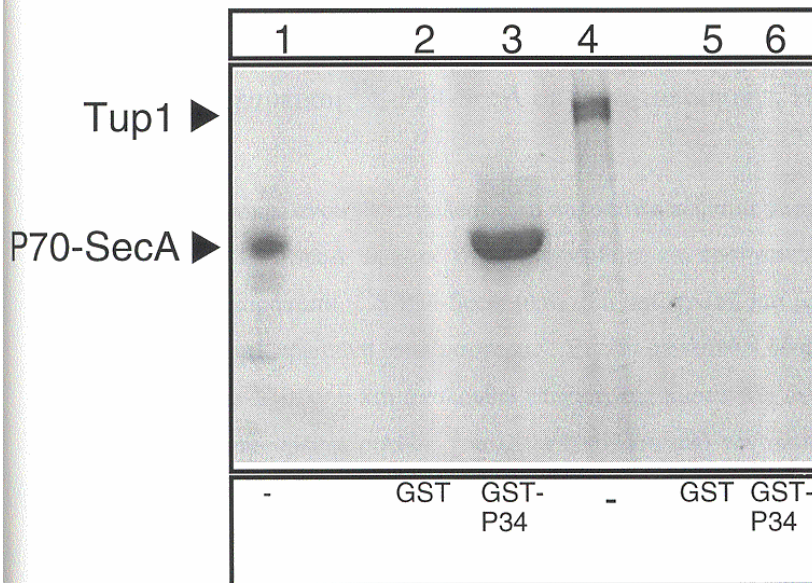
Με τον ίδιο τρόπο ελέγχεται η παραγωγή της P70-SecA (η πρωτεΐνη αυτή δημιουργήθηκε από την εισαγωγή στο γονίδιο που παράγει την SecA ενός κωδικού λήξης μετά την 70 KDa περιοχή) *in vivo* (σχήμα 10 β) , προκειμένου να παραχθεί ³⁵S-P70-SecA μετά από μεταγραφή και μετάφραση *in vitro* . Επίσης με τον ίδιο τρόπο παρήχθει η ³⁵S-TUP1 πρωτεΐνη από τη ζύμη για να χρησιμοποιηθεί σα μάρτυρας .

Στη συνέχεια γίνεται δέσμευση γλουταθειονικής s-τρανσφεράσης (GST) σε σφαιρίδια σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη (Glutathione Sepharose 4B beads) . Το ίδιο γίνεται και με την GST-P34-SecA . Ακολουθεί επώαση των παραπάνω σφαιριδίων με ³⁵S-P70-SecA , πλύσεις με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και έκλουση όλης της πρωτεΐνης που υπάρχει στα σφαιρίδια με διάλυμα 5X SDS-PAGE (πιο αναλυτικά η διαδικασία αναφέρεται στα υλικά και μέθοδοι) . Οι πρωτεΐνες που ελευθερώνονται από τα σφαιρίδια φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα και μετά από αυτοραδιογραφία του πηκτώματος διαπιστώνεται ότι γίνεται δέσμευση της ³⁵S-P70-SecA στα σφαιρίδια με GST-P34-SecA και όχι στα σφαιρίδια με GST πρωτεΐνη αποδεικνύοντας ότι η αντίδραση

είναι ειδική για το P34 τμήμα της GST-P34-SecA (σχήμα 11 πηγάδια 2 , 3) . Η ^{35}S -P70-SecA δεσμεύεται στο παραπάνω πείραμα κατά ένα ποσοστό 50% . Επιπλέον αν



Σχήμα10: α) έκφραση GST-P34SecA . β) έκφραση P70-SecA . Διαπιστώνεται ότι παρουσία απουσία IPTG ανιχνεύεται με το western χρωμοσωμική SecA .



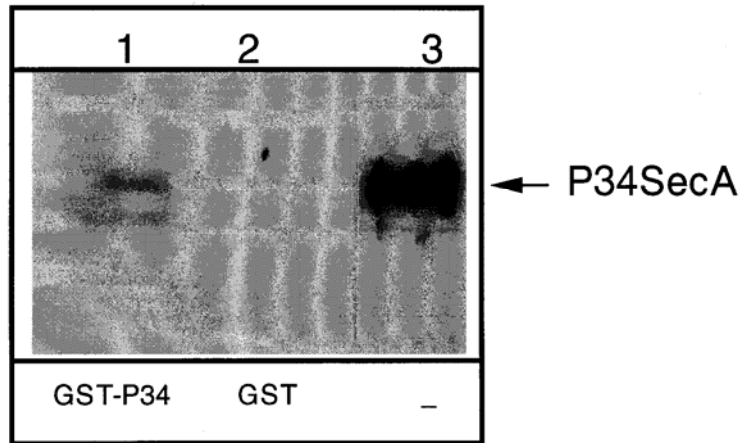
Σχήμα11: Δέσμευση της ^{35}S -P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται η ^{35}S -Tup1.

επώασουμε τα σφαιρίδια με μία ετερόλογη μη ειδική πρωτεΐνη , π.χ από ζύμη όπως η $^{35}\text{S-Tup1}$, δεν παρατηρείται δέσμευση της ούτε από τα σφαιρίδια με GST ούτε με GST-P34-SecA πρωτεΐνη (σχήμα 11 πηγάδια 5 , 6) .

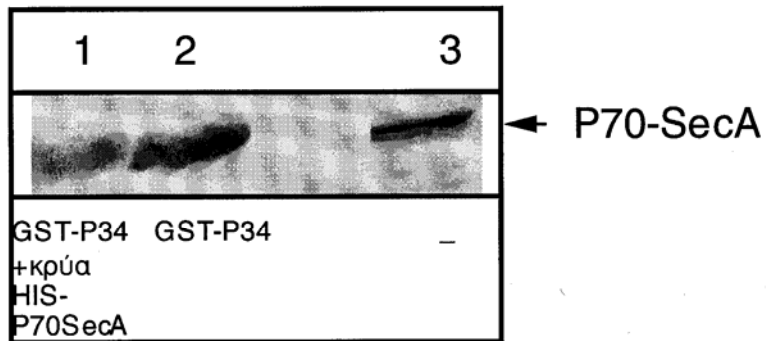
Ένας άλλος τρόπος να δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση GST-P34-SecA με $^{35}\text{S-P70-SecA}$ είναι ειδική , είναι να γίνει πείραμα συναγωνισμού της δέσμευσης $^{35}\text{S-P70-SecA}$ σε ακινητοποιημένη GST-P34 από κρύα HIS-P70-SecA (σχήμα. 12) . Έτσι καθαρίζεται επαρκής ποσότητα HIS-P70-SecA (η πρωτεΐνη αυτή παράγεται από το γονίδιο που παράγει την P70-SecA , με τη διαφορά ότι έχει προστεθεί σ'αυτό ένα τμήμα που κωδικοποιεί για έξι ιστιδίνες στο αμινοτελικό άκρο της P70-SecA) με τη βοήθεια κολώνας Νικελίου (σχήμα 13 α) (πιο αναλυτικά δίδεται ο καθαρισμός στα υλικά και μέθοδοι) και πραγματοποιείται το παραπάνω πείραμα με τη διαφορά ότι στα σφαιρίδια με GST-P34-SecA προστίθεται και 1000 φορές περισσότερη μη ραδιενεργά σημασμένη HIS-P70-SecA . σχήμα 12 πηγάδια 1 , 2) . Πράγματι στο προηγούμενο σχήμα φαίνεται σημαντική μείωση της δέσμευσης $^{35}\text{S-P70 SecA}$ παρουσία μη ραδιενεργά σημασμένης HIS-P70-SecA, γεγονός που ισχυροποιεί την παραπάνω αλληλεπίδραση .

2.2 Με δέσμευση $^{35}\text{S-P34-SecA}$ σε ακινητοποιημένη HIS-P70-SecA.

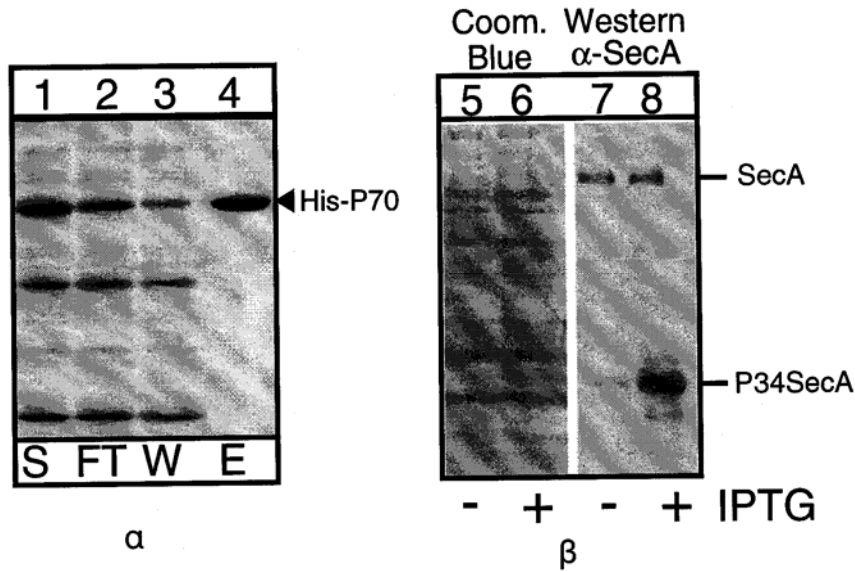
Προκειμένου να επιτελεστεί το παραπάνω πείραμα γίνεται καταρχήν έλεγχος της έκφρασης P34-SecA *in vivo*, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως (σχήμα 13 β)). Στη συνέχεια παράγεται $^{35}\text{S-P34-SecA}$ μετά από μεταγραφή και μετάφραση *in vitro* , όπως και $^{35}\text{S-Tup1}$ πρωτεΐνη σαν μάρτυρας . Έπειτα ακολουθεί δέσμευση της HIS-P70-SecA σε κολώνα Νικελίου και ακολουθεί επώαση της παραπάνω δεσμευμένης ρητίνης, αλλά και μη δεσμευμένης ρητίνης (κολώνα Νικελίου από την οποία δεν έχει περάσει HIS-P70-SecA) με $^{35}\text{S-P34-SecA}$. Στη συνέχεια γίνονται πλύσεις των δύο ειδών ρητίνης με κατάλληλο διάλυμα (υλικά και μέθοδοι) και έκλυση των δεσμευμένων σ' αυτές πρωτεϊνών με διάλυμα 5X SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα και μετά από αυτοραδιογραφία του πηκτώματος διαπιστώνεται ότι γίνεται δέσμευση $^{35}\text{S-P34-SecA}$ στη HIS-P70-SecA-κολώνα Νικελίου και όχι στη μη δεσμευμένη με HIS-P70-SecA-κολώνα Νικελίου (σχήμα 14 πηγάδια 2 , 3) . Η πρωτεΐνη δεσμεύεται στο προηγούμενο πείραμα κατά ένα ποσοστό περίπου 13% . Σαν μάρτυρας



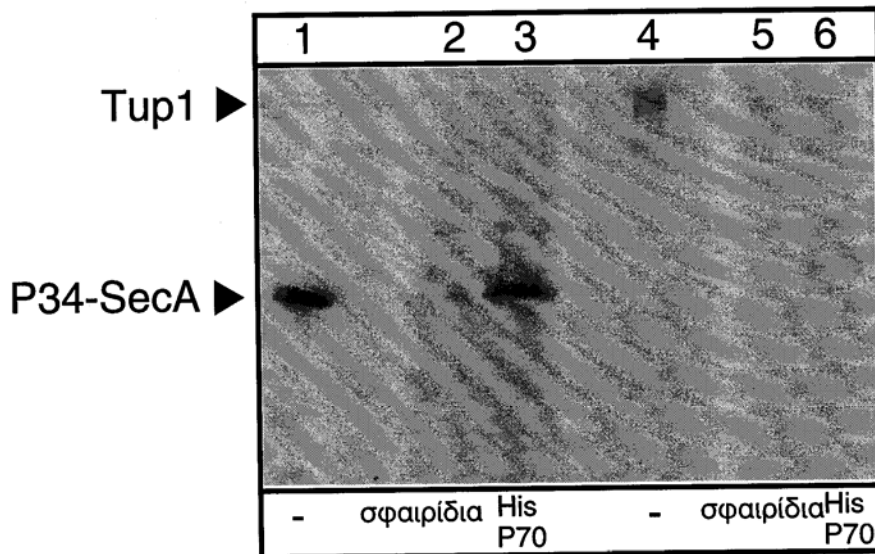
Σχήμα 15 : Δέσμευση της ^{35}S -P34SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34SecA.



Σχήμα 12: Συναγωνισμός της δέσμευσης ^{35}S -P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34 από κρύα HIS-P70SecA.



Σχήμα 13: α) έκφραση HIS-P70-SecA και καθαρισμός της μετά από πέρασμα από Ni-NTA κολώνα. S:υπερκείμενο, FT:το κλάσμα που βγαίνει από την κολώνα όταν την φορτώνουμε. W: το κλάσμα που βγαίνει από την κολώνα όταν την ξεπλένουμε. E:το κλάσμα που βγαίνει από την κολώνα όταν την εκλούουμε.
β) έκφραση P34-SecA.



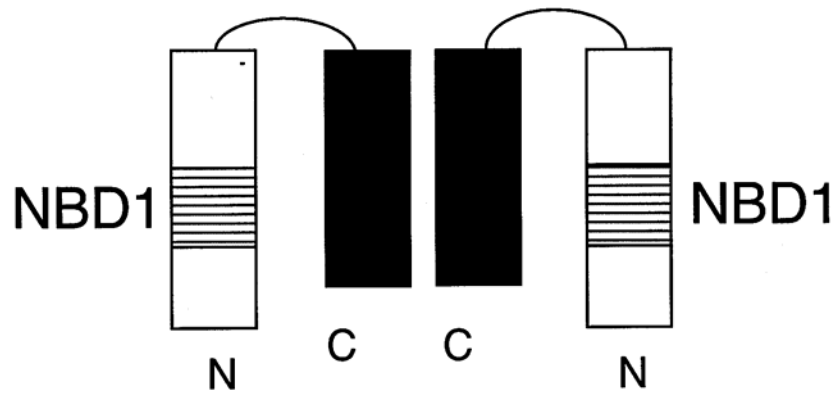
Σχήμα 14: Δέσμευση της ^{35}S -P34SecA σε ακινητοποιημένη HIS P70SecA. Σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται η ^{35}S -Tup1.

χρησιμοποιείται πάλι η ^{35}S -Tup1 πρωτεΐνη όπως και προηγουμένως, η οποία δεν προσδένεται σε κανένα από τα παραπάνω είδη ρητίνης (σχήμα 14 πηγάδια 5, 6) .

Καθώς εξετάζονται οι αλληλεπιδράσεις των πρωτογενών περιοχών της SecA γεννήθηκε η ανάγκη να επιβεβαιωθεί ότι στη C-περιοχή της SecA εντοπίζεται η περιοχή που είναι απαραίτητη για τον διμερισμό της (Hirano et al,1996) και ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ δύο C-τελικών περιοχών SecA πρωτεΐνης . Η διαφορά είναι ότι στο πείραμα που περιγράφεται εδώ γίνεται χρησιμοποίηση μιας πραγματικής περιοχής της SecA , της C-περιοχής της (όπως έδειξαν πειράματα θρυψινόλυσης , σχήμα 8) και όχι αυθαίρετα κομμένων τμημάτων του καρβοξυτελικού άκρου της SecA (Hirano et al,1996) . Έτσι GST και GST-P34-SecA σφαιρίδια σεφαρόζης 4B με γλουταθειόνη επωάζονται με ^{35}S -P34-SecA και ακολουθούν πλύσεις με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και έκλουση των δεσμευμένων στα σφαιρίδια πρωτεϊνών με διάλυμα 5X SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα και μετά από αυτοραδιογραφία του πηκτώματος διαπιστώνεται ότι γίνεται δέσμευση ^{35}S -P34-SecA στα GST-P34-SecA σφαιρίδια και όχι στα GST σφαιρίδια (σχήμα 15 πηγάδια 1 , 2) Η δέσμευση ^{35}S -P34-SecA πραγματοποιείται κατά ένα ποσοστό 5% . Επομένως επιβεβαιώνεται ότι η περιοχή που είναι υπεύθυνη για το διμερισμό της SecA εντοπίζεται στη C-περιοχή της .

Συμπερασματικά η C-περιοχή της SecA αλληλεπιδρά και με την N-περιοχή στο ίδιο μονομερές της SecA αλλά και με την C-περιοχή του άλλου μονομερούς στο διμερές της SecA . Προτείνεται λοιπόν το ακόλουθο μοντέλλο για την πρωτοταγή δομή της SecA (σχήμα 16),σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του Shilton et al , 1998 που λένε ότι μονομερή της SecA παρουσιάζουν σφαιρική εικόνα μετά από ανάλυση σκέδασης ακτίνων X υπό μικρή γωνία ,SAXS (σχήμα 34, συζήτηση) .

Μοντέλλο οργάνωσης της δομής της SecA



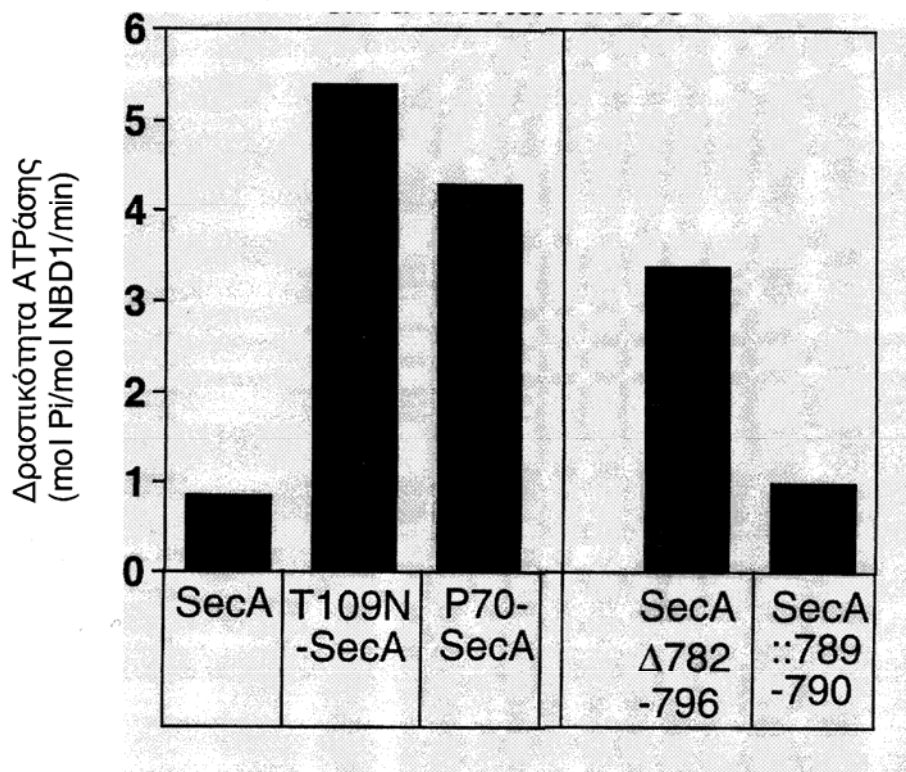
Σχήμα 16 : Απλουστευμένο μοντέλλο για την τριτοταγή δομή της SecA . Τα N και C αντιπροσωπεύουν την N- και C-περιοχή της SecA που είναι διμερές .

Κεφάλαιο 3

Λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της N-περιοχής και της C-περιοχής της SecA.

Η αλληλεπίδραση της N- με τη C-περιοχή της SecA είναι σημαντικό να δειχθεί ότι έχει και λειτουργική σημασία . Προκειμένου δε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα για τον ρόλο της C-τελικής περιοχής της SecA θα ασχοληθούμε με πρωτεΐνες στις οποίες αυτή η περιοχή έχει υποστεί αλλαγή (είτε δεν υπάρχει , είτε είναι μεταλλαγμένη) και θα δούμε πως οι πρωτεΐνες αυτές διαφέρουν στις ιδιότητες που έχουν σε διάλυμα , σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA , όπως για π.χ. στην ιδιότητα να δεσμεύουν και να υδρολύουν ATP, την οποία μπορούμε να προσδιορίσουμε βιοχημικά .

Συγκεκριμένα υπολογίζεται η δραστικότητα ATPάσης (πληροφορίες στα υλικά και μέθοδοι , Cunningham et al,1989 και στο Lill et al 1989) της P70-SecA (μιλήσαμε γι'αυτήν την πρωτεΐνη στο προηγούμενο κεφάλαιο, παράγραφο 2.1, σχήμα 10 β)) που είναι μία μορφή της SecA από την οποία λείπει η C-τελική περιοχή και της SecA . Προκειμένου να γίνεται απ'ευθείας σύγκριση της δραστικότητας ATPάσης της SecA (διμερές με δύο NBD1 θέσεις) και της P70-SecA(μονομερές με μία NBD1 θέση , Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) η παραπάνω δραστικότητα εκφράζεται σε κατάλληλες μονάδες (σχήμα 17) . Παρατηρείται λοιπόν μία ασυνήθιστα μεγάλη δραστικότητα ATPάσης για την P70-SecA σε σχέση με την ολόκληρη πρωτεΐνη που οδηγεί στην υπόθεση ότι η C-περιοχή της SecA δρα ρυθμιστικά και καταστέλλει την δραστικότητα ATPάσης της ολόκληρης πρωτεΐνης . Σημειώνεται εδώ ότι σαν μάρτυρας χρησιμοποιείται η T109NSecA η οποία παρουσιάζει μία ασυνήθιστα μεγάλη δραστικότητα ATPάσης (περισσότερες πληροφορίες δίνονται παρακάτω και στο Mitchell , Oliver , 1993) , όπως και η P70-SecA, που δικαιολογείται όμως από την μεταλλαγή που παρουσιάζει στην NBD1 θέση της SecA (περιοχή δέσμευσης ATP) . Έτσι στην T109NSecA η θρεονίνη στην 109 θέση της αμινοξικής αλληλουχίας , που εντοπίζεται η NBD1 θέση , έχει αντικατασταθεί από ασπαραγίνη . Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι εδώ μιλάμε για δραστικότητα ATPάσης της SecA σε διάλυμα (μόνο SecA και

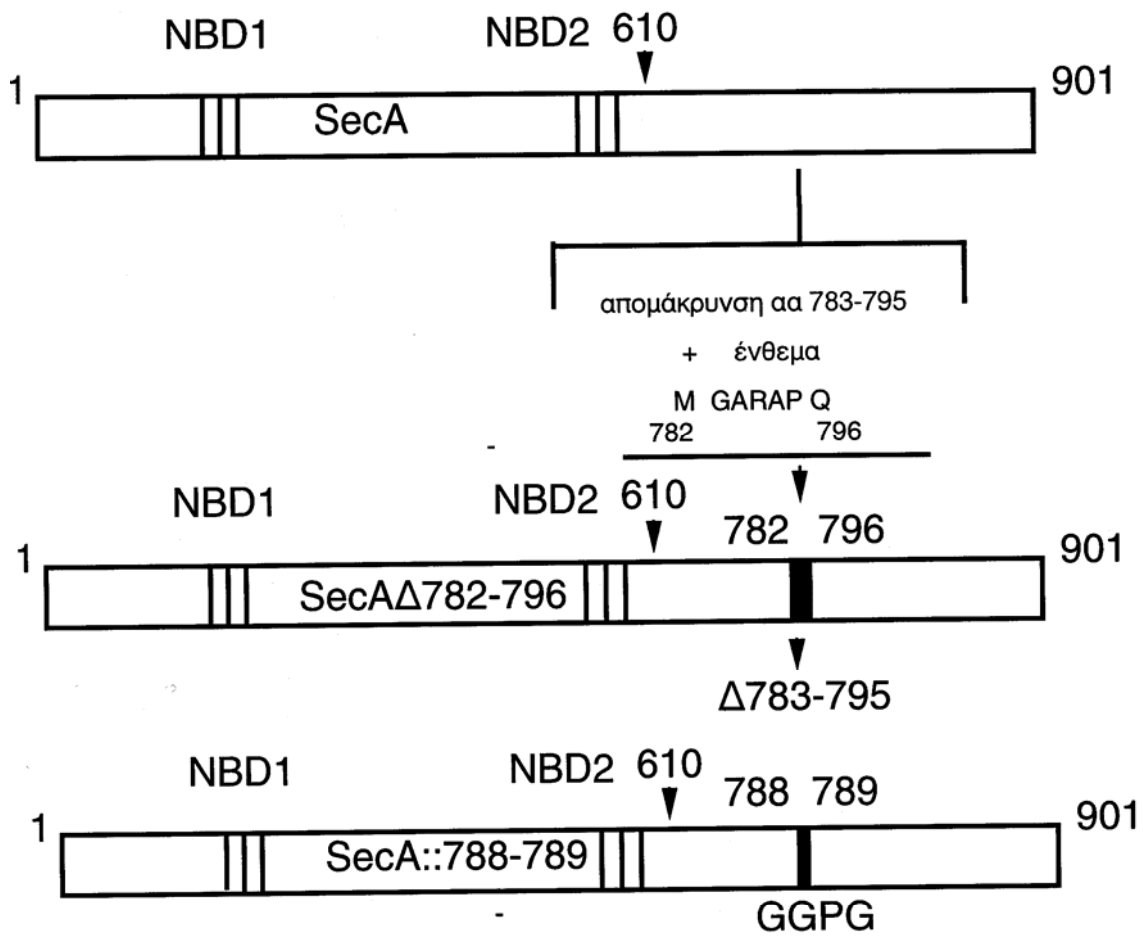


Σχήμα 17: Δραστικότητα ΑΤΡάσης της SecA και μεταλλαγμένων μορφών της.

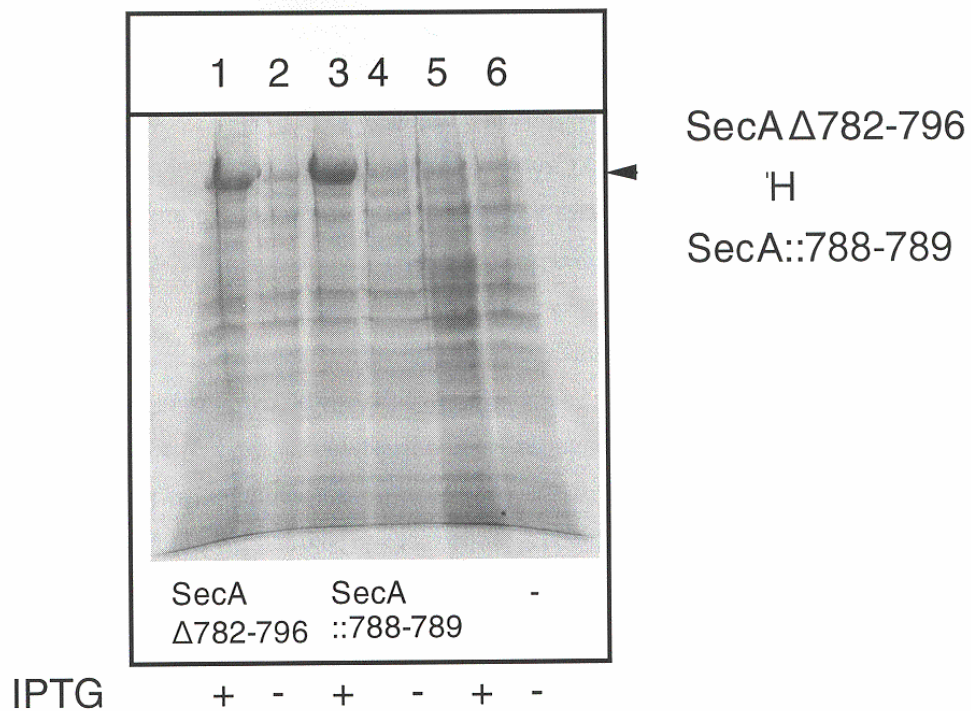
ATP έχει κάθε δείγμα) η οποία λέγεται βασική ή ενδογενής δραστηριότητα ATPάσης (basal ATPase activity) .

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η παραπάνω υπόθεση και για να εντοπιστούν συγκεκριμένες περιοχές που επιτελούν αυτή τη δράση ακολουθεί μελέτη δύο μεταλλαγμένων μορφών της SecA στη C-περιοχή , της SecA Δ 782-796 και της SecA::788-789 (Jarosik Oliver 1991) . Οι παραπάνω μεταλλαγές απομονώθηκαν γενετικά σαν επικρατή μεταλλάγματα που αποκαταστέλλουν την έκφραση της σύνθετης πρωτεΐνης SecA-LacZ (της οποίας τα επίπεδα έκφρασης προσδιορίζονται από την δραστηριότητα β-γαλακτοζιδάσης) επειδή δημιουργούν προβλήματα στην εξαγωγή πρωτεϊνών . Είναι γνωστό ότι το γονίδιο της SecA αυτοκαταστέλλεται κατά την φυσιολογική εξαγωγή πρωτεΐνης ενώ αποκαταστέλλεται όταν αυτή παρουσιάζει πρόβλημα (Schmidt , Oliver , 1989) . Οι δύο παραπάνω μεταλλαγές χαρτογραφούνται στη C-περιοχή της SecA , σε μία από τις δύο συντηρημένες περιοχές της περιοχής αυτής, όπως έχει διαπιστωθεί από πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριο μας (Κυρπίδης και Οικονόμου , αδημοσίευτα αποτελέσματα) , (σχήμα 18) , στην οποία δόθηκε από το εργαστήριο το όνομα MotifXIII (σχήμα 19) και η οποία ελέγχεται για το αν προσδίδει στη C-περιοχή το ρυθμιστικό της ρόλο. Οι παραπάνω μεταλλαγές έχουν προκύψει από έλλειψη ενός τμήματος στο μοτίβο XIII και προσθήκη ενός πέντα ή τέτραπεπτιδίου, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται αυτή η αρκετά συντηρημένη περιοχή της SecA (σχήμα 20) .

Πρώτα πρώτα γίνεται έλεγχος της έκφρασης των SecA Δ 782-796 και SecA::788-789 (όπως έγινε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, σχήμα 21 πηγάρια 3, 4, 5, 6) . Ακολουθεί καθαρισμός της SecA Δ 782-796 SecA και SecA::788-789 για να γίνουν οι διάφορες βιοχημικές μελέτες (δίνεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι) . Στη συνέχεια υπολογίζεται η ενδογενής δραστηριότητα ATPάσης των παραπάνω πρωτεϊνών που έχουν C-περιοχή αλλά εντοπίζεται σ' αυτή μεταλλαγή , προκειμένου να διερευνηθεί πάλι πως επηρεάζεται η καταλυτική τους δράση σε διάλυμα . Διαπιστώνεται ότι η SecA Δ 782-796 έχει αυξημένη βασική δραστηριότητα ATPάσης σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA (είναι τέσσερις φορές περίπου μεγαλύτερη) (σχήμα 17) γεγονός που ενισχύει ακόμα περισσότερο την υπόθεση της ύπαρξης μιας περιοχής στη C-περιοχή της SecA που είναι σημαντική για την λειτουργία της και πιο συγκεκριμένα για την δραστηριότητα ATPάσης της . Όσον αφορά τη βασική δραστηριότητα ATPάσης της SecA::788-789 είναι λίγο



Σχήμα 20: Δημιουργία SecA 782-796 και SecA::788-789 από SecA.



Σχήμα 21: Εκφραση SecA Δ 782-796 και SecA::788-789.

μετάλλαγμα	είδος μεταλλαγής	πρωτεϊνική σταθερότητα	συμπληρωματικότητα	δραστικότητα μετατόπισης	επικράτεια
SecA Δ 782-796	II	+	μη βιώσιμο στέλεχος	μη βιώσιμο στέλεχος	πολύ ισχυρή
SecA::788-789	I	+	-	-	ισχυρή

Σχήμα 22 : Πίνακας ιδιοτήτων των SecA παραγώγων με μεταλλαγές στο μοτίβο XIII .
 II .κατά συνθήκη θνησιγόνα (conditional lethal), κρυοευαίσθητη (cold sensitive cs) έναντι της χρωμοσωμική πρωτεΐνης .
 I .απλά επικρατής (dominant) πρωτεΐνη .

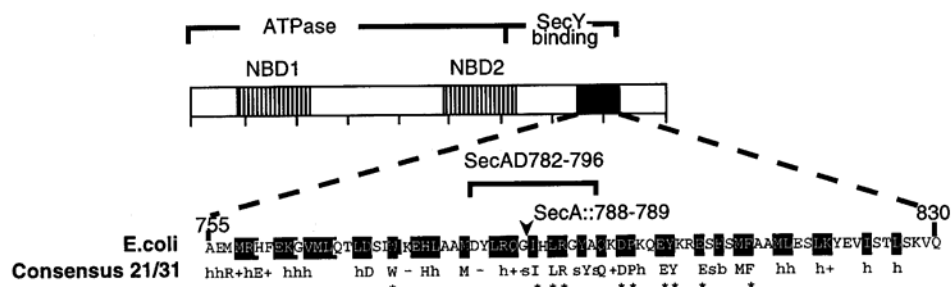
μεγαλύτερη της αγρίου τύπου SecA (μία φορά περίπου) (σχήμα 17). Γενικά όπως θα δούμε και παρακάτω στη συζήτηση η SecA::788-789 έχει λιγότερο έντονο φαινότυπο από την SecAΔ782-796 (η πρώτη είναι απλά επικρατής ενώ η δεύτερη ισχυρά επικρατής, πίνακας σχήμα 22) .

Πρέπει να σημειωθεί ότι θα ήταν φρόνημο να γίνουν σημειακές μεταλλαγές στη SecA , σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής που λείπει από την SecAΔ782-796 . Αυτό θα επέτρεπε να δειχθεί ότι ο φαινότυπος τους παραμένει ο ίδιος προκειμένου να ενισχυθεί η άποψη της σημασίας της συγκεκριμένης περιοχής και κατ'επέκταση και του MotifXIII στη ρύθμιση της βασικής δραστηριότητας ATPάσης της SecA . Και αυτό γιατί δεν μπορεί ακόμα να αποκλεισθεί οριστικά η πιθανότητα ότι η έλλειψη και πολύ περισσότερο η προσθήκη στην παραπάνω περιοχή ενός μικρού πεπτιδίου δημιουργεί τον παραπάνω φαινότυπο . Ότι δηλαδή προκαλείται τέτοια δραματική αλλαγή στην πρωτεΐνη που διαταράσσει σε σημαντικό βαθμό την οργάνωση της C-περιοχής της SecA . Στη διάρκεια της παρούσας εργασίας έχει ήδη αρχίσει μία τέτοια προσπάθεια αντικατάστασης των αμινοξέων που σημειώνονται στο σχήμα 23 με αστερίσκο, από αλανίνη και η εργασία αυτή βρίσκεται σε προκαταρκτικό στάδιο . Ο έλεγχος της λειτουργικότητας *in vivo* των παραπάνω παραγόμενων σημειακά μεταλλαγμένων SecA (έλεγχος γενετικής συμπληρωματικότητας) , είναι μία καλή αρχή για την περαιτέρω βιοχημική μελέτη τους . Για να βγούν περισσότερες πληροφορίες για το πως δρα η C-περιοχή της SecA και πως επηρεάζει την λειτουργία της , γίνεται κατασκευή κατασκευή γονιδίων που είτε παράγουν μόνο μια μεταλλαγμένη C-περιοχή , είτε παράγουν μόνο μια μεταλλαγμένη N-περιοχή , είτε τέλος παράγουν ολόκληρη SecA με μεταλλαγές και στην N-και στην C-περιοχή και ακολουθεί μελέτη των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους .

3.1 HIS-P34-SecAΔ782-796 και HIS-P34-SecA::788-789 πρωτεΐνες .

Η κατασταλτική δράση της C-περιοχής της SecA στη βασική δραστηριότητα ATPάσης της , πιστοποιήθηκε άμεσα στο εργαστήριο (Karamanou et all, υπό ετοιμασία) μετά από προσθήκη P34-SecA σε P70-SecA και μείωση της αυξημένης ATPάσης της τελευταίας παράλληλα με τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ τους . Για να ελεγχθεί

Map of SecAD782-796 and SecA::788-789

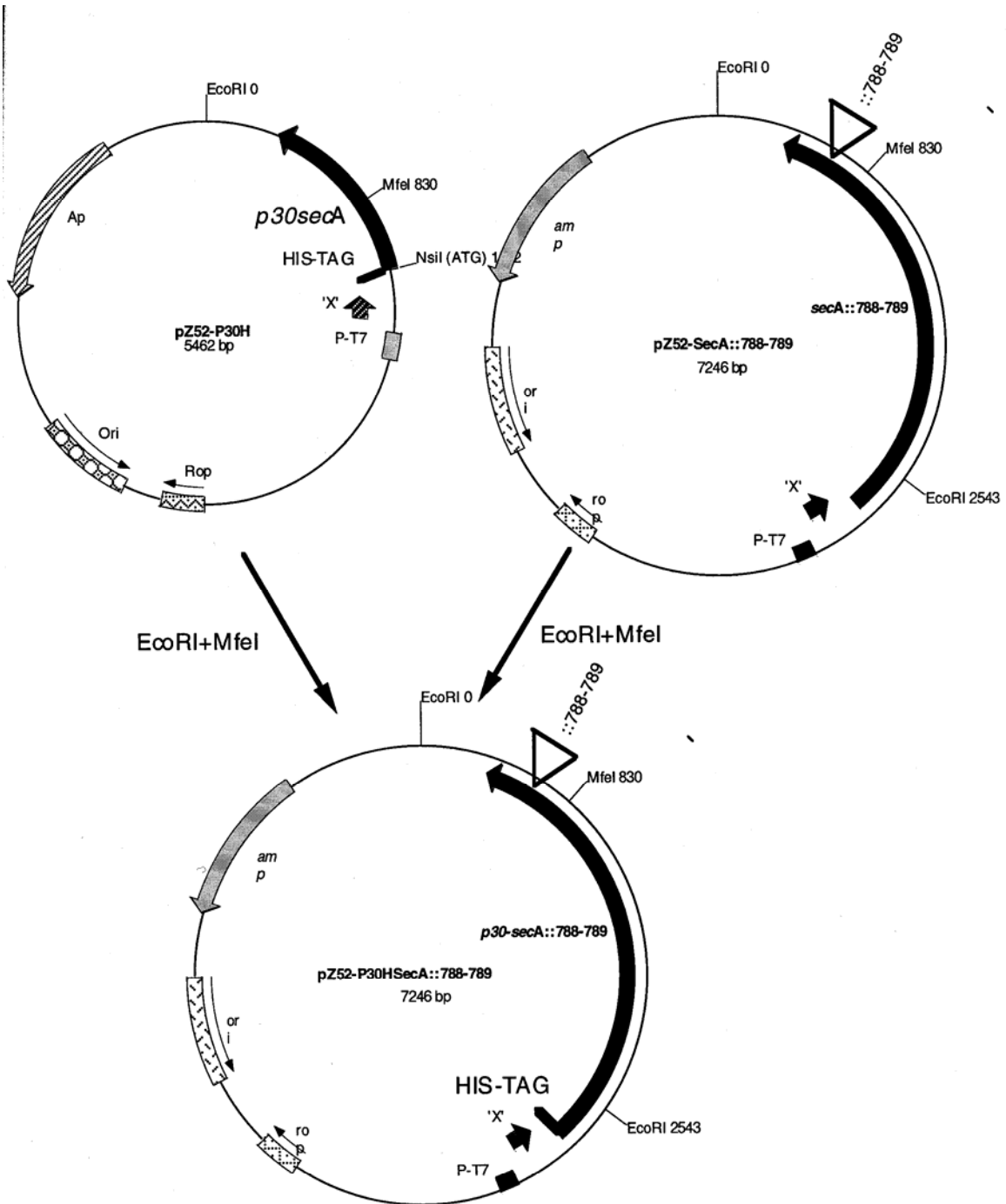


Σχήμα 23: Παρουσιάζονται οι σημειακές μεταλλαγές στο μοτίβο XIII με *.

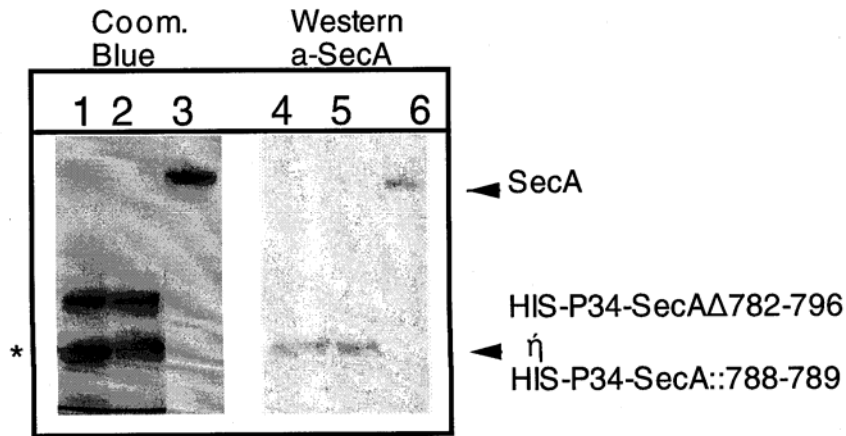
περαιτέρω αυτή η υπόθεση και να ισχυροποιηθεί ακόμα περισσότερο πρέπει να γίνει και προσθήκη P34-SecA Δ 782-796 όπως και P34-SecA::788-789 στην P70-SecA . Από τις ενδογενείς ATPάσες των ολόκληρων πρωτεϊνών αναμένεται στην πρώτη περίπτωση διατήρηση της αυξημένης ATPάσης της SecA (πρωτεΐνη με μεταλλαγμένη C-περιοχή) και στη δεύτερη μείωση – μικρότερη όμως απ' αυτή που προκαλεί η αγρίου τύπου P34-SecA (πρωτεΐνη με μεταλλαγμένη C-περιοχή αλλά με λιγότερο ισχυρό φαινότυπο απ'ότι προηγουμένως) .

Γεννήθηκε λοιπόν η ανάγκη για παραγωγή των παραπάνω μεταλλαγμένων P34-SecA πρωτεϊνών και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιείται κατασκευή των *his-p34secA Δ 782-796* και *his-p34secA::788-789* γονιδίων . (σχήμα 24) . Συγκεκριμένα γίνεται υποκλωνοποίηση ενός τμήματος DNA που περιλαμβάνει την μία ή την άλλη από τις παραπάνω μεταλλαγές από το pZ52-SecA Δ 782-796 ή το pZ52-SecA::788-789 πλασμίδιο στο pZ52P30SecAH πλασμίδιο . Και τα τρία πλασμίδια πέπτονται με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και MfeI και από τα μεν πρώτα απομονώνεται ένα 830 bp τμήμα DNA που περιέχει την κατάλληλη μεταλλαγή , από το δε τρίτο ένα 4602 bp τμήμα DNA στο οποίο γίνεται η υποκλωνοποίηση του 830 bp τμήματος .

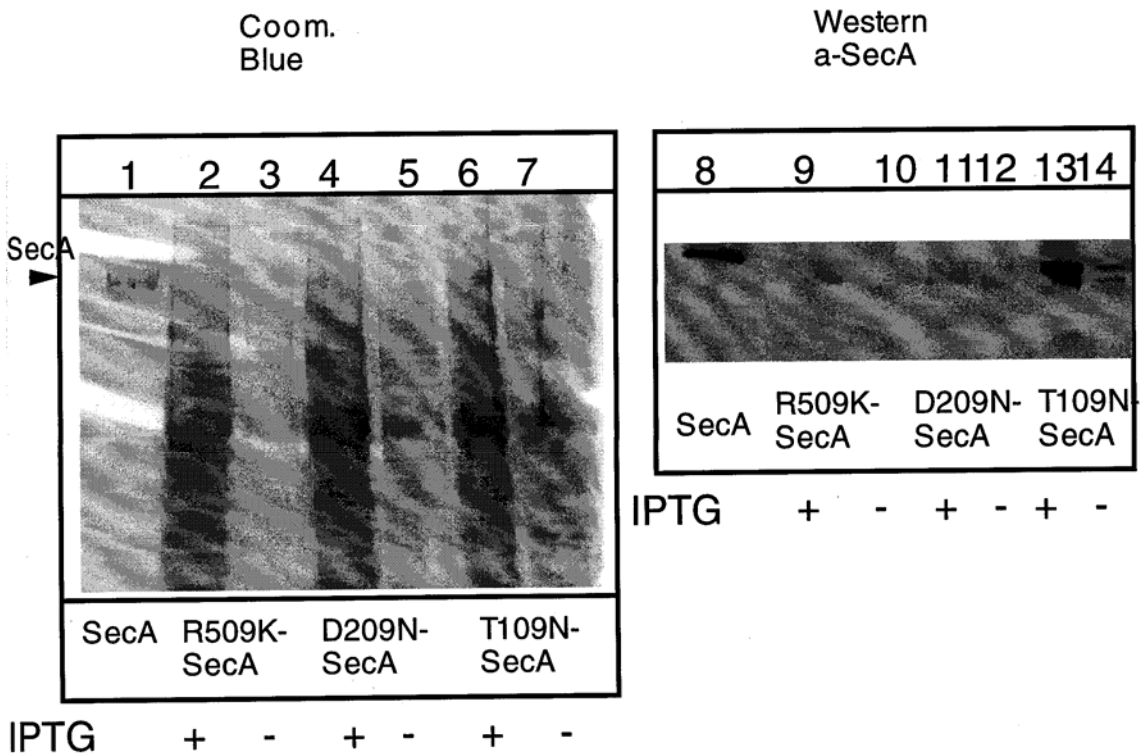
Για να μελετηθούν οι πρωτεΐνες που παράγονται από τα παραπάνω γονίδια (η έκφραση των πρωτεϊνών τους ελέγχεται *in vivo* όπως και προηγουμένως , αλλά δεν παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα) ακολουθεί καθαρισμός των πρωτεϊνών τους με τη χρησιμοποίηση κολώνας Νικελίου η οποία δεσμεύει τις ιστιδίνες που εντοπίζονται στο αμινοτελικό τους άκρο Συγκεκριμένα σε ρητίνη Νικελίου-NTA φορτώνεται σημαντική ποσότητα υπερκειμένου κυτταρικού εκχυλίσματος με υπερεκφρασμένες τις παραπάνω πρωτεΐνες . Ακολουθούν πλύσεις της ρητίνης με κατάλληλο διάλυμα και έκλυση των δεσμευμένων στην κολώνα πρωτεϊνών (περισσότερες πληροφορίες για τον παραπάνω καθαρισμό δίνονται στα Υλικά και μέθοδοι) . Τα κλάσματα που λαμβάνονται δεν είναι καθαρά και εκτός από τις μεταλλαγμένες P34-SecA πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τουλάχιστον άλλη μία κύρια πρωτεΐνη που μάλλον πρέπει να αλληλεπιδρά με την P34-SecA και έτσι συναπομονώνονται μαζί (σχήμα 25 πηγάρια 2, 3) . Πρέπει να γίνουν περαιτέρω προσπάθειες καθαρισμού των μεταλλαγμένων HIS-P34-SecA πρωτεϊνών προκειμένου να μελετηθούν αναλυτικότερα.



Σχήμα 24: Υποκλωνοποίηση ενός EcoRI-Mfel τμήματος από το pZ52-SecA::788-789 στο pZ52-P30H πλασμίδιο. Με όμοιο τρόπο πραγματοποιείται και η υποκλωνοποίηση του αντίστοιχου τμήματος από το pZ52-SecAΔ782-796 πλασμίδιο.



Σχήμα25: Εκφραση HIS-P34-SecAΔ782-796 και HIS-P34-SecA::788-789. Στη χρώση με Coomassie φαίνεται το πολυπεπτίδιο (*) που συναπομονώνεται με τις παραπάνω πρωτεΐνες και από την οποία πρέπει να απαλλαγούν για να μελετηθούν βιοχημικά.

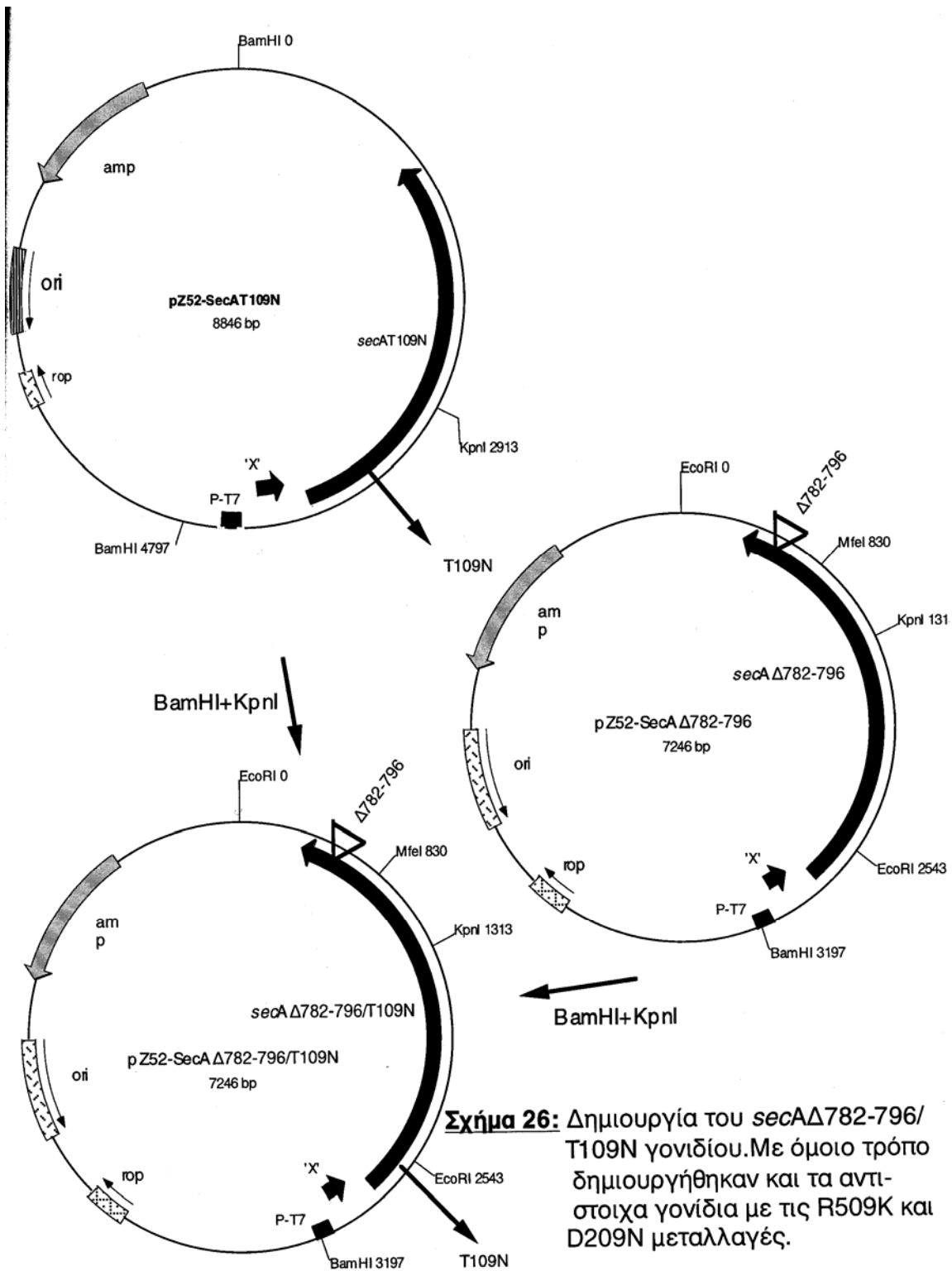


Σχήμα 27: Εκφραση T109N-SecA R509N-SecA και D209N-SecA. Υπερεκφράζεται μόνο η T109N-SecA.

3.2 SecAT109N/Δ782-796 , SecAR509K/Δ782-796 και SecAD209N/Δ782-796 πρωτεΐνες.

Εν συνεχεία, προκειμένου να αναλυθεί ως ένα σημείο ο τρόπος δράσης της C-περιοχής της SecA , αν δηλαδή ασκεί την επίδραση της στην NBD1 ή στην NBD2 θέση ή και στις δύο , έγινε προσπάθεια δημιουργίας των παρακάτω διπλά μεταλλαγμένων πρωτεϊνών , SecAT109N/Δ782-796 , SecAR509K/Δ782-796 και SecAD209N/Δ782-796 που φέρουν και την Δ782-796 μεταλλαγή στη C-περιοχή τους αλλά και σημειακές αντικαταστάσεις στις NBD1 και NBD2 θέσεις δέσμησης νουκλεοτιδίων . Είναι γνωστό ότι πολλές ATPάσες περιέχουν χαρακτηριστικά μοτίβα αλληλουχίας αμινοξέων που συνεισφέρουν στη δέσμηση νουκλεοτιδίου , στη δέσμηση του Mg^{2+} και στην υδρόλυση του ATP . Τα μοτίβα αυτά είναι τα A και B Walker box , με γνωστές συναινετικές αλληλουχίες, (Walker et al, 1982). Οι παραπάνω μεταλλαγές T109N , R509K και D209N προκλήθηκαν σε τέτοια μοτίβα , σε συντηρημένα μέσα σ'αυτά αμινοξέα (Mitchell , Oliver , 1993). Τονίζεται ότι οι μεταλλαγές αυτές αλλάζουν τις διάφορες δραστηριότητες ATPάσης της SecA (βασική , μεμβρανική και ATPάση μετατόπισης) . Έτσι ενώ η βασική δραστηριότητα ATPάσης της D209NSecA και της R509KSecA είναι ίδια με της αγρίου τύπου SecA η βασική δραστηριότητα ATPάσης της T109NSecA είναι 46 φορές μεγαλύτερη .

Γίνεται λοιπόν κατασκευή των *secAT109N/Δ782-796* , *secAR509K/Δ782-796* και *secAD209N/Δ782-796* γονιδίων (σχήμα 26) . Συγκεκριμένα γίνεται υποκλωνοποίηση ενός 1884 bp NcoI DNA τμήματος που περιέχει την T109N , R509K και D209N μεταλλαγή από το pZ52SecA πλασμίδιο με την αντίστοιχη μεταλλαγή (που έχει υποστεί πέψη με NcoI) στο 5360 bp τμήμα DNA που απομονώνεται από το pZ52SecAΔ782-796 πλασμίδιο μετά από την πέψη του επίσης με NcoI . Στη συνέχεια ελέγχεται η έκφραση των πρωτεϊνών των παραπάνω γονιδίων *in vivo* (σχήμα 27) . Από το παραπάνω σχήμα φαίνεται ότι υπερεκφράζεται μόνο η T109NSecA πρωτεΐνη (πηγάρια 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7) . Οι άλλες δύο πρωτεΐνες προφανώς δεν είναι πολύ σταθερές . Ακολουθεί προσπάθεια καθαρισμού της T109NSecA πρωτεΐνης σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού της αγρίου τύπου SecA και όλων των απλά μεταλλαγμένων SecA πρωτεϊνών (που θα αναφερθεί στα υλικά και μέθοδοι) , χωρίς αποτέλεσμα όμως (δεδομένα που δεν



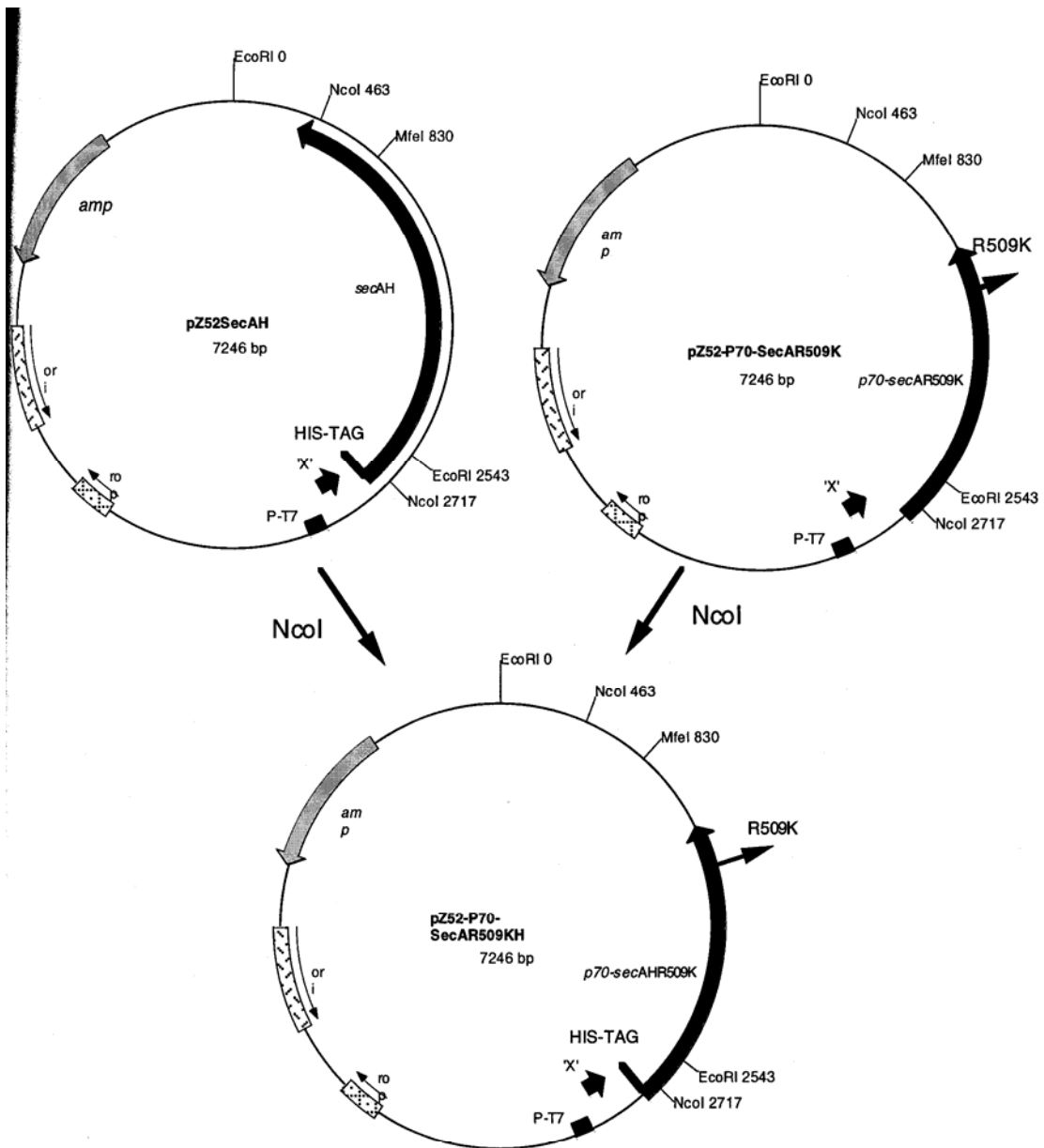
Σχήμα 26: Δημιουργία του *secA*Δ782-796/T109N γονιδίου. Με όμοιο τρόπο δημιουργήθηκαν και τα αντιστοιχα γονίδια με τις R509K και D209N μεταλλάξεις.

παρουσιάζονται) . Είναι πιθανό να έχουν αλλάξει οι χρωματογραφικές ιδιότητες της διπλά μεταλλαγμένης σε σχέση με την απλά μεταλλαγμένη SecA , οπότε πρέπει να τροποποιηθεί το πρωτόκολλο καθαρισμού για να καθαριστεί η πρωτεΐνη και να μελετηθεί βιοχημικά .

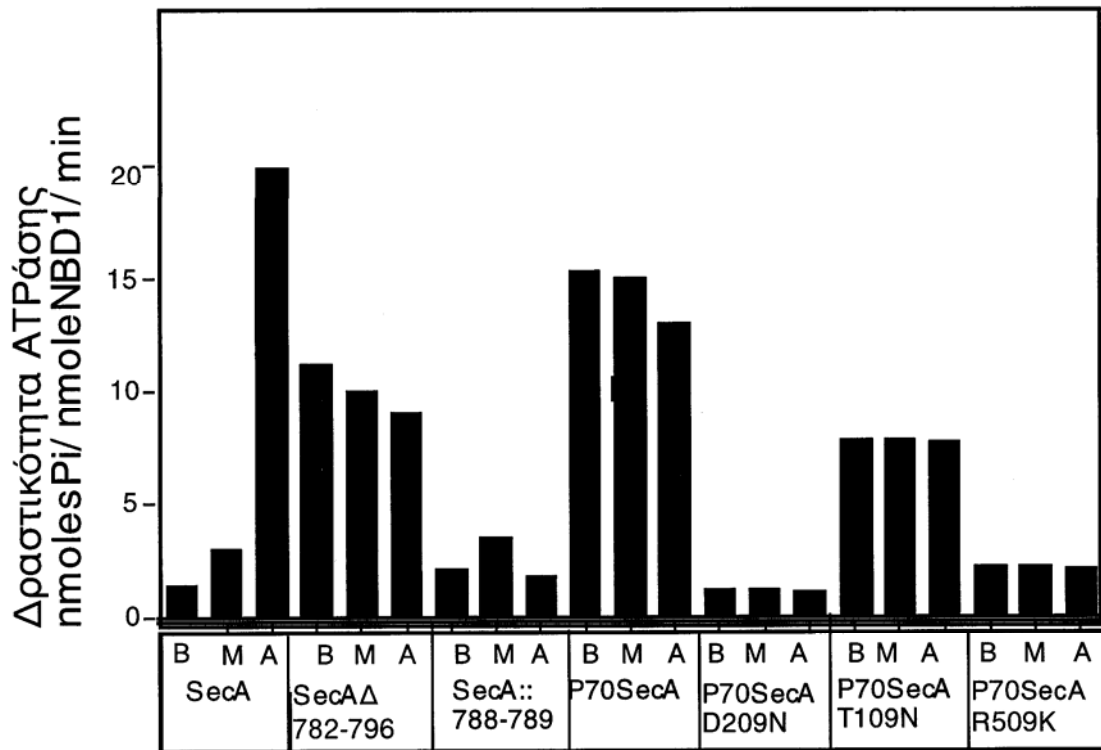
3.3 His-P70-SecAD209N, His-P70-SecAR509K και His-P70-SecAT109N πρωτεΐνες.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η αυξημένη δραστηριότητα ATPάσης της P70-SecA δεν είναι τυχαίο γεγονός της απομάκρυνσης απ' αυτήν της C-περιοχής της , αλλά παρουσιάζεται επειδή δεν ασκείται πια η καταλυτική δράση της C-περιοχής , πρέπει να δειχθεί ότι αυτή η αυξημένη ATPάση τροποποιείται από αλλαγές στην NBD1 ή στην NBD2 θέση . Γι' αυτό το λόγο γίνεται κατασκευή των *his-p70-secAD209N* , *his-p70-secAR509K* και *his-p70-secAT109N* γονιδίων (σχήμα 28) . Συγκεκριμένα γίνεται υποκλωνοποίηση ενός 2599 bp NcoI τμήματος DNA που περιέχει την T109N , R509K και D209N μεταλλαγή από το pZ52P70SecA πλασμίδιο με την αντίστοιχη μεταλλαγή (που έχει κοπεί με NcoI) , το οποίο περιέχει ένα κωδικό λήξης μέσα στο γονίδιο της SecA στο τέλος της P70 περιοχής , στο 4647 bp τμήμα DNA που απομονώνεται από το pZ52SecAH πλασμίδιο μετά από την πέψη του επίσης με NcoI . Στη συνέχεια γίνεται έλεγχος της έκφρασης των πρωτεϊνών των παραπάνω γονιδίων (δεδομένα που δεν παρουσιάζονται) και ακολουθεί καθαρισμός τους (παρουσιάζεται αναλυτικά στα υλικά και μέθοδοι) . Κατόπιν υπολογίζεται η βασική δραστηριότητα ATPάσης των παραπάνω πρωτεϊνών προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ενδογενής ATPάση της P70-SecA τροποποιείται παρουσία μεταλλαγών στις θέσεις δέσμευσης νουκλεοτιδίων . Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 29 , πράγματι η αυξημένη βασική δραστηριότητα ATPάσης της P70-SecA δεν είναι τυχαίο αποτέλεσμα της αφαίρεσης από την ολόκληρη SecA της C-περιοχής της αφού όταν υπάρχει βλάβη στην NBD1 ή στην NBD2 θέση (δεν γίνεται δέσμευση ATP ή στη μια ή στην άλλη) όπως στην HIS-P70-SecAD209N και στη HIS-P70-SecAR509K αντίστοιχα η αυξημένη βασική δραστηριότητα ATPάσης της P70-SecA πέφτει . Περισσότερη ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων γίνεται στη συζήτηση .

Σημειώνεται ότι το ίδιο συμβαίνει και στην HIS-P70-SecAT109N που παρουσιάζει μεταλλαγή στην NBD1 θέση αλλά σε μικρότερο βαθμό .



Σχήμα 28: Δημιουργία του *p70secAHR509K* γονιδίου. Με όμοιο τρόπο γίνεται και η δημιουργία των *p70secAHT109N* και *p70secAHD209N* γονιδίων.



Σχήμα 29 : Βασική, μεμβρανή και ΑΤΡάση μετατόπισης της SecA και των διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της .
 B: Βασική ΑΤΡάση ,M: μεμβρανή ΑΤΡάση και A: ΑΤΡάση μετατόπισης.

Κεφάλαιο 4

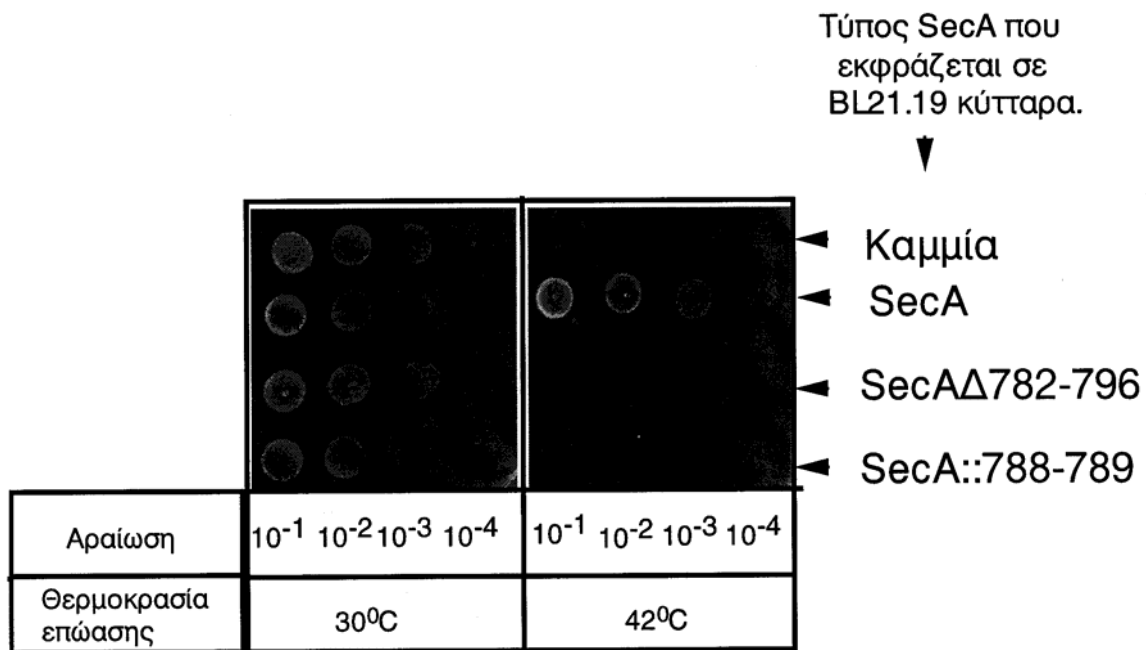
Ανάλυση του ρόλου της C-περιοχής της SecA κατά την μετατόπιση (translocation) πρωτεϊνών ;

Ποιός είναι ο ρόλος της C-περιοχής της SecA κατά την διάρκεια της μετατόπισης πρωτεϊνών ; Για να απαντηθεί αυτό το ερώτημα προχωρούμε από την μελέτη της SecA σε διάλυμα (που γνωρίζουμε ότι αλληλεπιδρά με ATP) σε *in vivo* πειράματα ή σε *in vitro* αλλά σε περιβάλλον που προσεγγίζει περισσότερο την κατάσταση που επικρατεί κατά την μετατόπιση πρωτεϊνών , προκειμένου να δούμε αν τα αρχικά συμπεράσματα που προέκυψαν έχουν νόημα μέσα στο κύτταρο . Το πρώτο ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι αν οι SecAΔ782-796 και SecA::788-789 πρωτεΐνες είναι λειτουργικές *in vivo* . Γι' αυτό το λόγο επιτελείται το ακόλουθο πείραμα συμπληρωματικότητας (complementation test) (σχήμα 30) . Σε BL21.19 κύτταρα γίνεται μετασχηματισμός τεσσάρων τύπων πλασμιδίων :

- 1.pZ52 SecAΔ782-796 (περιέχει το γονίδιο για την SecAΔ782-796) .
- 2.pZ52 SecA::788-789 (περιέχει το γονίδιο για την SecA::788-789) .
- 3.pZ52 SecA (περιέχει το γονίδιο για την φυσικού τύπου SecA) .
- 4.pET5 (δεν περιέχει γονίδιο για SecA) .

Τα γονίδια που παράγουν τις παραπάνω μορφές της SecA πρωτεΐνης βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του T7 υποκινητή . Στον T7 υποκινητή δρα η T7 πολυμεράση η οποία στο κύτταρο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του lac υποκινητή . Υπερεκφράζονται λοιπόν οι διάφορες μορφές της SecA πρωτεΐνης όταν υπερεκφράζεται και η T7 πολυμεράση δηλαδή όταν γίνεται προσθήκη IPTG . Επειδή ο T7 υποκινητής παρουσιάζει σημαντικό επίπεδο μεταγραφής ακόμη και απουσία IPTG , στην περίπτωση αυτή παράγεται αρκετή T7 πολυμεράση και έχουμε ικανοποιητική έκφραση των διαφόρων μορφών SecA . Έτσι στο συγκεκριμένο πείραμα δεν χρησιμοποιούμε τρυβλία με IPTG .

Μετά τον μετασχηματισμό των παραπάνω πλασμιδίων στα BL21.19 κύτταρα προκύπτουν τέσσερις τύποι BL21.19 κυττάρων . Ετοιμάζονται μικρές καλλιέργειες (5 ml) των παραπάνω τύπων κυττάρων και αφήνονται να αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας . Την άλλη μέρα αφού εξισωθούν οι οπτικές πυκνότητες των παραπάνω καλλιεργειών (αραιώση όπου χρειάζεται με LB) ετοιμάζονται τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} από κάθε καλλιέργεια (κάθε είδος κυττάρου) , οι



Σχήμα 30: Πείραμα γενετικής συμπληρωματικότητας προκειμένου να δούμε αν οι παραπάνω μορφές της SecA είναι λειτουργικές *in vivo*.

οποίες τοποθετούνται σε δύο τρυβλία με θρεπτικό υλικό LB και αμπικιλίνη (σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml) .Τα τρυβλία επωάζονται για 16-18 ώρες στους 30⁰C ή στους 42⁰C , οπότε και γίνεται ο έλεγχος της λειτουργικότητας των μεταλλαγμένων μορφών της SecA *in vivo* .

Συγκεκριμένα τα BL21.19 κυττάρα περιέχουν μία μεταλλαγμένη μορφή χρωμοσωμικής SecA με πρόωρο κωδικό λήξης . Στα ίδια κύτταρα όμως υπάρχει και μία δεύτερη μεταλλαγή σε μεταφορικό RNA (Ts tRNA) που αφήνει στο πρόωρο κωδικό λήξης ένα αμινοξύ με αποτέλεσμα να παράγεται λειτουργική SecA πρωτεΐνη από το χρωμόσωμα . Το παραπάνω όμως μεταφορικό RNA έχει την ιδιότητα της καταστολής μόνο σε χαμηλή θερμοκρασία (έως 30⁰C) με αποτέλεσμα σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 30⁰C π.χ 42⁰C να μην παράγεται χρωμοσωμική SecA . Αναπτύσσοντας λοιπόν τους παραπάνω τύπους BL21.19 κυττάρων στους 42⁰C ελέγχουμε κατά πόσο οι μεταλλαγμένες SecA που παράγονται από τα παραπάνω πλασμίδια μπορούν να συμπληρώσουν την μη λειτουργική χρωμοσωμική SecA , δηλαδή κατά πόσο είναι λειτουργικές ή όχι *in vivo* .

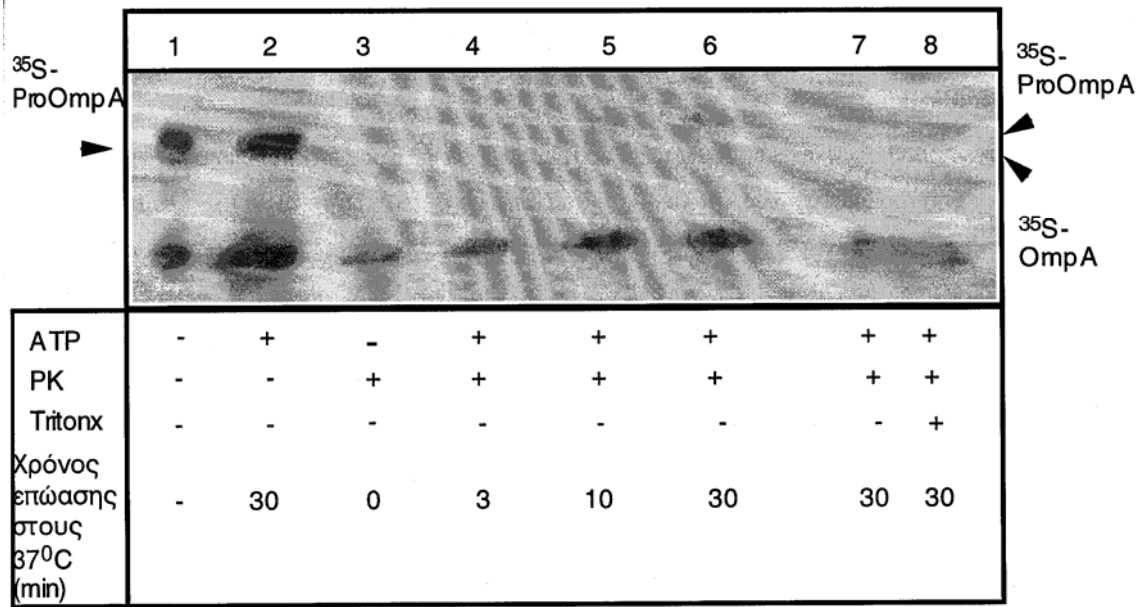
Από το Σχήμα 30 φαίνεται ότι στους 30⁰C όλοι οι τύποι BL21.19 κυττάρων αναπτύσσονται κανονικά , καθώς παράγεται λειτουργική χρωμοσωμική SecA (πιάτο μάρτυρας) . Σημειώνεται εδώ ότι παρόλο που η SecAΔ782-796 είναι επικρατής μεταλλαγή και κρουεοαίσθητη έναντι της χρωμοσωμικής SecA , εντούτοις τα BL21.19 κυττάρα με το pZ52 SecAΔ782-796 πλασμίδιο αναπτύσσονται φυσιολογικά στους 30⁰C . Στους 22⁰C θα υπήρχε πρόβλημα ανάπτυξης όπως επίσης και στους 30⁰C , αν είχαμε υπερέκφραση της μεταλλαγμένης SecA (+IPTG) . Στους 42⁰C αναπτύσσονται φυσιολογικά μόνο τα BL21.19 κυττάρα με το pZ52 SecA πλασμίδιο (σχήμα 30) καθώς παρόλο που δεν υπάρχει λειτουργική χρωμοσωμική SecA παράγεται λειτουργική SecA από το πλασμίδιο . Όπως αναμενόταν τα BL21.19 κυττάρα με το pET5 πλασμίδιο δεν αναπτύσσονται στους 42⁰C , γιατί ούτε το πλασμίδιο ούτε το χρωμόσωμα δεν εκφράζει SecA . Όσον αφορά τα BL21.19 κυττάρα με τις δύο μεταλλαγμένες μορφές SecA επίσης δεν αναπτύσσονται στους 42⁰C . Συμπεραίνουμε ότι η SecAΔ782-796 και η SecA::788-789 δεν είναι λειτουργικές *in vivo* .

Για να προσδιοριστεί πιο συγκεκριμένα η μοριακή δυσλειτουργία των SecA Δ 782-796 και SecA::788-789 πρωτεϊνών, επιτελούνται πειράματα *in vitro* αλλά σ'ένα περιβάλλον που προσεγγίζει περισσότερο την πραγματικότητα (π.χ παρουσία μεμβρανών , SecY , προπρωτεΐνης) . Πρώτα πρώτα υπολογίζονται τα διάφορα είδη ATPάσης των διαφόρων μορφών της SecA πρωτεΐνης , προκειμένου να φανεί πως επηρεάζονται οι παραπάνω πρωτεΐνες από τις μεμβράνες και το υπόστρωμα στην δραστικότητα ATPάσης τους. Συγκεκριμένα υπολογίζεται η μεμβρανική ATPάση (δηλαδή η ATPάση παρουσία μεμβρανών , Lill et al 1989) για την P70-SecA και τις μεταλλαγμένες μορφές της P70-SecAT109N , P70-SecAD209N και P70-SecAR509N , όπως και για την αγρίου τύπου SecA και την SecA Δ 782-796 και SecA::788-789 και συγκρίνεται με την αντίστοιχη βασική ATPάση κάθε πρωτεΐνης (σχήμα 29) . Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται είναι ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια μεμβρανών, κυττάρων *E.coli* στελέχους KM9 (στο οποίο τα γονίδια της F1F0 ATPάσης έχουν αφαιρεθεί) και έχουν προκύψει μετά από σπάσιμο των παραπάνω κυττάρων υπό υψηλή πίεση . Τα κυστίδια αυτά περιέχουν SecYEG μεμβρανικές πρωτεΐνες δεν έχουν όμως SecA καθώς έχουν υποστεί κατεργασία με ουρία . Από το Σχήμα 29 φαίνεται ότι οι μεμβράνες δεν επηρεάζουν την ATPάση ούτε της P70-SecA ούτε των μεταλλαγμένων μορφών της . Ομοίως η μεμβρανική ATPάση της SecA Δ 782-796 διατηρείται στα ίδια περίπου επίπεδα με την βασική ATPάση της ενώ η μεμβρανική ATPάση της SecA::788-789 αυξάνεται περίπου 1.7 φορές (λίγο) σε σχέση με την βασική της ATPάση . Επομένως οι μεμβράνες δεν φαίνεται να επηρεάζουν τις παραπάνω πρωτεΐνες με εξαίρεση την SecA::788-789 της οποίας η ATPάση αυξάνεται λίγο παρουσία τους . Υπολογίζεται επιπλέον η ATPάση μετατόπισης (ATPάση παρουσία μεμβρανών και υποστρώματος, Lill et al, 1989) και συγκρίνεται με την αντίστοιχη μεμβρανική ATPάση κάθε πρωτεΐνης . Από το σχήμα 29 φαίνεται ότι καμμία από τις παραπάνω πρωτεΐνες , πλην της αγρίου τύπου SecA δεν έχει ATPάση μετατόπισης και επομένως το υπόστρωμα δεν ασκεί καμμία επίδραση στη μεμβρανική ATPάση .

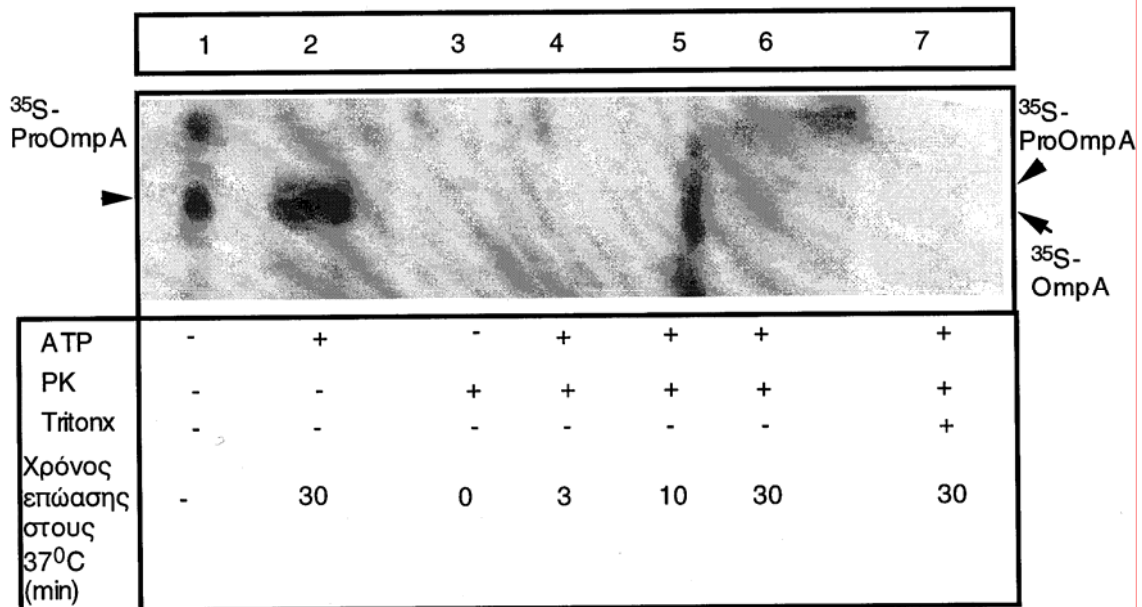
Ακολουθούν πειράματα με τα οποία ελέγχεται πιο άμεσα η δράση των μεμβρανών , της προπρωτεΐνης και της συνοδού πρωτεΐνης SecB στη δραστικότητα των διαφόρων μορφών SecA και στην ικανότητα τους να μετατοπίζουν πρωτεΐνες

Συγκεκριμένα πραγματοποιείται έλεγχος της μετατόπισης ραδιενεργούς προπρωτεΐνης ($^{35}\text{S-ProOmpA}$) στο εσωτερικό BL21.SecYEG μεμβρανών (πρόκειται για ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια που έχουν προκύψει όπως και στην περίπτωση των KM9 μεμβρανών με τη διαφορά ότι τα βακτηριακά κύτταρα είναι τα BL21), από τις διάφορες μορφές SecA, παρουσία ATP και SecB. Από την ανίχνευση ή όχι προπρωτεΐνης και ώριμης πρωτεΐνης (η προπρωτεΐνη μετατρέπεται σε ώριμη πρωτεΐνη μετά από αποκοπή του οδηγού πεπτιδίου της από την μεμβρανική Πεπτιδάση του οδηγού πεπτιδίου) διαπιστώνουμε την ικανότητα των διαφόρων μορφών SecA να μετατοπίζουν ή όχι πρωτεΐνες *in vitro* και άρα και *in vivo*. Έτσι οι παραπάνω μεμβράνες (που έχουν υποστεί επεξεργασία με ουρία για να μην έχουν ενδογενή SecA) επωάζονται με τις διάφορες μορφές SecA, με ATP, SecB και ραδιενεργή προπρωτεΐνη, στους 37°C , προκειμένου να υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες για μετατόπιση πρωτεϊνών. Κατόπιν οι πρωτεΐνες που μένουν εκτός των κυστιδίων και δεν μετατοπίζονται, πρωτεολύονται μετά από επώαση με πρωτεϊνάσηK. Τα κυστίδια συλλέγονται με κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ (TCA) και τα δείγματα φορτώνονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα. Μετά την αυτοραδιογραφία του πηκτώματος φαίνονται μόνο οι προστατευμένες από την πρωτεάση, $^{35}\text{S-ProOmpA}$ και $^{35}\text{S-OmpA}$, που μετατοπίζονται στο εσωτερικό των μεμβρανικών κυστιδίων (περισσότερες πληροφορίες για τα διάφορα βήματα της διαδικασίας δίνονται στα υλικά και μέθοδοι).

Στην αρχή γίνεται έλεγχος της μετατόπισης $^{35}\text{S-ProOmpA}$ από αγρίου τύπου SecA (σχήμα 31). Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα η αγρίου τύπου SecA μετατοπίζει την $^{35}\text{S-ProOmpA}$ μόνο παρουσία ATP και μάλιστα η μετατόπιση αυξάνεται με το χρόνο επώασης στους 37°C , από τα 3 έως τα 30 λεπτά (πηγάδια 3, 4, 5, 6, 7). Τονίζεται ότι στην αυτοραδιογραφία φαίνονται δύο πολυπεπτιδικές ζώνες που αντιστοιχούν στις μετατοπισμένες στο εσωτερικό των μεμβρανικών κυστιδίων $^{35}\text{S-ProOmpA}$ και $^{35}\text{S-OmpA}$. Αυτό συμβαίνει επειδή ένας αριθμός από τις μετατοπισμένες $^{35}\text{S-ProOmpA}$ υφίσταται αποκοπή της αλληλουχίας οδηγού από την μεμβρανική Πεπτιδάση του οδηγού πεπτιδίου και μετατρέπεται σε $^{35}\text{S-OmpA}$. Στο πηγάδι 2 της αυτοραδιογραφίας φαίνεται το σύνολο της μετατοπισμένης και μη $^{35}\text{S-ProOmpA}$ καθώς και της μετατοπισμένης και μη $^{35}\text{S-OmpA}$ (μόνο ένα τμήμα που περιλαμβάνει το πεπτιδίο οδηγό είναι αρκετό να μετατοπιστεί για να κοπεί η ProOmpA σε OmpA οπότε



Σχήμα31:Ελεγχος της μετατόπισης ^{35}S -ProOmpA από αγρίου τύπου SecA.

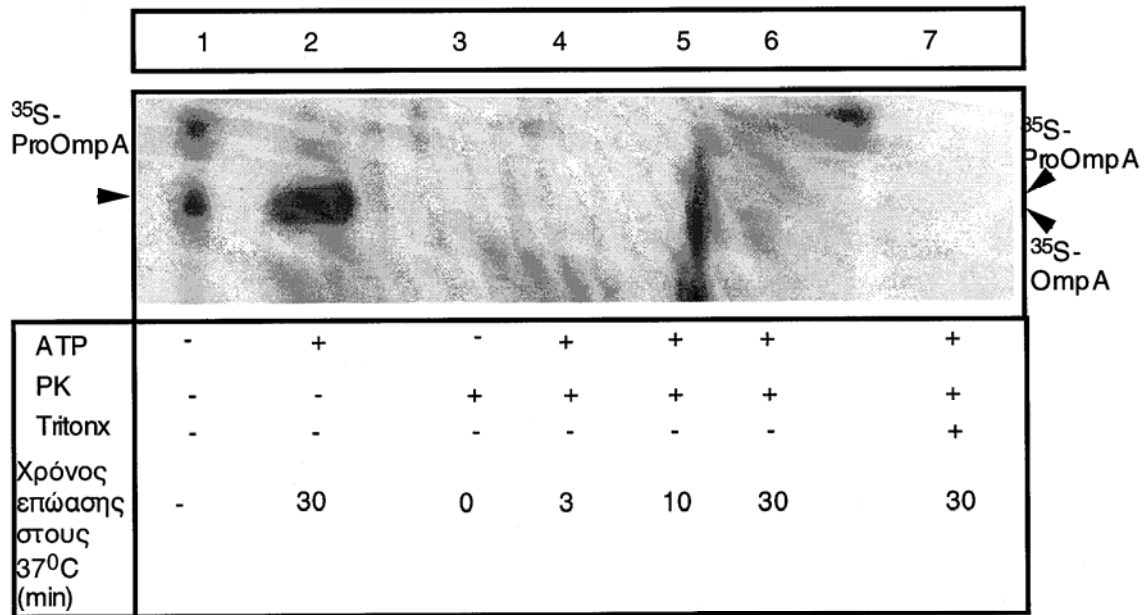


Σχήμα33:Ελεγχος της μετατόπισης ^{35}S -ProOmpA από SecA::782-76.

και μιλάμε για μη μετατοπισμένη OmpA) , αφού στο δείγμα που έχει φορτωθεί σ' αυτό το πηγάδι έχουν προστεθεί όλα τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για να γίνει μετατόπιση εκτός από πρωτεΐνάσηK . Στο πηγάδι 8 της αυτοραδιογραφίας αμέσως μετά την πρωτεΐνάσηK προστέθηκε TritonX100 σε τελική συγκέντρωση 0.1% . Το TritonX100 είναι μη ιοντικό απορρυπαντικό που διαλυτοποιεί τις μεμβράνες χωρίς να αποδιατάσει τις πρωτεΐνες οπότε διαπιστώνεται αν οι ^{35}S -ProOmpA και ^{35}S -OmpA που βλέπουμε στα προηγούμενα πηγάδια (4 , 5 , 6 , 7) μετατοπίζονται στο εσωτερικό των μεμβρανικών κυστιδίων και έτσι προστατεύονται από την πρωτεΐνάσηK , ή προστατεύονται για κάποιο άλλο άσχετο με την μετατόπιση λόγο . Στο συγκεκριμένο πείραμα φαίνεται ότι ισχύει η πρώτη περίπτωση . Η απόδοση της μετατόπισης είναι 35% (σύγκριση πηγαδιών 2 και 6).

Μπορούμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε τις παραπάνω μεμβράνες προκειμένου να διαπιστώσουμε αν γίνεται ή όχι μετατόπιση ^{35}S -ProOmpA από τις διάφορες μορφές της SecA , μιας και δεν διαθέτουν ενδογενή αγρίου τύπου SecA αλλά μπορούν να συμβάλλουν στη μετατόπιση προπρωτεΐνης αν προστεθεί σ'αυτές η αγρίου τύπου πρωτεΐνη .

Στη συνέχεια γίνεται έλεγχος της μετατόπισης ^{35}S -ProOmpA από SecA Δ 782-796 και SecA::788-789 (σχήμα 32 και 33 αντίστοιχα) . Αν παρατηρήσει κανείς στις δύο παραπάνω αυτοραδιογραφίες τα πηγάδια 3 , 4 , 5 και 6 (και στις δύο) στα οποία υπάρχουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για να γίνει μετατόπιση πρωτεϊνών και έχει προστεθεί και πρωτεΐνάσηK , θα πει ότι και οι δύο παραπάνω SecA δεν προάγουν μετατόπιση πρωτεϊνών . Παρατηρώντας όμως το πηγάδι 2 στο οποίο έχουμε πάλι μία πλήρη αντίδραση μετατόπισης , αλλά δεν έχει προστεθεί πρωτεΐνάσηK , βλέπουμε ^{35}S -OmpA . Το γεγονός αυτό υποδηλώνει είτε ότι γίνονται λίγοι μόνο κύκλοι μετατόπισης πρωτεϊνών από τις δύο παραπάνω μεταλλαγμένες SecA οπότε δεν βλέπουμε τα αποτελέσματά τους, παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πρωτεΐνάση K , είτε ότι λαμβάνει χώρα μετατόπιση ενός μόνο μικρού τμήματος της προπρωτεΐνης που περιλαμβάνει όμως το πεπτιδίο οδηγό με αποτέλεσμα να γίνεται αποκοπή του στο εσωτερικό κυστιδίου από την Πεπτιδάση οδηγό και να βλέπουμε ^{35}S -ProOmpA, μόνο πάλι απουσία πρωτεΐνάσης K, αφού το προστατευμένο από πρωτεάση μετατοπισμένο τμήμα έχει πολύ μικρό μέγεθος. Μεγαλύτερη ανάλυση γίνεται στη συζήτηση .



Σχήμα32:Ελεγχος της μετατόπισης ³⁵S-ProOmpA από SecA::782-76.

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι και η SecAΔ782-796 και η SecA::788-789 είτε επιτελούν μετατόπιση πρωτεϊνών με πολύ αργή κινητική είτε αφού μετατοπίσουν ένα μικρό μόνο τμήμα της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των κυστιδίων η αντίδραση σταματά. Και στις δύο περιπτώσεις η δυσλειτουργία των δύο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών εξηγεί την αδυναμία τους να λειτουργήσουν *in vivo*.

Κεφάλαιο 5-Συζήτηση.

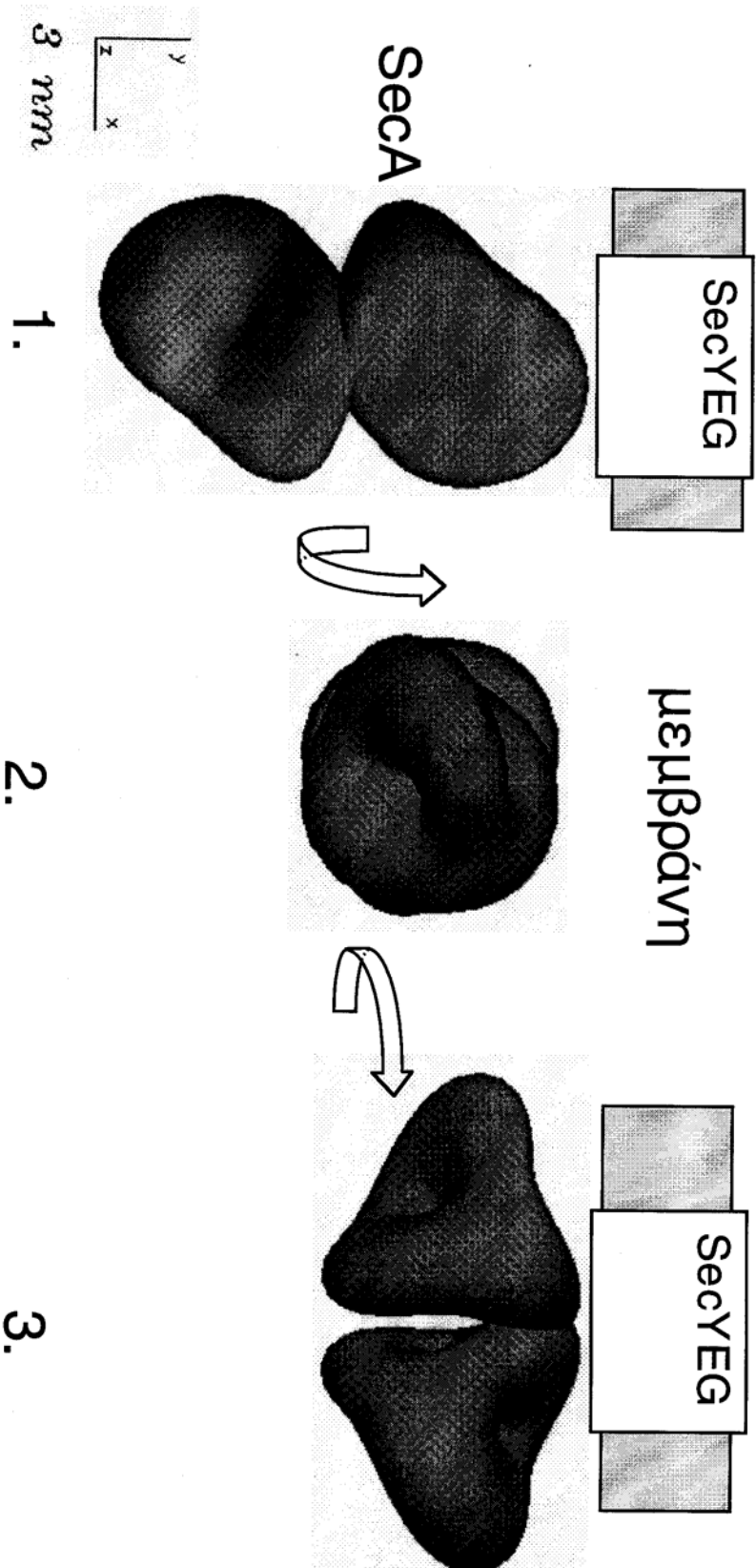
Σκοπός της εργασίας μου ήταν η ανάλυση του μηχανισμού λειτουργίας της SecA πρωτεΐνης .

Όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα ,προκαταρκτικά πειράματα στο εργαστήριο (σχήμα 8 και Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) υποδήλωναν τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτογενών περιοχών της SecA (N- και C-περιοχή) . Θεωρήθηκε λοιπόν σημαντικό να γίνει προσπάθεια να δειχθεί απ'ευθείας αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ της N- και C-περιοχής της SecA . Έγιναν λοιπόν πειράματα δέσμευσης της ^{35}S -P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34 (σχήμα 11) και της ^{35}S -P34SecA σε ακινητοποιημένη HIS-P70SecA (σχήμα 14) , με τα οποία δείχθηκε ότι η N- και η C-περιοχή της SecA αλληλεπιδρούν ισχυρά μεταξύ τους .

Αυτή η οργάνωση της SecA , με τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ της N- και C-περιοχής συμφωνεί με τη σφαιρική εικόνα που παρουσιάζουν τα μονομερή της SecA σε χαμηλής διακριτικότητας εικόνα του διμερούς της μετά από SAXS (small angle x-ray scattering) (Shilton et al. ,1998) (σχήμα 34) . Επίσης μία τέτοια οργάνωση εξηγεί το γιατί δέσμευση ATP από αμινοτελικά τμήματα της SecA πραγματοποιείται μόνο παρουσία και καρβοξυτελικών της τμημάτων (Matsuyama et al,1990) , όπως επίσης εξηγεί πειράματα με τα οποία αλλαγή ενός ασπαρτικού αμινοξέος στη θέση 200 που εντοπίζεται το κουτί Walker B της NBD1 θέσης και θεωρείται υποκαταστάτης για το Mg^{2+} , προκαλεί αλλαγή στο φθορισμό ενός αμινοξέος στη C-περιοχή της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα της τρυπτοφάνης στη θέση 760 .

Η αλληλεπίδραση όμως της N- και της C- περιοχής της SecA, έχει σημαντικό λειτουργικό ρόλο , όπως δείχθηκε στα αποτελέσματα και θα αναφερθεί και παρακάτω .

Προτού προχωρήσουμε όμως στη λειτουργική σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της N- και της C-περιοχής της SecA πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την διάρκεια των παραπάνω πειραμάτων διερεύνησης της αλληλεπίδρασης στο μόριο της SecA , επιβεβαιώθηκε και η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο C-τελικών περιοχών του παραπάνω μορίου (σχήμα 15) Οι Hirano et al 1996 έδειξαν ότι η περιοχή διμερισμού της SecA



Σχήμα 34. Χαμηλής διακριτικότητας δομή της SecA πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μετά από ανάδραση σκέδασης ακτίνων-X υπό μικρή γωνία (SAXS). Η δομή παρουσιάζεται υπό τρεις διαφορετικές οπτικές γωνίες. Η SecA παρουσιάζεται σε σύγκριση με το μεμβρανικό τμήμα SecYEG της τρανοδοκίας.

εντοπίζεται στη C-περιοχή της χρησιμοποιώντας αυθαίρετα κομμένα τμήματα αυτής της περιοχής . Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι κάτι τέτοιο συμβαίνει και με τη χρησιμοποίηση της ολόκληρης C-περιοχής της SecA (τμήμα 34kDa) επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη της περιοχής διμερισμού της στη , C-τελική περιοχή . Η σημασία του διμερισμού της SecA δεν είναι γνωστή . Το μόνο που είναι γνωστό είναι ότι η SecA απομονώνεται σαν διμερές ενώ υπάρχουν υποθέσεις για σύνδεση της ρύθμισης της μέσω διμερισμού . Αυτές οι υποθέσεις όμως ανακρούονται όπως θα αναφερθεί παρακάτω στη συζήτηση .

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η παραπάνω αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτογενών περιοχών της SecA (N-και C-περιοχής) έχει λειτουργική σημασία μελετήθηκαν μεταλλαγμένες στη C-περιοχή πρωτεΐνες της SecA . Έτσι παρατηρήθηκε ότι αν από την SecA αφαιρεθεί η C-περιοχή της (34kDa) συμβαίνει απορύθμιση στην υδρόλυση του ATP από την υπόλοιπη πρωτεΐνη , P70-SecA . Ενώ η ολόκληρη SecA,σε διάλυμα με ATP επιτελεί ένα κύκλο δέσμευσης και υδρόλυσης του , που της προσδίδει χαμηλή βασική δραστηριότητα ATPάσης , η P70-SecA επιτελεί πολλαπλούς κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης του ATP και έχει μία αυξημένη βασική δραστηριότητα ATPάσης (σχήμα 17) . Τα παραπάνω συμβαίνουν παρόλο που η αφαίρεση της C-περιοχής της SecA δεν αλλάζει δραματικά την διαμόρφωση της N- περιοχής της (κινητική θρυψινόλυσης της P70-SecA παρουσία και απουσία ATP καθώς και θρυψινόλυση παρουσία διαφόρων τύπων νουκλεοτιδίων δίδουν παρόμοια προφίλ μ'αυτά της ολόκληρης SecA , Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και επομένως δεν οφείλονται σε αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης από την αφαίρεση της C-περιοχής. Μπορεί λοιπόν κανείς να συμπεράνει ότι η C-περιοχή της SecA δεν χρειάζεται για απλούς κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης του ATP (η P70-SecA μπορεί και υδρολύει ATP) , αλλά αντίθετα καταστέλλει τη βασική δραστηριότητα ATPάσης της πρωτεΐνης (η P70-SecA έχει αυξημένη την παραπάνω δραστηριότητα σε σχέση με την SecA) .

Παρόλα αυτά επειδή η C-περιοχή της SecA (34kDa) αποτελεί ένα μεγάλο τμήμα της πρωτεΐνης (σχήμα 8) , η αφαίρεση της και η μελέτη πια της P70-SecA,δεν είναι απόλυτα ασφαλής και δεν αρκεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων σε σχέση με τη λειτουργία της C-περιοχής της SecA . Γι' αυτό έγινε προσπάθεια να εξαχθούν

συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο της C-περιοχής της SecA , από τη μελέτη μεταλλαγμένων σ' αυτή την περιοχή πρωτεϊνών .

Συγκεκριμένα μελετήθηκαν η SecA Δ 782-796 και η SecA::788-789 . Η μελέτη αυτών των μεταλλαγών κρίθηκε σημαντική επειδή είναι καταρχήν μεταλλαγμένες στο C-τελικό τμήμα της SecA και μάλιστα σε περιοχή που είναι συντηρημένη (μοτίβο XIII , σχήμα 19) , που περιλαμβάνεται στην προτεινόμενη θέση δέσμευσης της SecY πρωτεΐνης (Snyders et al, 1997) και πιθανά εντοπίζεται και η περιοχή ρύθμισης της δραστηριότητας ATPάσης της SecA .

Επιπρόσθετα η SecA Δ 782-796 και η SecA::788-789 είναι σταθερές πρωτεΐνες (ο εντοπισμός τους με Western δεν παρουσιάζει κανένα πρόβλημα αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται) . Από την άλλη μεριά είναι επικρατή μεταλλάγματα που προκαλούν σημαντικά προβλήματα στην εξαγωγή πρωτεϊνών (περισσότερες πληροφορίες για τις παραπάνω μεταλλαγές δίνονται στον πίνακα στο σχήμα 22 . Επικρατή μεταλλάγματα σ' ένα πολυπρωτεϊνικό σύστημα στη Γενετική συχνά δρουν « κλειδώνοντας » (καταλαμβάνοντας) κάποια θέση σ' αυτό το σύστημα και δεν αφήνουν έτσι να δράσει η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (Leberer et al , 1992 και Chang et al , 1997) . Όντας λοιπόν ημιλειτουργικές πρωτεΐνες η SecA Δ 782-796 και η SecA::788-789 η βιοχημική τους μελέτη, μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό πολλών από τις λειτουργικές θέσεις αλληλεπίδρασης της SecA με την προπρωτεΐνη όπως και με συστατικά της μηχανής εξαγωγής πρωτεϊνών καθώς η SecA συμμετέχει σ' ένα πολυπρωτεϊνικό σύστημα .

Επιπλέον η διαμόρφωση τους στο χώρο δεν αλλάζει σημαντικά σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA αφού πειράματα θρυψινόλυσης τους παρουσία διαφόρων τύπων νουκλεοτιδίων παρουσιάζουν παρόμοιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο με την αγρίου τύπου SecA (Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) . Επίσης τρέχουν στο ίδιο ύψος σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDS PAGE) και το πρότυπο τους είναι το ίδιο σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα (NATIVE PAGE) με την αγρίου τύπου SecA (Καραμάνου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) . Η τελευταία παρατήρηση υποδηλώνει ότι οι παραπάνω μεταλλαγμένες πρωτεΐνες είναι διμερή , όπως και η αγρίου τύπου SecA , κάτι που φαίνεται άλλωστε και από το τρέξιμο τους σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης μαζί με αγρίου τύπου SecA και εμφάνιση αντιστοιχών με αυτήν προτύπων. Τέλος οι παραπάνω μεταλλαγμένες πρωτεΐνες καθαρίζονται βιοχημικά με τον ίδιο τρόπο όπως και

η αγρίου τύπου πρωτεΐνη (π.χ δεσμεύονται σε ρητίνη Cibacron blue, περισσότερες πληροφορίες θα δοθούν στα υλικά και μέθοδοι) διατηρώντας έτσι τις ίδιες μ'αυτήν χρωματογραφικές ιδιότητες .

Μελετώντας λοιπόν τη βασική δραστικότητα ATPάσης των SecAΔ782-796 και SecA::788-789 βρέθηκε ότι η πρώτη έχει αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA , ενώ η δεύτερη έχει περίπου την ίδια (σχήμα 29) . Άρα λοιπόν ένα τμήμα πλέον στη C-περιοχή της SecA όπου εντοπίζονται οι παραπάνω μεταλλαγές (από το 780 έως το 800 αμινοξύ , σχήμα 19) και που δεν είναι απαραίτητο για απλούς κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης ATP (και οι δύο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες υδρολύουν ATP) είναι υπεύθυνο για την καταστολή της βασικής δραστικότητας ATPάσης της , χωρίς όμως να έχει να εξακριβωθεί ακόμα ο ακριβής μοριακός μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο . Μία υπόθεση που μπορεί να προταθεί είναι ότι η C-περιοχή της SecA σχηματίζοντας σύμπλοκο με την N-περιοχή της εμποδίζει την απομάκρυνση του παραγόμενου από την υδρόλυση του ATP , ADP , με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί καινούργιο ATP στην πρωτεΐνη και να επιτελείται ένας μόνο κύκλος υδρόλυσης ATP απ' αυτήν(το ADP εξάλλου, προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, σχήμα 8) . Για να ελεγχθεί η κατασταλτική δράση της C-περιοχής έχουν αρχίσει να γίνονται σημειακές μεταλλαγές στην παραπάνω περιοχή (σχήμα 23) και εξετάζεται αν ο φαινότυπος των αντίστοιχων πρωτεϊνών παραμένει ο ίδιος με της SecAΔ782-796 πρωτεΐνης . Αυτό συμβαίνει διότι ελλείψεις και ταυτόχρονες προσθήκες σε μια πρωτεΐνη μπορεί να ειπωθεί ότι επηρεάζουν την συνολική διαμόρφωση της και άρα και τις λειτουργίες της .

Στη συνέχεια προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης της C-περιοχής της SecA έγινε δημιουργία των διαφόρων γονιδίων που αναφέρθηκαν στα αποτελέσματα για να μελετηθούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες τους .

Συγκεκριμένα για να ενισχυθεί το πείραμα με το οποίο πιστοποιείται άμεσα η κατασταλτική δράση της C-περιοχής της SecA στη βασική δραστικότητα ATPάσης της (προσθήκη P34-SecA σε P70-SecA έλεγχος ATPάσης και δημιουργία συμπλόκου μεταξύ τους, Καραμάνου αδημοσίευτα αποτελέσματα) έγινε κατασκευή των *his-p34secA*Δ782-796 και *his-p34secA*::788-789 γονιδίων (σχήμα 24) για την απομόνωση των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους . Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για

να ελεγχθεί ο ρόλος του MotifXIII στην επικοινωνία της N- με την C-περιοχή της SecA . Είναι το ίδιο ισχυρή η παραπάνω επικοινωνία όταν στη C-περιοχή υπάρχει μία από τις παραπάνω μεταλλαγές ; Είναι πολύ πιθανό να χρειαστεί στη περίπτωση αυτή να γίνει ένα πιο προσεκτικό ποσοτικό πείραμα προσθέτοντας σε ακινητοποιημένη μεταλλαγμένη HIS P34-SecA , διαφορετικά ποσά ³⁵S-P70-SecA (έτσι ώστε να γίνεται και περιοριστική) και ελέγχονται διαφορές στην αλληλεπίδραση N-και C-περιοχής . Χρήσιμη επομένως θα είναι και η δημιουργία των αντίστοιχων *gst-p34secA* γονιδίων . Όπως όμως φάνηκε και στα αποτελέσματα (σχήμα 25) υπάρχει πρόβλημα καθαρισμού των παραπάνω πρωτεϊνών και πρέπει να επιστρατευθούν και άλλα χρωματογραφικά στάδια πέρα από την χρήση κολώνας Νικελίου (πριν η μετά) προκειμένου να απομονωθούν σε επαρκώς καθαρή μορφή οι παραπάνω πρωτεΐνες και να μπορέσει κανείς να τις χρησιμοποιήσει περαιτέρω .

Έπειτα προκειμένου να βρεθεί αν η C-περιοχής της SecA της επηρεάζει την NBD1 ή την NBD2 θέση ή και τις δύο κατασκευάστηκαν τα *secAT109N/Δ782-796* , *secAR509K/Δ782-796* και *secAD209N/Δ782-796* γονίδια (σχήμα 26) . Αραγε η SecAΔ782-796 , με πρόβλημα στην δέσμευση νουκλεοτιδίων στην NBD1 ή την NBD2 θέση , εξακολουθεί να έχει αυξημένη βασική δραστηριότητα ATPάσης ; Η SecAT109N/Δ782-796 παρουσιάζει συνθετικό φαινότυπο ; Αυτά τα ερωτήματα θα απαντηθούν μετά τον καθαρισμό των παραπάνω πρωτεϊνών . Καθώς όμως υπερεκφράζεται μόνο η SecAT109N/Δ782-796 (σχήμα 27) , έγινε προσπάθεια καθαρισμού καταρχήν αυτής της πρωτεΐνης προκειμένου να μελετηθεί βιοχημικά . Ακολουθήθηκε το σύνηθες πρωτόκολλο καθαρισμού της αγρίου τύπου SecA και των διάφορων απλά μεταλλαγμένων μορφών της , χωρίς αποτέλεσμα όμως . Προφανώς οι δύο μεταλλαγές έχουν αλλάξει τις χρωματογραφικές ιδιότητες της SecA και πρέπει να βρεθεί καινούργια σειρά σταδίων καθαρισμού . Το παραπάνω πρόβλημα , καθώς και το πρόβλημα υπερέκφρασης των άλλων δύο μεταλλαγμένων SecA , μπορεί πιθανά να ξεπεραστεί δημιουργώντας παράγωγα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που φέρουν εκφύσεις ιστιδίνης .

Τέλος με τη μελέτη των HIS-P70-SecAD209N , HIS-P70-SecAR509K και HIS-P70-SecAT109N πρωτεϊνών . διαπιστώθηκε η σημασία της C-περιοχής για την ρύθμιση της δραστηριότητας ATPάσης της SecA , αφού η P-70SecA έχει αυξημένη δραστηριότητα

η οποία όμως δεν είναι τυχαία καθώς πέφτει όταν υπάρχει πρόβλημα στη δέσμευση νουκλεοτιδίου στην NBD1 ή την NBD2 θέση (σχήμα 29). Μία πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων παρατίθεται παρακάτω . Τόσο η SecAD209N όσο και η SecAR509K έχουν βασική δραστικότητα ATPάσης σαν της αγρίου τύπου SecA πιθανά επειδή βλάβη στην NBD1 ή την NBD2 θέση αντίστοιχα, δεν επηρεάζει τον ένα κύκλο δέσμευσης και υδρόλυσης του ATP που έχουμε στην περίπτωση της βασικής δραστικότητας ATPάσης της ολόκληρης SecA . Αντίθετα όταν η SecA απαλλαγεί από την C-περιοχή της και αποκτήσει αυξημένη ATPάση που σημαίνει πολλούς κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης ATP , βλάβη στην NBD1 ή την NBD2 θέση μάλλον είναι καθοριστική (P-70SecAD209N και P-70SecAR509K) . Το ίδιο πιθανά συμβαίνει και στην μεμβρανική ATPάση και ATPάση μετατόπισης της ολόκληρης SecA με τις D209N και R509K μεταλλαγές, που είναι χαμηλές αφού στη φυσιολογική SecA περιλαμβάνουν περισσότερους από ένα κύκλους δέσμευσης και υδρόλυσης ATP . Σημειώνεται εδώ ότι σε μία προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος του συμπλόκου μεταξύ N-και C-περιοχή της SecA στις SecAD209N , SecAR509K και SecAT109N έγινε πείραμα δέσμευσης ³⁵S-P34-SecA σε ακινητοποιημένη HIS-P70-SecA , HIS-P70-SecAT109N και σε HIS-P70-SecAR509K . Επειδή όμως τα πειραματικά δεν είναι ξεκάθαρα και πρέπει να επαναληφθούν γι' αυτό δεν παρουσιάστηκαν στα κεφάλαια των αποτελεσμάτων .

Η μικρή βασική δραστικότητα ATPάσης της P-70SecAR509K , υποδηλώνει και την σημασία της NBD2 θέσης για φυσιολογική δραστικότητας ATPάσης , παρόλο που είναι μικρής συγγένειας θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου (σχήμα 29 και Mitchell et al) . Έτσι είναι πολύ πιθανό η NBD2 να έχει και αυτή κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στη δραστικότητα ATPάσης της N- περιοχής της SecA , όπως και η C-περιοχή .

Είναι σημαντικό να διερευνηθεί η σημασία των βασικών βιοχημικών ιδιοτήτων της SecA που αναλύθηκαν προηγουμένως σε συνθήκες αλληλεπίδρασης με μεμβράνες , προπρωτεΐνη , SecB και γενικά μ' όσο γίνεται περισσότερα συστατικά του μηχανισμού μετατόπισης πρωτεϊνών προκειμένου να διαπιστωθεί η αξία τους . Γι' αυτό το λόγο επιτελέστηκε το πείραμα συμπληρωματικότητας (σχήμα 30) με το οποίο διαπιστώθηκε καταρχήν ότι η SecAΔ782-796 και η SecA::788-789 δεν είναι λειτουργικές *in vivo* . Πιθανά είναι πρωτεΐνες που κλειδώνουν κάποιες θέσεις κατά την διάρκεια του μηχανισμού μετατόπισης πρωτεϊνών και έτσι επικρατούν έναντι της αγρίου τύπου SecA .

Υποτίθεται δηλαδή ότι στα κύτταρα με υπερεκφρασμένες τις παραπάνω μεταλλαγμένες SecA πρωτεΐνες η μετατόπιση πρωτεϊνών ακολουθεί τα χαρακτηριστικά που τις προσδίδουν αυτές οι πρωτεΐνες και είτε δεν γίνεται μετατόπιση πρωτεϊνών σ' αυτά είτε γίνεται μετατόπιση αλλά με πολύ αργό ρυθμό που δεν συμβαδίζει με τις αυξανόμενες ανάγκες για έκκριση πρωτεϊνών του κυττάρου με αποτέλεσμα αυτό να πεθαίνει είτε στη μία είτε στην άλλη περίπτωση . Επομένως φαίνεται ότι βλάβες στην C-περιοχή της SecA οδηγούν σε μη λειτουργικές πρωτεΐνες ενισχύοντας έτσι τον πιθανό λειτουργικό ρόλο αυτής της περιοχής .

Σημειώνεται ότι ομοίως εξετάστηκε στο εργαστήριο (Πολίτης και Οικονόμου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) η λειτουργία *in vivo* της P70SecA και βρέθηκε ότι είναι μη λειτουργική πρωτεΐνη κάτι που άλλωστε αναμενόταν αφού η αφαίρεση της C-περιοχής της SecA είναι μεγάλη για να αφήνει την πρωτεΐνη λειτουργική . Πείραμα συμπληρωματικότητας δεν έγινε όμως για τις διπλά μεταλλαγμένες πρωτεΐνες για τις οποίες μιλήσαμε στα αποτελέσματα καθώς , καμιά από τις απλά μεταλλαγμένες πρωτεΐνες δεν είναι λειτουργική *in vivo* και δεν αναμένεται αναστροφή του φαινοτύπου των SecAΔ782-796 και SecA::788-789 μεταλλαγμένων πρωτεϊνών από τις απλές T109N , R509K και D209N μεταλλαγές (οι δύο τελευταίες εξάλλου δεν εκφράζονται) , δεδομένου ότι οι πρώτες έχουν προέλθει από σημαντικές αλλαγές στην πρωτεΐνη όπως ελλείψεις και ταυτόχρονες προσθήκες .

Εν συνεχεία έγιναν *in vitro* πειράματα σε περιβάλλον που προσεγγίζει περισσότερο την πραγματική κατάσταση (και όχι SecA μόνο σε διάλυμα) με τη χρησιμοποίηση μεμβρανών , SecYEG και προπρωτεΐνης .

Υπολογίστηκαν καταρχήν η μεμβρανική ATPάση και η ATPάση μετατόπισης της P70SecA και των μεταλλαγμένων μορφών της καθώς και της SecAΔ782-796 και SecA::788-789 και διαπιστώθηκε (σχήμα 29) ότι οι μεμβράνες δεν επηρεάζουν την δραστικότητα ATPάσης των παραπάνω μορφών SecA . Εξαίρεση αποτελεί η SecA::788-789 που παρουσιάζει 1.2 φορές μεγαλύτερη μεμβρανική ATPάση σε σχέση με τη βασική ATPάση της (σχήμα 29) . Βρέθηκε ακόμα ότι καμιά όμως από τις μεταλλαγμένες SecA δεν έχει ATPάση μετατόπισης , δηλαδή η μεμβρανική ATPάση όλων των παραπάνω μορφών SecA δεν επηρεάζεται από το υπόστρωμα (σχήμα 29) . Θα μπορούσε λοιπόν να υποθέσει κανείς ότι όλες οι παραπάνω SecA δεν αντιδρούν ούτε με μεμβράνες ούτε

με προπρωτεΐνη . Αυτό είναι μεν αναμενόμενο για την P70SecA και τις μεταλλαγμένες μορφές της αλλά δεν πρέπει να ισχύει για τις SecAΔ782-796 και SecA::788-789 . Και αυτό γιατί είναι μεν όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες μη λειτουργικές *in vivo* , αλλά οι δύο τελευταίες είναι και επικρατείς έναντι της χρωμοσωμικής SecA . Αυτό υποδηλώνει , όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως , ότι πιθανά μετέχουν στο μηχανισμό μετατόπισης πρωτεϊνών καταλαμβάνοντας θέσεις δράσης της χρωμοσωμικής αγρίου τύπου SecA , αλλά δεν τον ολοκληρώνουν, ή τον ολοκληρώνουν με αργή κινητική . Αναμένεται λοιπόν ότι η SecAΔ782-796 και η SecA::788-789 αντιδρούν και με προπρωτεΐνη και με μεμβράνες και ότι κάπου πιο μετά στην πορεία μετατόπισης εντοπίζεται το πρόβλημά τους . Αλλά και από την ΑΤΡάση μετατόπισης των παραπάνω πρωτεϊνών μπορεί να υποθέσει κανείς αυτές δεν επιτελούν μετατόπιση πρωτεϊνών αφού η ΑΤΡάση μετατόπισης είναι απαραίτητη και πιθανά επαρκής για εξαρτώμενη από την SecA μετατόπιση πρωτεϊνών .

Για να ελεγχθούν οι παραπάνω υποθέσεις έγιναν πιο λεπτομερή πειράματα μετατόπισης ³⁵S-ProOmpA στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων από τις SecAΔ782-796 και SecA::788-789 . Τα πειράματα αυτά δεν έδειξαν μετατόπιση προπρωτεΐνης όπως συμβαίνει τουλάχιστον με την αγρίου τύπου SecA (σχήμα 31, 32, 33) . Ένας τρόπος εξήγησης των αποτελεσμάτων των παραπάνω σχημάτων, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 4 των αποτελεσμάτων, είναι ότι γίνεται και από τις δύο παραπάνω πρωτεΐνες μετατόπιση ενός μικρού τμήματος της ProOmpA (ένας κύκλος μετατόπισης) , που περιέχει τουλάχιστον το πεπτίδιο οδηγό , από το οποίο η Πεπτιδάση του οδηγού κόβει το πεπτίδιο οδηγό . Έτσι απουσία πρωτεΐνης K φαίνεται η παραγωγή ώριμης OmpA ενώ παρουσία της πρωτεάσης δεν υπάρχει καθόλου ανιχνεύσιμο σήμα στην αυτοραδιογραφία , αφού το μετατοπισμένο τμήμα της προπρωτεΐνης από το οποίο αποκόπεται το πεπτίδιο οδηγός και το οποίο προστατεύεται από τη δράση της πρωτεάσης είναι πολύ μικρό για να το δούμε .

Μία εναλλακτική εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι ότι και οι δύο μεταλλαγμένες SecA μετατοπίζουν πρωτεΐνες , αλλά με πολύ αργό ρυθμό με αποτέλεσμα να μην φαίνεται καθόλου προστατευμένη από πρωτεάση ³⁵S-ProOmpA και ³⁵S-OmpA ακόμα και μετά 30 λεπτά επώασης στους 37⁰C , επειδή ακόμα και τότε οι κύκλοι μετατόπισης που έχουν επιτελεστεί είναι λίγοι και η απόδοση του πειράματος δεν είναι

αρκετά υψηλή για να τους δούμε . Οι δύο αυτές πιθανές εξηγήσεις των αποτελεσμάτων ενισχύουν την υπόθεση ότι η SecA Δ 782-796 και SecA::788-789 δεν επιτελούν ομαλή μετατόπιση πρωτεϊνών (επικρατείς μεταλλαγές , έλεγχος συμπληρωματικότητας , ATPάση μετατόπισης) , ενώ συμφωνούν με αλληλεπίδραση των παραπάνω πρωτεϊνών τόσο με προπρωτεΐνη (αφού μετατοπίζουν τουλάχιστον ένα τμήμα της) όσο και με μεμβράνες (στις οποίες υπάρχει το κανάλι μεταφοράς πρωτεϊνών SecYEG , Matlack et al,1998) και με εντοπισμό του προβλήματος μετατόπισης σε κάποιο σημείο στους πολλαπλούς κύκλους μετατόπισης πρωτεϊνών) .

Για να δει κανείς λοιπόν που οι παραπάνω μεταλλαγές στην εξαρτώμενη από την SecA μετατόπιση πρωτεϊνών έχουν πρόβλημα και να βρει και πιθανούς ρόλους της C-περιοχής της SecA , πρέπει να μελετήσει τις διαφορές υποαντιδράσεις στην πορεία της μετατόπισης πρωτεϊνών . Έτσι π.χ μπορεί να μελετήσει τη μετατόπιση που προκαλείται από τη δράση του AMP-PNP (η αγρίου τύπου SecA παρουσία AMP-PNP εισάγει ένα μικρό τμήμα προπρωτεΐνης στις μεμβράνες και πέραν αυτού τίποτα , Economou and Wickner, 1994 και Economou et al, 1995) , την εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη , τον σχηματισμό του I16 εκκριτικού ενδιάμεσου και την προς τα εμπρός κίνηση (στην περίπτωση αυτή η μισή ProOmpA είναι μετατοπισμένη στις μεμβράνες , Schiebel et al , 1991) .

Από τα αποτελέσματα λοιπόν που παρουσιάστηκαν δείχθηκε ότι η C-περιοχή της SecA έχει ρυθμιστικό ρόλο στην δραστικότητα ATPάσης της SecA σε διάλυμα , αλλά και ότι παίζει ακόμα ρόλο στην μεμβρανική ATPάση και στην ATPάση μετατόπισης και είναι απαραίτητη για την ομαλή μετατόπιση πρωτεϊνών από την SecA όπως και για την λειτουργικότητα τους *in vivo* .

Είναι επίσης γνωστό ότι η SecA μέσω της C-περιοχής της διμερίζεται (αποτελέσματα Κεφάλαιο 2 και Hirano et al , 1996) , αλληλεπιδρά με όξινα φωσφολιπίδια (Breukink et al , 1997) , αλληλεπιδρά με τη SecY (Snyders et al , 1997) , εισέρχεται στη μεμβράνη στη SecYEG θέση (Economou , Wickner , 1994 , Economou et al , 1995) και αλληλεπιδρά με SecB (Breukink et al , 1995 , Fekkes et al , 1997) . Μπορεί λοιπόν κανείς να υποθέσει απ' όλα τα παραπάνω ότι η C-περιοχή της SecA , με το σύνολο των αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζει μέσα στο μονομερές της SecA και έξω από αυτό και με τους ρυθμιστικούς ρόλους που δείξαμε ότι έχει , ότι είναι

βασικός ρυθμιστής του κεντρικού μονοπατιού έκκρισης πρωτεϊνών στα βακτήρια (Sec εξαρτώμενο μονοπάτι) και ότι προσδίδει στην SecA τον καταλυτικό της ρόλο στο παραπάνω μονοπάτι . Δηλαδή μπορεί να υποθεθεί ότι η C-περιοχή αλληλεπιδρώντας με την N-περιοχή της SecA καταστέλλει την δραστικότητα ATPάσης της , η οποία όμως μπορεί να τροποποιείται από αλληλεπιδράσεις με την SecY (στις οποίες μετέχει η C-περιοχή) , αλλά και με το υπόστρωμα (πρέπει να ελεγχθεί αν και εδώ μετέχει η C-περιοχή) για να επιτρέπεται η υδρόλυση του ATP κατά την μετατόπιση πρωτεϊνών .

Για να διερευνηθεί λοιπόν η παραπάνω υπόθεση αλλά και για να ενισχυθεί ο πιθανός κεντρικός ρυθμιστικός ρόλος της C-περιοχής της SecA , είναι πολύ σημαντικό ναδειχθεί ότι συμμετέχει και στην δέσμευση του υποστρώματος .

Μέχρι σήμερα πειράματα χημικής διασύνδεσης , γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος εντοπίζονται πιθανά στην 70KDa περιοχή της SecA (Oliver et al , 1993) . Τμήματα της προπρωτεΐνης είναι πιθανό να έχουν θέσεις δέσμευσης και στην C-περιοχή της SecA . Έτσι μπορεί να γίνει π.χ. έλεγχος της δέσμευσης ³⁵S-ProOmpA από ακινητοποιημένη GST , GST-P34 και GST-P34 πρωτεΐνη που σχηματίζει σύμπλοκο με P70-SecA και να βρεθεί αν γίνεται δέσμευση της ProOmpA στη C-περιοχή της SecA και αν η δέσμευση αυτή επηρεάζεται από το σχηματισμό του συμπλόκου της C-με την N-περιοχή της SecA . Τέτοια πειράματα έγιναν αλλά επειδή τα πειραματικά αποτελέσματα δεν είναι ξεκάθαρα και πρέπει να επαναληφθούν , γι' αυτό και δεν αναφέρθηκαν στα αποτελέσματα .

Σε μία προσπάθεια να ξεπεραστούν τα παραπάνω προβλήματα και να ελεγχθεί ακόμα αν στη δέσμευση της ProOmpA συμμετέχουν τα αμινοξέα που μετέχουν στην αλληλεπίδραση της N- και C-περιοχής της SecA , έγινε και ένα πείραμα συναγωνισμού της δέσμευσης ³⁵S-P70 SecA σε ακινητοποιημένη GSTP34SecA από κρύα ProOmpA . Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι στη δέσμευση της ProOmpA μετέχουν τα αμινοξέα της N- ή της C-περιοχής της SecA που λαμβάνουν μέρος στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση (δεν μπορεί να ξεκαθαριστεί από το συγκεκριμένο πείραμα αν είναι τα αμινοξέα της N- ή της C-περιοχής) καθώς έχουμε μείωση της παραπάνω δέσμευσης παρουσία κρύας ProOmpA (όχι όμως και τα δύο αφού τότε η παραπάνω δέσμευση θα ήταν η ίδια) , επειδή όμως πρέπει να επαναληφθούν δεν παρουσιάστηκαν .

Ένας από τους άμεσους στόχους είναι να εξεταστεί και ο ρόλος του MotifXIII στην δέσμευση της προπρωτεΐνης όπως και για την περίπτωση της αλληλεπίδρασης με την SecY πρωτεΐνη, με την χρησιμοποίηση των HIS-P34SecA Δ 782-796 και HIS-P34SecA::788-789 ή των αντίστοιχων GSTP34SecA πρωτεϊνών .

Απ' όλα τα παραπάνω λοιπόν μπορούμε να καταλήξουμε στο ακόλουθο υποθετικό μοντέλλο για τα αρχικά στάδια της Sec εξαρτώμενης μετατόπισης πρωτεϊνών στα βακτήρια . Η SecA αρχικά ευρισκόμενη στο κυτταρόπλασμα δεν έχει την ικανότητα πολλαπλών κύκλων υδρόλυσης ATP (επιτελεί μόνο έναν , που υποδηλώνει ότι δεν έχει πρόβλημα με τη δέσμευση ATP , βασική ATPάση) . Πιθανά η C-περιοχής της αλληλεπιδρώντας με την N-περιοχή εμποδίζει την απομάκρυνση του ADP παραγώγου και δεν επιτρέπεται η ξαναδέσμευση ATP από την πρωτεΐνη . Έχοντας όμως αυξημένη συγγένεια για τις μεμβράνες και συγκεκριμένα για τις θέσεις που εντοπίζονται όξινα φωσφολιπίδια και το κανάλι SecYEG , έρχεται στις μεμβράνες όπου και αυξάνει η ικανότητα της να υδρολύει ATP (μεμβρανική ATPάση) . Αυτό συμβαίνει μάλλον επειδή χαλαρώνει η αλληλεπίδραση N- και C-περιοχής και απελευθερώνεται έτσι το ADP , καθώς η C-περιοχή αλληλεπιδρά και με την SecY και με τα λιπίδια . Ενώ χαλαρώνει όμως η αλληλεπίδραση C-και N-περιοχής δεν αυξάνεται μόνο η ικανότητα ATPάσης της SecA αλλά και η ικανότητα της να δεσμεύσει το υπόστρωμα στην N-περιοχή (πρέπει να γίνει έλεγχος αν αυτό ισχύει και για την C-περιοχή) και τη SecB που σχηματίζει σύμπλοκο με το υπόστρωμα στη C-περιοχή . Η δε δέσμευση αυτή του συμπλόκου υποστρώματος/ SecB , μεταξύ N- και C-περιοχής αποκλείει την αλληλεπίδραση των δύο παραπάνω περιοχών μεταξύ τους και έτσι έχουμε μεγάλη αύξηση στην δραστηριότητα ATPάσης της SecA ικανής να δώσει την ενέργεια για τις ακόλουθες μεταβολές που υφίσταται στη διαμόρφωση της (είσοδος της SecA στη μεμβράνη μετά από δέσμευση με ATP) , για τις οποίες μιλήσαμε στην εισαγωγή .

Κεφάλαιο 6-Υλικά και μέθοδοι

1.Απομόνωση ProOmpA από σωματίδια έγκλεισης (Inclusion bodies)

Υλικά

1. Λυσοζύμη 10mg/ml
2. MgCl₂ 1M
3. DnaseI 1 mg/ml
4. Κιτρικό buffer
5. Απορρυπαντικό Sarkosyl 10%
6. Tris-Cl pH:8 1M
7. DTT 1M
8. Ουρία 10M
9. Ομογενοποιητής

Πρωτόκολλο

1. 30g κυττάρων λιώνουν σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη 4.5ml λυσοζύμης 6mg/ml
3. Επώαση στους 23°C για 5min
4. Προσθήκη 155λ MgCl₂ 1M 15λ DnaseI 1mg/ml
5. Επώαση 5min στους 23°C
6. Αραίωση δείγματος με 100ml 50mM κιτρικού buffer
7. Ομογενοποίηση
8. Επώαση στους 23°C για 30min
9. Φυγοκέντρηση στις 10.000rpm, στους 23°C για 15min
10. Κρατώ υπερκείμενο στους 4°C (sup 1)
11. Διαλυτοποίηση ιζήματος σε 100ml κιτρικού buffer και φυγοκέντρηση όπως στο 9.
Κρατώ υπερκείμενο (sup 2)

12. Επανάληψη του σταδίου 11 (sup 3)
13. Διαλυτοποίηση ιζήματος 60ml κιτρικού buffer 100mM με 1.5% Sarkosyl
14. Επώαση στους 23°C για 30min
15. Φυγοκέντρηση όπως στο 11, αλλά στις 16.000rpm (sup 4)
16. Διαλυτοποίηση ιζήματος σε 60ml κιτρικού buffer
17. Επανάληψη του 16, 4 φορές. Sups: 6, 7, 8 και 9.
18. Διαλυτοποίηση ιζήματος σε 30ml Tris-Cl 50mM pH: 8
19. Φυγοκέντρηση όπως στο 15
20. Φυλάσσω το υπερκείμενο σαν sup 10 και διαλυτοποιώ το ίζημα σε 6ml ουρία 6M-50mM Tris-Cl pH: 8 – 2mM DTT
21. Τρέχω τα sups σε SDSPAGE

2.Καθαρισμός αγρίου τύπου SecA, SecA Δ782-746 και SecA::788-789

Υλικά

1. Κολώνα Cibacron blue
2. KCL 4M
3. Tris 1M pH:8
4. DTT 1M
5. 100% γλυκερόλη
6. PMSF 0.1M
7. Λυσοζύμη 10mg/ml

Πρωτόκολλο

1. 10gr κυττάρων λιώνουν σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη 964λ 10mg/ml λυσοζύμης σε πάγο
3. Επώαση στον πάγο για 1 ώρα
4. Προσθήκη 0.1M PMSF

5. Ομογενοποίηση στον πάγο
6. Φέρνω τον τελικό όγκο σε 20mls με 50mM Tris pH:7.6 – 350mM KCl – 2mM DTT – 10% γλυκερόλη
7. Φυγοκέντρωση για 1 ώρα, στους 4°C στις 15.000rpm
8. Μεταφέρω υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και προσθέτω 180λ 0.1M PMSF
9. Διαλυτοποίηση ιζήματος σε 30mls του A
10. Εξισορροπώ κολώνα με το A και φορτώνω το υπερκείμενο του 8
11. Συλλέγω το Flow through
12. Ξεπλένω την κολώνα με 20mls του A
13. Εκλούω την πρωτεΐνη με 50mls του A, αλλά 600mM KCl αντί για 350mM
14. Έλεγχος κλασμάτων με Bradford
15. Χρησιμοποίηση κολώνας Centricon αν χρειάζεται

3.Καθαρισμός πρωτεϊνών με πολλαπλές ιστιδίνες στο αμινοτελικό τους άκρο

Υλικά

1. Κολώνα Cibacron blue
2. Κολώνα-Νικελίου
3. Ιμιδαζόλιο 1M

Πρωτόκολλο

1. 10gr κυττάρων λιώνουν σε θερμοκρασία δωματίου
2. Προσθήκη 964λ 10mg/ml λυσοζύμης σε πάγο
3. Επώαση στον πάγο για 1 ώρα
4. Προσθήκη 0.1M PMSF
5. Ομογενοποίηση στον πάγο
6. Φέρνω τον τελικό όγκο σε 20mls με 50mM Tris pH:7.6 – 350mM KCl – 2mM DTT – 10% γλυκερόλη
7. Φυγοκέντρωση για 1 ώρα, στους 4°C στις 15.000rpm
8. Μεταφέρω υπερκείμενο σε νέο σωλήνα και προσθέτω 180λ 0.1M PMSF

9. Ανάφιξη 4ml κολώνας-Νικελίου, υπερκειμένου και buffer μέχρι όγκου 50ml. Τελική συγκέντρωση ιμιδαζόλιου είναι 5mM
10. Φορτώνω την κολώνα με αντλία P1 (2.5*10) με 0.5 ml/min
11. Ξέπλυμα κολώνας με 40mls 5mM Ιμιδαζόλιου
12. Ξέπλυμα όπως προηγουμένως αλλά με 20mM Ιμιδαλοζίου
13. Εκλούση με 100mM Ιμιδαζόλιου. Συλλογή κλασμάτων των 4ml
14. SDS PAGE, Bradford

4.Απομάκρυνση ουρίας από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια *E. coli*

1. Προσθήκη σε εναιώρημα ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων ενός όγκου ουρίας σε 1X buffer B σε τελική συγκέντρωση 6M

(10xBufferB: 500mM Tris-Cl pH:8

500mM KCl

50mM MgCl₂

1mM DTT)

2. Αφήνω στον πάγο για 35min
3. Φυγοκέντρωση σε TLX για 20min στους 4°C στις 100.000rpm. Φορτώνω το δείγμα επάνω από buffer S (0.2M σουκρόζη – 50mM Tris-Cl pH:8 – 50mM KCl)
4. Διώχω υπερκείμενο
5. Ξεπλένω ίζημα με buffer B
6. Διαλυτοποίηση σε BufferB με Vortex

5.Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από αντισώματα (Western blots)

Υλικά

1. 10X TBS
20mM Tris pH:7.6

- 150mM NaCl
2. 10X TTBS
20mM Tris pH:7.5
150mM NaCl
0.3% Tween 20
 3. Διάλυμα απομάκρυνσης θορύβου (blocking solution)
1X TTBS
5% γάλα σκόνη
 4. Διάλυμα αντισώματος
1X TTBS
1% γάλα σκόνη
αντίσωμα (πρωτογενές ή δευτερογενές)

Πρωτόκολλο

1. Μετά την μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προσθέτω διάλυμα απομάκρυνσης θορύβου για 30min σε θερμοκρασία δωματίου
2. Ξεπλένω με 1X TTBS, 1X για 15min, 2X για 5min
3. Επώαση και ανάδευση 1 ώρα με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος
4. Ξέπλυμα με 1X TTBS, 1X για 15min, 2X για 5min
5. Επώαση όπως στο (3) αλλά με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος (1:10.000 Goat-antiRabbit-IgG-horseradish peroxidase conjugated)
6. Ξέπλυμα με 1X TTBS, 1X για 15min και 4X για 5min
7. Ξέπλυμα με 1X TBS για 5min. Στο μεσοδιάστημα γίνεται ετοιμασία ELL αντιδραστηρίων
8. Επεξεργασία μεμβράνης με ECL και έκθεση

6. Δέσμευση ³⁵S-P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34SecA

Υλικά

1. Διάλυμα A: 100 mM NaCl

- 20 mM Tris-CL
- 0.3% NP40
- 0.124% BSA
- 2. Σφαιρίδια γλουταθειόνης 4B
- 3. Διάλυμα 5X SDS PAGE
 - 100ml: 100ml γλυκερόλης
 - 10gr SDS
 - 30ml Tris 1M pH:8
 - 1ml β-μερκαπτοαιθανόλης
 - 0.005% μπλε της βρωμοφαινόλης

Βιοχημικά:

1. GST-P34SecA (σύμφυση P34SecA στο C-άκρο της γλουταθειονικής-τρανσφεράσης)
2. ³⁵S-P70SecA

Πρωτόκολλο

A. Ετοιμασία σφαιριδίων 4B με γλουταθειόνη

1. Φυγοκέντρηση των σφαιριδίων (133 λ) στις 3000 rpm για 3'. Απομάκρυνση υπερκείμενου .
2. Ξέπλυμα των σφαιριδίων με 1ml διαλύματος A. Απομάκρυνση υπερκείμενου .
3. Επανααιώρηση των σφαιριδίων σε 100 λ διαλύματος A.

B. Δέσμευση GST-P34SecA στα παραπάνω σφαιρίδια.

1. Τα σφαιρίδια επωάζονται με 500μg GST-P34SecA σε διάλυμα A, για 30', σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Ξέπλυμα των σφαιριδίων με διάλυμα A 3 φορές. Φυγοκέντρηση όπως στο A1 μετά από κάθε ξέπλυμα και απομάκρυνση υπερκείμενου.
3. Μετά και το τρίτο ξέπλυμα τα σφαιρίδια είναι έτοιμα για το επόμενο στάδιο.

Γ. Δέσμευση ³⁵S-P70SecA σε ακινητοποιημένη GST-P34SecA.

1. Ετοιμασία ³⁵S-P70SecA από DNA της P70SecA και μεταγραφή και μετάφραση in vitro σύμφωνα με το TnT Coupled Reticulocyte Lysate system.
2. Προσθήκη ³⁵S-P70SecA στα παραπάνω σφαιρίδια (B3) παρουσία 400 λ διαλύματος A.
3. Επώαση στους 4⁰C για 2 ώρες υπό ανάδευση .
4. Ξέπλυμα των σφαιριδίων με 1ml διαλύματος A, 3 φορές υπό ανάδευση όπως και προηγουμένως αλλά για 30'. Ενδιάμεσα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση όπως στο A1.
5. Ξέπλυμα μία φορά με διάλυμα A που δεν έχει BSA, όπως στο 4.

6. Οι προσδεδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες αποδεσμεύονται με διάλυμα 5X SDS PAGE. Συγκεκριμένα προστίθενται 100 λ από το παραπάνω διάλυμα στα σφαιρίδια (Γ5) και ακολουθεί βράσιμο στους 100⁰C για 5'.
7. Φυγοκέντριση όπως στο Α1. Συλλογή υπερκείμενου.
8. Επανάληψη σταδίων 6 και 7.
9. Φόρτωμα δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα.
10. Αυτοραδιογραφία του πηκτώματος.

7. Μετατόπιση *in vitro* ραδιενεργούς ProOmpA σε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια E.Coli.

Υλικά :

1. 10X διάλυμα B: 500 mM Tris-Cl pH:8
500 mM KCl
50 mM MgCl₂
10 mM DTT
2. Διάλυμα ουρίας: 6 M ουρία
50 mM Tris-Cl pH:8
1 mM DTT
3. 0.1M ATP
4. TCA (25%)
5. Ακετόνη
6. Βιοχημικά:
 - α) ³⁵SproOmpA (συνήθως 20000-100000 c.p.m/ml). Κατασκευάζεται με μεταγραφή και μετάφραση *in vitro*.
 - β) SecA, 1mg/ml
 - γ) SecB, 1mg/ml
 - δ) ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια 4-12 mg/ml (IMVs)
- Πρωτεΐνωση K, 10mg/ml
- BSA, 10mg/ml

Πρωτόκολλο

1. Ετοιμασία διαλύματος (όπως φαίνεται στον πίνακα) και ισομοίραση του σε σωλήνες στον πάγο.

	1x50 μ l		Τελική συγκέντρωση
Διάλυμα B 10X	5 μ l		
BSA (10 mg/ml)	2 μ l		
H ² O	μ l		
SecA (1-3 mg/ml)	1 μ l		40 μ g/ml
SecB (0.8 mg/ml)	1 μ l		16-24 μ g/ml
IMVs (4-10 mg/ml)	5 μ l		100 μ g/ml
ATP (0.1 M)	1 μ l		2 mM
³⁵ SProOmpA	1.5 μ l		

2. Προσθήκη ³⁵SproOmpA σε τελικό όγκο 50 λ .
3. Επώαση στους 37⁰C για 15'.
4. Λήξη της αντίδρασης στον πάγο.
5. Προσθήκη 5 λ πρωτεΐνάσης K (τελική συγκέντρωση 1mg/ml) και πέψη στον πάγο για 15'.
6. Προσθήκη TCA (25% w/v) σε τελική συγκέντρωση 12.5%. Αφήνω στον πάγο για 20'.
7. Φυγοκέντρηση στις 16000g στους 4⁰C για 8'. Απομάκρυνση του υπερκειμένου.
8. Ξέπλυμα ιζήματος με 1ml κρύας ακετόνης.
9. Φυγοκέντρηση όπως στο 7 . Απομάκρυνση υπερκειμένου.
10. Στέγνωμα ιζήματος.
11. Προσθήκη 20-30 λ διαλύματος 5X SDS-PAGE.
12. Φόρτωμα σε αποδιατακτικό πήκτωμα.
13. Αυτοραδιογραφία του πηκτώματος.

8. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

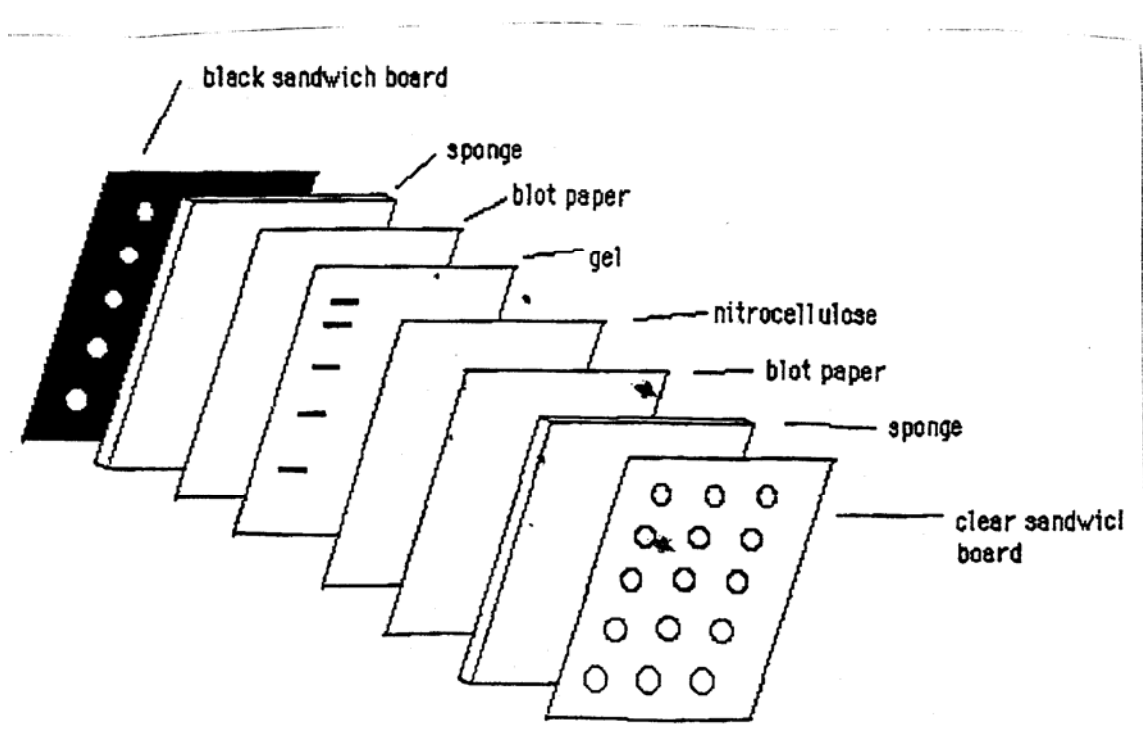
Υλικά

Διάλυμα μεταφοράς:	4 lt
50 mM Tris:	23.2 gr
380 mM γλυκίνη:	116 gr
0.1% SDS :	4 gr

20 %μεθανόλη: 800 ml

Πρωτόκολλο

1. Τρέξιμο πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα.
2. Συγκρότηση του σαντουίτς-μεταφοράς όπως φαίνεται παρακάτω.



9. Δραστηκότητα ΑΤΡάσης της SecA και των μεταλλαγμένων μορφών της.

(ο ελεύθερος φώσφορος προσδιορίζεται από το αντιδραστήριο malachite green)

Υλικά

1. 10X διάλυμα B
2. Διάλυμα ουρίας
3. BSA, 10 mg/ml
4. ATP 01 M
5. Ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (IMVs) από το *unc⁻* KM9 στέλεχος της E.Coli που έχουν επεξεργαστεί με ουρία για να μην έχουν ενδογενή SecA
5. Αντιδραστήριο Malachite green και Malachite green molybdate
6. Κιτρικό οξύ 34%(w/v)
7. Βιοχημικά:•
8. Α) Προπρωτεΐνη ProOMpA
B) SecA 1 mg/ml

Πρωτόκολλο

1. Ετοιμασία προδρόμου διαλύματος σύμφωνα με τον πίνακα:

Πρόδρομο διάλυμα	1x50μl assay		Τελική συγκέντρωση
10X διάλυμα B	5 μl		
ATP (0.1 M)	0.5 μl		1mM
BSA (10 mg/ml)	2 μl		
H ₂ O	36.5 μl		
Πρόδρομο διάλυμα/σωλήνα	44 μl		
SecA (1mg/ml)	1 μl		20-40 μg/ml
ProOmpA (2 mg/ml)	1.5 μl		30-80 μg/ml
IMVs (1mg/ml)	3.5 μl		5 μg/50μl=100μg/ml
	50 μl		

3. Προσθήκη proOmpA (ή διάλυμα ουρίας) στο τοίχωμα κάθε σωλήνα
4. Προσθήκη SecA στο τοίχωμα κάθε σωλήνα
5. Προσθήκη προδρόμου διαλύματος σε κάθε σωλήνα. Vortex.
6. Έναρξη αντίδρασης με προσθήκη ανεστραμμένων μεμβανικών κυστιδίων
7. Επώαση στους 37⁰C για 20 min
8. Λήξη αντίδρασης στον πάγο
9. Μεταφορά 20-40 μl από κάθε σωλήνα σε 800 μl αντιδραστήριου Malachite green molybdate
10. Παραμονή για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου
11. Προσθήκη 100 μl κιτρικού οξέος και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 40 min
12. Μέτρηση της O.D στα 640 nm των προς έλεγχο δειγμάτων καθώς και ορισμένων προτύπων για κατασκευή προτύπου καμπύλης (προστίθενται 50 μl από κάθε πρότυπο στο αντιδραστήριο Malachite green molybdate
13. Προσδιορισμός των nmoles Pi/20-40μl από την καμπύλη

10.Μοριακές τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

Πραγματοποιούνται σύμφωνα με το Molecular cloning, a laboratory manual, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, second edition και με το Current protocols in Molecular Biology, F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, K. Struhl.

11. Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDSPAGE)- Χρώση με Coomassie

Πραγματοποιούνται σύμφωνα με Compton & Jones, 1985 και με Analytical Biochemistry 151, 369-374

Βιβλιογραφία

- Arkowitz, R, Bassilana, M. (1994). Protein translocation in Escherichia coli. BBA, 1197, 311-343.
- Bassilana, M., Arkowitz, R.A., and Wickner, W. (1992). The role of the mature domain of proOmpA in the translocation ATPase reaction. J. Biol. Chem. 267, 25246-25250.
- Breukink E, Nouwen N, van Raalte A, Mizushima S, Tommassen J, de Kruijff B (1995) The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. J Biol Chem 270: 7902-7907
- Chen X, Xu H, Tai PC (1996) A significant fraction of functional SecA is permanently embedded in the membrane. SecA cycling on and off the membrane is not essential during protein translocation. J Biol Chem 271, 29698-29706
- den Blaauwen T, Fekkes P, de Wit JG, Kuiper W, Driessen AJ (1996) Domain interactions of the peripheral preprotein Translocase subunit SecA. Biochemistry 35, 11194-12004
- Duong, F, Eihler, J, Price, A, Leonard, MR and Wickner, W. (1997). Biogenesis of the Gram-negative Bacterial Envelope. Cell, 91, 567-573
- Duong, F. and Wickner, W. (1997) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. EMBO J 16, 2756 - 2768
- Economou, A. and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. Cell 78, 835-843.
- Economou, A. , Pogliano, J.P., Beckwith, J., Oliver, D.B. and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. Cell 83 , 1171-1181.
- Economou. A (1998) Bacteria preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. Molecular Microbiology 27 (3), 511-518.
- Eichler J, Wickner W (1997) Both an N-terminal 65-kDa domain and a C-terminal 30-kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 5574-5581
- Eichler J, Brunner J, Wickner W (1997) The protease-protected 30 kDa domain of SecA is largely inaccessible to the membrane lipid phase. EMBO J 16, 2188-2196
- Ekkehard Leberer, Daniel Dignard, Linda Hougan, David Y. Thomas and Malcolm Whiteway (1992) Dominant-negative mutants of a yeast G-protein α subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. EMBO J 11 4805-4813.
- Flower AM, Osborne RS, Silhavy TJ (1995) The allele-specific synthetic lethality of prlA-prlG double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. EMBO J 14: 884-893

Hanada M, Nishiyama K, Tokuda H (1996) SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. FEBS Lett 381:25-28

Hirano, M., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1996) The carboxyl-terminal region is essential for Sec-A dimerization. Biochem Biophys Res Commun 229, 90-95

Homma T, Yoshihisa T, Ito K (1997) Subunit interactions in the Escherichia coli protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. FEBS Lett 408:11-15

Jarosik, G.P. and Oliver, D.B. (1991). Isolation and analysis of dominant secA mutations in *Escherichia coli*. J. Bact. 173, 860-868.

Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L., Ito, K., Oliver, D., and Wickner, W. (1989). The SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *E. coli*. EMBO J. 8, 961-966.

Matlack, KES, Mothes, W, and Rapaport, T. (1998). Protein translocation:Tunnel Vision. Cell, 92, 381-390.

Matsuyama, S., Kimura, E., and Mizushima, S. (1990). Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of *Escherichia coli*, allows ATP binding to its amino terminal region. J. Biol. Chem. 265, 8760-8765.

Mitchell, C. and Oliver, D. (1993). Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. Mol. Microbiol., 10, 483-497.

Nouwen N, de Kruijff B, Tommassen J (1996) prlA suppressors in Escherichia coli relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild-type precursors. Proc Natl Acad Sci U S A 93:5953-5957

Oliver,D.B. (1993) SecA protein: Autoregulated ATPase catalyzing preprotein insertion and translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol., 7, 159-165.

Oliver, D.B., Cabelli, R.J., and Jarosik, G.P. (1990). SecA protein: autoregulated initiator of secretory precursor protein translocation across the *E. coli* plasma membrane. J. Bioenerg. Biomembr. 22, 311-336.

Pohlschröder, M, Prinz, W, Hartmann, E, and Beckwith, J. (1997). Protein translocation in the three domains of life: Variations on a Theme. Cell, 91, 563-566.

Price, A., Economou, A., Duong, F. and Wickner, W.(1996) Separable ATPase and membrane insertion domains of the SecA subunit of preprotein translocase. Journal of Biological Chemistry 271, 31580-31584.

Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57, 50-108.

Schatz, G, and Dobberstein, B. (1996). Common Principles of Protein Translocation Across Membranes. Science, 271, 1519-1526.

Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., and Wickner, W. (1991). Dm_H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell 64, 927-939.

Shilton, B, Svergun, D, Volcov,V, Koch, M, Cusack, S and Economou, A. (1998). Escherichia coli shape and dimensions. FEBS Letters.439 (in press).

Shinkai, A., Mei, L.H., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1991). The conformation of SecA, as revealed by its protease sensitivity, is altered upon interaction with ATP, preseretary proteins, everted membrane vesicles, and phospholipids. J. Biol. Chem. 266, 5827-5833.

Snyders S, Ramamurthy V, Oliver D (1997) Identification of a region of interaction between Escherichia coli SecA and SecY proteins. J Biol Chem 272, 11302-11306

Tien-Hsien Chang, Lori J. Latus, Zheng Liu and John M. Abbott (1997) Genetic interactions of conserved regions in the DEAD-box protein Prp28p. Nucleic Acid Research, Vol. 25, No. 24 5033-5040

Ulbrandt, N.D., London, E., and Oliver, D.B. (1992). Deep penetration of a portion of *Escherichia coli* SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding. J. Biol. Chem. 267, 15184-15192

van der Does C, den Blaauwen T, de Wit JG, Manting EH, Groot NA, Fekkes P, Driessen AJ (1996) SecA is an intrinsic subunit of the Escherichia coli preprotein translocase and exposes its carboxyl terminus to the periplasm. Mol Microbiol 22: 619-629

Walker, JE, Saraste, M, Runswick, MJ, Gay, NJ. (1982). Distantly related sequences in the alpha-beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J 1(8), 945-51

Yamada, H., Matsuyama, S.-I., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989). A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles. J. Biol. Chem. 264, 18577-18581.

Yang, Y.B., Yu, N. and Tai, P.C. (1997) SecE-depleted membranes of Escherichia coli are active. SecE is not obligatorily required for the in vitro translocation of certain protein precursors. J Biol Chem 272, 13660-13665

