

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Στόχευση προπρωτεϊνών στην μεμβράνη με την
βοήθεια σαπερονών**

Εμμανουηλίδης Λεωνίδας

Επιβλέπων καθηγητής : Α. Οικονόμου

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τμήμα Βιολογίας
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα πρωτεϊνικής βιοτεχνολογίας

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2011

MASTER THESIS

Chaperone assisted preprotein targeting to the membrane

Emmanouilidis Leonidas

Supervisor : A. Economou

University of Crete
Department of Biology
Post-graduate program protein biotechnology

Heraklion, September 2011

Στους γονείς μου και στην αδερφούλα μου,

Ευχαριστίες

Μετά από δυο σχεδόν χρόνια και την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω εκείνους που με βοήθησαν σε όλη αυτήν την ανηφόρα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Οικονόμου για την φιλοξενία στο χώρο του εργαστηρίου και την επιστημονική καθοδήγηση κατά την διάρκεια των δυο αυτών χρόνων.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για τις ώρες που περάσαμε μαζί.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Λίλη για την διδασκαλία της τεχνικής που χρησιμοποίησα κατά κόρων σε αυτήν την εργασία.

Πολλά ευχαριστώ στον Γκουρίδη για τις υπερπολύτιμες γνώσεις του αλλά και για τις ώρες συζητήσεων πρωί βράδυ.

Όλοι μου έμαθαν τι σημαίνει επαγγελματική συμπεριφορά.

Την οικογένεια μου που με βοήθησε και με στήριξε σε πολλές αποφάσεις μου.

Θα είχα ξεφύγει πολλές φορές από τον στόχο μου και θα είχα συνθλιβεί αν δεν είχα την μικρή μου κυρία στο πλάι μου. Πω σε ευχαριστώ ! Πω σε χοχλίζω !

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η στόχευση προπρωτεϊνών στην μεμβράνη με την βοήθεια σαπερονών. Χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την προπρωτεΐνη αλκαλική φωσφατάση βρήκαμε ποια είναι τα αναγκαία χαρακτηριστικά για την πρόσδεση της με τις σαπερόνες SecB και Trigger factor. Με την χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε σύνδεση με MALLS/QELS, δείξαμε ότι είναι αναγκαίο το υπόστρωμα να είναι σε δομή εύπλαστης σφαίρας ώστε να προσδεθεί στις δύο σαπερόνες. Ακόμα ο μηχανισμός που οι σαπερόνες αναγνωρίζουν την προπρωτεΐνη δεν βρέθηκε ίδιος, καθώς ο Trigger factor μάλλον δύναται να αναγνωρίζει έμμεσα ή άμεσα την ύπαρξη σηματοδοτικού πεπτιδίου, ενώ η SecB σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο ακόμα και με το ώριμο τμήμα της αλκαλικής φωσφατάσης. Επιπρόσθετα, αποδείξαμε ότι η SecB είναι σε θέση να μεταφέρει την προπρωτεΐνη στην ATPάση SecA σε συνθήκες διαλύματος. Έτσι, προτείνουμε μηχανισμό στόχευσης των πρωτεϊνών μέσω των σαπερονών στην μεμβράνη.

ABSTRACT

In this thesis we studied chaperone assisted preprotein targeting to the membrane. Using as substrate the preprotein, alkaline phosphatase, we found the necessary characteristics for the binding of chaperones SecB and Trigger factor. Our method involves size exclusion chromatography connected with MALLS / QELS, which proved that it is necessary for substrate to be in the molten globule state in order to bind with both chaperones. Furthermore, the mechanism by which chaperones recognize the preprotein found to be different in every case. Trigger factor rather may recognize directly or indirectly the existence of signal peptide, whereas SecB forms a stable complex even with the mature domain of alkaline phosphatase. Additionally, we have shown that SecB is able to transfer preprotein to the ATPase SecA in solution. Thus, we propose a mechanism for chaperone assisted preprotein targeting to the membrane.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 | 9 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 9 |
| 1.1 Εισαγωγή | 9 |
| Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο πολύπλοκα δομικά βιολογικά μακρομόρια, τα οποία συμμετέχουν σχεδόν σε όλες τις βιολογικές διαδικασίες. Τα κύτταρα παράγουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες ώστε να μπορούν να ρυθμίζουν αποτελεσματικά την ομοιόσταση τους. Τα μόρια αυτά συντίθενται από τα ριβοσώματα ως γραμμικές αλυσίδες, όπου κάθε κρίκος αποτελεί ένα αμινοξύ. Οι αλυσίδες αυτές για να είναι λειτουργικές θα πρέπει γενικά να αποκτήσουν μια στεροδιαμόρφωση, η οποία αποτελείται από μερικές πολύ όμοιες τρισδιάστατες μορφές που βρίσκονται σε συνεχή εναλλαγή μεταξύ τους (Bartlett and Radford 2009). Το σύνολο αυτών των μορφών αποτελεί την εγγενή κατάσταση της πρωτεΐνης. Ο τρόπος με τον οποίο οι αλυσίδες αποκτούν αυτήν την τρισδιάστατη μορφή και πως το κύτταρο καταφέρνει να διατηρεί όλες αυτές τις πρωτεΐνες στην λειτουργική μορφή είναι κάποια από τα κυρία ερωτήματα στη βιολογία..... | 9 |
| 1.2 Αναδίπλωση πρωτεϊνών..... | 10 |
| 1.3 Σαπερόνες | 12 |
| 1.3.1 Η σαπερόνη Trigger Factor (TF)..... | 13 |
| 1.4 Μετάθεση πρωτεϊνών..... | 15 |
| 1.5 Το περιπλασμικό ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (PhoA)..... | 16 |
| 1.6 Στόχευση και μετατόπιση πρωτεϊνών από την SecA ΑΤΡάση..... | 17 |
| 1.6.1 Η σαπερόνη SecB..... | 18 |
| 1.6.2 Η ΑΤΡάση SecA..... | 21 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 | 22 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 22 |
| 2.1 Βιοφυσικός χαρακτηρισμός δομής της αλκαλικής φωσφατάσης..... | 22 |
| 2.1.1 Έκφραση και καθαρισμός της αλκαλικής φωσφατάσης..... | 22 |
| 2.1.2 Εγγενής και μη εγγενής κατάσταση της αλκαλικής φωσφατάσης..... | 23 |
| 2.1.3 Επίδραση των μετάλλων στον ολιγομερισμό της αλκαλικής φωσφατάσης..... | 26 |
| 2.1.4 Επίδραση της μετάλλαξης T59R και του σηματοδοτικού πεπτιδίου στην υδροδυναμική ακτίνα και τον ολιγομερισμό της αλκαλικής φωσφατάσης..... | 27 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 | 29 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 29 |
| 3.1 Σχηματισμός και χαρακτηρισμός συμπλοκών της αλκαλικής φωσφατάσης με τις σαπερόνες SecB και TF..... | 29 |
| 3.1.1 Σύμπλοκο αλκαλικής φωσφατάσης με TF..... | 29 |
| 3.1.2 Σύμπλοκο αλκαλικής φωσφατάσης με SecB..... | 31 |
| 3.1.3 Επίδραση σηματοδοτικού σήματος της αλκαλικής φωσφατάσης στις αλληλεπιδράσεις της με τις σαπερόνες..... | 32 |

| | | |
|---------|---|-------------------------------------|
| 3.2 | Σχηματισμός και χαρακτηρισμός συμπλόκων της β-γλυκοσιδάσης BglX με τις σαπερόνες SecB και TF | 33 |
| 3.3 | Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σαπερονών και της μετεξέτασης SecA | 34 |
| 3.4 | Μεταφορά υποστρωμάτων στην ΑΤΡάση SecA..... | 37 |
| | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 | 39 |
| | ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 39 |
| | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 | 45 |
| 5.1 | Τεχνικές μοριακής βιολογίας..... | 45 |
| 5.1.1 | Κατασκευή της σημειακής μετάλλαξης proPhoA(T59R)-His..... | 45 |
| 5.1.2 | Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης | 46 |
| 5.1.3 | Παράγωγη επιδεικτικών κυττάρων : Μέθοδος RbCl | 46 |
| 5.1.4 | Μετασχηματισμός κυττάρων | 47 |
| 5.2 | Έκφραση πρωτεϊνών σε <i>E.coli</i> | 48 |
| 5.2.1 | Έκφραση πρωτεϊνών με χρήση του pET συστήματος..... | 48 |
| 5.2.2 | Έκφραση και καθαρισμός εκκριτικών υποστρωμάτων υπο αποδιατακτικές συνθήκες | 48 |
| 5.2.3 | Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών His-SecB και His-TF με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου (Ni ²⁺ -NTA) | 50 |
| 5.2.4 | Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών SecA(N1-901) και SecA(6A) N15-901..... | 51 |
| 5.2.5 | Καθαρισμός της πρωτεΐνης His-SecB με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. | 53 |
| 5.3 | Ανίχνευση και μελέτη καθαρότητας και μεγέθους πρωτεϊνών | 53 |
| 5.3.1 | Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) | 53 |
| 5.3.2 | Χρώση coomassie blue..... | 54 |
| 5.4 | Σχηματισμός συμπλόκων και ανάλυση τους | 54 |
| 5.4.1 | Αντίδραση σχηματισμού συμπλόκων | 55 |
| 5.4.1.1 | Αντιδράσεις εκκριτικών υποστρωμάτων και παραγώγων τους με τις πρωτεΐνες SecB,TF και SecA..... | 55 |
| 5.4.1.2 | Αντίδραση σαπερονών που φέρουν υποστρώματα με την SecA | 56 |
| | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 | 61 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 61 |
| | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 | 63 |
| | ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 | Error! Bookmark not defined. |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες είναι τα πιο πολύπλοκα δομικά βιολογικά μακρομόρια, τα οποία συμμετέχουν σχεδόν σε όλες τις βιολογικές διαδικασίες. Τα κύτταρα παράγουν χιλιάδες διαφορετικές πρωτεΐνες ώστε να μπορούν να ρυθμίζουν αποτελεσματικά την ομοιόσταση τους. Τα μόρια αυτά συντίθενται από τα ριβοσώματα ως γραμμικές αλυσίδες, όπου κάθε κρίκος αποτελεί ένα αμινοξύ. Οι αλυσίδες αυτές για να είναι λειτουργικές θα πρέπει γενικά να αποκτήσουν μια στεροδιαμόρφωση, η οποία αποτελείται από μερικές πολύ όμοιες τρισδιάστατες μορφές που βρίσκονται σε συνεχή εναλλαγή μεταξύ τους (Bartlett and Radford 2009). Το σύνολο αυτών των μορφών αποτελεί την εγγενή κατάσταση της πρωτεΐνης. Ο τρόπος με τον οποίο οι αλυσίδες αποκτούν αυτήν την τρισδιάστατη μορφή και πως το κύτταρο καταφέρνει να διατηρεί όλες αυτές τις πρωτεΐνες στην λειτουργική μορφή είναι κάποια από τα κυρία ερωτήματα στη βιολογία.

Όλα τα κύτταρα υπάρχουν λόγω της μεμβράνης λιπιδίων που φέρουν, δημιουργώντας έτσι εσωτερικό χώρο – κυτταρόπλασμα - στον οποίο εσωκλείουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για τις λειτουργίες τους. Πολλές από αυτές πρέπει να γίνουν είτε στην επιφάνεια είτε εκτός της μεμβράνης, ενώ στην συντριπτική πλειοψηφία εμπλέκονται και πρωτεΐνες. Έτσι πάνω από το ένα τρίτο του πρωτεώματος οποιουδήποτε κυττάρου δεν λειτουργεί στο εσωτερικό του αλλά

είτε στην επιφάνεια του είτε εκτός αυτού. Το μεγάλο αυτό ποσοστό ευθύνεται για πληθώρα ζωτικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα περί ή εκτός μεμβράνης, όπως η βιογένεση της ίδιας της μεμβράνης, η εύρεση και μεταφορά θρεπτικών στοιχείων, η παθογένεια, η κίνηση και άλλα. Για να φτάσει μια πρωτεΐνη, όμως, σε αυτά τα μέρη του κύτταρου θα πρέπει να οδηγηθεί εκεί. Ο τρόπος με τον οποίο το κύτταρο είναι σε θέση να διαχωρίσει ποιες πρωτεΐνες είναι κυτταροπλασματικές ή μη, πως αντιμετωπίζει την φυσική τους τάση να αναδιπλώνουν και πως τις στοχεύει στο σωστό υποκυτταρικό διαμέρισμα, είναι ερωτήματα που απασχολούν την παρούσα διατριβή.

1.2 Αναδίπλωση πρωτεϊνών

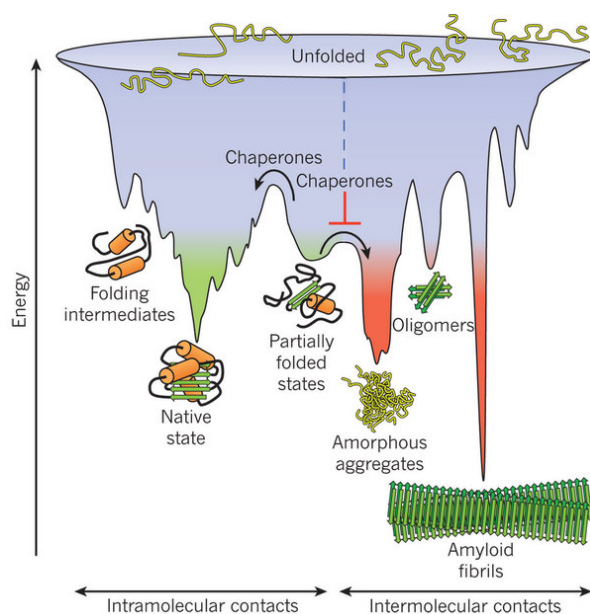
Παρόλο που πρόκειται για μια διαδικασία που μελετάται σε βάθος τα τελευταία πενήντα χρόνια, παραμένει μυστήριο πως οι πρωτεΐνες, ξεκινώντας από εν σειρά τοποθετημένα αμινοξέα, αποκτούν τελικά την σωστή τρισδιάστατη μορφή. Ενώ είναι γνωστό ότι η τελική αυτή κατάσταση καθορίζεται από την αλληλουχία και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αμινοξέων που απαρτίζουν κάθε μια, εντούτοις ο μηχανισμός παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Επιπλέον, έχει δηχθεί ότι αποσυντιθέμενες πρωτεΐνες απαιτούν την βοήθεια άλλων μικρότερων μορίων ώστε να αναδιπλωθούν σωστά και γρήγορα.

Όπως οι περισσότερες διαδικασίες στη φύση, υπάρχει η τάση, τα μόρια να οδεύουν από την άμορφη (ενεργειακά υψηλή) κατάσταση προς μια πιο οργανωμένη κατάσταση (ενεργειακά χαμηλότερη). Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες απαρτίζονται από «χάντρες» (αμινοξέα) τοποθετημένες η μια δίπλα στην άλλη, μπορεί να υπάρξει εντυπωσιακά μεγάλος αριθμός πιθανών σχημάτων. Η δυναμική ενέργεια που υπάρχει σε κάθε δυνατή δομή είναι αυτή που δείχνει το μονοπάτι αναδίπλωσης. Το «πρόβλημα» στην περίπτωση των βιολογικών μορίων έγκειται στο γεγονός ότι δεν πρέπει να αποκτήσουν το απόλυτα σταθερό (ενεργειακά χαμηλό) σχήμα που θα μπορούσαν, γιατί τότε δεν θα ήταν σε θέση να αλληλεπιδράσουν με κανένα άλλο μόριο. Το ζωντανό κύτταρο δεν μπορεί να υπάρξει χωρίς τις αλληλεπιδράσεις χιλιάδων μακρομορίων. Η σταθερότερη αναδίπλωση συχνά σημαίνει σύνδεση πολλών μορίων της ίδιας πρωτεΐνης και

δημιουργία είτε άμορφων συσσωματωμάτων (ίζημα) είτε ινιδίων. Η βιολογικά σημαντική δομή, η εγγενής, έχει μέσο ενεργειακό περιεχόμενο. Έτσι αυτά τα αξιοθαύμαστα βιομόρια, για να συντηρηθεί η ζωή, είναι καταδικασμένα να ισορροπούν ανάμεσα στα υψηλά και στα χαμηλά ενεργειακά σκαλοπάτια (σχήμα 1.1).

Το 90% του πρωτεώματος ενός κύτταρου αποτελείται από πρωτεΐνες μεγαλύτερες από 100 αμινοξέα, γεγονός που καθιστά εξαιρετικά πολύπλοκο και δύσκολο να ακολουθείται αυθόρμητα κάθε φορά το ίδιο μονοπάτι που οδηγεί στην εγγενή κατάσταση (Brockwell and Radford 2007). Αυτό δικαιολογεί γιατί οι περισσότερες πρωτεΐνες έχουν τάση όταν βρίσκονται μόνες τους σε υδατικά διαλύματα να σχηματίζουν μη-εγγενείς μορφές. Πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αναδιπλωθεί με λάθος τρόπο τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα αργά ή γρήγορα. Η γενεσιουργός αιτία αυτών είναι ότι στις λάθος διαμορφώσεις μπορεί να είναι εκτεθειμένα υδρόφοβα αμινοξέα προς την υδατινή φάση, ενώ στην εγγενή αυτά είναι κρυμμένα προς το εσωτερικό της δομής.

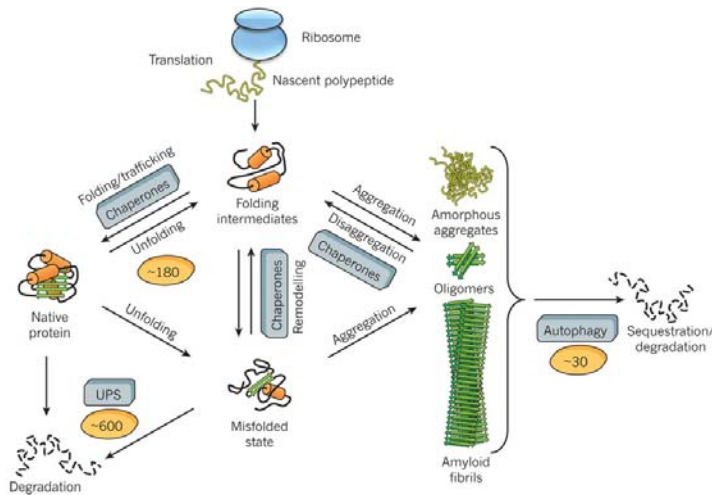
Η ενδογενής τάση των μορίων να σχηματίζουν συσσωματώματα δίχως βιολογική αξία, μάλλον εντείνεται εντός του κύτταρου όπου συνωστίζονται σε πολύ λίγο χώρο χιλιάδες μόρια. Αυτό εξηγεί την ανάγκη ύπαρξης των μικρότερων βοηθητικών πρωτεϊνών που θα συνοδεύσουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα προς την σωστή αναδίπλωση.



Σχήμα 1.1 : από (Hartl, Bracher et al. 2011) Ενεργειακό τοπίο που οι πρωτεΐνες ερευνούν ώστε τελικά να βρουν την εγγενή κατάσταση τους (native state), σχηματίζοντας ενδομοριακούς δεσμούς. Το ανώμαλο τοπίο έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται θέσεις στις οποίες μπορεί να εγκλωβιστεί μια πρωτεΐνη καθοδόν προς την εγγενή. Για να ελευθερωθεί το μόριο απ' αυτές τις θέσεις και να συνεχίσει το μονοπάτι του, χρειάζεται εξωγενώς ενέργεια. Στην πραγματικότητα σε ένα ζωντανό κύτταρο αυτός είναι ο ρόλος των σαπερονών, η οποίες αναλαμβάνουν να επιταχύνουν την διαδικασία. Όταν πολλά μόρια αυθόρμητα βρεθούν στην ίδια ενεργειακά θέση, μπορούν να δημιουργήσουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα συσσωματώματα (amorphous aggregates) ή ινίδια (amyloid fibrils).

1.3 Σαπερόνες

Ως μοριακή σαπερόνη ορίζεται οποιαδήποτε πρωτεΐνη που είτε σταθεροποιεί είτε βοηθά άλλες πρωτεΐνες να αποκτήσουν την λειτουργική εγγενή διαμόρφωση, ενώ δεν συμμετέχει στην τελική δομή (Hartl 1996; Hartl and Hayer-Hartl 2009). Στο κύτταρο υπάρχουν πάρα πολλές διαφορετικές σαπερόνες δημιουργώντας ένα τεράστιο δίκτυο αλληλεπιδράσεων. Με κριτήριο ποτέ συνδέονται με τις πρωτεΐνες-υποστρώματα μπορούμε να χωρίσουμε αυτά τα μόρια σε δυο μεγάλες ομάδες. Η πρώτη κατηγορία περιέχει εκείνες που συνδέονται με το ριβόσωμα και αλληλεπιδρούν με την αποσυντιθέμενη αλυσίδα ενώ ακόμα εκφράζεται. Αντίθετα, στην δεύτερη κατηγορία βρίσκουμε σαπερόνες που δεν σχετίζονται με το ριβόσωμα και ανιχνεύουν τις πρωτεΐνες αφού έχουν εκφραστεί (Hartl and Hayer-Hartl 2009; Kramer, Boehringer et al. 2009). Αντίστοιχα, διαχωρισμός των βοηθητικών μορίων μπορεί να γίνει με βάση την λειτουργία τους. Έτσι η πολυπληθέστερη κατηγορία σαπερονών είναι εκείνες που ανταποκρίνονται σε απότομες μεταβολές του περιβάλλοντος, οι οποίες δυσκολεύουν την επιβίωση του κυττάρου. Σε αυτές τις συνθήκες οι περισσότερες πρωτεΐνες τείνουν να σχηματίζουν τα μη επιθυμητά συσσωματώματα. Έτσι το κύτταρο αντιδρά παράγοντας μεγαλύτερες ποσότητες από τις σαπερόνες, καθώς χρειάζεται να προστατέψει τα πολύτιμα βιομόρια του. Οι λειτουργίες στις οποίες συμμετέχουν περιλαμβάνουν απευθείας αναδίπλωση της πρωτεΐνης-στόχου,



επαναφορά σωστής δομής από λάθος, σχηματισμός ολιγομερών, στόχευση σε υποκυτταρικό διαμέρισμα ακόμα και την πρωτεόλυση (σχήμα 1.2).

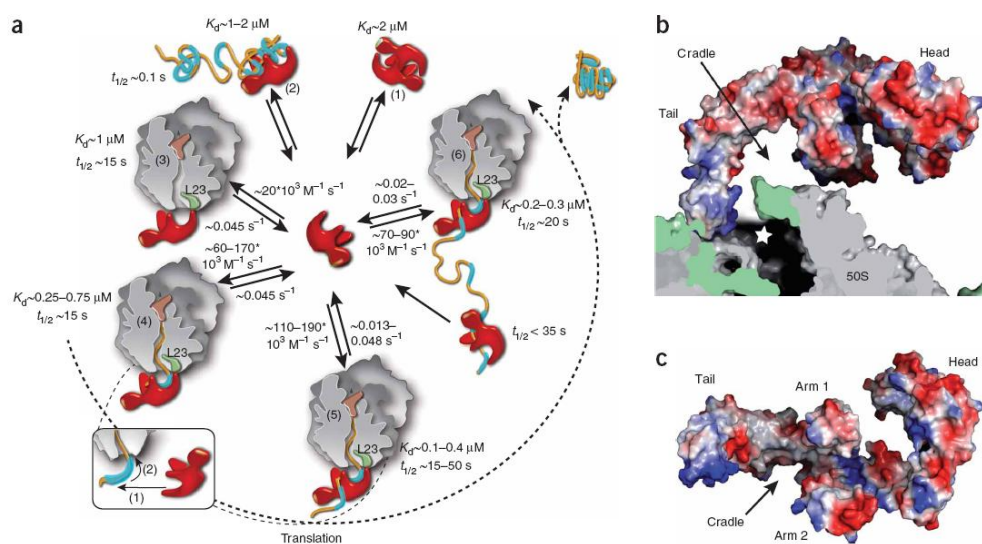
Σχήμα 1.2 : από (Hartl, Bracher et al. 2011) Τα δίκτυα στα οποία συμμετέχουν οι σαπερόνες από το ριβόσωμα ως της πρωτεόλυση. Περίπου 180 σαπερόνες αριθμούν οι σαπερόνες στο μονοπάτι της αναδίπλωσης και στόχευσης (folding/trafficking), ενώ στην πρωτεόλυση 600. Ενώ έχει βρεθεί και μηχανισμός αποσύνθεσης πρωτεϊνών στον οποίο συμμετέχουν, ο κύριος στόχος αυτών των σαπερονών παραμένει να αποτρέψουν την δημιουργία συσσωματωμάτων.

1.3.1 Η σαπερόνη Trigger Factor (TF)

Ο Trigger Factor (στο έξης θα αναφέρεται ως TF) αποτελεί τον μοναδικό γνωστό εκπρόσωπο από την κατηγορία σαπερονών που συνδέονται με το ριβόσωμα στα βακτήρια (Kramer, Rauch et al. 2002). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που βρίσκεται σε μεγάλη αφθονία στο κυτταρόπλασμα (~ 50mM) ενώ αλληλεπιδρά παροδικά με τα ριβοσώματα με στοιχειομετρία 1:1 (Lill, Crooke et al. 1988; Hesterkamp and Bukau 1996). Ο TF εντοπίζεται κυρίως στην έξοδο του ριβοσώματος, από όπου εξέρχονται οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνει να ανιχνεύει την πλειοψηφία αυτών πολύ νωρίς στην σύνθεση τους, αμέσως μόλις τα πρώτα αμινοξέα προβάλλουν από το στόμα του ριβοσώματος.

Όταν στο ριβόσωμα δεν εκφράζεται κάποια πρωτεΐνη, ο TF πραγματοποιεί κύκλους στους οποίους συνεχώς συνδέεται και αποσυνδέεται από αυτό, ενώ ο

χρόνος παραμονής του είναι 11-15 sec (Maier, Eckert et al. 2003; Kaiser, Chang et al. 2006; Rutkowska, Mayer et al. 2008). Με την έναρξη της έκφρασης, αναλόγως το μήκος, την αλληλουχία και την φύση της κάθε αλυσίδας, ο TF αυξάνει το χρόνο παραμονής του από 9 έως 30 φορές (Raine, Lonmar et al. 2006). Έτσι, μάλλον ο μηχανισμός λειτουργίας του έγκειται στην ικανότητα να γραπώνει και να αφήνει γρήγορα υποστρώματα που φέρουν αρωματικά και υδροφοβικά κατάλοιπα, ανιχνεύοντας με αυτόν τον τρόπο συνεχώς καινούργια σημεία πρόσδεσης πάνω στην αλυσίδα που εξέρχεται από το ριβόσωμα (Maier, Scholz et al. 2001; Patzelt, Rudiger et al. 2001). Αργότερα, αναλυτικότερες μελέτες έδειξαν ότι ο TF είναι σε θέση να παραμείνει σε σύμπλοκο με την νέα αλληλουχία ακόμα κι όταν εκείνη έχει απομακρυνθεί από το ριβόσωμα. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι, ενώ απαιτείται η σύνδεση του TF στο ριβόσωμα για την εύρυθμη λειτουργία του κύτταρου, ο ίδιος είναι σε θέση να λειτουργήσει ως κλασσική σαπερόνη ανεξάρτητα από το ριβόσωμα. Το άθροισμα των αλληλεπιδράσεων του TF εμφανίζεται στο σχήμα 1.3.



Σχήμα 1.3 : από (Kramer, Boehringer et al. 2009) Αλληλεπιδράσεις του TF με τις αποσυντιθέμενες αλυσίδες και το ριβόσωμα. **a)** Μοντέλο του λειτουργικού κύκλου του TF (κόκκινο). Ο ελεύθερος TF βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία ανάμεσα στη μονομερή και διμερή κατάσταση (1). Είναι σε θέση να αλληλεπιδρά και να βοηθά στην αναδίπλωση άλλων πρωτεϊνών μακριά από το ριβόσωμα στο κυτταρόπλασμα (2) και να προσδέεται σε ριβόσωμα το οποίο δεν παράγει πρωτεΐνη (3). Η παρουσία πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο ριβόσωμα επιταχύνει πολύ την σύνδεση του με αυτό (4).

Καθώς μεγαλώνει η αλυσίδα που συντίθεται και εμφανίζονται όλο και περισσότερα υδροφοβικά κατάλοιπα (κυανό) αντίστοιχα η αυξάνεται η συγγένεια του TF με το ριβόσωμα. Ο ρυθμός με τον οποίο προσδένεται ο TF στο ριβόσωμα μειώνεται μόνο όταν η πολυπεπτιδική αλυσίδα εξέλθει από τη σήραγγα του δευτέρου, ενώ μπορεί να παραμείνει σε αυτή τη περίπτωση συνδεδεμένος με την αλυσίδα στο κυτταρόπλασμα (6) (Rutkowska, Mayer et al. 2008). **b)** Μοντέλο του TF από το βακτήριο *E. coli*, προσδεμένο σε σύμπλοκο ριβόσωμα-πολυπεπτιδική αλυσίδα, όπως αυτό πρόεκυψε από συνδυασμό κρυσταλλογραφίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Παρατηρείται η επιφάνεια του TF-ριβόσωμα-αλυσίδα, ενώ τα χρώματα αντιπροσωπεύουν ηλεκτροστατικές ιδιότητες των καταλοίπων. **c)** Κρυσταλλική δομή του TF.

1.4 Μετάθεση πρωτεϊνών

Αφού οι πρωτεΐνες εκφραστούν στο κυτταρόπλασμα, κάποιες θα παραμείνουν σε αυτό άλλες όμως πρέπει να μετατεθούν σε άλλα σημεία του κύτταρου. Μετά από χιλιάδες χρόνια εξέλιξης, έχει αναπτυχθεί πληθώρα μηχανισμών μεταφοράς πρωτεϊνών δια μέσου μεμβρανών, ή ενσωμάτωσης τους μέσα σε αυτές (Holland 2004; Economou, Christie et al. 2006). Από όλα τα συστήματα μεταφοράς μόνο το Sec είναι αναγκαίο για την διατήρηση της ζωής, ενώ απαντάται και στους τρεις χώρους ζωής (αρχαία, βακτηρία, ευκαρυωτικά). Τα βακτηρία είναι σε θέση να μεταφέρουν πρωτεΐνες είτε αυτές είναι ήδη αναδιπλωμένες είτε όχι.

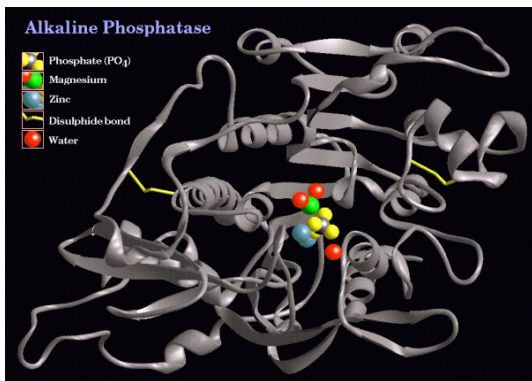
Η μεταφορά μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από την πλασματική μεμβράνη πραγματοποιείται από το Sec σύστημα. Η διαδικασία έκκρισης πρωτεϊνών μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα η αναγνώριση των εκκρινόμενων (προπρωτεϊνών) και μεμβρανικών πρωτεϊνών από τα στοιχεία της μετεξέτασης με την βοήθεια των οποίων πραγματοποιείται στην συνέχεια η στόχευση τους στο SecY κανάλι μετατόπισης. Οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται στο περίπλασμα (έξω από την εσωτερική μεμβράνη) ή ενσωματώνονται στη μεμβράνη κατά το δεύτερο στάδιο. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται αποκοπή του πεπτιδίου σήματος και αναδίπλωση των ωρίμων πλέον πρωτεϊνών (Papanikou, Karamanou et al. 2007). Όλες οι πρωτεΐνες (προπρωτεΐνες) περιέχουν στο αμινοτελικό τους άκρο προεκτάσεις οι οποίες ονομάζονται πεπτίδια οδηγού ή πεπτίδια σήματα. Οι προεκτάσεις αυτές έχουν σημαντικό ρόλο στην μετατόπιση

της πρωτεΐνης, ενώ με το πέρας αυτής απομακρύνονται, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί ωρίμανση της πρωτεΐνης (von Heijne 1990)

1.5 Το περιπλασμικό ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (PhoA).

Η αλκαλική φωσφατάση είναι από τις πρωτεΐνες που πρέπει να φτάσουν στον περιπλασμικό χώρο ώστε να αναδιπλωθεί σωστά και να αποκτήσει την ενδημική της ενεργότητα. Όπως οι περισσότερες περιπλασμικές πρωτεΐνες στο *E. Coli*, χρησιμοποιεί το Sec σύστημα για την εκκρισή της. Αφού εκφραστεί στο κυτταρόπλασμα παραμένει σε μια όχι πλήρως αναδιπλωμένη μορφή, την κατάσταση της εύπλαστης σφαίρας (molten globule). Αυτό της επιτρέπει να αναγνωριστεί από την ATPάση και να διέλθει το διαμεμβρανικό κανάλι ως προπρωτεΐνη (proPhoA). Λίγο πριν την ολοκλήρωση της μεταφοράς το σηματοδοτικό πεπτίδιο κόβεται από άλλο ένζυμο και έτσι προκύπτει στο περίπλασμα η ώριμη αλκαλική φωσφατάση (PhoA). Αποτελεί πολύ κρίσιμο στάδιο, το μονοπάτι που θα ακολουθήσει αυτή η πρωτεΐνη μέχρι να καταλήξει στην μεμβράνη, καθώς απαραίτητη προϋπόθεση είναι να μην έχει την εγγενή στεροδιαμόρφωση, άλλα ούτε να έχει σχηματίσει συσσωματώματα. Αυτόν τον ρόλο τον επωμίζονται οι σαπερόνες, που είτε σταθεροποιούν κάποια δομή είτε βοηθούν την προπρωτεΐνη να αποκτήσει αυτήν την στεροδιαμόρφωση ώστε να φτάσει στην μεμβράνη.

Η αλκαλική φωσφατάση σχηματίζει στο περίπλασμα ένα ομοδιμερές συνολικής μάζας 94 kDa, με 449 κατάλοιπα σε κάθε μονομερές (Bradshaw, Cancedda et al. 1981). Επιπρόσθετα για να λειτουργήσει ως ένζυμο άλλα και για λόγους θερμοδυναμικής σταθερότητας της δομής χρειάζεται δυο μόρια ψευδαργύρου και ένα μαγνησίου σε κάθε πρωτόμερες (Kim and Wyckoff 1991). Η PhoA φέρει τέσσερις πολύ σημαντικές κυστεΐνες οι οποίες πρέπει να οξειδωθούν μεταξύ τους με τον σωστό τρόπο για να αποκτήσει η πρωτεΐνη την εγγενή δομή (σχήμα 1.4).

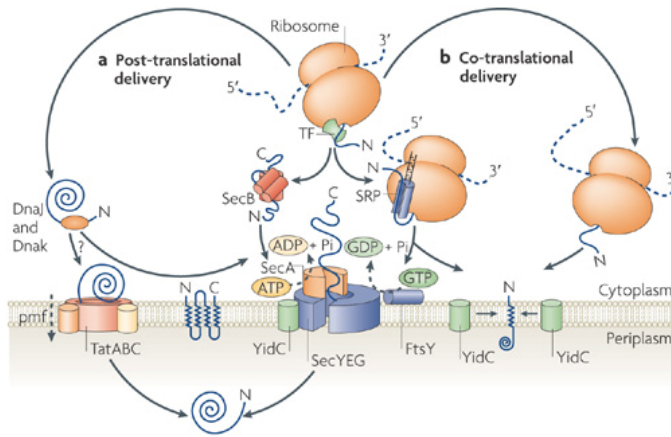


σχήμα 1.4 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μονομερούς αλκαλικής φωσφατάσης. Με πράσινο φαίνεται το ιόν μαγνησίου, ενώ με γαλάζιο τα δυο ιόντα ψευδαργύρου. Με κίτρινες γραμμές έχουν σημειωθεί οι δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στις κυστεΐνες της πρωτεΐνης.

1.6 Στόχευση και μετατόπιση πρωτεϊνών από την SecA ATPάση

Υπάρχουν δυο τρόποι στόχευσης των πρωτεϊνών στην ATPάση (σχήμα 1.5). Η πλειοψηφία των εκκριτικών πρωτεϊνών εικάζεται ότι στοχεύεται στην ATPάση μέσω της αλληλεπίδρασης των σαπερονών (μετά-μεταφραστική στόχευση). Εκείνες φέρουν τα υποστρώματα στην ATPάση, όπου με υδρόλυση ATP, τελικά τα μεταφέρει εντός του διαμεμβρανικού καναλιού. Αντίθετα οι μεμβρανικές πρωτεΐνες στοχεύονται σαν πολυπεπίδια προσδεδεμένα στο ριβόσωμα με ειδικό μόριο (SRP – signal recognition particle) με την βοήθεια του μεμβρανικού υποδοχέα FtsY (Paranikou, Karamanou et al. 2007; Driessen and Nouwen 2008).

Το μονοπάτι στόχευσης που ακολουθείται επιλέγεται πολύ νωρίς με την έξοδο ενός μικρού τμήματος της νεοσυντιθεμένης πολυπεπτιδικής αλυσίδας από το ριβόσωμα (Koch, Hengelage et al. 1999). Στο σημείο αυτό ο ανταγωνισμός μεταξύ SRP και TF για την δέσμευση του πολυπεπτιδίου (Beck, Wu et al. 2000), όποτε τελικά η συγγένεια μεταξύ των μορίων θα καθορίσει τον προσθετή της.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Σχήμα 1.5 : από (Cross, Sinning et al. 2009) Στόχευση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στις μεμβρανικές μεταθετάσες. **α)** Κατά την μετά-μεταφραστική στόχευση η σαπερόνη SecB προσδένει το ώριμο τμήμα των προπρωτεϊνών αποτρέποντας την αναδίπλωση του κατά την μεταφορά του στην μεμβρανικά προσδεδεμένη SecA. Η SecA στην συνέχεια πραγματοποιεί κύκλους υδρόλυσης ATP για να μεταφέρει τις προπρωτεΐνες στο SecY κανάλι μετατόπισης. Οι γενικές σαπερόνες DnaK και DnaJ ίσως ενέχονται στην διαδικασία αποτρέποντας την αναδίπλωση των προπρωτεϊνών. Πρωτεΐνες οι οποίες πρέπει να μετατοπίσουν ούσες ήδη αναδιπλωμένες, χρησιμοποιούν το μονοπάτι του TAT συστήματος. **β)** Η συν-μεταφραστική αρχίζει με την δέσμευση του πεπτιδίου σήματος από το SRP, το οποίο στην συνέχεια στρατολογεί το σύμπλοκο ριβόσωμα-νεοσυντιθεμένη αλυσίδα στην μεμβράνη μέσω του υποδοχέα του FtsY.

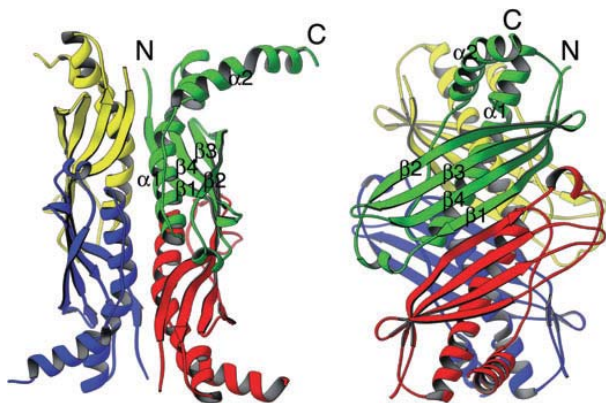
1.6.1 Η σαπερόνη SecB

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν το Sec σύστημα μεταφοράς πρέπει να βρίσκονται σε μια μη πλήρως αναδιπλωμένη στεροδιαμόρφωση, όμως να μην οδηγεί στην δημιουργία συσσωματωμάτων (Randall and Hardy 1986). Η συμβατή αυτή με την μετατόπιση δομή, οφείλεται κυρίως στην σαπερόνη SecB (Fekkes and Driessen 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι η SecB δεν εντοπίζεται σε όλα τα βακτήρια (van der Sluis and Driessen 2006).

Η σαπερόνη SecB αναγνωρίζει μια μη-εγγενή δομή στο ώριμο τμήμα των προπρωτεϊνών και προσδένεται σε αυτήν με υψηλή συγγένεια (5-50 nM) (Randall

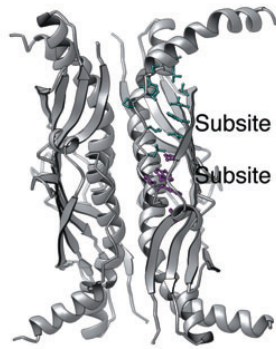
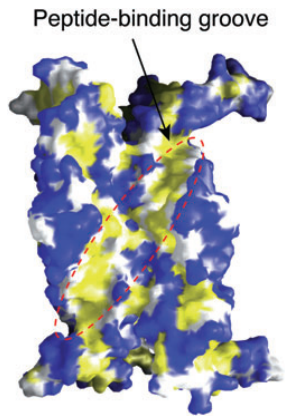
and Hardy 1995). Το πεπτίδιο σήμα δεν προσδένεται από την σαπερόνη SecB (Randall, Topping et al. 1990) είναι όμως απαραίτητο για την μετατόπιση των πρωτεϊνών. Οι λόγοι για τους οποίους εικάζεται να είναι σημαντικό στην μετατόπιση είναι : καθυστερεί την αναδίπλωση της πρωτεΐνης «κρατώντας» την στην μη εγγενή στερεοδιαμόρφωση που αναγνωρίζεται από την SecB, και επίσης προσδένεται πάνω σε επιφάνεια της SecA (Gelís, Bonvin et al. 2007).

Η κρυσταλλική δομή της SecB έδειξε τον σχηματισμό τετραμερούς και ανέδειξε ότι αυτό οργανώνεται σαν ένα διμερές διμερών (Xu, Knafels et al. 2000) (σχήμα 1.6). Το μονομερές της SecB σχηματίζει μια β-πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων β-φύλλων και δυο αντιπαράλληλες α-έλικες. Το διμερές σταθεροποιείται κυρίως από δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των δυο αντιπαράλληλων β1 φύλλων. Δυο διμερή της SecB ενθέτουν τις 4 α-έλικες μεταξύ των οχτώ αντιπαράλληλων β-φύλλων για να σχηματίσουν το τετραμερές. Το τετραμερές που δημιουργείται είναι ιδιαίτερα σταθερό, μιας και η σταθερά ισορροπίας του διμερούς-τετραμερούς είναι 20 mM.



Σχήμα 1.5 : από (Zhou and Xu 2005)
Σχηματική αναπαράσταση του τετραμερούς SecB. Κάθε μονομερές αναπαριστάται με διαφορετικό χρώμα. Το ένα διμερές απαρτίζεται από το πράσινο και κόκκινο μονομερές ενώ το δεύτερο από το μπλε και κίτρινο.

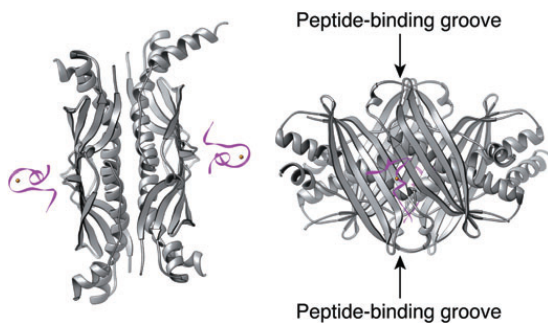
Η δομή της SecB από το *H. Influenza* φανέρωσε τον σχηματισμό ενός αυλακιού στο οποίο εικάζεται ότι προσδένονται τα ώριμα τμήματα των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (σχήμα 1.6). Έχει προταθεί ότι το αυλάκι αυτό αποτελείται από δυο ξεχωριστά σημεία πρόσδεσης, τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά των προπρωτεϊνών.



Σχήμα 1.6 : από (Xu, Knafels et al. 2000) Το αυλάκι πρόσδεσης προπρωτεϊνών υποστρωμάτων από τετραμερές SecB. (αριστερά) Επιφάνεια του τετραμερούς (άσπρο : άτομα του πολυπεπτιδικού κορμού, μπλε : άτομα φορτισμένων ή πολικών καταλοίπων, κίτρινο : άτομα υδρόφοβων καταλοίπων). (δεξιά) Με μωβ και πράσινο χρώμα τα σημεία πρόσδεσης subsite 1 και subsite 2

αντίστοιχα.

Η SecB προσδένεται με την SecA ATPάση στο διάλυμα με $K_d = 1.6 \mu\text{M}$ (Fekkes, de Wit et al. 1999) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του θετικά φορτισμένου καρβοξυτελικού άκρου της SecA με τις αρνητικά φορτισμένες περιοχές στις δυο πλευρές του τετραμερούς της SecB (σχήμα 1.7). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι η εναλλαγή διμερούς-μονομερούς της SecA επισκιάζει τον μηχανισμό διέλευσης της προπρωτεΐνης από την SecB στην SecA και στην συνέχεια την απελευθέρωση της SecB από το ένζυμο της ATPάσης (Randall, Crane et al. 2005).



σχήμα 1.7 : από (Zhou and Xu 2005). Κρυσταλλική δομή του τετραμερούς SecB με τα καρβοξυτελικά κατάλοιπα της SecA (κατάλοιπα 876-899 με μωβ). Κάθε πεπτίδιο προσδένει ένα ιόν ψευδαργύρου.

1.6.2 Η ATPάση SecA

Η SecA υδρολύει ATP και παρέχει στο σύστημα Sec την απαραίτητη ενέργεια για την μεταφορά των υποστρωμάτων διάμεσου του μεμβρανικού καναλιού SecY. Η SecA εμφανίζεται στο διάλυμα ως διμερές με σταθερά διάστασης 1 μM , ενώ η συγκέντρωσή της στο κύτταρο είναι 2-5 μM . Επομένως αναμένεται ότι η SecA στο κύτταρο βρίσκεται σε διμερή μορφή (Driessen 1993). Η κατανομή της πιστεύεται ότι είναι ίση στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. Το σημείο διαμερισμού, παρόλο που έχει κρυσταλλωθεί και ως διμερές, δεν είναι με βεβαιότητα γνωστό μιας και σε κάθε δομή φαίνεται να είναι διαφορετικό (Zimmer, Li et al. 2006; Papanikolaou, Papadonasilaki et al. 2007). Το κάθε πρωτομερές (102 kDa) απαρτίζεται από τρεις διακριτές δομικές μονάδες: τον DEAD κινητήρα, την περιοχή πρόσδεσης προπρωτεϊνών (PBD) και το καρβοξυτελικό τμήμα (C-domain) (Vrontou and Economou 2004).

Στην διατριβή αυτή επιδιώξαμε να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο οι εκκριτικές πρωτεΐνες στοχεύονται στην ATPάση SecA, στην περίπτωση της μετά-μεταφραστικής μετατόπισης, με την βοήθεια των σαπερονών. Θελήσαμε να κατανοήσουμε και να καταγράψουμε ποιά είναι τα κρίσιμα χαρακτηριστικά στην δομή των προπρωτεϊνών, πως αυτά αναγνωρίζονται από τις σαπερόνες και πως τελικά τα εκκριτικά υποστρώματα παραδίδονται στην SecA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

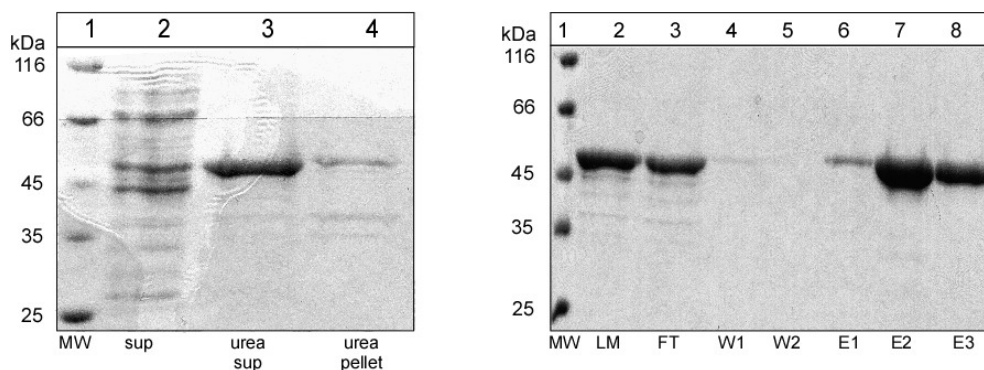
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1 Βιοφυσικός χαρακτηρισμός δομής της αλκαλικής φωσφατάσης

2.1.1 Έκφραση και καθαρισμός της αλκαλικής φωσφατάσης

Η αλκαλική φωσφατάση είναι πρωτεΐνη που ενώ φυσιολογικά συντίθεται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή πρόδρομου μορίου, καταλήγει τελικά στο περίπλασμα όπου και λειτουργεί ως ένζυμο. Πρόκειται για ένα μόριο το οποίο είναι απόλυτα διαλυτό σε υδατικά διαλύματα, συμπεριφέρεται άψογα κατά τον καθαρισμό όπως και στην χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, την βασική τεχνική σε αυτήν την διατριβή.

Τα γονίδια της αλκαλικής φωσφατάσης και των παραγώγων της απομονώθηκαν και εισήχθηκαν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν εξαΐστιδινικό καρβοξυτελικό επίτοπο ο οποίος χρησιμοποιείται για την απομόνωση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος με την χρήση χρωματογραφίας συγγενείας μετάλλου (βλ.5.2.2). Τα πλασμίδια εισήχθησαν σε βακτηριακά στελέχη BL21.19 (Mitchell and Oliver 1993) και η υπερέκφραση των πρωτεϊνών επάχθηκε με την χρήση IPTG. Ακλουθώντας συγκεκριμένες συνθήκες υπερέκφρασης, το 70-90% της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε σωματία εγκλεισμού τα όποια απομονώθηκαν για να πραγματοποιηθεί καθαρισμός της πρωτεΐνης (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Ανάλυση του καθαρισμού της αγρίου τύπου αλκαλικής φωσφατάσης με SDS-PAGE σε 12,5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών πραγματοποιήθηκε με χρώση Coomassie Blue. Η αλκαλική φωσφατάση με τον εξαϊστιδινικό επίτοπο (52kDa) καθαρίστηκε από έγκλειστα σωματίδια διαλυτοποιημένα σε ουρία (αριστερή εικόνα), τα οποία είχαν προέλθει από 3L E. Coli βακτηριακής καλλιέργειας, αφού διαπέρασαν σε 10ml ρητίνης Ni²⁺-NTA (δεξιά). Αριστερή εικόνα, σειρά 1: μοριακοί δείκτες Biorad (MW), σειρά 2: υπερκείμενο διασπασμένων κυττάρων μετά από υπερφυγοκέντρηση (sup), σειρά 3: υπερκείμενο επαναδιαλυτοποιημένου σε ουρία του ιζήματος από την πρώτη υπερφυγοκέντρηση (urea sup), σειρά 4: ίζημα υπερφυγοκέντρησης παρουσία ουρίας. Δεξιά εικόνα, σειρά 1: μοριακοί δείκτες Biorad (MW), σειρά 2: δείγμα από το στάδια εξαγωγής της πρωτεΐνης από τα έγκλειστα σωματίδια που αντιπροσωπεύει το υλικό που διαπέρασε την ρητίνη (LM), σειρά 3: υλικό που διαπέρασε την ρητίνη (FT), σειρά 4,5: δείγματα από τα στάδια εκπλύσεων, σειρά 6,7,8: δείγματα καθαρής πρωτεΐνης από τα κλάσματα έκλουσης της από την ρητίνη.

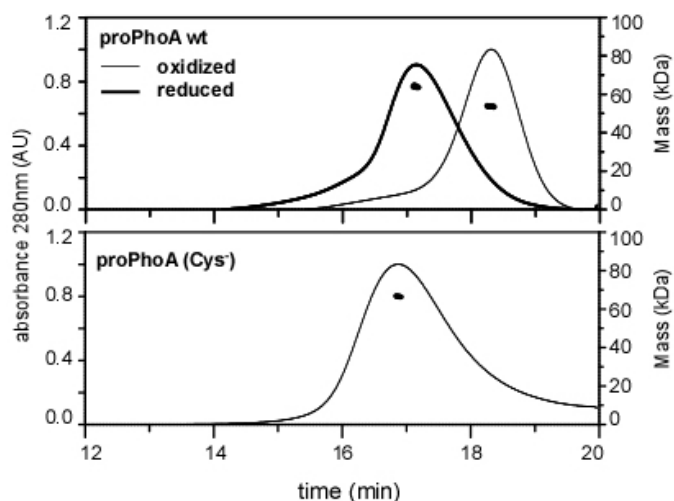
2.1.2 Εγγενής και μη εγγενής κατάσταση της αλκαλικής φωσφατάσης

Η αναδίπλωση της αλκαλικής φωσφατάσης στην ενζυμικά ενεργή, εγγενή της στεροδιαμόρφωση, απαιτεί την δημιουργία δυο ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών (Akiyama and Ito 1993). Αντίθετα, η ανηγμένη, μη εγγενής αλκαλική φωσφατάση είναι ενδημικά ανενεργή. Έκτος από την ενζυμική δραστηριότητα, οι δυο αυτές καταστάσεις της πρωτεΐνης διαφέρουν και στην δυνατότητα τους να μετατοπισθούν διάμεσου μεμβράνης από την Sec ATPάση (Gouridis, Karamanou et al. 2009). Η οξειδωμένη, εγγενή μορφή, ενώ είναι ενζυμικά ενεργή δεν μπορεί να μετατοπισθεί στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων παρουσία ATP. Αντίθετα η ανηγμένη, μη εγγενή μορφή, μετατοπίζεται από την Sec ATPάση.

Με την παρουσία ή μη αναγωγικού παράγοντα (DTT) μπορούμε να ρυθμίσουμε σε ποια μορφή θα βρίσκεται η αλκαλική φωσφατάση.

Μελετήσαμε τις δυο μορφές του μορίου και μπορέσαμε να τις διακρίνουμε με την χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Έτσι απουσία αναγωγικού παράγοντα η αλκαλική φωσφατάση εκλύεται με καθυστέρηση, σαν μικρότερο μόριο, από ότι παρουσία DTT (σχήμα 2.2). Για να αποδείξουμε ότι η παρουσία του αναγωγικού παράγοντα επηρεάζει μόνο την κατάσταση της αλκαλικής φωσφατάσης, εξετάστηκε και το παράγωγο της αλκαλικής φωσφατάσης του οποίου οι κυστεΐνες μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες. Το παράγωγο αυτό είναι εντελώς ανάλογο, σε λειτουργία και ιδιότητες, της ανηγμένης κατάστασης (Gouridis, Karamanou et al. 2009), και το επιβεβαιώσαμε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Το παράγωγο εκλύεται σε όμοιο χρόνο με την μη εγγενή μορφή της αλκαλικής φωσφατάσης (σχήμα 2.2).

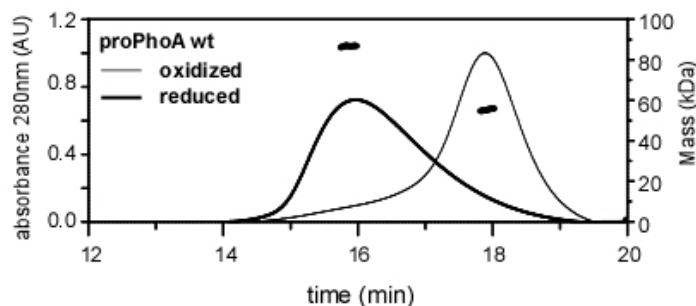
Το δείγμα διαπερνά κολώνα, η οποία περιέχει υλικό Superdex 200, και τα μόρια που περιέχονται σε αυτό διαχωρίζονται με βάση τον υδροδυναμικό τους όγκο. Με την σκέδαση ακτινών λέιζερ που εκπίπτουν στα μόρια που εκλύονται από την κολώνα από πολλές διαφορετικές γωνίες (MALLS) μπορέσαμε να μετρήσουμε την μάζα της πρωτεΐνης και στις δυο καταστάσεις που περιγράψαμε. Επιπλέον με την σκέδαση στατικού φωτός (QELS) στο δείγμα μπορέσαμε να μετρήσουμε την υδροδυναμική ακτίνα των μορίων (βλ. 5.4) (σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2: Αποτελέσματα χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού που συνδέεται με MALLS της αλκαλικής φωσφατάσης (proPhoA) σε διάλυμα 50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl. Οι τελείες αντιπροσωπεύουν την μετρούμενη μάζα για το εκλυόμενο μόριο. Εικόνα πάνω : διακρίνονται οι

δύο διαφορετικές καταστάσεις (εγγενής και μη εγγενής) ως δύο διακριτοί πληθυσμοί. Η εγγενής (oxidized) μορφή εμφανίζεται με λεπτή γραμμή να εκλύεται αργότερα απ' ό,τι η μη εγγενής (reduced), η οποία φαίνεται με έντονη γραμμή. Εικόνα κάτω : το χρωματογράφημα του παραγώγου της αλκαλικής φωσφατάσης στο οποίο έχουν αντικατασταθεί όλες οι κυστεΐνες με σερίνες. Σε όλες τις περιπτώσεις η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που φορτώθηκε στη κολώνα είναι 20mM.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν απόκλιση της πειραματικής μάζας της αλκαλικής φωσφατάσης από την θεωρητική. Σε όλες τις περιπτώσεις η μετρούμενη μάζα δεν βρέθηκε μικρότερη από περίπου 62 kDa, ενώ το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης υπολογίζεται 52 kDa. Με την μεθοδολογία που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό της μάζας, η μέτρηση μας είναι πάντα ο μέσος όρος των μαζών που ανιχνεύονται ανα στιγμή από το laser. Έτσι οι επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πολύ πάνω από την θεωρητική μάζα αποτελούν ένδειξη συνείπαρξης μεγαλύτερων μορίων μαζί με τον κύριο πλυθισμό των 52 kDa. Είναι γνωστό ότι η αλκαλική φωσφατάση μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον εαυτό της και να προκύψουν ολιγομερή. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η απόκλιση που παρατηρούμε οφείλεται σε ολιγομερισμό της πρωτεΐνης, πραγματοποιήσαμε πειράματα με διαφορετικές συνθήκες και διαφορετικά παράγωγα του μορίου. Αποδείξαμε ότι η απόκλιση οφείλεται όντως στην συνύπαρξη πληθυσμού ολιγομερών. Επιπλέον παρατηρήσαμε ότι η ανηγμένη μορφή της αλκαλικής φωσφατάσης έχει πολύ μεγαλύτερη τάση να δημιουργεί ολιγομερή απ' ό,τι η οξειδωμένη (σχήμα 2.3).

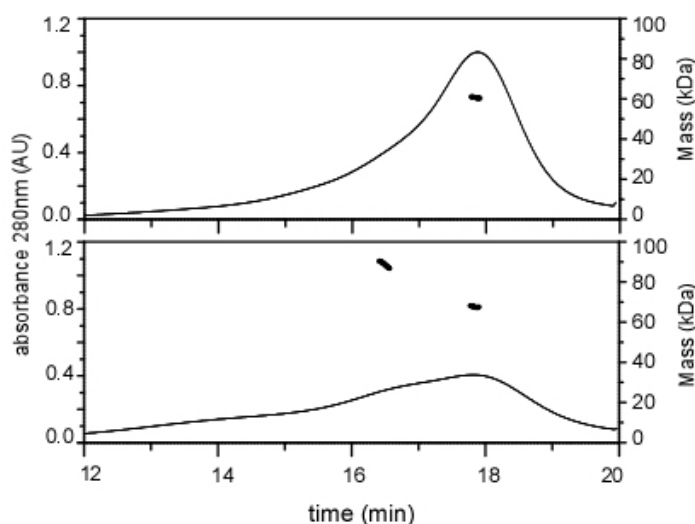


Σχημα 2.3 : Χρωματογραφήματα της αγρίου τύπου αλκαλικής φωσφατάσης σε υψηλή συγκέντρωση. Οι τελείες αντιπροσωπεύουν την μέτρηση μάζας στη μονάδα του χρόνου. Διακρίνονται οι δύο διαφορετικές μορφές της πρωτεΐνης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις η ανηγμένη μορφή (έντονη γραμμή) έχει πολύ μεγάλη τάση να δημιουργεί ολιγομερή καθώς η μάζα ~90 kDa της ανηγμένης μορφής έχει πολύ μεγάλη απόκλιση από την θεωρητική. Αντίθετα η οξειδωμένη

κατάσταση της πρωτεΐνης δεν εμφανίζει τον ίδιο φαινότυπο καθώς η μάζα παραμένει ίδια με αυτήν που μετρήθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση ~60 kDa. Η συγκέντρωση της αλκαλικής φωσφατάσης που φορτώθηκε στην κολώνα είναι 100mM.

2.1.3 Επίδραση των μετάλλων στον ολιγομερισμό της αλκαλικής φωσφατάσης

Είναι γνωστό ότι η αλκαλική φωσφατάση είναι ενζυμο που στην εγγενή του μορφή φέρει μέταλλα. Για να μελετήσουμε τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν τα μέταλλα τις δυο καταστάσεις της πρωτεΐνης πραγματοποιήσαμε πειράματα παρουσία επιπρόσθετης ποσότητας μετάλλων. Παρατηρήσαμε ότι η παρουσία μαγνησίου και ψευδαργύρου προάγει την δημιουργία ολιγομερών στην οξειδωμένη κατάσταση (σχήμα 2.4).

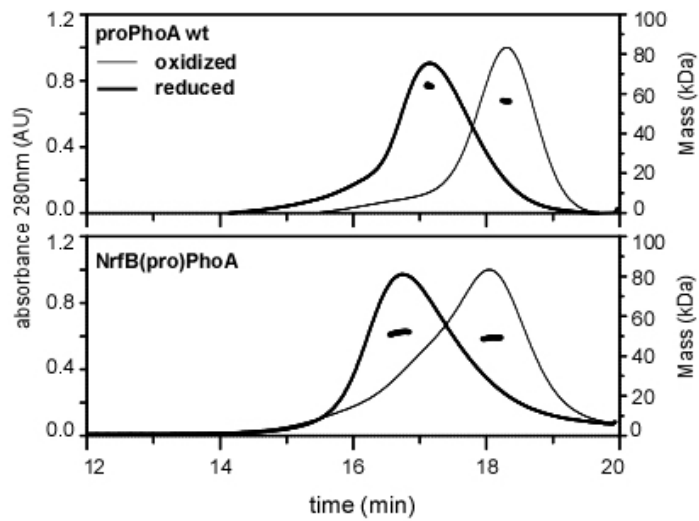


Σχήμα 2.4 : Χρωματογράφημα της αγρίου τύπου αλκαλικής φωσφατάσης σε συγκέντρωση 1,2 mM. Η οξειδωμένη μορφή (πανω) εξακολουθεί να παραμένει κατά πλειοψηφία μονομερες με μαζα 62 kDa. Με την προσθήκη επιπλέον 1,2 mM μαγνησίου και 1,2 mM ψευδαργύρου η εγγενής, οξειδωμένη, μορφή εμφανίζει πληθώρα ολιγομερών.

2.1.4 Επίδραση της μετάλλαξης T59R και του σηματοδοτικού πεπτιδίου στην υδροδυναμική ακτίνα και τον ολιγομερισμό της αλκαλικής φωσφατάσης.

Το γεγονός ότι η παρουσία ενός παραγοντα (DTT) αλλάζει τόσο εντυπωσιακά την χρωματογραφική συμπεριφορά του μορίου, ενώ προκειται για την ίδια πρωτείνη, αποτελεί ένδειξη ότι επέρχεται μια δραματική αλλαγή στον υδροδυναμικό όγκο του. Η μέτρηση της υδροδυναμικής ακτινας δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί στην αγρίου τυπου αλκαλικη φωσφαταση, ειδικα στην ανηγμενη μορφη, διοτι ο πληθυσμος δεν είναι ομοιογενεις, αφου μετραται μεγαλυτερη από 60 kDa.

Για αυτόν τον λόγο εστιασαμε στην ευρεση ενός παραγωγου της αλκαλικης φωσφατασης χωρις την ταση να δημιουργει ολιγομερη, ετσι ώστε να πετυχουμε μετρησεις μαζας οσο πιο κοντα στο θεωρητικο. Δοκιμασαμε το μεταλλαγμα T59R της αλκαλικης φωσφατασης το οποιο εχει αναφερθει ως μονομερες (Boulangier and Kantrowitz 2003). Παραλληλα εξετασθηκαν και παραγωγα στα οποια ειχε αντικατασταθει το σηματοδοτικο πεπτιδιο με αυτο αλλων περιπλασμικων πρωτεινων. Επιβεβαιωθηκε ο φαινοτυπος της μεταλλαξης T59R όμως οι μικροτερες αποκλισεις στην μαζα προεκυψαν από αλκαλικη φωσφαταση που φερει το σηματοδοτικο πεπτιδιο της πρωτεινης NrfB. Με την προσθηκη αναγωγικου παραγοντα επηλθε αυξηση της υδροδυναμικης ακτινας από 3.3nm σε 4.3nm, ενώ και στις δυο περιπτωσεις η μετρομενη μαζα είναι 49 kDa και 52 kDa αντιστοιχα, ειχε μηδενικη αποκλιση από την θεωρητικη (σχημα 2.5) (παράρτημα 2).



Σχήμα 2.5 : Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αγρίου τύπου αλκαλικής φωσφατάσης (πάνω) με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 60 kDa και στις δυο καταστάσεις - εγγενής και μη εγγενής -. Αντίθετα το παράγωγο της (κάτω), στο οποίο έχει αντικατασταθεί το σηματοδοτικό πεπτίδιο με αυτό της NrfB μετράται με μοριακό βάρος 49 kDa και 51 kDa στην εγγενή και μη εγγενή αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

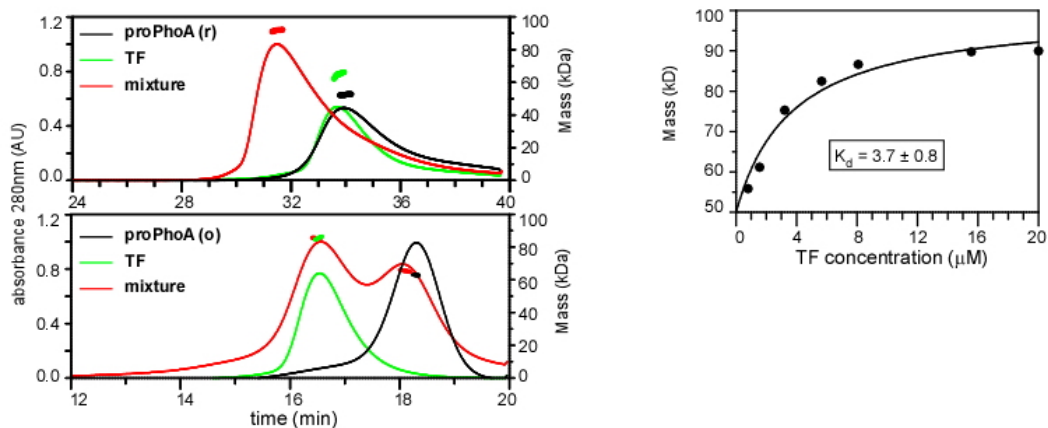
3.1 Σχηματισμός και χαρακτηρισμός συμπλοκών της αλκαλικής φωσφατάσης με τις σαπερόνες SecB και TF

Η αλκαλική φωσφατάση όπως και όλες οι πρωτεΐνες συντίθενται στο κυτταρόπλασμα, όμως ο τελικός της προορισμός είναι το περίπλασμα. Η διαδρομή που ακολουθούν οι εκκριτικές πρωτεΐνες, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Παρόλο που έχουν προταθεί πολλοί διαφορετικοί «οδοί» προς την μεμβράνη καμιά δεν φαίνεται να είναι ολοκληρωμένη και κοινά αποδεκτή. Η ιδέα ότι άλλα μόρια – οι σαπερόνες – βοηθούν αυτές τις πρωτεΐνες ώστε τελικά να φτάσουν στην Sec ATPάση κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος. Σε όλα τα πειράματα που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκε το μετάλλαγμα της αλκαλικής φωσφατάσης, του οποίου έχουν αντικατασταθεί όλες οι κυστεΐνες, αντί της αγρίου τύπου ανηγμένης μορφής. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η οποία αμφιβολία για το ποσοστό αναγωγής της πρωτεΐνης σε κάθε περίπτωση. Η ανάλυση έγινε με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε σύνδεση με MALLS-QELS, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις η κινητή φάση είναι 50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA, εκτός αν αναγράφεται διαφορετικά.

3.1.1 Σύμπλοκο αλκαλικής φωσφατάσης με TF

Η σαπερόνη Trigger Factor (TF) βρίσκεται φυσιολογικά προδεδεμένη στο ριβόσωμα, κάτι που σημαίνει ότι είναι το πρώτο μόριο που ανιχνεύει συνεχώς τη πρωτεΐνη εκφράζεται. Όταν δεν αλληλεπιδρά με κάποιο άλλο μόριο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ως διμερές με σταθερά διάστασης ~3 μM (σχήμα 3.1). Δεν ήταν γνωστό όμως αν συμμετέχει στο μονοπάτι που οδηγεί τις περιπλασμικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη. Ακόμα δεν ήταν γνωστό αν διέθετε την ικανότητα να ξεχωρίζει ποια μόρια πρέπει να στοχευθούν στην μεμβράνη και ποια όχι. Στην παρούσα διατριβή διαπιστώσαμε ότι ενώ ο TF είναι σε θέση να δημιουργεί σταθερό σύμπλοκο με την ανηγμένη μορφή της αλκαλικής φωσφατάσης, δεν

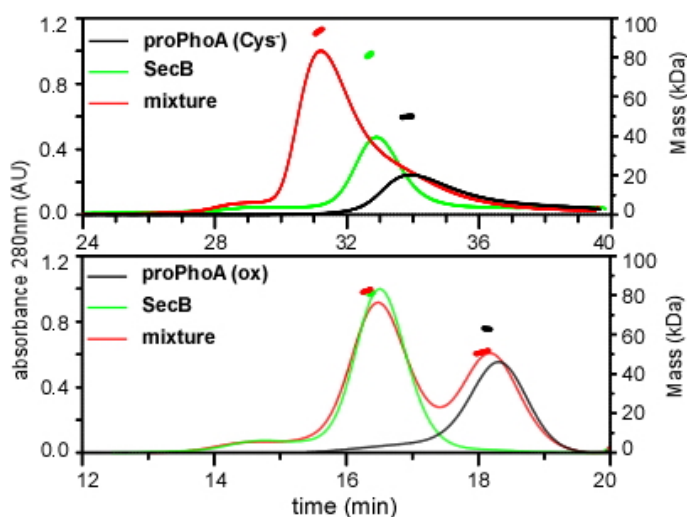
αλληλεπίδρα με την οξειδωμένη (σχήμα 3.1). Παρατηρήσαμε ότι η στοιχειομετρία του συμπλόκου του TF με την αλκαλική φωσφατάση είναι 1:1. Έτσι δείξαμε ότι διμερές της σαπερόνης παύει να υπάρχει, ώστε να αντιδράσει με το υπόστρωμα.



Σχήμα 3.1 : (Αριστερά) Αλληλεπίδραση της σαπερόνης TF με την ανηγμένη αλκαλική φωσφατάση (proPhoA (r)) και την οξειδωμένη (proPhoA (o)) όπως φαίνεται από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. (πάνω αριστερά) Αντίδραση 40μM TF με 20mM proPhoA(Cys⁻) (αναλογο της ανηγμενης μορφης proPhoA(r)) σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA) για 15 min σε θερμοκρασία 4°C. Για να επιτευχτεί καλύτερος διαχωρισμός η ανάλυση έγινε με ροη 0.4 ml/min. Παρατηρείται να εμφανίζεται νέος πληθυσμός ενώ παράλληλα έχει μειωθεί το σήμα των αρχικών μορίων. Ο νέος πληθυσμός μετράται με μάζα 94 kD, που δικαιολογεί την δημιουργία συμπλόκου από ένα μόριο TF και άλλο ένα μόριο αλκαλικής φωσφατάσης. (κάτω αριστερά) Αντίδραση όπως περιγράφηκε παραπάνω άλλα με οξειδωμένη αλκαλική φωσφατάση, με ροη 0.8 ml/min. Το αποτέλεσμα είναι η συμβολή των δυο αρχικών καμπυλών, το οποίο δείχνει ότι δεν έχουν αλληλεπιδράσει τα δυο μόρια. Επιβεβαίωση αποτελεί η μέτρηση μάζας η οποία πριν και μετά την ανάμιξη παραμένει ίδια στους δυο κυρίως πληθυσμούς. (δεξιά) Η συγγένεια του TF για τον εαυτό του βρέθηκε όπως φαίνεται 3.7 mM. Οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται στο οριζόντιο άξονα αναφέρονται στην συγκέντρωση μετά την αραιώση που έχει υποστεί το δείγμα, περίπου δέκα φορές, αφότου φορτώθηκε στην κολώνα.

3.1.2 Σύμπλοκο αλκαλικής φωσφατάσης με SecB

Η SecB είναι η ειδική σαπερόνη του συστήματος μετατόπισης Sec. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 17 kDa η οποία σχηματίζει πολύ σταθερό τετραμερές όταν βρίσκεται σε διάλυμα. Η προσθήκη του εξαϊστιδινικού επιτόπου στο αμινοτελικό της άκρο έχει σαν αποτέλεσμα να οργανώνεται τελικά ένα τετραμερές με συνολική μάζα 80 kDa. Η ανάμιξη της SecB με την ανηγμένη αλκαλική φωσφατάση στα πειράματα μας είχε ως αποτέλεσμα να δημιουργηθεί ένα σταθερό σύμπλοκο 94 kDa. Αυτή η μάζα θα μπορούσε μόνο να αντιστοιχεί σε διμερές μόριο SecB μαζί με ένα μόριο αλκαλικής φωσφατάσης, στοιχειομετρία δηλαδή 2:1. Όπως στην περίπτωση του TF, η SecB δεν βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την εγγενή κατάσταση της proPhoA (σχήμα 3.2).

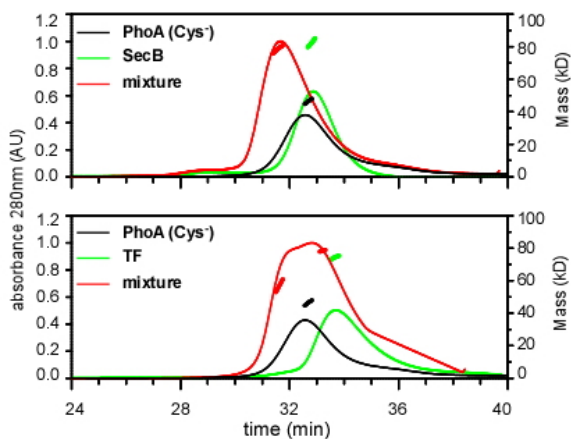


Σχήμα 3.2 : Αντίδραση της σαπερόνης SecB με τις δυο μορφές της αλκαλικής φωσφατάσης. (πάνω) Αντίδραση 80 μ M SecB με 20 μ M proPhoA(Cys⁻) σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA) για 15 min σε θερμοκρασία. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με ροή 0.4 ml/min. Το τετραμερές SecB (πράσινο) φαίνεται δίσταται ώστε να προσδεθεί ως διμερές με την αλκαλική φωσφατάση σχηματίζοντας έναν νέο πληθυσμό με μοριακό βάρος ~91 kDa. (κάτω) Η αντίδραση της SecB με την οξειδωμένη αλκαλική φωσφατάση όπως πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες,

με μόνη διαφορά την ροή (0.8 ml/min). Η καμπύλη της ανάμιξης όπως φαίνεται είναι το άθροισμα των δυο καμπύλων των αρχικών μορίων.

3.1.3 Επίδραση σηματοδοτικού σήματος της αλκαλικής φωσφατάσης στις αλληλεπιδράσεις της με τις σαπερόνες

Για να εξετάσουμε αν το αμινοτελικό άκρο της αλκαλικής φωσφατάσης (signal peptide), το οποίο φέρει πολύ σημαντικό σήμα για την επιτυχημένη μετατόπιση της στο περίπλασμα, επηρεάζει την σύνδεση της με τις σαπερόνες πραγματοποιήσαμε πειράματα με παράγωγα της αλκαλικής φωσφατάσης στα οποία είτε έλειπε πλήρως είτε είχε αντικατασταθεί. Όσον αφορά την σαπερόνη SecB δεν φάνηκε να διαφοροποιείται η εικόνα σε σχέση με την ολόκληρη proPhoA. Η SecB είναι σε θέση να σχηματίσει σταθερό σύμπλοκο με την ανηγμένη μορφή του ώριμου τμήματος της αλκαλικής φωσφατάσης με την ίδια στοιχειομετρία 2:1. Αντίθετα, η ικανότητα του TF να αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα επηρεάστηκε αισθητά από την έλλειψη του σηματοδοτήσου πεπτιδίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και η αντικατάσταση του πεπτιδίου με αυτό άλλης περιπλασμικής πρωτεΐνης, δεν άλλαξε τον φαινότυπο. Από τα χρωματογράφημα φαίνεται ότι ο TF μάλλον αλληλεπιδρά με το ώριμο ανηγμένο τμήμα της proPhoA όμως δεν σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο ώστε να προκύψει ένας νέος πληθυσμός μορίων (σχήμα 3.3)

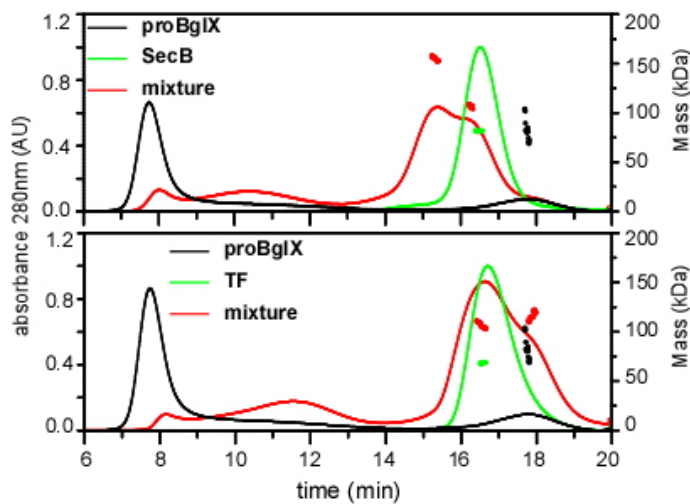


Σχήμα 3.3 : Αντίδραση του ώριμου τμήματος της αλκαλικής φωσφατάσης με τις σαπερόνες SecB (πάνω) και TF (κάτω) και ανάλυση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ροή 0.4 ml/min. Χρησιμοποιήθηκε το παράγωγο του ώριμου τμήματος στο οποίο έχουν αντικατασταθεί οι κυστεΐνες με σαπερόνες, πρόκειται δηλαδή για ανάλογο της ανοιγμένης μορφής. (πάνω) Ανάμιξη 80μM SecB (πράσινο) με 20μM ώριμης αλκαλικής φωσφατάσης (μαύρο) σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA) και επώαση για 15 min στους 40C. Ο νέος πληθυσμός εμφανίζεται με μοριακό βάρος 80 kDa.

(κάτω) Αντίδραση 40 mM TF με 20 mM proPhoA ώριμης αλκαλικής φωσφατάσης στις ίδιες συνθήκες. Παρόλο που το αποτέλεσμα δεν είναι ακριβώς η συμβολή των δυο αρχικών καμπυλών, εντούτοις η μετρούμενη μάζα δεν δικαιολογεί την δημιουργία κάποιου σταθερού συμπλόκου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο μορίων είναι πιθανόν αδύναμη και παροδική με αποτέλεσμα να μην μπορεί να εκλουσθεί ένας ομοιογενής πληθυσμός.

3.2 Σχηματισμός και χαρακτηρισμός συμπλόκων της β-γλυκοσιδάσης BglX με τις σαπερόνες SecB και TF

Εκτός από την αλκαλική φωσφατάση εξεταστήκαν και άλλες περιπλασμικές πρωτεΐνες ώστε να διαπιστωθεί αν αναγνωρίζονται με τον ίδιο τρόπο από τις δυο σαπερόνες. Η πρόδρομη β-γλυκοσιδάση proBglX λειτουργεί ως ενζυμο στο περίπλασμα, ενώ πρόκειται για ένα σαφώς μεγαλύτερο μόριο απ' τήν αλκαλική φωσφατάση με μοριακό βάρος 82 kDa. Εργαζόμενοι με την ίδια μεθοδολογία τα αποτελέσματα έδειξαν η SecB προσδένεται στην γλυκοσιδάση σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με μάζα 165 kDa (σχήμα 3.4). Μια τέτοια μάζα θα μπορούσε να δικαιολογηθεί μόνο με την συνύπαρξη ενός μορίου υποστρώματος και τεσσάρων σαπερόνης, δηλαδή στοιχειομετρία 1:4. Για τον TF, εν αντιθέση με την SecB, δεν μπορούν να εξαρθούν ασφαλή συμπεράσματα. Από την χρωματογραφία προκύπτει ότι ενώ η σαπερόνη αποτρέπει την γλυκοσιδάση να δημιουργήσει συσσωματώματα, εντούτοις δεν σχηματίζεται σταθερό σύμπλοκο TF-proBglX (σχήμα 3.4).



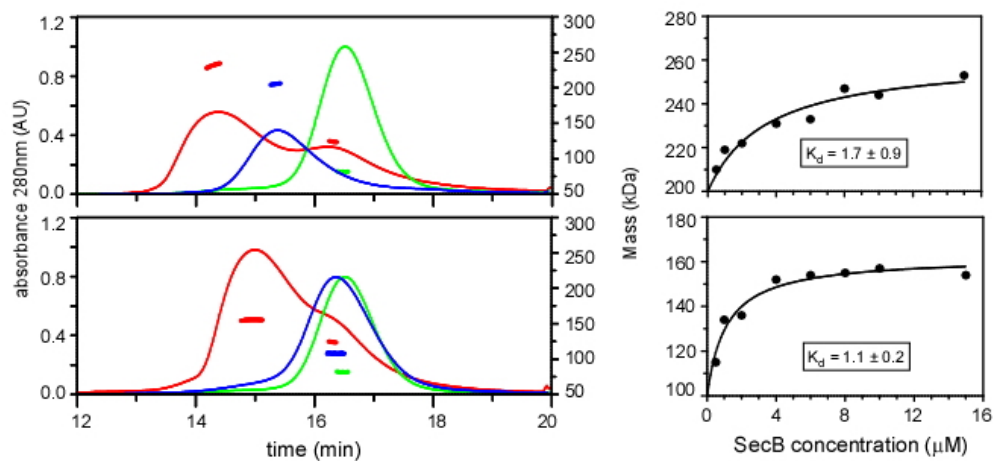
Σχήμα 3.4 : Αντίδραση των σαπερονών SecB (πάνω) και TF (κάτω) με την πρόδρομη β-γλυκοσιδάση και ανάλυση με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με ροή 0.8 ml/min. (πάνω) Ανάμιξη 10 mM proBglX (μαύρο) με 80 mM SecB (πράσινο) στο διάλυμα της χρωματογραφία και επώαση για 15 min στους 40C. Η γλυκοσιδάση έχει πολύ μεγάλο πρόβλημα να κρατηθεί διαλυτή σε υδατικά διαλύματα, σχηματίζοντας συσσωματώματα. Τα συσσωματώματα εμφανίζονται στα 8 λεπτά (μαύρο) απουσία σαπερόνης. Με τη προσθήκη της SecB το αποτέλεσμα (κόκκινο) είναι να μειώνεται δραματικά ο πληθυσμός ο οποίος έχει δημιουργήσει συσσωματώματα ενώ παράλληλα εμφανίζεται ένας νέος. Στα δεκαπέντε λεπτά εκλύεται ο νέος πληθυσμός με μάζα 165 kDa, το οποίο δικαιολογείται μόνο με τον σχηματισμό σταθερού συμπλόκου ανάμεσα σε τέσσερα μόρια σαπερόνης και ένα υποστρώματος. (κάτω) Αντίδραση ανάμεσα σε 40 mM TF με 10 mM proBglX στις ίδιες συνθήκες. Ενώ και ο TF μπορεί να εμποδίσει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων, καθώς το σήμα σχεδόν μηδενίζεται στα οκτώ λεπτά (κόκκινο), εντούτοις η αλληλεπίδραση δεν μεταφράζεται σιν δημιουργία σταθερού συμπλόκου. Το υπόλοιπο χρωματογράφημα μοιάζει περισσότερο με το άθροισμα των δυο αρχικών καμπύλων.

3.3 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σαπερονών και της μετεξέτασης SecA

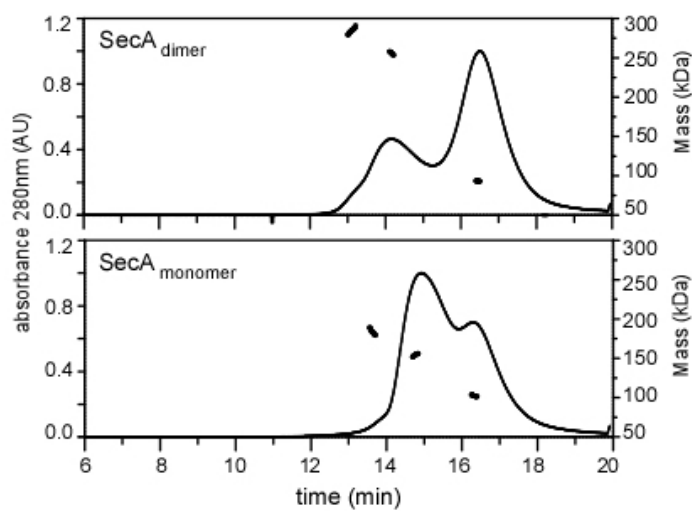
Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σαπερονών είναι ζωτικής σημασίας καθώς στο ζωντανό κύτταρο δεν υπάρχει μόνο μια σαπερόνη με ένα υπόστρωμα την φόρα. Πολύπλοκα δίκτυα και αλληλεπικαλυπτόμενοι οδοί συνθέτουν την πραγματική εικόνα. Για να κατανοήσουμε πλήρως τον τρόπο με τον οποίο οι

εκκρινόμενες πρωτεΐνες φθάνουν τελικά στην μεμβράνη και στην ATPάση SecA θα πρέπει να γνωρίζουμε αν και πως οι σαπερόνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με την ATPάση. Παρατηρήσαμε ότι ο TF δεν εμφανίζει αξιόλογη συγγένεια είτε με την SecB είτε με την SecA. Αντίθετα η SecB σχηματίζει ένα πολύ σταθερό σύμπλοκο με την SecA με συγγένεια 1.7 μM . Η στοιχειομετρία του συμπλόκου βρέθηκε SecB/SecA=2/1 δημιουργώντας ένα σύμπλοκο με ~245 kDa μάζα (σχήμα 3.5). Η SecA φυσιολογικά εμφανίζεται ως διμερές, διαφοροποιώντας όμως το αμινοτελικό της άκρο προκύπτει πρωτεΐνη η οποία δεν είναι σε θέση να δημιουργήσει το διμερές (manuscript in preparation). Χρησιμοποιώντας αυτό το μετάλλαγμα της SecA πραγματοποιήσαμε την ίδια σειρά πειραμάτων και αποδείξαμε ότι το μονομερές της SecA έχει τον αναγκαίο και ικανό επίτροπο πρόσδεσης στην SecB. Το μονομερές σχημάτισε σύμπλοκο με την SecB με μάζα ~ 150 kDa, το οποίο σημαίνει ότι εξακολουθούν να προσδένονται δυο μόρια σαπερόνης στην SecA (σχήμα 3.5). Η συγγένεια του μονομερούς με την SecB υπολογίστηκε 1.1 μM .

Αξίζει να σημειωθεί ότι με την προσθήκη μεγάλης περίσσειας SecB (πάνω από δέκα φορές από την συγκέντρωση της SecA) και στις δυο μορφές της SecA εμφανίστηκε ένας πληθυσμός μορίων μεγαλύτερος σε μάζα από 245 kDa και 150 kDa. Η μάζα που υπολογίστηκε για αυτά τα μόρια ήταν 285 kDa και 185 kDa για το διμερές και μονομερές αντίστοιχα (εικόνα 3.6). Η επιπλέον μάζα ταιριάζει με αυτήν ενός επιπλέον διμερούς SecB και στις δυο περιπτώσεις.



Σχήμα 3.5 : (αριστερά) Αποτελέσματα αντίδρασης (κόκκινο) της SecB με την αγρίου τύπου SecA (πάνω) και με το μονομερές μετάλλαγμα (κάτω). Στις δυο περιπτώσεις η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl) με ροή 0.8 ml/min. Η επώαση έγινε για 15 min στους 4°C. (πάνω) 80mM SecB (πράσινο) και 10μM αγρίου τύπου SecA(μπλε), (κάτω) 80mM SecB (πράσινο) και 10μM μονομερούς SecA (μπλε). (δεξιά) Η αύξηση του μοριακού βάρους του συμπλόκου SecA-SecB καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της προστιθεμένης SecB. Η συγγένεια της SecB για την SecA (πάνω) υπολογίζεται 1.7μM ενώ για την μονομερή (κάτω) 1.1μM. Η συγκέντρωση της SecA και στις δυο περιπτώσεις είναι 10μM λαμβάνοντας υπ' όψιν ως μοριακό βάρος το μονομερές. Έτσι στην περίπτωση της αγρίου τύπου SecA (πάνω) υπάρχουν 20μM πρωτομερών ενώ του μετάλλαγματος (κάτω) 10μM πρωτομερών. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία DTT 5mM.

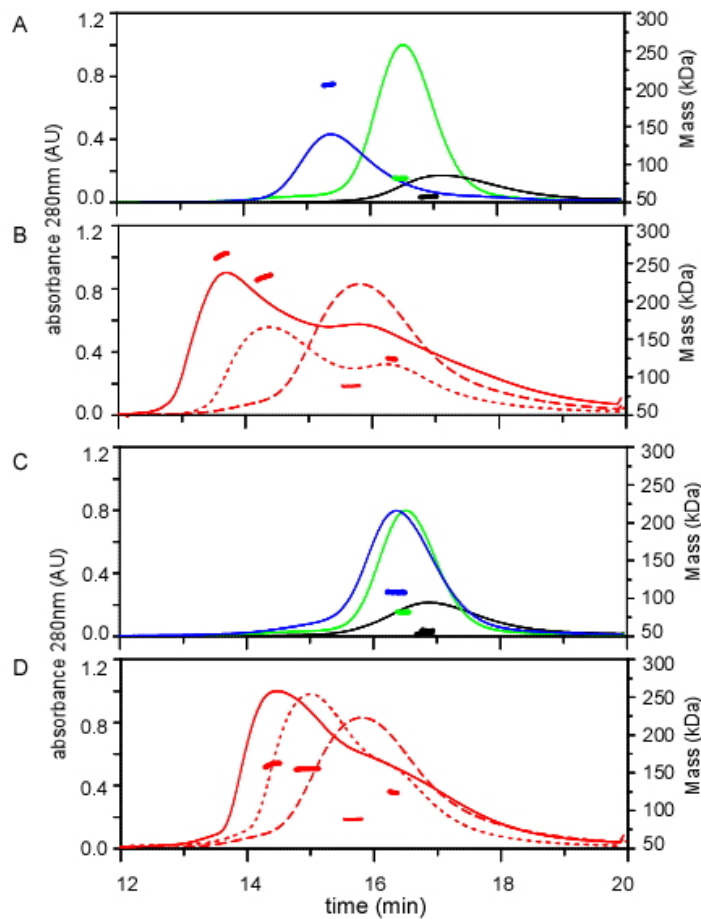


σχήμα 3.6 : Αποτελέσματα αντίδρασης μεγάλης περίσσειας SecB με αγρίου τύπου SecA (πάνω) και μονομερούς SecA (κάτω)(δεν εμφανίζονται τα αρχικά μόρια). (πάνω) Προσθήκη 150mM SecB σε 10mM SecA έχει ως αποτέλεσμα τον πληθυσμό που εκλύεται στα δεκαπέντε λεπτά. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν μάζα 285 kDa. (κάτω) Αντίστοιχα

για το μονομερές μετάλλαγμα της SecA, με την προσθήκη 150 μ M SecB αρχίζει να εμφανίζεται ένας ώμος στην καμπύλη λίγο πριν τα δεκατέσσερα λεπτά. Ο πληθυσμός αυτός μετριέται να έχει μάζα 185 kDa. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία DTT 5mM.

3.4 Μεταφορά υποστρωμάτων στην ΑΤΡάση SecA.

Όλα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, μετατοπίζονται στο περίπλασμα με μηχανική ώση από την ΑΤΡάση SecA διάμεσου του μεμβρανικής καναλιού SecY. Κάτι τέτοιο προϋποθέτει ότι κάποια στιγμή αναπόφευκτα αλληλεπιδρούν με την SecA, όμως η συγγένεια τους με την SecA στο διαλυμα είναι 3 μ M (Gouridis, Karamanou et al. 2009). Για αυτόν τον λόγο εξετάσαμε μήπως η προηγούμενη πρόσδεση σε σαπερόνη βοηθά ώστε να δημιουργηθεί σύμπλοκο στο οποίο να συνυπάρχουν υπόστρωμα και SecA. Παρατηρήσαμε ότι η ανάμιξη ενός ήδη σχηματισμένου συμπλόκου SecB-υπόστρωμα με την ΑΤΡάση έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μεγαλύτερου μορίου. Στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης εμφανίζεται ένας πληθυσμός με μοριακό βάρος 265 kDa. Δεδομένου των αποτελεσμάτων από την ενότητα 3.3, τέτοια μοριακά βάρη μπορούν να αποδοθούν μόνο σε σύμπλοκο ενός μορίου ΑΤΡάσης με ένα μόριο προπρωτεΐνης (σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.7 : Αντίδραση αλκαλικής φωσφατάσης με SecB και SecA. **A)** 20μM proPhoA (Cys⁻) (μαύρο), 80μM SecB (πράσινο), 10μM αγρίου τύπου SecA (μπλε), **B)** σύμπλοκο 20μM proPhoA με 80μM SecB (διακεκομμένο κόκκινο), σύμπλοκο 80μM SecB και 10 μM αγρίου τύπου SecA (τελείες κόκκινες), προσχηματισμένο σύμπλοκο 20 μM proPhoA με 80μM SecB στο οποίο έχει προστεθεί 10μM SecA (κόκκινη γραμμή). Ο πληθυσμός που εκλύεται από τα δεκατρία λεπτά έχει μοριακό βάρος 265 kDa. **C)** 20 μM proPhoA (Cys⁻) (μαύρο), 80μM SecB (πράσινο), 10μM μονομερούς μεταλλάγματος SecA (μπλε), **D)** σύμπλοκο 20μM proPhoA με 80μM SecB (διακεκομμένο κόκκινο), σύμπλοκο 80μM SecB με 10μM μονομερής SecA (τελείες κόκκινες), προσχηματισμένο σύμπλοκο 20μM proPhoA με 80μM SecB στο οποίο έχει προστεθεί 10μM μονομερής SecA (κόκκινη γραμμή). Εμφανίζεται ένας νέος πληθυσμός που εκλύεται λίγο πριν τα δεκατέσσερα λεπτά και ο οποίος έχει μοριακό βάρος 165 kDa. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία DTT.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όλες οι πρωτεΐνες του κυττάρου συντίθενται από το ριβόσωμα στο κυτταρόπλασμα, όμως πάνω από το 30% αυτών λειτουργεί είτε στην επιφάνεια είτε εκτός του κυττάρου. Οι εκκριτικές (προπρωτεΐνες) και οι μεμβρανικές πρωτεΐνες πρέπει με κάποιον τρόπο να στοχευθούν στο SecYEG κανάλι μετατόπισης, το οποίο είτε τις ενσωματώνει στην μεμβράνη είτε τις μετατοπίζει στο περίπλασμα. Η μεταφορά τόσο μεγάλων και δομικά πολύπλοκων μορίων διαμέσου της μεμβράνης αποτελεί πολύ μεγάλη πρόκληση για το κύτταρο. Τέτοιες προκλήσεις είναι ο διαχωρισμός των μη κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, η διατήρησή τους σε μια ενδιάμεση δομική κατάσταση η όποια να επιτρέπει την μεταφορά τους διάμεσου του καναλιού και η στόχευση αυτών στην μεμβράνη.

Σύμφωνα με τα όσα είναι γνωστά έως τώρα, το κύτταρο αντιμετωπίζει αυτές τις προκλήσεις με τις σαπερόνες και το πεπτιδίο σήμα των προπρωτεϊνών. Η SecB θεωρείται ότι σχηματίζει σύμπλοκο με τα υποστρώματα και ταυτόχρονα αποτρέπει την λανθασμένη αναδίπλωση και την στόχευση στο κανάλι SecYEG. Εναλλακτικά, τα υποστρώματα δύνανται να προσδεθούν στην ATPάση SecA μέσω του πεπτιδίου σήμα. Στην παρούσα διατριβή ερευνήσαμε μήπως υπάρχουν επιπλέον χαρακτηριστικά των προπρωτεϊνών, τα όποια είναι αναγκαία για την στόχευσή τους στην SecA. Επιπρόσθετα, προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε ποιές σαπερόνες βοηθούν την στόχευση των υποστρωμάτων στην ATPάση.

Αρχικά χαρακτηρίσαμε βιοφυσική μια γνωστή εκκριτική πρωτεΐνη, την αλκαλική φωσφατάση. Το ένζυμο αυτό λειτουργεί στο περίπλασμα, ενώ απαραίτητες προϋποθέσεις για να αποκτήσει την εγγενή του στερεοδιαμόρφωση, εκτός από την απομάκρυνση του πεπτιδίου σήματος, είναι η δέσμευση μετάλλων και δημιουργία δυο δισουλφιδικών δεσμών. Μελετήσαμε την πρόδρομη μορφή της αλκαλικής φωσφατάσης, έτσι όπως αυτή βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Με την χρήση χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού σε σύνδεση με MALLS/QELS μπορέσαμε να παρατηρήσουμε δυο διαφορετικές μορφές του μορίου απουσία ή παρουσία αναγωγικού παράγοντα. Η επώαση της αλκαλικής φωσφατάσης με

5mM DTT είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέου χρωματογραφικού πληθυσμού. Μετρήσαμε την υδροδυναμική ακτίνα αυτού του πληθυσμού 4.2 nm. Δεδομένου ότι η υδροδυναμική ακτίνα της οξειδωμένης μορφής είναι 3.5 nm, η αναγωγή της προπρωτεΐνης επέφερε αύξηση της ακτίνας κατά 20%. Αυτή η αύξηση δείχνει ότι το μόριο άλλαξε δραματικά στερεοδιαμόρφωση αποκτώντας την δομή εύπλαστης σφαίρας (molten globule). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες εντός του κυττάρου δεν θα επέτρεπαν την δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών. Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η molten globule δομή είναι πιο κοντά σε αυτήν που έχει η προπρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα.

Αξιοπρόσεκτη είναι η συμπεριφορά της πρόδρομης αλκαλικής φωσφατάσης όσον αφορά στον ολιγομερισμό της. Είναι γνωστό ότι λειτουργεί ως διμερές, κάτι που παρατηρήσαμε κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Η ανηγμένη μορφή σχηματίζει ολιγομερή σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (1μM). Αντίθετα, η οξειδωμένη χρειάζεται επιπρόσθετα μέταλλα και πολύ υψηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης (120μM). Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η οξειδωμένη κατάσταση που παρατηρούμε δεν αντιστοιχεί σε αυτήν που τελικά αναδιπλώνεται στο περίπλασμα, καθώς εκεί η πρωτεΐνη σχηματίζει διμερή. Βέβαια κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο, καθώς δεν προσομοιώνονται πλήρως οι συνθήκες του περιπλάσματος από το πείραμα. Επίσης πολύ σημαντική διαφορά είναι ότι στο περίπλασμα υπάρχει μόνο ως ώριμη πρωτεΐνη, δείχνοντας ότι σηματοδοτικό πεπτίδιο έχει κάποιο ρόλο στον ολιγομερισμό της εύπλαστης σφαίρας.

Μελετώντας τα παράγωγα της αλκαλικής φωσφατάσης που τους έχει αφαιρεθεί ή αντικατασταθεί το πεπτίδιο σήμα, παρατηρήσαμε ότι όντως αυτό παίζει ρόλο στον ολιγομερισμό της. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο φαινότυπος του μεταλλάγματος proPhoA T59R παρομοιάζεται αρκετά με τον φαινότυπο των PhoA και NrfB(pro)PhoA. Η μετάλλαξη T59R εμποδίζει τον σχηματισμό του διμερούς και το ίδιο παρατηρείται με την αφαίρεση ή αντικατάσταση του πεπτιδίου σήματος. Ενώ η αντικατάσταση του πεπτιδίου σήματος με αυτό της NrfB έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της τάσης να σχηματίζονται ολιγομερή, αντικατάσταση με το YehR σηματοδοτικό πεπτίδιο φαίνεται να προάγει την δημιουργία τους(παράρτημα 1 & 2). Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι το πεπτίδιο σήμα με κάποιον τρόπο επηρεάζει τον ολιγομερισμό της αλκαλικής φωσφατάσης. Ενώ το κύτταρο το χρησιμοποιεί για να μαρκάρει και να στοχεύει τις πρωτεΐνες,

εντούτοις αργότερα ίσως παρεμβάλλεται στο μονοπάτι για την εγγενή αναδίπλωση και γι' αυτό επέλεξε να το απομακρύνει.

Ακολούθως, ερευνήσαμε ποιό είναι το πιθανό μονοπάτι που ακολουθούν προπρωτεΐνες για να φθάνουν στην μεμβράνη. Είναι γνωστό ότι μονό η ενδημικά ανενεργή (μη-εγγενής) κατάσταση της αλκαλικής φωσφατάσης αναγνωρίζεται από την ATPάση SecA (Gouridis, Karamanou et al. 2009). Κατ' αντιστοιχία, παρατηρήσαμε ότι μονό η μη-εγγενής κατάσταση είναι σε θέση να σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με τις σαπερόνες SecB και TF. Αν για την SecB ήταν αναμενόμενο, καθώς αποτελεί την ειδική σαπερόνη του συστήματος μετατόπισης Sec, η αλληλεπίδραση του TF με μια προπρωτεΐνη δεν έχει ξαναπαρατηρηθεί. Καθώς ο TF βρίσκεται στο ριβόσωμα, αποτελεί την πρώτη σαπερόνη που συνάντα η πολυπεπτιδική αλυσίδα. Θα μπορούσαμε να σκεφτούμε ότι ο TF αναγνωρίζει για μικρό χρονικό διάστημα, αφότου τερματίσει η έκφραση, τις εκκριτικές πρωτεΐνες. Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκε σύμπλοκο στο οποίο να συμμετέχουν και τα τρία μόρια (SecB – TF – proPhoA) άλλα ούτε και αλληλεπίδραση του συμπλόκου TF – proPhoA με την SecA, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο TF ελευθερώνει το υπόστρωμα ώστε να το παραλάβει η SecB. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε μονό να ισχύει σε συνθήκες διαλύματος που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα, καθώς παρουσία μεμβράνης, η συγγένεια της SecA με το υπόστρωμα αυξάνεται από 0.2 μM σε 3 μM (Gouridis, Karamanou et al. 2009), επιτρέποντας στην SecA να αλληλεπιδράσει απευθείας με το υπόστρωμα απουσία οποιασδήποτε σαπερόνης.

Ανάλυση των μορίων με MALLS/QELS μας επέτρεψε να υπολογίσουμε την στοιχειομετρία όλων των συμπλόκων που παρατηρήσαμε. Αποτελεί πολύ ενδιαφέρον αποτέλεσμα το γεγονός ότι SecB και TF μονομερίζονται ώστε να σχηματίσουν σύμπλοκο με την αλκαλική φωσφατάση. Το διμερές του TF δίσταται για να προσδεθεί με το υπόστρωμα, σχηματίζοντας σύμπλοκο με μοριακό βάρος 93 kDa. Η SecB οργανώνεται σε ένα διμερές διμερών (80 kDa) και κατ' αντιστοιχία με τον TF, δίσταται ώστε ένα διμερές να προσδεθεί στο υπόστρωμα, δημιουργώντας σύμπλοκο 94 kDa (παράρτημα 1). Μια τέτοια παρατήρηση για την διάσταση των σαπερονών, μπορεί να δείχνει ότι η επιφάνεια με την οποία αλληλεπιδρούν με τα υποστρώματα, βρίσκεται κρυμμένη-προστατευμένη στο σημείο διμερισμού τους.

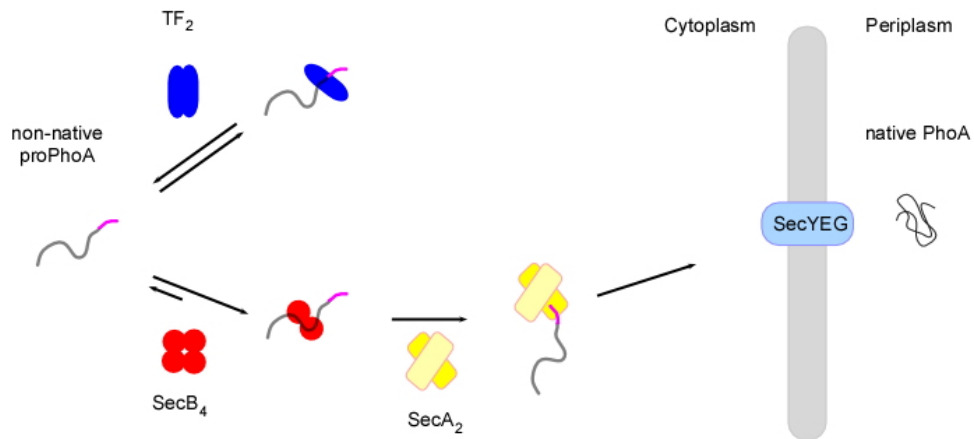
Για να διερευνήσουμε αν αυτός ο μηχανισμός αποτελεί γενική προσέγγιση για όλα τα υποστρώματα μελετήσαμε ακόμα την προπρωτεΐνη β-γλυκοσιδάση proBglX. Πρόκειται για ένα σαφώς μεγαλύτερο σε μάζα μόριο απ' ό τι η αλκαλική φωσφατάση, καθώς έχει μοριακό βάρος 80 kDa, και αποτελεί πρόκληση η μεταφορά του διάμεσου της μεμβράνης. Η γλυκοσιδάση έχει την τάση να δημιουργεί συσσωματώματα απουσία αποδιατακτικού παράγοντα. Παρόλο που και οι δυο σαπερόνες είναι σε θέση να αποτρέψουν τον σχηματισμό αυτών των συσσωματωμάτων, εντούτοις μόνο η SecB δύναται να δημιουργήσει σταθερό σύμπλοκο με την γλυκοσιδάση. Αυτή η εικόνα συμφωνεί με τα πιο παραπάνω αποτελέσματα, ότι ο TF μάλλον αλληλεπιδρά παροδικά με τα υποστρώματα. Στην περίπτωση της proBglX η SecB σχηματίζει σύμπλοκο, όχι ως διμερές άλλα ως τετραμερές. Κάτι τέτοιο έχει ξαναπαρατηρηθεί (Randall, Crane et al. 2005) και αποτελεί έως τώρα την επικρατούσα άποψη για τον μηχανισμό δράσης της. Αν συνδυάσουμε όμως τα αποτελέσματα της αλκαλικής φωσφατάσης με αυτά της γλυκοσιδάσης ίσως φαίνεται πιο αναλυτικά αυτός ο μηχανισμός. Οι τέσσερις μάζες SecB στο σύμπλοκο δεν είναι γνωστό αν αποτελούν ένα τετραμερές ή δυο διμερή προσδεμένα πάνω σε δυο διαφορετικούς επιτόπους της proBglX. Έτσι, η ογκοδέστερη γλυκοσιδάση, με αρκετά μεγαλύτερο πρόβλημα διαλυτότητας στο νερό, ίσως χρειάζεται περισσότερη «βοήθεια» απ' ό τι η μικρότερη και καλύτερα διαλύτη αλκαλική φωσφατάση. Αυτό μεταφράζεται σε επιπλέον μόρια SecB.

Για να κατανοήσουμε τον μηχανισμό στόχευσης των προπρωτεϊνών στην SecA, μελετήσαμε αρχικά τις αλληλεπιδράσεις σαπερονών με αυτήν. Μόνο η SecB σχημάτισε, υπό τις συνθήκες του πειράματος, σταθερό σύμπλοκο με την SecA. Μάλιστα, το σύμπλοκο αυτό αποκάλυψε αρκετά χαρακτηριστικά της φύσης του διμερούς SecA. Η μάζα του συμπλόκου (245 kDa) αντιστοιχεί σε ένα διμερές SecB με ένα διμερές SecA. Έως τώρα είχε παρατηρηθεί (Randall, Crane et al. 2005) σύμπλοκο SecA-SecB στο οποίο συμμετέχει ένα τετραμερές SecB. Πραγματικά μπορέσαμε να παρατηρήσουμε σύμπλοκο με μάζα 285 kDa αλλά μόνο με την προσθήκη πολύ μεγάλης ποσότητας σαπερόνης. Το γεγονός ότι εμφανίζεται αυτό το σύμπλοκο σαν νέος πληθυσμός σε αυτές τις συνθήκες, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ακόμα επιτόπου πρόσδεσης SecB επί της SecA, με πολύ χαμηλή συγγένεια. Με την χρήση μεταλλάγματος SecA, το οποίο δεν σχηματίζει ομοδιμερή, μπορέσαμε να αποδείξουμε ότι ένα πρωτομερές SecA είναι αναγκαίο και ικανό για την πρόσδεση

SecB. Όπως και η άγριου τύπου διμερής SecA, έτσι και το μονομερές μετάλλαγμα δημιουργεί σύμπλοκο με ένα διμερές SecB, αρχικά, και με δυο ανά αυξηθεί η προστιθεμένη σαπερόνη. Αυτό αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι πλέον το δεύτερο διμερές SecB το οποίο εμφανίζεται, και στις δυο περιπτώσεις, μάλλον αλληλεπιδρά με το ήδη υπάρχον SecB πάνω στην SecA, (σχήμα 4.1), και όχι πάνω στο δεύτερο πρωτομερές της ATPάσης. Το γεγονός αυτό καθιστά το διμερές της αγρίου τύπου ATPάσης ασύμμετρο, καθώς δεν διαθέτει τους ίδιους επιτόπους πρόσδεσης SecB στα δυο πρωτομερή.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις παρουσία τριών μορίων, SecB, SecA και αλκαλικής φωσφατάσης. Η προσθήκη προσχηματισμένου συμπλόκου SecB – αλκαλική φωσφατάση στην ATPάση, επέφερε την μεταφορά της προπρωτεΐνης στην SecA και παράλληλα την αποδέσμευση της σαπερόνης. Δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την αλλαγή που επέτρεψε την παράδοση του υποστρώματος στην ATPάση. Στο νέο σύμπλοκο, είτε πρόκειται για διμερή είτε για μονομερή SecA, βρίσκεται μόνο ένα μόριο προπρωτεΐνης, κάτι που ενισχύει την υπόθεση της ασυμμετρίας που διατυπώθηκε παραπάνω.

Συμπερασματικά, οι προπρωτεΐνες περιέχουν χαρακτηριστικά (πεπτίδιο σήμα, δισουλφιδικό δεσμό, στερεοδιαμόρφωση) τα οποία βοηθούν το κύτταρο να διαχωρίσει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες από τις υπόλοιπες. Στη παρούσα διατριβή αποδείξαμε ότι οι σαπερόνες SecB και TF μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις προπρωτεΐνες, αναγνωρίζοντας αυτά τα χαρακτηριστικά τους. Δείξαμε ότι η SecB είναι σε θέση να παραδώσει στην ATPάση σε συνθήκες διαλύματος ένα μόριο υποστρώματος, ολοκληρώνοντας έτσι την πορεία του από το ριβόσωμα στην SecA (σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1 : Υποθετικό μονοπάτι στόχευσης της αλκαλικής φωσφατάσης στο κανάλι SecYEG. Ενώ συντίθεται προπρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον TF, ο οποίος βρίσκεται ήδη στο ριβόσωμα. Το πρώτο συμπλοκο που αναμένεται να δημιουργηθεί είναι αυτό με τον TF. Αργότερα ο TF λόγω χαμηλής συγγένειας με τα υποστρώματα αφήνει την προπρωτεΐνη, η οποία πλέον σχηματίζει σύμπλοκο με την SecB. Η αλκαλική φωσφατάση είναι τώρα σε θέση να αλληλεπιδράσει με την ATPάση SecA ακόμα και στο κυτταρόπλασμα. Έπειτα λόγω της υψηλής συγγένειας της ATPάσης με το κανάλι SecYEG ($K_d = 30 \text{ nM}$), η προπρωτεΐνη φθάνει τελικά στο κανάλι και διαμέσου αυτού στον τελικό της προορισμό, το περιπλασμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Οι μοριακές τεχνικές εκτελέστηκαν με βάση τα εγχειρίδια :

A) "MOLECULAR CLONING" laboratory manual, J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis

B) "Current protocols in Molecular biology", F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, K. Struhl.

Χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτοκολλά και έτοιμα διαλύματα της QUEEN. Όλες οι DNA κατασκευές αλληλουχίστηκαν είτε στο εργαστήριο μικροχημείας στο IMBB είτε από την MACROGEN.

5.1.1 Κατασκευή της σημειακής μετάλλαξης proPhoA(T59R)-His

Πραγματοποιούμε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με 90ng πλασμιδιακού φορέα pET22b-proPhoA-His (pIMBB1142), εκκινητές X1014 : AAT GGC GAT GGG ATG GGG GAC TCG GAA ATT CGT GCC GCA CGT AAT TAT GCC GAA GGT GCG GGC, X1015 : GCC CGC ACC TTC GGC ATA AAT TAC GTG CGG CAC GAG TCC CAT CGC CAA σε τελική συγκέντρωση 10pmol/mL και ειδική Pfu ultra πολυμεράση σε τελική ενεργότητα 2.5u/μL. Το προϊόν της αντίδρασης το επωάζουμε με το ενζυμο DpnI. Το ενζυμο DpnI θα πέψη το αρχικό μεθυλιωμένο DNA που προσθέσαμε. Έτσι το μόνο ολόκληρο DNA που θα παραμείνει θα είναι τα θυγατρικά μόρια τα οποία φέρουν την μετάλλαξη. Αφού πραγματοποιηθεί η πέψη για 2h στους 37°C, μετασχηματίζουμε *E.Coli* κύτταρα DH5α και τα επιστρώνουμε σε τριβλίο LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό. Οι αποικίες που θα αναπτυχθούν θα πρέπει να φέρουν το σωστό πλασμίδιο ώστε να επιβιώσουν. Οι κλώνοι υπόκεινται σε αλληλούχιση ώστε να επιβεβαιωθεί η εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης.

5.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαχωρίζονται μόρια DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με το φόρτωμα των δειγμάτων στο πήκτωμα και εφαρμογή σε αυτό ηλεκτρικού πεδίου. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA κινούνται προς τον θετικό πόλο και διαχωρίζονται. Μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα και διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή διότι διαπερνούν ευκολότερα τους πόρους του πηκτώματος απτοί τα μεγαλύτερα. Για την χρώση των ζωνών DNA χρησιμοποιείται χρωμιούχο αιθύλιο το οποίο προσδένεται σε αυτό και φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Για την προετοιμασία του πηκτώματος, διαλύεται η ενδεδειγμένη ποσότητα αγαρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων. Ψύχεται στην συνέχεια το πήκτωμα στους 56 °C και προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 mg/ml. Στα δείγματα εισάγεται διάλυμα που φέρει χρωστική και γλυκερολη ώστε να είναι ευκολοτερος ο χειρισμος. Φορτώνονται στο πήκτωμα και εφαρμόζεται η κατάλληλη τάση ρεύματος. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και εμφανίζονται οι ζώνες των μορίων DNA.

5.1.3 Παράγωγή επιδεκτικών κυττάρων : Μέθοδος RbCl

Για την παράγωγή επιδεκτικών κυττάρων E.coli χρησιμοποιείται η μέθοδος του χλωριούχου ρουβιδίου σε όλες τις περιπτώσεις σε αυτήν την εργασία. Με την μέθοδο αυτή τα κύτταρα που έχουν υποστεί επεξεργασία με υποτονικό διάλυμα χλωριούχου ρουβιδίου διογκώνονται με αποτέλεσμα την μείωση της τοπικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Έτσι το αρνητικά φορτισμένο DNA μπορεί να προσδεθεί σε αυτήν και να εισέρθει στο εσωτερικό του κύτταρου.

Για την παράγωγή δεκτικών κυττάρων εμβολιάζουμε μοναδική αποικία από στερεό θρεπτικό LB σε υγρό και επωάζουμε με ολονύκτια ανάδευση σε κατάλληλη θερμοκρασία. Η ολονύκτια καλλιέργεια αραιώθηκε εκατό φορές σε νέο υγρό

θρεπτικό LB που περιέχει 20μM MgSO₄ και επωάστηκε μέχρι OD₆₀₀= 0,47. Έπειτα γίνεται συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση (3000g, 5min, 4oC). Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 0,4 όγκου καλλιέργειας παγωμένο διάλυμα TFB1 και επωάζεται για 5min στον πάγο. Επαναλαμβάνεται η προηγούμενη φυγοκέντρηση και το ίζημα αυτή τη φορά επαναδιαλύεται σε 0,04 όγκους καλλιέργειας παγωμένο TFB2 διάλυμα. Ακολουθεί επώαση για 60min στον πάγο και ψύξη με υδατόλουτρο αιθανόλης στο οποίο έχει προστεθεί ξηρός πάγος. Η αποθήκευση γίνεται στους -80oC.

5.1.4 Μετασχηματισμός κυττάρων

Με την χρήση επιδεικτικών κυττάρων μπορούμε να εισάγουμε εξωγενώς ξένο γενετικό υλικό εντός του κυττάρου. Εφόσον αυτό το υλικό είναι κατάλληλο και φέρει όλα τα χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να πολλαπλασιάζεται και να εκφράζει γονίδια του με την βοήθεια των παραγόντων του κυττάρου, τότε μπορούμε να εισάγουμε οποιοδήποτε γονίδιο επιθυμούμε και να παρόχθιε οποία πρωτεΐνη από το κύτταρο. Τέτοια υλικό είναι οι κυκλικοί πλασμιδιακοί φορείς εκφράσεις που φέρουν αυτά τα χαρακτηριστικά και το επιθυμητό γονίδιο.

Περίπου σε 100μL δεκτικών κυττάρων προσθέτουμε 2-10ng του επιθυμητού DNA. Τα κύτταρα μένουν με το DNA στον πάγο για 30min και στην συνέχεια επωάζονται για 45sec στους 42oC. Άμεσα τοποθετούνται στον πάγο για 2min. Έπειτα αφού προστεθεί 900 mL θρεπτικού LB, επωάζονται για 60min υπό ανάδευση στη κατάλληλη θερμοκρασία. Ακόλουθη επίστρωση των κυττάρων σε τριβλίο LB που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζονται ολονύκτια.

5.2 Έκφραση πρωτεϊνών σε *E.coli*

5.2.1 Έκφραση πρωτεϊνών με χρήση του pET συστήματος

Το pET πλασμίδιο είναι ένας βακτηριακής φορέας ο οποίος επιτρέπει την παραγωγή οποιασδήποτε επιθυμητής πρωτεΐνης. Περιέχει ορισμένα σημαντικά στοιχεία όπως: το *lacI* γονίδιο, τον *lac* καταστολέα, τον T7 υποκινητή ο οποίος είναι ειδικός μόνο για την T7 RNA πολυμεράση (και όχι για τις βακτηριακές RNA πολυμεράσες), τον *lac* χειριστή ο οποίος εμποδίζει την μεταγραφή, έναν πολυσύνδετη, το f1 σινιάλο έναρξης αντιγραφής, γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο χειριστής δεν βρίσκεται σε καταστολή, η μεταγραφή του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προχωρά με γρήγορο ρυθμό. Επειδή ο T7 είναι ιικός υποκινητής, μεταγράφεται πολύ γρήγορα και ανεξέλεγκτα αρκεί να είναι παρούσα η T7 RNA πολυμεράση. Η έκφραση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος αυξάνει όσο αυξάνει και το μεταγραφόμενο mRNA. Μέσα σε λίγες ώρες η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος θα αποτελεί ένα από τα πιο επικρατή συστατικά μέσα στο κύτταρο. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό του φορέα σε κατάλληλο βακτηριακό ξενιστή που φέρει το γονίδιο της RNA πολυμεράσης φηγού T7 στο γένωμα του (*λDE3*) το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *lac* υποκινητή και χειριστή. Κοινό χαρακτηριστικό όλων το πλασμωδιακών φορέων pET που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την διατριβή είναι ότι προσθέτουν ένα εξαΐστιδινικό επίτοπο στο αμινοτελικό ή στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αναλόγως την περίπτωση.

5.2.2 Έκφραση και καθαρισμός εκκριτικών υποστρωμάτων υπο αποδιατακτικές συνθήκες.

Οι pET πλασμωδιακοί φορείς που φέρουν τις *proPhoA*, τα παράγωγα της, της *proYdeN*, *proBglX* και *proPpiA* μετασχηματιστήκαν σε κύτταρα *E.coli* BL21.19. Εμβολιάσαμε μια μεμονωμένη αποικία σε LB θρεπτικό που περιέχει αμπικιλίνη

(100ng/μL) η οποία μεγάλωσε ολονυκτία στους 30°C. Αραιώσαμε την ολονύκτια βακτηριακή καλλιέργεια είκοσι φορές σε φρέσκο LB θρεπτικό που περιείχε αμπικιλίνη (100ng/μL) και επωάσαμε στους 30°C έως ότου η οπτική πυκνότητα $OD_{600}=0.6-0.8$. Πραγματοποιήσαμε επαγωγή των πρωτεϊνών με IPTG (0.1mM) για 3-4 ώρες και στην συνέχεια συλλέξαμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση (10.000g, 4°C, 10min).

Ακολουθώντας τις συνθήκες που περιγράφηκαν, το 70-90% της εκφραζόμενης πρωτεΐνης βρίσκονται στα έγκλειστα σωματίδια, τα οποία στην συνέχεια απομονώθηκαν έτσι ώστε να καθαριστούν οι πρωτεΐνες με χρήση χρωματογραφίας συγγενείας μετάλλου.

Συγκεκριμένα ίζημα επαναδιαλύθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5% glycerol) με ανάδευση στους 4°C και προστέθηκε PMSF (2.5mM) και DNase (50μg/μL). Στην συνέχεια τα κύτταρα διασπάστηκαν και τα έγκλειστα σωματίδια απομονώθηκαν με υπερφυγοκέντρηση (50.000g; 4°C, 30min). Το υπερκείμενο φυλάχθηκε ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris, pH 8.0, 0.5M NaCl, 8M urea, 5% glycerol). Στο επαναδυσταλυμένο ίζημα προστέθηκε PMSF (2.5mM) και φυγοκεντρήθηκε (50.000g; 4°C; 30min). Το επαναδυσταλυμένο σε ουρία ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris, pH 8.0, 0.5M NaCl, 8M urea, 5% glycerol). Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE πηκτής ακρυλαμίδης, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει στο διαλυτοποιημένο σε ουρία ίζημα για να χρησιμοποιηθεί η ενδεδειγμένη ποσότητα ρητίνης Ni⁺²-NTA. Η ρητίνη εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 6M urea, 5% glycerol). Το επαναδιαλυτοποιημένο σε ουρία ίζημα αραιώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 5% glycerol) έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση ουρίας 6M, προστέθηκε σε αυτό β-mercaptethanol (5mM) και φορτώθηκε στην ρητίνη. Πραγματοποιήθηκαν εκπλήσεις της ρητίνης αρχικά με 10 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5M NaCl, 6M urea, 5% glycerol) και στην συνέχεια με 15 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl, 6M urea, 5% glycerol) . Η έκλουση της δεσμευμένης στην ρητίνη πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε με 10 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl, 6M urea, 250mM imidazol, 5% glycerol). Τα δείγματα της

έκλυσης αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE πηκτής ακρυλαμίδης, έτσι ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρότητας. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοριακή διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl, 6M urea, 5% glycerol) ώστε να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο. Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν με φυγοκέντρηση (Amicon Centricon).

5.2.3 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών His-SecB και His-TF με τη χρήση χρωματογραφίας συγγένειας μετάλλου (Ni²⁺ -NTA)

Όπως και η proPhoA και οι σαπερόνες SecB και TF που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την διατριβή είχαν εισαχτεί σε pET φορείς έκφρασης. Ακολουθώντας την διαδικασία έκφρασης όπως αυτή περιγράφηκε για την proPhoA καταλήγουμε με όλη την πρωτεΐνη να βρίσκεται σε υδατοδιαλυτή μορφή στο κυτταρόπλασμα.

Οι σαπερόνες His-SecB και His-TF φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο εξαϊστιδινικό επίτοπο. Ο επίτοπος προσφέρει ένα τεράστιο πλεονέκτημα όσον αφορά την εύκολη και γρήγορη απομόνωση της σε καθαρή μορφή με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας νικελίου. Η ρητίνη που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, περιέχει αγοράζω ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το νικέλιο μέσω νιτριλο-τριοξικού οξέος (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης υποκατάστατη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος νικελίου, αφήνοντας ελεύθερες δυο θέσεις να αλληλεπιδράσουν με τον εξαϊστιδινικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών. Έτσι τρία ιόντα νικελίου αντιστοιχούν σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό του άκρο. Η ρητίνη χρωματογραφίας θα κατακρατήσει μόνο τη φέρουσα τον επίτοπο πρωτεΐνη, και η μη ειδική σύνδεση πρωτεϊνών αποτρέπεται με τις εκπλήσεις της ρητίνης με χαμηλής συγκέντρωσης διάλυμα ιμιδαζολίου.

Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 1M NaCl, 10% glycerol, 5mM Imidazol) και προστίθεται αναστολέας πρωτεασών PMSF με τελική συγκέντρωση 2mM. Ακολουθεί συμπίεση και τελικά σπάσιμο των κυττάρων με τη χρήση γαλλικής πρέσας. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα και άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (30min, 40C,

3000g). Συλλέγουμε το υπερκείμενο και τα φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει τη Ni²⁺-NTA ρητίνη εξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 1M NaCl, 10% glycerol, 5mM Imidazol), με ρυθμό ροής μικρότερο από 1mL/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά την ρητίνη, και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 1M NaCl, 10% glycerol, 5mM Imidazol). Ακολουθεί ακόμα μια έκπλυση με μειωμένη συγκέντρωση αλατιού (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM NaCl, 10% glycerol, 5mM Imidazol). Τέλος εκλύεται η καθαρή πρωτεΐνη με 5 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM NaCl, 10% glycerol, 250mM Imidazol). Η συλλογή των κλασμάτων έκλυσης γίνεται συνήθως σε μισό όγκο απ' αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση με δείγματα από όλα τα στάδια ώστε να κριθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Τέλος αφού αναμιχτούν τα κλάσματα με την περισσότερη πρωτεΐνη υπόκεινται σε ολονύκτιο διαπίδυση ενάντια σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM NaCl, 50% glycerol) και η καθαρισμένη πρωτεΐνη φυλάσσεται στο -20oC.

5.2.4 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών SecA(N1-901) και SecA(6A) N15-901

Για την έκφραση των πρωτεϊνών SecA(N1-901) και SecA(6A)(N15-901) χρησιμοποιήθηκε το pZ σύστημα έκφρασης. Η αρχή λειτουργίας του συστήματος είναι ίδια με αυτή του pET όπως αυτό περιγράφηκε παραπάνω. Επιλέχτηκε το pZ σύστημα για αυτές τις πρωτεΐνες διότι δεν έπρεπε να φέρουν κάποιο επιπλέον επίτοπο είτε στο αμινοτελικό είτε στο καρβοξυτελικό άκρο τους. Αυτό μας το επιτρέπουν οι πλασμοδιακοί φορείς έκφρασης pZ. Οι τελευταίοι φορείς που περιείχαν τα γονίδια των πρωτεϊνών μετασηματίστηκαν κύτταρα E.coli JM109pLySs και ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφηκε για την proPhoA, με την μοναδική διαφορά ότι η επαγωγή έγινε σε OD₆₀₀=0,5.

Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 175mM KCl, 10% glycerol) και προστίθεται αναστολέας πρωτεασών PMSF σε τελική συγκέντρωση 2mM. . Ακολουθεί συμπύεση και τελικά σπάσιμο των

κυττάρων με τη χρήση γαλλικής πρέσας. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα και άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (30min, 4oC, 3000g). Συλλέγουμε το υπερκείμενο και τα φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει την Blue Sepharose CL-6B εξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 175mM KCl, 10% glycerol), με ρυθμό ροής μικρότερο από 1mL/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά την ρητίνη, και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 175mM KNaCl, 10% glycerol). Ακολουθεί ακόμα μια έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 200mM KCl, 10% glycerol). Τέλος εκλούεται η καθαρή πρωτεΐνη με 5 όγκους διαλύματος (50mM Tris-HCl pH:8.0, 1M KCl, 10% glycerol). Η συλλογή των κλασμάτων ελκούσης γίνεται συνήθως σε μισό όγκο απ' αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση με δείγματα από όλα τα στάδια ώστε να κριθεί η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Αφού αναμιχτούν τα κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη συγκεντρώνονται σε τελικό όγκο 5mL και πραγματοποιείται περαιτέρω καθαρισμός με την μέθοδο της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Γ' αυτήν την μέθοδο χρησιμοποιείται η παρασκευαστική κολώνα HiLoad, με υλικό Superdex 200 και ροή 2mL/min, εξισορροπημένη με 2 όγκους του ιδίου διαλύματος που πραγματοποιείται και για την χρωματογραφία (50mM Tris-HCl pH:8.0, 1M KCl). Έπειτα συλλέγονται τα κλάσματα και ακολουθεί SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για την επιλογή των κλασμάτων που φέρουν την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και πραγματοποιείται και δεύτερη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αυτή τη φορά σε χαμηλότερη περιεκτικότητα αλάτι (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl) και αφού πρώτα γίνει επώαση της πρωτεΐνης με 5mM DTT για μια ώρα στους 4oC. Μετά την συλλογή των κλασμάτων και την συγκέντρωση αυτών, υπόκεινται σε ολονυκτία διαπίδυση ενάντια σε διάλυμα (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 50% glycerol) και το δείγμα φυλάσσεται στους -20oC.

5.2.5 Καθαρισμός της πρωτεΐνης His-SecB με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Για να επιτευχτεί η μέγιστη δυνατή καθαρότητα της πρωτεΐνης His-SecB έκτος από την απομόνωση της με την χρωματογραφία συγγένειας, πραγματοποιείται επιπλέον βήμα καθαρισμού με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size-exclusion chromatography, SEC). Πρόκειται για μια χρωματογραφική μέθοδο με την οποία τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους. Όσο μικρότερο είναι κάποιο μόριο τόσο περισσότερο θα παραμείνει εγκλωβισμένο στους πόρους των σφαιριδίων της σταθερής φάσης. Έτσι τα μικρότερα μόρια θα εκλουθούν με μεγαλύτερη καθυστέρηση απ' ότι τα μεγαλύτερα.

Για να εφαρμοστεί η παραπάνω μέθοδος, συγκεντρώνεται ή αραιώνεται ο όγκος του διαλύματος της His-SecB ώστε να γίνει 5mL, τότε το δείγμα φορτώνεται στην κολώνα που έχει πρώτα εξισοροπιστεί με δυο όγκους διαλύματος της χρωματογραφίας (50mM Tris-HCl, pH:8.0, 50mM KCl) και πραγματοποιείται η χρωματογραφία με ροή 2mL/min. Η διαδικασία συνεχίζεται όπως αυτή έχει περιγράψει παραπάνω για την SecA πρωτεΐνη.

5.3 Ανίχνευση και μελέτη καθαρότητας και μεγέθους πρωτεϊνών

5.3.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πρωτεϊνικό μίγμα αρχικά επεξεργάζεται με διάλυμα Laemmli που περιέχει SDS ένα

ιονικό απορρυπαντικό το οποίο σπάει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις σε μη αποδιαταγμένες (native) πρωτεΐνες. Το διάλυμα αυτό περιέχει επίσης β-μερκαπταιθανόλη ώστε να αναχθούν τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί. Το SDS προσδένεται πάνω στην πρωτεΐνη με αποτέλεσμα την αποδιάταξη της και την δημιουργία συμπλόκου SDS - αποδιαταγμένη πρωτεΐνη το οποίο φέρει μεγάλο αρνητικό φορτίο και κατά προσέγγιση ανάλογο του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης.

5.3.2 Χρώση coomassie blue.

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση με Coomassie Brilliant Blue (R-250) που βαφεί με μπλε τις πρωτεϊνικές ζώνες και ανιχνεύει πρωτεΐνες από 0,1mg.

5.4 Σχηματισμός συμπλόκων και ανάλυση τους

Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκε η αλληλεπίδραση πρόδρομων μορφών εκκρινόμενων πρωτεϊνών με τις σαπερόνες SecB και TF καθώς και την ATPαση SecA. Μετά από επώαση των μορίων στις κατάλληλες συνθήκες ακολουθεί η ανάλυση τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης με την μέθοδο του μοριακού αποκλεισμού. Παράλληλα τα μόρια καθώς εκλούνται από την χρωματογραφική στήλη ανιχνεύονται διαδοχικά από τέσσερις ανιχνευτές. Κάθε ένας προσδιορίζει διαφορετική φυσικοχημική ιδιότητα του εκλουόμενου μορίου. Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα είναι η Pharmacia Superdex 200 HR 10/30. Ανιχνευτής ο οποίος φέρει ακτίνες laser, σε πολλές γωνίες πρόσπτωσης, προσδιορίζει τη σκέδαση στατικού φωτός του διαλύματος που εκλύεται ανά πάσα στιγμή. Με την μέτρηση της σκέδασης και της συγκέντρωσης (Multi-Angle Laser Light Scattering- MALLS,

Deleted: <#>Εκτίμηση της ποσοτήτας πρωτεΐνης¶
¶
<#>Ποσοτικοποίηση με το αντιδραστήριο Bradford¶
<#>Ποσοτικοποίηση με την μέθοδο BCA¶
¶

DAWN-EOS Wyatt Technology και Refractometer Index detector Shimadzu αντίστοιχα) μπορούμε να προσδιορίσουμε το μοριακό βάρος κάθε μορίου. Επιπρόσθετα ανιχνευτής σκέδασης δυναμικού φωτός (Quasi-Elastic Light Scatter - QELS Wyatt Technology) μετρά την υδροδυναμική ακτίνα των μορίων. Όλες οι μετρήσεις που δίνουν τα όργανα επεξεργάζονται στο λογισμικό Astra και προκύπτουν τελικά το χρωματογράφημα και βιοφυσικές ιδιότητες των μορίων.

5.4.1 Αντίδραση σχηματισμού συμπλόκων

5.4.1.1 Αντιδράσεις εκκριτικών υποστρωμάτων και παραγώγων τους με τις πρωτεΐνες SecB, TF και SecA

Οι προπρωτεΐνες έχουν καθαρισθεί υπό αποδιατακτικές συνθήκες, έτσι δεν έχουν αναδιπλωθεί πλήρως αλλά βρίσκονται στο μονοπάτι προς την αναδίπλωση τους. Γνωρίζουμε για την PhoA ότι μπορεί να αναδιπλωθεί πλήρως και να αποκτήσει ενζυμική δραστικότητα όταν απομακρυνθεί από το διάλυμα ο αποδιατακτικός παράγοντας, ουρία. Επιπλέον γνωρίζουμε τις συνθήκες υπό τις οποίες η PhoA παραμένει ικανή να μεταφερθεί διάμεσου της μεμβράνης στο περίπλασμα. Εκμεταλλευόμενοι αυτές τις ιδιότητες της, δοκιμάζουμε αν καθώς απομακρύνεται ο αποδιατακτικός παράγοντας δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες SecB, TF και SecA. Όλες οι αναγραφόμενες συγκεντρώσεις αναφέρονται στα μονομερή των πρωτεϊνών, ανεξάρτητου τι ολιγομερές δημιουργεί η κάθε μια σε οποιαδήποτε περίπτωση.

Για την δοκιμασία της proPhoA και των παραγώγων της, πριν την αντίδραση προηγείται στάδιο ανάγωγης των δισουλφιδικών δεσμών. Για αυτόν τον λόγο επωάζεται για 15min στους 40C με 5mM DTT τελικού όγκου αντίδρασης. Ακολουθεί αραίωση και επώαση για 15min στους 40C, με κρύο διάλυμα της χρωματογραφίας (50mM Tris-HCl pH:8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA) το οποίο περιέχει ήδη την επιθυμητή συγκέντρωση σαπερόνης. Με αυτόν τον τρόπο η ανοιγμένη proPhoA ενώ απομακρύνεται από την ουρία, αμέσως μπορεί να αλληλεπιδράσει με την σαπερόνη, πριν αναδιπλωθεί πλήρως μόνη της. Η αντίδραση φορτώνεται στη κολώνα με ροή 0,4mL/min και αναλύεται όπως

περιγράφεται παραπάνω. Η συγκέντρωση στην οποία εργαζόμαστε με την αλκαλική φωσφατάση είναι 10-20μM, καθώς σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχει την τάση να δημιουργεί ολιγομερή.

Αντίστοιχα εργαζόμαστε και για το υποστρώμα, proBglX. Μοναδική διαφοροποίηση σε σχέση με την proPhoA είναι η αυξημένη τάση που έχει να δημιουργεί συσσωματώματα μόλις αφαιρεθεί η ουρία. Έτσι πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις πρώτα με το κρύο διάλυμα της χρωματογραφίας ώστε να απομακρύνεται σταδιακά ο χαστροπικός παράγοντας. Για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες εισάγουμε τις σαπερόνες όταν η ουρία είναι σε συγκέντρωση 3-4M.

5.4.1.2 Αντίδραση σαπερονών που φέρουν υποστρώματα με την SecA

Αφού πρώτα εργαστούμε όπως περιγράφηκε στο 5.5.1.1 και επιβεβαιώσουμε ότι δημιουργήθηκε στο συμπλοκο υποστρώματος-σαπερόνης προσθέσουμε την επιθυμητή συγκέντρωση SecA. Σε αυτήν την περίπτωση ένα μέρος του συμπλόκου υποστρώμα-σαπερόνη αναλύεται ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του και στο υπόλοιπο προστίθεται η SecA και αναλύεται με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH:8.0, 50 mM KCl. Το διάλυμα στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση είναι 50 mM Tris-HCl pH:8.0, 50 mM KCl, 1 mM EDTA. Η ιδανικές συγκεντρώσεις των αντιδρώντων πρωτεϊνών είναι 20μM:80μM:10μM (proPhoA:SecB:SecA).

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

Ab Solution (freshly made)

- TTBS 1x
- Dry milk powder 1%

Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης 5x (50ml)

- Ficoll 400 6,25 g
- Bromophenol blue 0,1g
- TBE 10X 3,35ml
- Distilled water

Buffer B 10X

- Tris HCl pH 8.0 500mM
- KCl 500mM
- MgCl₂ 50mM

Blocking Solution (freshly made)

- TTBS 1X
- Dry milk powder 5%

Chromatography buffer A

- Tris 50 mM
- KCl 50 mM

Chromatophaphy buffer B

- Tris 50 mM
- KCl 50 mM
- EDTA 1mM

Coomasie blue staining (1L)

- Coomasie blue R-250 0,1 g
- Methanol 400mL
- Acetic acid 100mL

Store at room temperature, can be reused several times

Laemmli buffer

- Glycerol 50 mL
- SDS 10 g
- Tris pH 6.3 30 mL
- β -mercaptethanol 1mL
- bromophenol blue 0,005%

Stock solution can be stored at -20°C or at R.T.

Lysogeny Broth LB (1L)

- Tryptone 10 g
- Yeast Extract 5 g
- NaCl 10 g
- NaOH 1N to pH 7,2
- Distilled water

Διαλυμα P1 (50 mL)

- Tris pH 8.0 50 mM
- EDTA 10 mM
- Distilled water

Διαλυμα P2 (50 mL)

- NaOH 200 mM
- SDS 1%

Διαλυμα P3 pH 5.5 (50 mL)

- Potassium Acetate 3M
- Glacial acetic acid to pH 5.5
- Distilled water

Running buffer 10X (1 L)

- Tris 30 g
- Glycine 144 g
- SDS 10 g

TAE 10X pH 8.5 (1 L)

- Trizma base 48,4 g
- Glacial acetic acid 11,44 mL
- EDTA 0,5M pH 8.5 20 mL
- Distilled water

TFB1

- Potassium acetate 30 mM
- CaCl₂ 10 mM

- MnCl_2 50 mM
- RbCl 10mM
- Glycerol 15%
- Acetic acid 1M to pH 5.8

TFB2

- MOPS pH 6.5 10 mM
- CaCl_2 75 mM
- RbCl 10 mM
- Glycerol 15 %
- KOH 1M to pH 6.5

TTBS 10X (1 L)

- Tris pH 7.5 1M 200 mL
- NaCl 87,4 g
- Tween-20 30 mL
- Distilled water
- HCl to pH 8.0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akiyama, Y. and K. Ito (1993). "Folding and assembly of bacterial alkaline phosphatase in vitro and in vivo." J Biol Chem **268**(11): 8146-50.
- Bartlett, A. I. and S. E. Radford (2009). "An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 582-8.
- Beck, K., L. F. Wu, et al. (2000). "Discrimination between SRP- and SecA/SecB-dependent substrates involves selective recognition of nascent chains by SRP and trigger factor." Embo J **19**(1): 134-43.
- Boulanger, R. R., Jr. and E. R. Kantrowitz (2003). "Characterization of a monomeric Escherichia coli alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution." J Biol Chem **278**(26): 23497-501.
- Bradshaw, R. A., F. Cancedda, et al. (1981). "Amino acid sequence of Escherichia coli alkaline phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(6): 3473-7.
- Brockwell, D. J. and S. E. Radford (2007). "Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes?" Curr Opin Struct Biol **17**(1): 30-7.
- Cross, B. C., I. Sinning, et al. (2009). "Delivering proteins for export from the cytosol." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(4): 255-64.
- Driessen, A. J. (1993). "SecA, the peripheral subunit of the Escherichia coli precursor protein translocase, is functional as a dimer." Biochemistry **32**(48): 13190-7.
- Driessen, A. J. and N. Nouwen (2008). "Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane." Annu Rev Biochem **77**: 643-67.
- Economou, A., P. J. Christie, et al. (2006). "Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes." Mol Microbiol **62**(2): 308-19.
- Fekkes, P., J. G. de Wit, et al. (1999). "Zinc stabilizes the SecB binding site of SecA." Biochemistry **38**(16): 5111-6.
- Fekkes, P. and A. J. Driessen (1999). "Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane." Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 161-73.
- Gelis, I., A. M. Bonvin, et al. (2007). "Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR." Cell **131**(4): 756-69.
- Gouridis, G., S. Karamanou, et al. (2009). "Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase." Nature **462**(7271): 363-7.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-9.
- Hartl, F. U., A. Bracher, et al. (2011). "Molecular chaperones in protein folding and proteostasis." Nature **475**(7356): 324-32.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-Hartl (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 574-81.
- Hesterkamp, T. and B. Bukau (1996). "Identification of the prolyl isomerase domain of Escherichia coli trigger factor." FEBS Lett **385**(1-2): 67-71.
- Holland, I. B. (2004). "Translocation of bacterial proteins--an overview." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 5-16.
- Kaiser, C. M., H. C. Chang, et al. (2006). "Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes." Nature **444**(7118): 455-60.
- Kim, E. E. and H. W. Wyckoff (1991). "Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis." J Mol Biol **218**(2): 449-64.

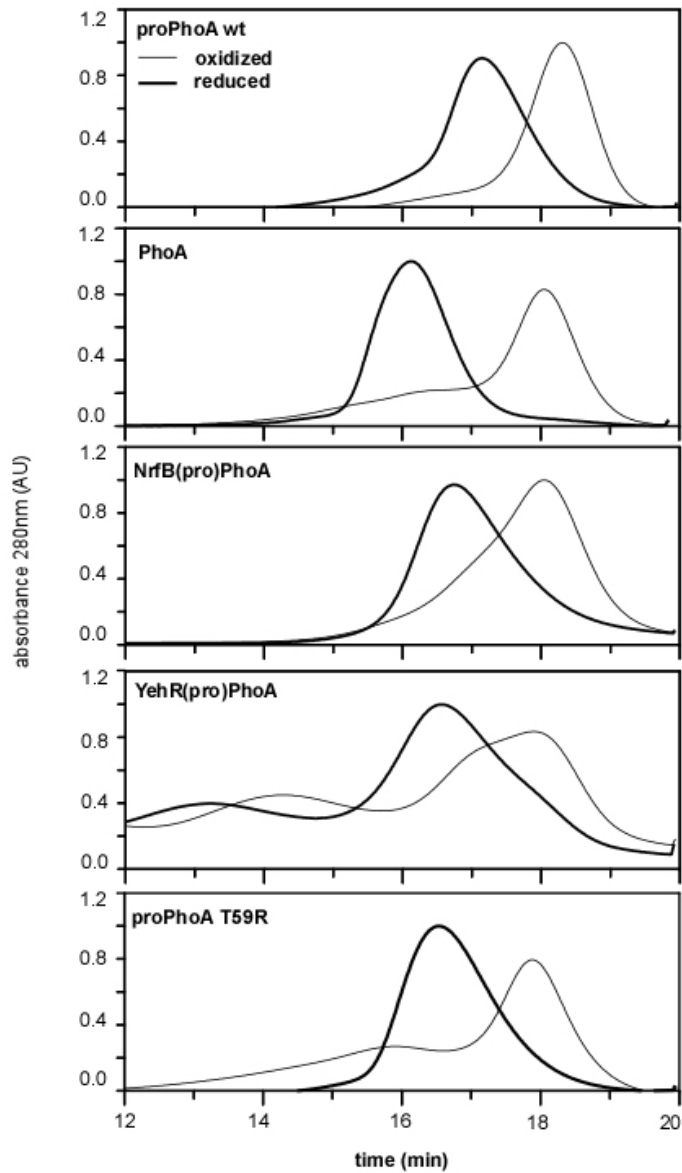
- Koch, H. G., T. Hengelage, et al. (1999). "In vitro studies with purified components reveal signal recognition particle (SRP) and SecA/SecB as constituents of two independent protein-targeting pathways of Escherichia coli." Mol Biol Cell **10**(7): 2163-73.
- Kramer, G., D. Boehringer, et al. (2009). "The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 589-97.
- Kramer, G., T. Rauch, et al. (2002). "L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome." Nature **419**(6903): 171-4.
- Lill, R., E. Crooke, et al. (1988). "The "trigger factor cycle" includes ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane." Cell **54**(7): 1013-8.
- Maier, R., B. Eckert, et al. (2003). "Interaction of trigger factor with the ribosome." J Mol Biol **326**(2): 585-92.
- Maier, R., C. Scholz, et al. (2001). "Dynamic association of trigger factor with protein substrates." J Mol Biol **314**(5): 1181-90.
- Mitchell, C. and D. Oliver (1993). "Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by Escherichia coli SecA ATPase." Mol Microbiol **10**(3): 483-97.
- Papanikolaou, Y., M. Papadovasilaki, et al. (2007). "Structure of dimeric SecA, the Escherichia coli preprotein translocase motor." J Mol Biol **366**(5): 1545-57.
- Papanikou, E., S. Karamanou, et al. (2007). "Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine." Nat Rev Microbiol **5**(11): 839-51.
- Patzelt, H., S. Rudiger, et al. (2001). "Binding specificity of Escherichia coli trigger factor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14244-9.
- Raine, A., M. Lovmar, et al. (2006). "Trigger factor binding to ribosomes with nascent peptide chains of varying lengths and sequences." J Biol Chem **281**(38): 28033-8.
- Randall, L. L., J. M. Crane, et al. (2005). "Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export." J Mol Biol **348**(2): 479-89.
- Randall, L. L. and S. J. Hardy (1986). "Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in E. coli." Cell **46**(6): 921-8.
- Randall, L. L. and S. J. Hardy (1995). "High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding." Trends Biochem Sci **20**(2): 65-9.
- Randall, L. L., T. B. Topping, et al. (1990). "No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export." Science **248**(4957): 860-3.
- Rutkowska, A., M. P. Mayer, et al. (2008). "Dynamics of trigger factor interaction with translating ribosomes." J Biol Chem **283**(7): 4124-32.
- van der Sluis, E. O. and A. J. Driessen (2006). "Stepwise evolution of the Sec machinery in Proteobacteria." Trends Microbiol **14**(3): 105-8.
- von Heijne, G. (1990). "The signal peptide." J Membr Biol **115**(3): 195-201.
- Vrontou, E. and A. Economou (2004). "Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 67-80.
- Xu, Z., J. D. Knafels, et al. (2000). "Crystal structure of the bacterial protein export chaperone secB." Nat Struct Biol **7**(12): 1172-7.
- Zhou, J. and Z. Xu (2005). "The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function." Mol Microbiol **58**(2): 349-57.
- Zimmer, J., W. Li, et al. (2006). "A novel dimer interface and conformational changes revealed by an X-ray structure of B. subtilis SecA." J Mol Biol **364**(3): 259-65.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

| | Mass (kDa) | error | Radius (nm) | error |
|--------------------------|---------------|--------|----------------|-------|
| proPhoA (o) | 55,5 | ± 0,7 | 3,5 | ± 0,2 |
| proPhoA (r) | 86 | ± 15,2 | 5,3 | ± 0,5 |
| PhoA (o) | 47,3 | ± 2,1 | 3,1 | ± 0,1 |
| PhoA (r) | 56 | ± 1,3 | 4,4 | ± 0,1 |
| proPhoA T59R (o) | 53,7 | ± 0,6 | 3,2 | ± 0,1 |
| proPhoA T59R (r) | 65 | ± 3,0 | 4,3 | ± 0,3 |
| NrfB(sp)PhoA (o) | 49 | ± 1,2 | 3,3 | ± 0,1 |
| NrfB(sp)PhoA (r) | 51 | ± 3,0 | 4,2 | ± 0,2 |
| SecB | 80,4 | ± 0,5 | 3,7 | ± 0,1 |
| TF (monomer) | 60,5 | ± 2,1 | 2,7 | ± 0,1 |
| TF (dimer) | 93 | ± 2,8 | 4,1 | ± 0,0 |
| TF – proPhoA | 93 | ± 1,6 | 4,9 | ± 0,1 |
| SecB – proPhoA | 94 | ± 1,0 | 4,6 | ± 0,3 |
| SecA ₂ – SecB | 247,7 | ± 8,7 | 5,3 | ± 0,3 |
| SecA ₁ – SecB | 148,9 | ± 9,6 | 4,6 | ± 0,3 |

Συγκεντρωτικός πίνακας μοριακών βαρών και υδροδυναμικών ακτινών πρωτεϊνών και συμπλόκων τους. (o) : οξειδωμένη μορφή, (r) : ανηγμένη μορφή

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2



Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού παραγώγων αλκαλικής φωσφατάσης. Με έντονη γραμμή σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται η ανηγμένη μορφή της πρωτεΐνης. Φαίνεται ότι μάλλον κάποια πεπτίδια σήματα (YehR) προάγουν τον σχηματισμό ολιγομερών ενώ άλλα (NrfB) όχι.