

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"Μοριακή αρχιτεκτονική των πρωτεϊνών του εκκριτικού
συστήματος τύπου III του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*"

ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ Ν. ΧΑΡΟΒΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009



Κοινωνικό Ίδρυμα Αλεξάνδρος Σ. Ωνάσης



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ




ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ
2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

"Μοριακή αρχιτεκτονική των πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*"

ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑ Ν. ΧΑΡΟΒΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Επιβλέποντες Καθηγητές: Ν.Ι. Πανόπουλος & Μ. Κοκκινίδης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή: Ν.Ι. Πανόπουλος, Μ. Κοκκινίδης, Γ. Χαλεπάκης.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή: Ν.Ι. Πανόπουλος, Μ. Κοκκινίδης, Γ. Χαλεπάκης, Β. Μπουριώτης, Κ. Κοτζαμπάσης, Α. Οικονόμου, Κ. Καλαντίδης.

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών σε στενή συνεργασία με το εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας. Άμεσοι επιβλέποντες της εργασίας μου ήταν οι επικεφαλείς των προαναφερθέντων εργαστηρίων κ. Ν.Ι. Πανόπουλος και Μ. Κοκκινίδης τους οποίους επιθυμώ να ευχαριστήσω πρώτα απ' όλους και θερμότατα για την εξαιρετική τους καθοδήγηση και το συστηματικό συμβουλευτικό τους έργο. Μέσα στο συμπιεσμένο πρόγραμμά τους πάντα ήταν στη διάθεση μου και μου προσέφεραν απλόχερα την πολύτιμη γνώση τους προς διαφώτιση των προβληματισμών μου, νέες ιδέες και εξοπλισμό για την πραγματοποίηση και συνέχιση των πειραμάτων μου, οικονομική μέριμνα και ψυχολογική στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Οφείλω να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών κ. Κ. Ρουμπελάκη και όλο το συμβούλιο των καθηγητών που αποφάσισαν να με δεχτούν στο πρόγραμμα για να εκπονήσω τη διατριβή μου. Τον κ. Χαλεπάκη ως τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής μου. Την επταμελή εξεταστική μου επιτροπή για τις τελικές παρατηρήσεις επί της εργασίας μου. Τις γραμματείες του τμήματος Βιολογίας και ιδιαίτερα την κ. Χαριτίνη Ζαφειροπούλου που ακούραστη στάθηκε στο πλευρό μου για ο,τιδήποτε χρειάστηκα. Την Γεωργία Παπαδάκη και ασφαλώς την Ελευθερία Λαρεντζάκη ευχαριστώ για την υπομονή τους μαζί μου.

Καθοριστικής σημασίας για τη διενέργηση, απρόσκοπτη συνέχιση και ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής μου υπήρξε η τετραετής παροχή υποτροφίας από το Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δ.Σ. του Ιδρύματος που απεφάνθη την έγκριση της υποτροφίας μου και ασφαλώς την κ. Φανή Παπαθάνου, υπεύθυνη για τις υποτροφίες εσωτερικού του Ιδρύματος που μερίμνησε για όλα τα θέματά μου.

Στη Δρ. Αναστασία Γαζή, εξαιρετικής οξύνοιας, ερευνητικής διάθεσης και ειλικρινούς αγάπης για τη βιολογία, τα μυστήρια και τις τέχνες της, αποτίω φτωχές επί χάρτου ευχαριστίες. Συνεργάτης και επιβλέπουσα, μα πάνω από όλα Φίλη και Συνοδοιπόρος, εντός και εκτός εργαστηρίων, αναγνώρισε τη δυναμική μέσα μου, με μύησε να «οσμίζομαι τον αέρα» ερευνητικά και όχι μόνο, με εμπιστεύτηκε ανεπιφύλακτα και με «ανάγκασε» με την άψογη συμπεριφορά να της αντιγυρίσω αυτήν την πίστη.

Θερμότατα θα ευχαριστήσω την υποψήφια μαζί μου Δρ. Μαρίνα Μπαστάκη με την οποία συμβιώσαμε δίπλα δίπλα για πολύ καιρό στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών. Συνεργαστήκαμε πολύ στενά για την διεξαγωγή σημαντικών πακέτων εργασίας, κουραστήκαμε μαζί αλλά και συζητήσαμε επί παντός επιστητού, γελάσαμε πολύ, στηρίξαμε η μια την άλλη σε δύσκολες περιστάσεις και γίναμε σχεδόν αχώριστες. Σύντομα μάλιστα πλησιάζει η ώρα που θα δρέψουμε τους καρπούς των κοινών ερευνητικών μας κόπων.

Τη Δρ. Βίκυ Φαδούλογλου οφείλω να ευχαριστήσω για την απρόσκοπτη συνεργασία και συμπαράσταση, την αγόγγυστη προσφορά πάσης φύσεως αρωγής, τα κοινά μας

γεύματα «νωρίς» το μεσημέρι, τις εξαιρετικά ενδιαφέρουσες επιστημονικές, κοινωνικές και φιλοσοφικές συζητήσεις μέσα και έξω από τα εργαστήρια.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω προς το τεχνικό προσωπικό του εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας και ιδιαιτέρως προς την Ντίνα Κοτσυφάκη, που «συνέπασχε» μοιραζόμενη πειράματα και ανησυχίες επί της συχνά προβληματικής συμπεριφοράς των πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Την ευχαριστώ επίσης για την συστηματική προσφορά τεχνικής βοήθειας κάθε φορά που τη χρειάστηκα.

Ευχαριστώ θερμά την ομάδα του Dmitri Svergun (εξωτερικός σταθμός EMBL, DESY Αμβούργου) για την επίβλεψη κατά τη συλλογή των δεδομένων σκέδασης όπως και τον ίδιο προσωπικά για την δοκιμαστική μοντελοποίηση της πρωτεΐνης HrpE.

Σύσσωμο το προσωπικό των δυο εργαστηρίων ευχαριστώ, και ιδιαίτερα το Νίκο Σκανδάλη και τον Παναγιώτη Σαρρή, για το εξαιρετικά ευχάριστο κλίμα εργασίας. Την Νατάσα Ταμπακάκη για τις εύστοχες υποδείξεις και την παροχή επιστημονικού υλικού. Την Κλητώ Τσιγκρή που είχα την πραγματική ευχαρίστηση να επιβλέψω στα πρώτα της βήματα στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής της διατριβής στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας και εν μέσω αυτής της διαδικασίας απέκτησα μια καλή φίλη. Τις Ανθή Μέττου, Μαρία Αμπράζη, Αλέκα Τσαλαφούτα για την εξαιρετική παρέα εντός κι εκτός.

Τους αδερφικούς μου φίλους Αθηνά Ανδριοπούλου, Σοφία Αρναουτέλη, Τάσο Αλεξιάδη, Δημήτρη Ρομπότη, Ισμήνη Καρακασιλιώτη, Γιάννη Βλατάκη, Παναγιώτη Μόσχου, Χρήστο Βελάνη για τις πολλές ώρες επί φαγητού, καφέ, ποτού, ψυχαγωγίας, για τη συμπαράσταση, τη φιλία, το γέλιο, την προσοχή, τα ταξίδια. Ό,τι και να γραφτεί δεν φτάνει να περιγράψει την ευγνωμοσύνη μου για την τύχη να βρεθούν στο δρόμο μου με την αφορμή της συνύπαρξης σε γειτονικούς χώρους και εργαστήρια.

Και ασφαλώς κλείνω με τις ευχαριστίες προς την οικογένειά μου σε Αθήνα και Ηράκλειο, για την αγάπη, την υπομονή και την ατέλειωτη υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS, type three secretion system) είναι ένα δομικά και λειτουργικά συντηρημένο υπερμοριακό σύμπλοκο δομούμενο από περισσότερες από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από συντηρημένες γονιδιακές «νησίδες» οι οποίες απαντώνται σε πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κατά κανόνα είτε συμβιωτικά είτε παθογόνα ευκαρυωτικών οργανισμών. Εννέα από τις πρωτεΐνες του T3SS έχουν σημαντικό βαθμό ομολογίας, σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας, με πρωτεΐνες που δομούν στοιχεία του βασικού σωματίου του βακτηριακού μαστιγίου, με το οποίο το T3SS έχει κοινές εξελικτικές ρίζες.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε το δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών που δομούν το T3SS του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, αξιοποιώντας κυρίως ένα δικιστρονικό πλασμιδιακό φορέα, τον pPROPET ο οποίος κατασκευάστηκε στην πορεία της διατριβής, για την ετερόλογη συνέκφραση πρωτεϊνών στην *Escherichia coli* και συγκαθαρισμό συμπλόκων μεταξύ επιλεγμένων ζευγών πρωτεϊνών.

Για την πρωτεΐνη HrpG, η θέση του κωδικού της πλαισίου σε σχέση με της σεκρετίνης HrcC υπέδειξε ρόλο πιθανής σαπερόνης τάξης I. Παρεταίρω ένδειξη ενός τέτοιου ρόλου προέκυψε από την κατάδειξη αλληλεπίδρασης της με τη ρυθμιστική του συστήματος πρωτεΐνη HrpJ μετά από συνέκφραση και συγκαθαρισμό σε ετερόλογο βακτηριακό σύστημα. Οι πρωτεΐνες HrpG-HrpV-HrpJ ανιχνεύτηκαν ως σύμπλοκο μετά από συνέκφραση από τρικιστρονική κασέτα στην *E. coli*. Οι θέσεις πρόσδεσης των HrpV και HrpJ επί της HrpG πιθανόν να είναι αλληλεπικαλυπτόμενες. Η αλληλεπίδραση HrpG-HrpJ συμπληρώνει τον ελλειπή κρίκο της αλυσίδας πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση του TTSS, στην οποία, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, συμμετέχουν οι πρωτεΐνες HrpG, HrpV, HrpS, HrpR και HrpL που κωδικοποιούνται από τη νησίδα *hrp/hrc*. Πειράματα συνέκφρασης/συγκαθαρισμού έδειξαν ομοίως ότι η πρωτεΐνη HrpG αλληλεπιδρά ισχυρά με την καρβοξυτελική κυτταροπλασματική επικράτεια της μεμβρανικής πρωτεΐνης HrcU, συστατικού του κεντρικού πυρήνα του ενυσοσώματος, και λιγότερο ισχυρά με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη HrpO. Οι αλληλεπιδράσεις της HrpG με μέλη του C-δακτυλίου υποστηρίζουν τον ρόλο σαπερόνης του T3SS για την πρωτεΐνη. Συμπληρωματικά, απομονώθηκε μετά από ετερόλογη έκφραση το σύμπλοκο HrcN-HrpE, ATPάσης του T3SS και αρνητικού ρυθμιστή της αντίστοιχα, αλλά μόνο σε ακραία αλκαλικό pH. Πειράματα μοριακής διήθησης κατέδειξαν την ύπαρξη δυο διαφορετικών μορφών του συμπλόκου HrcN-HrpE με διαφορετική μοριακή μάζα και πιθανή στοιχειομετρία.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες μιας σειράς επιλεγμένων διαλυτών πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων του T3SS της *P. syringae* pv. phaseolicola μελετήθηκαν σε τιμές pH 8 και 11 με μεθόδους μοριακής διήθησης, σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS) και κυκλικού διχρωισμού (CD): Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν: α) η χαρπίνη HrpZ, β) η πρωτεΐνη HrpP, φερόμενη ως διακόπτης αλλαγής ειδικευσης έκκρισης υποστρώματος κατ' αναλογία με τις ανάλογές της πρωτεΐνες YscP στη *Yersinia* και FliK του μαστιγιακού TTSS, γ) η πρωτεΐνη HrpE (αρνητικός ρυθμιστής της ATPάσης του συστήματος HrcN) και η καρβοξυτελική της επικράτεια, ξεχωριστά και δ) το σύμπλοκο HrpG-HrpV, απομονωμένο μετά από υπερέκφραση από τον αντίστοιχο δικιστρονικό φορέα. Το ακραίο αλκαλικό pH: α) προώθησε την αποσυσσωμάτωση των μεγαλομοριακών φυσικών πληθυσμών των πρωτεϊνών, όπως εκτιμήθηκε από την υποχώρηση του εντοπιζόμενου στο νεκρό όγκο των στηλών

μοριακής διήθησης ποσοστού της κάθε πρωτεΐνης, β) οδήγησε στην εκτεταμένη διαμόρφωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών HrpZ, HrpP αφήνοντας άθικτα τα διμερή τους, γ) διέσπασε το πιθανό τετραμερές της πρωτεΐνης HrpE στην κατάσταση πιθανώς του διμερούς, δ) δεν διέσπασε το σύμπλοκο HrcN-HrpE, ε) οδήγησε σε μείωση των ποσοστών α-έλικας προς όφελος των ποσοστών β-κλώνων σε όλες τις περιπτώσεις αλλά σε καμία περίπτωση δεν επέφερε κατάρρευση της πρωτεϊνικής δευτεροταγούς δομής, στ) είχε μικρή ή καμία επίδραση στην τριτοταγή διαμόρφωση των υπό εξέταση μορίων, όπως έδειξαν μελέτες κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες ζ) κατά κανόνα οδήγησε σε μείωση της θερμοσταθερότητας των εξετασθέντων πρωτεϊνών, όπως αυτή εκφράζεται από την μείωση του σημείου μετάπτωσης (T_M), και η) σε καμία περίπτωση δεν οδήγησε σε εμφάνιση ενδιάμεσων καταστάσεων κατά τη μετάβαση των μορίων από την αναδιπλωμένη στην αποδιπλωμένη μορφή.

Abstract

Type III secretion system (T3SS) is a conserved in structure and function macromolecular multiprotein complex, built from over 20 proteins encoded by conserved pathogenicity islands (PAIs) found in many Gram negative bacteria with known pathogenic, symbiotic or commensal associations with eukaryotic organisms. Nine of the T3SS proteins are similar to proteins of the flagellar basal body, which reflects the distant evolutionary relationship between these two systems.

The present study concerns the characterization of the T3S protein interaction network in the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, using new molecular and biophysical methods. A bicistronic plasmid vector, pPROPET, was used for the heterologous co-expression of T3SS proteins in *E. coli*. For the HrpG protein, the genomic location next to the gene coding for the HrcC secretin suggested that it is a putative class I T3SS chaperone and the protein was isolated as a complex with the regulatory protein HrpJ, after co-expression in *E. coli*. The HrpG, HrpV and HrpJ proteins were also isolated as a ternary complex. The binding region of HrpV and HrpJ on HrpG appear to be overlapping. The HrpG-HrpJ interaction provides a missing link in the T3SS regulatory network which so far involved proteins HrpG, HrpV, HrpS & HrpR and HrpL, coded by the *hrp/hrc* PAI. Further, HrpG was shown to interact with the carboxy-terminal, cytoplasmic domain of the transmembrane core protein HrcU and, less strongly, with the cytoplasmic protein HrpO. The interactions with predicted components of the *P. syringae* T3SS C-ring further support a T3SS chaperone role for protein HrpG. Moreover, a complex between the T3SS ATPase, HrcN, and its negative regulator HrpE was isolated at pH 11 but not at pH 8 from *E. coli* overexpressing the two proteins. Gel filtration experiments revealed two distinct forms of the complex, each with different apparent molecular size and different subunit stoichiometry in gel filtration experiments.

The physicochemical properties of selected T3SS soluble proteins were studied at pH 8 & 11 by gel filtration, small-angle X-ray scattering and circular dichroism methods. These studies included the following proteins: a) harpin (HrpZ), b) HrpP (putative substrate specificity switch protein, by analogy to the *Yersinia* YscP and the flagellum FliK proteins), c) HrpE (negative regulator of HrcN ATPase) and its carboxy-terminal domain and d) the HrpG-HrpV complex, isolated after coexpression from the bicistronic vector pPROPET. Extreme alkaline pH conditions: a) resulted in the solubilization of large aggregates of the co-expressed proteins, b) promoted a more extended form for secreted proteins HrpZ, HrpP without disturbing the homodimer formation, c) disrupted the putative HrpE homotetramer, favoring its dimeric form, d) did not disrupt the HrcN-HrpE complex, e) lead to a reduction of the α -helix content in favor of β -strand in all cases, although it did not result in a collapse of the secondary structure, f) had a little or no effect on the tertiary structure of the proteins investigated, as judged by circular dichroism studies in near UV, g) reduced the thermal stability for almost all proteins examined, as judged by the reduction in the T_M value during thermal denaturation and h) did not lead to formation of intermediates during the thermal transition from the folded to the unfolded state for any of the proteins investigated.

Συντμήσεις

16s rRNA	16s ribosomic-RiboNucleic Acid
ATP	Adenosine TriPhosphate
ATPάση	Adenosine TriPhosphatase
ATSAS	All That Small Angle Scattering
Avr	AViRulence (genes/proteins)
BSA	Bovine Serum Albumine
CBD	Chaperone Binding Domain
CD	Circular Dichroism
CEL	Conserved Effector Locus
Cya	Adenyl CYclase
DESY	Deutsches Elektronen-SYNchrotron
DAS	Dense Alignment Surface
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
DTT	DiThioThreitol
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPEC	EnteroPathogenic <i>E.Coli</i>
ETI	Effector-Triggered Immunity
E-value	Expectation value
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathione -S-Transferase
Hop	Hrp-dependent Outer Proteins
HR	Hypersensitive Response
Hrc	Hypersensitive Response and Conserved
Hrp	Hypersensitive Response and Pathogenicity
HT	His-Tag
IDA	IminoDiacetic Acid
IPTG	IsoPropyl-Thio-β-D Galactoside
kb	KiloBase pairs
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani broth
LMW	Low Molecular Weight
MAMPs	Microbe-Associated Molecular Patterns
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBP	Maltose-Binding Protein
MCS	MultiCloning Site
mRNA	messenger-RiboNucleic Acid
MW	Molecular Weight
NC	Needle Complex
NCBI	National Center of Biotechnology Information

Ni-NTA	Nickel-NitriloTriacetic Acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRMSD	Normalized Root Mean Square Deviation
NSD	Normalized Spatial Discrepancy
NTA	NitriloTriacetic Acid
OD	Optical Density
ori	ORIGIN of replication
PAI	PATHogenicity Island
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
pI	isoelectric point
PMF	Proton Motive Force
PMSF	PhenylMethaneSulfonylFluoride
PNPase	PolyNucleotide Phosphorylase
Pop	<i>Pseudomonas</i> Outer Protein
PR	Pathogenesis Related
PRRs	Pattern Recognition Receptors
Psc	<i>Pseudomonas</i> SeCretion
PSI-BLAST	Position Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool
PSIPRED	Position Specific Iterated PREDiction
PTI	PAMP-Triggered Immunity
R	Resistance (genes/proteins)
RBS	Ribosome Binding Site
R _g	Radius of gyration
R _h	Hydrodynamic radius
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNAse	RiboNucleAse
SAR	Systemic Acquired Resistance
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SD	Shine Dalgarno
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SVD	Singular Value Decomposition
Syc	Specific Yop Chaperone
T3SS	Type 3 Secretion System
TEV	Tobacco Etch Virus
TPRs	TetratricoPeptide Repeats
tRNA	transfer-RiboNucleic Acid
Xop	<i>Xanthomonas</i> Outer Protein
Yop	<i>Yersinia</i> Outer Protein
Ysc	<i>Yersinia</i> SeCretion

Περιεχόμενα

Πρόλογος	5
Περίληψη	7
Συντμήσεις	10
Περιεχόμενα	12

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

1.1 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS)	18
1.1.1 Εισαγωγή	18
1.1.2 Απεικονίσεις των συμπλόκων βελόνας - Δομή του T3SS	18
1.1.3 Το βασικό σωματίο	20
1.1.4 Τα εξωκυττάρια συστατικά	22
1.1.5 Η ATPάση του συστήματος και ο C-δακτύλιος	25
1.1.6 Αλλαγή ειδίκευσης υποστρώματος και έλεγχος μήκους της βελόνας – Μοντέλα – η βελόνα ως αισθητήρας και ρυθμιστής	26
1.1.7 Οι σαπερόνες του T3SS	30
1.1.8 Οι λειτουργίες των μορίων τελεστών – η φύση του αμινοτελικού σήματος έκκρισης	33
1.1.9 Οι τελεστές του φυτοπαθογόνου μοντέλου <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	34
1.2 Το μαστιγιακό T3SS	36
1.2.1 Το μαστίγιο ως κινητήριο οργανίδιο	36
1.2.2 Το μαστιγιακό γενετικό σύστημα	36
1.2.3 Η δομή του μαστιγίου	36
1.2.4 Το μορφογενετικό μονοπάτι του μαστιγίου	37
1.2.5 Τα συστατικά της μηχανής έκκρισης	38
1.2.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών της συσκευής έκκρισης	38
1.3 Οικογένειες T3SS και εξελικτικές θεωρήσεις	39
1.4 Εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες και η λειτουργία τους	42
1.5 Τα σπειρωμένα σπειράματα	44
1.5.1 Χαρακτηριστικά δομής, σταθερότητα, ειδίκευση και βιολογική λειτουργία	44
1.5.2 Αποδίπλωση και σπειρωμένα σπειράματα στο T3SS	47
Σκοπός της εργασίας	49
Βιβλιογραφία	50

Κεφάλαιο 2. Αρχές μεθοδολογίας

2.1 <i>In silico</i> επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών	59
2.1.1 ProtParam	59
2.1.2 DAS (Dense Alignment Surface)	60
2.1.3 PSIPRED	61
2.1.4 FoldIndex	61

2.1.5 ROSETTA	62
2.1.6 PROSITE / SCANPROSITE	63
2.2 Έκφραση πρωτεϊνών από ετερόλογο σύστημα	64
2.2.1 Το μεταβολικό βάρος της ετερόλογης υπερέκφρασης	64
2.2.2 Έκφραση πρωτεϊνών από το ετερόλογο σύστημα της <i>Escherichia coli</i>	65
2.3 Μέθοδοι χρωματογραφίας για την απομόνωση ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών	70
2.3.1 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου	70
2.3.2 Χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής	73
2.3.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	76
2.4 Μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνικών συμπλόκων	79
2.4.1 Σημασία ανάδειξης πρωτεϊνικών συμπλόκων	79
2.4.2 Η δομική βάση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	79
2.4.3 Μέθοδοι ανάδειξης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	79
2.4.4 Η συνέκφραση και ο συγκαθαρισμός ως μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνικών συμπλόκων	82
2.4.5 Βασικές αρχές κατασκευής δικιστρονικού φορέα	85
2.5 Κυκλικός διχρωισμός (CD, circular dichroism)	86
2.5.1 Βασικές αρχές κυκλικού διχρωισμού	86
2.5.2 Σήμα στο άπω υπεριώδες (far-UV)	87
2.5.3 Βασικός εξοπλισμός και τεχνικές λεπτομέρειες	88
2.5.4 Ανάλυση δεδομένων κυκλικού διχρωισμού	89
2.5.5 Σετ αναφοράς (reference databases)	91
2.5.6 Σήμα στο εγγύς υπεριώδες (near-UV)	92
2.5.7 Κυκλικός διχρωισμός και πρωτεϊνική αποδίπλωση	93
2.5.8 Χαρακτηρισμός της αποδίπλωσης με την παρακολούθηση των αλλαγών ελλειπτικότητας σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος συναρτήσει της θερμοκρασίας	94
2.5.9 Χαρακτηρισμός της αποδίπλωσης μιας πρωτεΐνης με την διερεύνηση των φασμάτων της συναρτήσει της θερμοκρασίας	95
2.5.10 Η θεωρία πίσω από το SVD	95
2.6 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS, small angle X-ray scattering)	97
2.6.1 Εισαγωγή	97
2.6.2 Βασικές αρχές της μεθόδου	98
2.6.3 Σκέδαση διαλυμάτων μακρομορίων	99
2.6.4 Συνολικές παράμετροι	100
2.6.5 Το πρόγραμμα PRIMUS	103
2.6.6 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων και ανισομετρία Σωματιδίου	104
2.6.7 Το πρόγραμμα GNOM	106
2.6.8 Τα αντιληπτικά κριτήρια στο GNOM	107
2.6.9 Ανάλυση <i>ab initio</i> του σχήματος του σωματιδίου και της δομής επικρατειών – τα προγράμματα DAMMIN & GASBOR	109
2.6.10 Υπέρθωση ανεξάρτητων μοντέλων - παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου – το πακέτο προγραμμάτων DAMAVER	111
2.6.11 Προετοιμασία δειγμάτων	112
Βιβλιογραφία	113

Κεφάλαιο 3. Ανάδειξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

3.1 Εισαγωγή	119
3.1.1 Οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης HrpG	119
3.1.2 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ATPάσης, του αρνητικού ρυθμιστή της και της σαπερόνης γενικών καθηκόντων του T3SS	121
3.1.3 Οι αλληλεπιδράσεις της HrpP	122
3.1.4 Ο σκοπός των πειραμάτων που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο	122
3.2 Υλικά και μέθοδοι	123
3.2.1 Υλικά	123
3.2.2 Μέθοδοι	124
3.2.2.1 Επαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	124
3.2.2.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών φερουσών ετικέτα ιστιδινών με χρωματογραφία συγγένειας	125
3.2.2.3 Καθαρισμός πρωτεϊνών φερουσών ετικέτα ιστιδινών με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής	126
3.2.2.4 Αναδίπλωση και απομόνωση πρωτεϊνικού συμπλόκου πάνω στη στήλη συγγένειας	126
3.2.2.5 Εγγενής ηλεκτροφόρηση συνεπώσεων πρωτεϊνών σε πήκτωμα αгарόζης για την ανάδειξη αλληλεπιδράσεων	127
3.2.2.6 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)	127
3.3 Αποτελέσματα	128
3.3.1 Κατασκευή δικιστρονικού φορέα pPROPET	128
3.3.2. Εγγενής ηλεκτροφόρηση συνεπώσεων πρωτεϊνών σε πήκτωμα αгарόζης για την ανάδειξη αλληλεπιδράσεων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες	131
3.3.3 Αναδίπλωση και απομόνωση πρωτεϊνικού συμπλόκου πάνω στη στήλη συγγένειας	133
3.3.4 Απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία Συγγένειας	133
3.3.4.1 Το ζεύγος HrpG-HrpV	133
3.3.4.2 Το ζεύγος HrpG-HrpJ	135
3.3.4.3 Η τριπλέτα HrpG-HrpV-HrpJ	136
3.3.4.4 Το ζεύγος HrpG ^{-C14} -HrcUc	138
3.3.4.5 Το ζεύγος HrpG ^{-C14} -HrpO	139
3.3.4.6 Το ζεύγος HrpV-HrpS	140
3.3.4.7 Το ζεύγος HrcN-HrpE και η τριπλέτα HrcN-HrpE-HrpO	141
3.3.4.8 Το ζεύγος HrpO-HrpE	144
3.3.4.9 Οι περιπτώσεις των αλληλεπιδράσεων HrpP-HrpE & HrpP-HrcQb	146
3.4 Συζήτηση	147
Βιβλιογραφία	150

Κεφάλαιο 4. Φυσικοχημική ανάλυση επιλεγμένων διαλυτών πρωτεϊνών του εκκριντικού συστήματος τύπου III του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

4.1 Εισαγωγή	155
4.1.2 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες HrpZ, HrpP, HrpB από το φυτοπαθογόνο <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	155
4.1.2.1 Η πρωτεΐνη HrpZ	155
4.1.2.2 Η πρωτεΐνη HrpP	157
4.1.2.3 Η πρωτεΐνη HrpB	157
4.1.3 Η επίδραση του ακραία αλκαλικού pH στις ιδιότητες των πρωτεϊνών <i>in vitro</i>	158
4.1.3.1 Γενικές αρχές	158
4.1.3.2 Η επίδραση του αλκαλικού pH σε μια πρωτεΐνη σπειρωμένου σπειράματος	158
4.1.4 Σκοπός των πειραμάτων που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο	159
4.2 Υλικά και μέθοδοι	160
4.2.1 Υλικά	160
4.2.2. Μέθοδοι	161
4.2.2.1 Μοριακή διήθηση	161
4.2.2.2 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS)	162
4.2.2.3 Κυκλικός διχρωισμός (CD)	163
4.3 Αποτελέσματα	164
4.3.1 Μοριακή διήθηση	164
4.3.1.1 Η πρωτεΐνη HrpB	164
4.3.1.2 Η πρωτεΐνη HrpP	166
4.3.1.3 Η πρωτεΐνη HrpZ	168
4.3.1.4 Η πρωτεΐνη HrpE	170
4.3.1.5 Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT-HrcN + HrpE	172
4.3.1.6 Η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrpE (HrpEc)	174
4.3.1.7 Το σύμπλοκο HrpG + HrpV-HT	175
4.3.2 Κυκλικός διχρωισμός	176
4.3.2.2 Η πρωτεΐνη HrpP	176
4.3.2.3 Η πρωτεΐνη HrpZ	183
4.3.2.4 Η πρωτεΐνη HrpE	190
4.3.3 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (Small-Angle X-ray scattering)	195
4.3.3.1 Η πρωτεΐνη HrpP	195
4.3.3.2 Η πρωτεΐνη HrpZ	198
4.3.3.3 Η πρωτεΐνη HrpE	202
4.3.3.4 Η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrpE (HrpEc)	203
4.3.3.5 Το σύμπλοκο HrpG-HrpV	207
4.4 Συζήτηση	210
Βιβλιογραφία	215
Συζήτηση - Μελλοντικές προοπτικές	218

Παραρτήματα

Παράρτημα 1- Αλληλουχίες εκκινητών, μήτρες προέλευσης των ενθεμάτων και πλασμίδια αποδέκτες τους	221
Παράρτημα 2- Οι χάρτες των εμπορικών φορέων έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	222
Παράρτημα 3- Βιοϋπολογιστική ανάλυση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών της <i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> race1 (Psp3121) που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία με τα προγράμματα DNAMAN, ProtParam, FoldIndex, Psipred, MATCHER, Scan Prosite (λειτουργικό Windows)	224
Παράρτημα 4- Βαθμονομήσεις των στηλών μοριακής διήθησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και τα γραφήματα ανεύρεσης μοριακού βάρους και υδροδυναμικής ακτίνας	237
Παράρτημα 5- Γραφική απεικόνιση προσαρμογής των <i>ab initio</i> υπολογισμένων μοντέλων από τα προγράμματα DAMMIN και GASBOR στα πειραματικά δεδομένα	240

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS)

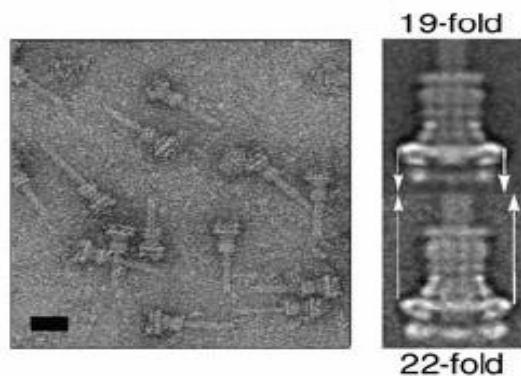
1.1.1 Εισαγωγή

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS, type three secretion system) είναι ένα δομικά και λειτουργικά συντηρημένο μακρομοριακό σύμπλοκο δομούμενο από περισσότερες από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες και απαντάται σε πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κατά κανόνα είτε συμβιωτικά είτε παθογόνα ευκαρυωτικών οργανισμών (Cornelis 2006). Οι μισές περίπου εξ αυτών των πρωτεϊνών είναι συντηρημένες στα περισσότερα εκκριτικά συστήματα τύπου III και εμπλέκονται στην κατασκευή αυτής της πρωτεϊνικής νανομηχανής, η οποία διασχίζει την εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο, τη στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης, την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, τον εξωκυττάριο χώρο, το κυτταρικό τοίχωμα του ευκαρυωτικού κυττάρου-ξενιστή -αν πρόκειται για φυτικό κύτταρο- και τέλος την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή (Moraes et al., 2008). Μέσα στο ευκαρυωτικό κύτταρο οι πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) τροποποιούν τις αμυντικές λειτουργίες του ξενιστή προς όφελος του παθογόνου. Οι περισσότερες από τις συντηρημένες πρωτεΐνες του T3SS είναι όμοιες στην αλληλουχία με πρωτεΐνες που δομούν στοιχεία του βασικού σωματίου (basal body, βλέπε παράγραφο 1.1.3) του βακτηριακού μαστιγίου, κάτι που υποδεικνύει την κοινή εξελικτική ιστορία των δύο συστημάτων (Troisfontanes & Cornelis 2005) (για τις εξελικτικές σχέσεις των δύο συστημάτων βλέπε παράγραφο 1.3). Η πολυπλοκότητα συναρμογής του συστήματος και η μεγάλη συσχέτισή του με μεμβράνες, αποτελούν μεγάλη πρόκληση για τους δομικούς βιολόγους που μελετούν τις μοριακές λεπτομέρειες των επιμέρους συστατικών του και στοχεύουν στην κατανόηση των ρόλων μέσα στο γενικότερο πλαίσιο δομής και λειτουργίας του συμπλόκου. Προσφάτως, διαφορετικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν α) αναπαραστάσεις ηλεκτρονικής κρυο-μικροσκοπίας του δομικού πυρήνα του T3SS στα διάφορα στάδια συναρμολόγησής του β) διασαφήνιση των ατομικών δομών μερικών εκ των συστατικών του T3SS μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X και γ) τεχνικές μοριακής μοντελοποίησης, έχουν βελτιώσει την κατανόηση του τρόπου δόμησης του T3SS (Moraes et al., 2008).

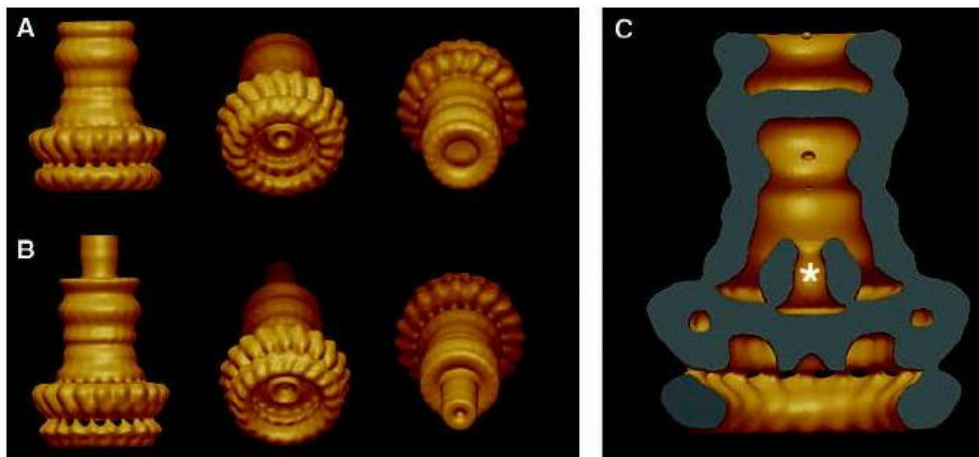
1.1.2 Απεικονίσεις των συμπλόκων βελόνας - Δομή του T3SS

Η τρισδιάστατη ηλεκτρονική μικροσκοπία συνέβαλε σε αναδομήσεις του βασικού πυρήνα του T3SS, χαρακτηριζομένου και ως σύμπλοκο βελόνας (NC, needle complex), αποτελούμενο από τα τμήματα εκείνα του συστήματος που διασχίζουν τις δυο βακτηριακές μεμβράνες και προεξέχουν εξωκυττάρια. Η απεικόνιση μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης των NC από τη *Salmonella typhimurium* ήταν ορόσημο για την έρευνα του πεδίου (Kubori et al., 1998). Με την ίδια τεχνική έχουν προκύψει στη συνέχεια απεικονίσεις των NC από τη *Shigella flexneri* (Tamano et al., 2000) και εντεροπαθογόνα στελέχη της *Escherichia coli* (EPEC)(Sekiya et al., 2001). Η ανάλυση μονού σωματιδίου σε συνδυασμό με ηλεκτρονική κρυο-μικροσκοπία επέτρεψε τον καθορισμό της δομής μιας απομονωμένης βελόνας της *S. flexneri* σε υψηλή ευκρίνεια (Blocker et al., 2001). Η μελέτη αυτή φανέρωσε για πρώτη φορά την ύπαρξη ενός κεντρικού καναλιού διαμέτρου περίπου 2-3 nm που εκτείνεται από τη βάση των δακτυλίων έως την άκρη της εξωκυττάριας βελόνας. Το κανάλι αυτό είναι εξαιρετικά μικρής διαμέτρου για τη διέλευση πλήρως αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και η παρατήρηση ήταν συνεπής με προγενέστερες παρατηρήσεις που

υποδείκνυαν ότι τα υποστρώματα έκκρισης πρέπει να εισαχθούν αποδιπλωμένα στο κανάλι του T3SS. Σχετικά πρόσφατα η χρήση ηλεκτρονικής κρυο-μικροσκοπίας από την ερευνητική ομάδα του Marlovits (2004) βελτίωσε την ανάλυση των μοντέλων του συμπλόκου βελόνας και αποκάλυψε την παρουσία ενός κυλινδρικού βασικού σωματίου μήκους 300 Å και πάχους 240 Å και μιας κοίλης προτεταμένης βελόνας μήκους 50 nm η οποία ενσωματώνεται στο βασικό σωματίο κατά τη συναρμογή του συστήματος (Εικ. 1.1). Η επιβαλλόμενη από την ομάδα του Marlovits συμμετρία στην μελέτη ηλεκτρονικής κρυο-μικροσκοπίας είναι της τάξεως των 19-21, με τον άξονα συμμετρίας παράλληλο του μακρύτερου άξονα της εκκριτικής μηχανής και με την πλειονότητα των απομονωμένων βελόνων να χαρακτηρίζονται από 20-απλή συμμετρία. Η επιβολή μιας 20-απλής συμμετρίας σε όλη τη δομή της βελόνας πιθανόν να μην αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα για συστατικά που δεν την ακολουθούν, παρόλα αυτά την υπακούουν ικανοποιητικά οι δακτύλιοι της εσωτερικής μεμβράνης όπου διαχωρίζονται ξεκάθαρα οι επιμέρους υπομονάδες. Από την απεικόνιση του εσωτερικού του βασικού σωματίου φάνηκε ότι στο πάνω μέρος του σφραγίζεται από ένα διάφραγμα πιθανόν σχηματιζόμενο από κάποια επικράτεια της πρωτεΐνης InvG. Η βάση του παρουσιάζεται κοίλη και στο κάτω μέρος της διακρίνεται μια δομή υποδοχής που αγκυροβολεί μια δομή που διασχίζει το κανάλι και καλείται εσωτερική ράβδος (inner rod) (Εικ. 1.2). Η εσωτερική ράβδος αποτελείται πιθανόν -βάσει έμμεσων βιοχημικών και δομικών μελετών- από την πρωτεΐνη PrgJ και μπορεί να χρησιμεύει ως άγκυρα για το κανάλι ή ως ρυθμιστής του μήκους της βελόνας (Marlovits et al., 2004)(βλέπε παράγραφο 1.1.6).



Εικ. 1.1. Αριστερά. Ηλεκτρονική μικρογραφία αρνητικής χρώσης από σύμπλοκα βελόνας της *S. typhimurium*. **Δεξιά.** Η εφαρμογή 19 και 22-απλής συμμετρίας στο μοντέλο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των Marlovits et al. (2004) και σύγκριση των δύο. Τροποποιημένη εικόνα από την πηγή: Marlovits et al. (2004).

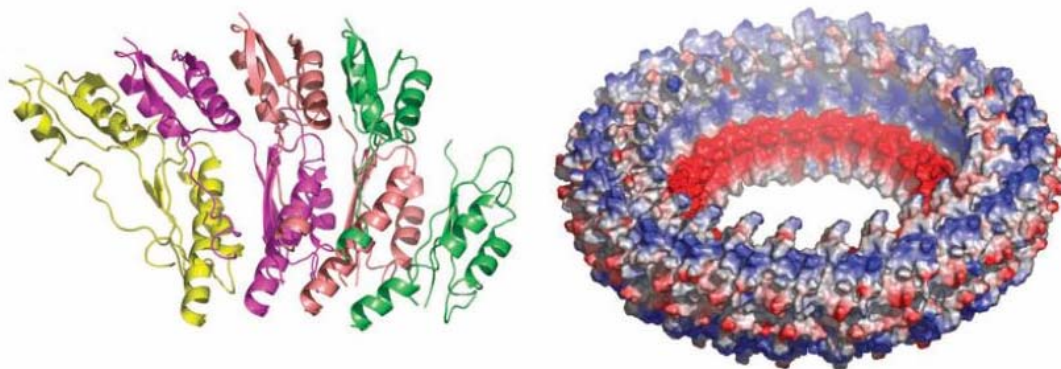


Εικ. 1.2. Απεικονίσεις επιφάνειας της κρυο-ηλεκτρονικής ανάλυσης του συμπλόκου βελόνας από τη *S. typhimurium*. **A & B.** Απεικονίσεις της βάσης και της βελόνας. Στους εσωτερικούς δακτυλίους διακρίνονται υπομονάδες ενώ οι εξωτερικοί εμφανίζονται λείοι. **C.** Το εσωτερικό διαμέρισμα της βάσης. Η δομή της υποδοχής (socket) που λειτουργεί σαν άγκυρα για την εσωτερική ράβδο και τη βελόνα είναι σημασμένη με λευκό αστερίσκο. Πηγή: Marlovits et al. (2004).

1.1.3 Το βασικό σωματίο

Το βασικό σωματίο (basal body) του TTSS δομείται ως ένα διπλό ζεύγος ομόκεντρων δακτυλίων βυθισμένων στη διπλή μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου. Επί του βασικού σωματίου αγκυροβολείται το σύμπλοκο της βελόνας το οποίο στη *S. typhimurium* αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες, τις PrgH, PrgK και InvG. Από αυτές, οι δυο πρώτες σχηματίζουν τον εσωτερικό δακτύλιο του βασικού σώματος (inner ring) ο οποίος είναι ενσωματωμένος στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, ενώ η InvG σχηματίζει τον εξωτερικό δακτύλιο (outer ring) που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου (Kubori et al., 1998, Blocker et al., 2001). Στη *Shigella* ο εσωτερικός δακτύλιος σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες MxiJ και MxiG (Ghosh 2004).

Ο εσωτερικός δακτύλιος εμφανίζει μεγαλύτερη διάμετρο σε σχέση με τον εξωτερικό. Η πρωτεΐνη PrgK ανήκει στην οικογένεια περιπλασματικών λιποπρωτεϊνών YscJ η οποία φέρεται να εντοπίζεται στην εξωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης μέσω λιπίδωσης στο αμινοτελικό άκρο και για κάποια μέλη της οικογένειας μέσω μιας καρβοξυτελικής διαμεμβρανικής έλικας (Kimbrough & Miller 2000). Με τον εντοπισμό αυτό, ο δακτύλιος της PrgK μπορεί να λειτουργεί ως εναρκτής της συναρμογής της βελόνας και ως βάση στρατολόγησης και άλλων συστατικών του T3SS που εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη. Από την καθορισμένη ατομική δομή της πρωτεΐνης EscJ (ομόλογης πρωτεΐνης του εσωτερικού δακτυλίου της EPEC) μοντελοποιήθηκε ένας δακτύλιος 24 υπομονάδων της πρωτεΐνης, με παρόμοιες γενικές διαστάσεις με τον εσωτερικό δακτύλιο που προέκυψε από την ηλεκτρονική μικροσκοπία και ο οποίος εφάρμοσε καλά επί του ηλεκτρονιακού χάρτη του βασικού σωματίου της *S. typhimurium* (Yip et al., 2005, Stebbins et al., 2005). Το κεντρικό κανάλι της δομής αυτής στενεύει σαν κώνος από τα 120 Å έως τα 73 Å καθώς εκτείνεται από την εσωτερική μεμβράνη προς τον περιπλασμικό χώρο. Η εσωτερική επιφάνεια της δομής σχηματίζεται από όξινα κατάλοιπα, δημιουργώντας έναν πολύ ισχυρά αρνητικά φορτισμένο εσωτερικό χώρο (Εικ. 1.3). Οι πρωτεΐνες PrgK και MxiJ μοιάζουν στο αμινοτελικό τους άκρο με τη μαστιγιακή πρωτεΐνη FliF που δομεί τον δακτύλιο MS της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού μαστιγίου και λειτουργεί ως παθητικό κανάλι για το μαστιγιακό κινητήρα (rotor). Αντιθέτως, οι PrgH και MxiG δεν έχουν κάποιο μαστιγιακό ομόλογο αλλά συσχετίζονται μεταξύ τους στην καρβοξυτελική τους περιοχή ενώ η τοπολογία τους προβλέπει μια μικρή αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή, μια διαμεμβρανική περιοχή και τέλος μια μεγάλη περιπλασμική επικράτεια (Ghosh 2004). Η PrgH μόνη της έχει αναφερθεί ότι σχηματίζει ομοτετραμερή, κάτι που υποδεικνύει ότι τα ολιγομερή αυτά πιθανόν αποτελούν ενδιάμεσα κατά τη συναρμολόγηση του εσωτερικού δακτυλίου (Kimbrough & Miller 2000). Παρόλα αυτά η σταθερότητα του εσωτερικού δακτυλίου απαιτεί την από κοινού παρουσία των πρωτεϊνών PrgH και PrgK (Sukhan et al., 2001).



Εικ. 1.3. Αριστερά. Η καθορισμένη κρυσταλλογραφική δομή του τετραμερούς της EscJ. **Δεξιά.** Μοντέλο του βασικού δακτυλίου της EscJ βάσει της δομής του τετραμερούς. Η απεικόνιση μοριακής επιφάνειας έχει παραχθεί βάσει του ηλεκτροστατικού δυναμικού, όπου με μπλε απεικονίζονται οι βασικές επιφάνειες, με κόκκινο οι όξινες. Πηγή: Stebbins (2005).

Ο εξωτερικός δακτύλιος αποτελείται από την InvG που ανήκει στην οικογένεια των σεκρετινών YscC (secretins) (Crago & Koronakis 1998, Tamano et al., 2000, Burghout et al., 2004). Οι σεκρετίνες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν ομοπολυμερείς δακτυλιοειδείς δομές με μεγάλους κεντρικούς πόρους και λειτουργούν ως εξωτερικά μεμβρανικά συστατικά όχι μόνο για το T3SS αλλά και για το τύπου II εκκριτικό σύστημα, τη βιογένεση του πύλου στο εκκριτικό σύστημα τύπου IV, όπως επίσης και για την εξωτερίκευση των νηματοειδών φάγων (Cornelis 2006). Όλες οι σεκρετίνες αποτελούνται από δυο επικράτειες, μια καρβοξυτελική περιοχή ομολογίας η οποία είναι ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη και μια αμινοτελική που εντοπίζεται στο περίπλασμα. Η τελευταία είναι μερικώς συντηρημένη μέσα στην οικογένεια των σεκρετινών αλλά εξαιρετικά συντηρημένη μέσα σε κάθε τύπου σύστημα T3SS και θεωρείται ότι λειτουργεί στην αναγνώριση και την πρόσδεση άλλων περιπλασματικών συστατικών ή συστατικών της εσωτερικής μεμβράνης. Οι πιλοτίνες είναι μια άλλη κατηγορία μορίων που διαμεσολαβούν στον εντοπισμό των σεκρετινών στην εξωτερική μεμβράνη, μέσω πρόσδεσης του καρβοξυτελικού τους άκρου (Crago & Koronakis 1998, Burghout et al., 2004).

Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του πυρήνα του βασικού σωματίου, οι δακτύλιοι της εσωτερικής μεμβράνης θεωρούνται ως πλατφόρμα εντοπισμού των ενσωματωμένων στην εσωτερική μεμβράνη πρωτεϊνών του T3SS, YscR, YscS, YscT και YscU στην περίπτωση της *Yersinia* (Moraes et al., 2008). Ο δακτύλιος MS του μαστίγιου (βλέπε παρ. 1.2.3) περιλαμβάνει στο κέντρο του τις ομόλογες των προαναφερθέντων πρωτεϊνών, FliP, FliQ, FliR, FlhB αντίστοιχα (Ghosh 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι συντηρημένες στα εκκριτικά συστήματα τύπου III και στο μαστίγιο και πιθανόν αλληλεπιδρούν με υποστρώματα έκκρισης κατά τη μεταφορά τους ή δρουν ως υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα σήματα έκκρισης επί των υποστρωμάτων. Η πρωτεΐνη YscU ομοίως με την ομόλογή της από το μαστίγιο FlhB κόβεται πρωτεολυτικά στο εξαιρετικά συντηρημένο μοτίβο NPTH της οικογένειας των πρωτεϊνών αυτών, το οποίο εδράζεται στο καρβοξυτελικό κυτταροπλασματικό τους άκρο και το καρβοξυ-καρβοξυτελικό θραύσμα παραμένει σε στενή γειτνίαση με το υπόλοιπο μόριο μέσω αλληλεπίδρασης (Edqvist et al., 2003; Lavander et al., 2003). Αν και η πρωτεόλυση αυτή δεν φαίνεται να απαιτείται για τη λειτουργία του συστήματος, ίσως προωθεί μια μη τοξική αναδίπλωση της πρωτεΐνης μέσα στο

βακτηριακό κύτταρο ή ίσως παίζει ρόλο στην αλλαγή ειδίκευσης υποστρώματος όπως έχει προταθεί για την περίπτωση του μαστιγίου (βλέπε παράγραφο 1.1.6).

1.1.4 Τα εξωκυττάρια συστατικά

Τα εξωκυττάρια συστατικά του T3SS αποτελούν τις δομές της βελόνας για τα ζωοπαθογόνα (ή του hrp/hrc πύλου για τα φυτοπαθογόνα), το σύμπλοκο καλύμματος της βελόνας (needle tip complex) που σχηματίζει ένα κωδωνοειδές κάλυμμα (ή νημάτιο στην EPEC) και το σύμπλοκο του πόρου μεταφοράς (translocon, translocation pore) το οποίο αποτελείται από δυο μεμβρανικές πρωτεΐνες της οικογένειας των YopB/YopD, οι οποίες ολιγομερίζονται για το σχηματισμό ενός πόρου στη μεμβράνη του ξενιστή ευκαρυώτη (Yip & Strynadka 2006).

Η δομή βελόνας του T3SS είναι ένα ελικοειδές, ευθύ και κοίλο πολυμερές αποτελούμενο από μερικές εκατοντάδες υπομονάδων της οικογένειας YscF της *Yersinia*. Το μήκος της βελόνας είναι 50 nm στη *Salmonella*, 45.4 ± 3.3 nm στη *Shigella* και 58 ± 10 nm στη *Yersinia*, μεγέθη πολύ μικρότερα σε σχέση με το μήκος του βακτηριακού μαστιγίου (10-15 μ m) ενώ η εσωτερική διάμετρος του καναλιού είναι 25 Å για όλες τις περιπτώσεις. Οι πρόσφατα καθορισμένες δομές των μονομερών βελόνας, MxiH (*S. flexneri*) (Deane et al., 2006), BsaL (*B. pseudomallei*) (Zhang et al., 2006), PrgI (*S. typhimurium*) (Wang et al., 2007) (Εικ. 1.4) ανέδειξαν μια κοινή δομή δεματιού δύο ελίκων σπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil) που συνδέεται με μια συντηρημένη στροφή μοτίβου PxxP. Η δομή αυτή μοιάζει σημαντικά με την επικράτεια D0 της πρωτεΐνης FliC (flagellin) και της EspA που σχηματίζει το σύμπλοκο καλύμματος της EPEC (Yip et al., 2005). Το μοτίβο του σπειρωμένου σπειράματος προσαρμόστηκε πάνω στον ηλεκτρονικό χάρτη βελόνας από την *S. flexneri*, ανάλυσης 16 Å, και με τον τρόπο αυτό παρείχε τις πρώτες ατομικές προβλέψεις των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων που συμμετέχουν στην αρχιτεκτονική της βελόνας (Cordes et al., 2003). Η πρωτεΐνη MxiH πολυμερίζεται σε μια ελικοειδή υπερδομή με 5.6 υπομονάδες ανά στροφή και βήμα της έλικας 24 Å, διάταξη πολύ όμοια αυτής του μαστιγιακού νήματος και άγκιστρου, παρά το γεγονός ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες δεν εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα σε επίπεδο πρωτοταγούς αλληλουχίας. Μεταλλαγές της MxiH που οδηγούν σε συστατική έκκριση χαρτογραφούνται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ της κεφαλής της μιας υπομονάδας και της ουράς του μονομερούς που πακετάρεται από πάνω της. Αυτό επιβεβαιώνει την άποψη του ρόλου της βελόνας ως αισθητήρα, όπου το σήμα μεταφέρεται στη βελόνα μέσω των μοριακών επαφών των υπομονάδων της ρυθμίζοντας την έκκριση (Moraes et al., 2008).

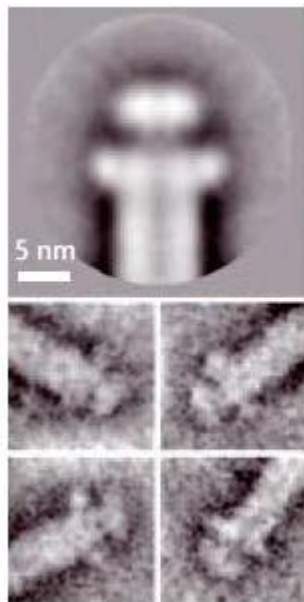
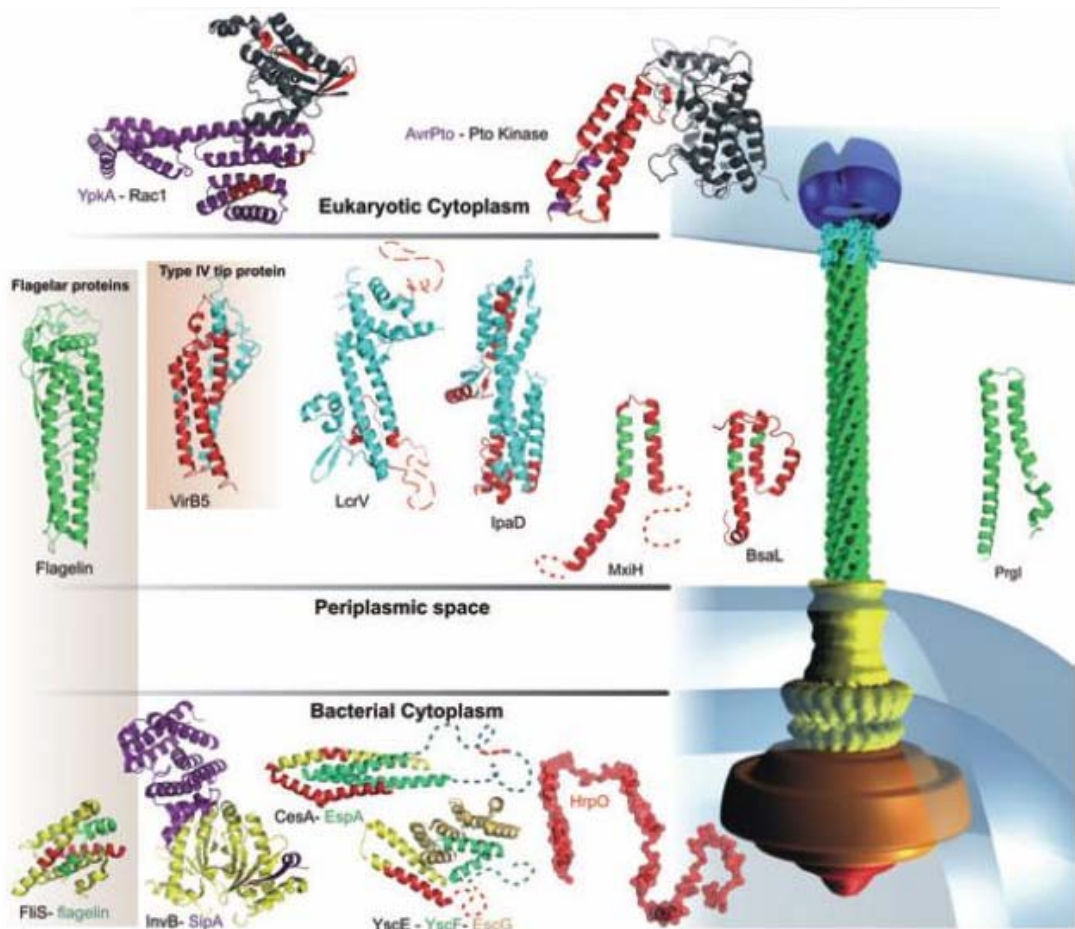
Τα βακτηριακά φυτοπαθογόνα αντί βελόνας διαθέτουν τον αγωγό Hrp/Hrc ή πύλο, ο οποίος έχει εξωτερική διάμετρο 80 Å όπως και οι βελόνες των ζωοπαθογόνων αλλά το μήκος του μπορεί να φτάσει και τα 2 μ m, υπερβαίνοντας κατά πολύ το μήκος της αγρίου τύπου βελόνας και εξυπηρετώντας την ανάγκη διάσχισης του κυτταρικού τοιχώματος (>100 nm πάχος) ώσπου να προσεγγισθεί η πλασματική μεμβράνη του ξενιστή (Roine et al., 1997). Η πρωτεΐνη HrpA αποτελεί την υπομονάδα δόμησης του αγωγού Hrp της *P. syringae* pv tomato DC3000 και έχει ομολογία αλληλουχίας μόνο της τάξεως του 30% με την HrpA της *P. syringae* pv phaseolicola. Η πρωτεΐνη HrpA των στελεχών αυτών παρουσιάζει 18-21% ταυτόσημη αλληλουχία με την YscF, ποσοστό κατάτι μικρότερο από την ταυτόσημη αλληλουχία των MxiH, PrgI ή EscF με τη YscF (Roine et al., 1997, Ghosh 2004). Αν και δεν υπάρχει ευθεία πειραματική ένδειξη ότι η πρωτεϊνική μεταφορά πραγματοποιείται μέσω του κέντρου της βελόνας,

υπάρχει ένδειξη για την μεταφορά μέσα από το κέντρο του αγωγού Hrp. Συγκεκριμένα παρουσιάστηκε ο εντοπισμός του τελεστή AnrPto και της χαρπίνης HrpZ στο μακρινό άκρο του αγωγού, με τη χρήση τεχνικών ανοσοανίχνευσης με σωματίδια χρυσού και ηλεκτρο-μικρογραφικές απεικονίσεις κατά τη διαδικασία της έκκρισης (Jin et al., 2001).

Οι πρωτεΐνες καλύμματος της βελόνας πιστεύεται ότι ρυθμίζουν τη σωστή ένθεση του πόρου μεταφοράς συνδέοντας τη βελόνα με τη μεμβράνη του ξενιστή. Η προσαρμογή της δομής της βελόνας MxiH στην ηλεκτρονιακή αναπαράσταση της *S. flexneri* παρείχε την πλατφόρμα μοντελοποίησης του καλύμματος της βελόνας. Με τον τρόπο αυτό πέντε μονομερή του LcrV (*Y. pestis*) μπόρεσαν να τοποθετηθούν στην άκρη της βελόνας (Εικ. 1.4)(Deane et al. 2006). Ο καθορισμός της ατομικής δομής της πρωτεΐνης LcrV φανέρωσε μια επίσης κωδωνοειδή μορφή (Derewenda et al. 2004). Οι δομές επιπρόσθετων μονομερών καλύμματος από άλλα παθογόνα, IpaD (*Shigella flexneri*) & BipD (*Burkholderia pseudomallei*) (Johnson et al., 2007), EspA (EPEC)(Yip et al., 2005) μπορούν να συγκριθούν με τη δομή του LcrV στο ότι φέρουν μια κεντρική περιοχή σπειρωμένου σπειράματος. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος είναι το αμινοτελικό άκρο των IpaD, BipD που φέρεται να επιτελεί ρόλο σαπερόνης για το καρβοξυτελικό άκρο με το οποίο συντελείται ο ολιγομερισμός του καλύμματος (Johnson et al., 2007). Το σύμπλοκο καλύμματος του LcrV φαίνεται να είναι ομοπενταμερές, ενώ στην περίπτωση της IpaD φέρεται να είναι ομοτετραμερές με την επιπρόσθετη συμμετοχή ενός μορίου του πόρου μεταφοράς και συγκεκριμένα της IpaB. Τα μόρια IpaD:IpaB παρουσιάζουν στοιχειομετρία 4:1 και το σύμπλοκο που σχηματίζεται μπορεί να παίζει το ρόλο βαλβίδας εξόδου από τη βελόνα, εμποδίζοντας την πρόωρη απώλεια πρωτεϊνών του πόρου μεταφοράς ή/και πρωτεϊνών-τελεστών (Blocker et al., 2008). Εξαιρετικά διαφοροποιημένο είδος καλύμματος αποτελεί αυτό της πρωτεΐνης EspA (EPEC) η οποία σχηματίζει ένα διακριτό και εξαιρετικά προτεταμένο νημάτιο στο άκρο της βελόνας (δομημένης από υπομονάδες της πρωτεΐνης EscF) με εξωτερική διάμετρο 120 Å και εσωτερική 25 Å και το οποίο φέρεται πιθανόν ως προσαρμογή στην ανάγκη πρόσδεσης της EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Yip et al., 2005). Μια αναπαράσταση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου των νημάτων της EspA με ανάλυση 15 Å φανέρωσε μια πολυμορφικότητα στο μήκος του (3.6-5.8 Å), παρά το ότι διακρίνεται από μια καθορισμένη γωνία 5.6 υπομονάδων ανά στροφή (Wang et al., 2006).

Ο πόρος μεταφοράς πιθανόν συγκροτείται επί του συμπλόκου καλύμματος που λειτουργεί ως μήτρα, καθώς το πενταμερές σύμπλοκο καλύμματος του LcrV τουλάχιστον έχει φανεί ότι σχηματίζεται στο άκρο της βελόνας πριν από την επαφή με το κύτταρο-ξενιστή. Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο μια αναφορά δομικής μελέτης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου του πόρου μεταφοράς της EPEC (πρωτεΐνες EspB/EspD), η οποία φανέρωσε μια μη συμμετρική ετερο-ολιγομερή στοιχειομετρία 6-8 υπομονάδων (Ide et al., 2001).

Η πρώτη υποψήφια πρωτεΐνη πόρου στα φυτοπαθογόνα ήταν η HrpF από τη *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, με ομόλογα σε διάφορες άλλες ξανθομονάδες, ριζόβια, τη *R. solanacearum* και τη *P. syringae* pv. *tomato* (Buttner & Bonas 2002). Παρ'όλα αυτά, τα ομόλογα της HrpF στην *P. syringae* pv. *tomato* και στην *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* δεν είναι απαραίτητα για την παθογένεια κάτι που υποδεικνύει πως επιπρόσθετες πρωτεΐνες συμμετέχουν στη διαδικασία της μεταφοράς μέσω του πόρου (Buttner & Bonas 2006).



Εικ. 1.4. Πάνω. Σχηματική απεικόνιση ενός πλήρως ανεπτυγμένου συμπλόκου βελόνας της *Y. enterocolitica*. Περιλαμβάνονται διάφορες δομές συστατικών του συστήματος. Πηγή: Gazi et al. (2009). **Κάτω.** Απεικόνιση από μικροσκοπία διέλευσης της δομής του συμπλόκου LcrV στην κορυφή της βελόνας. Ένα κεντρικό κανάλι διασχίζει το εσωτερικό τόσο της βελόνας όσο και της δομής καλύμματος. Εικόνα τροποποιημένη από την πηγή: Cornelis (2006).

1.1.5 Η ΑΤΡάση του συστήματος και ο C-δακτύλιος

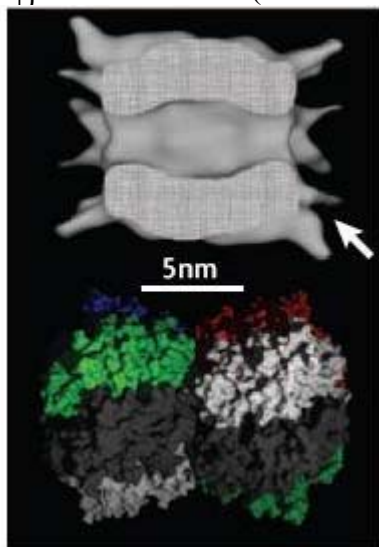
Η συντηρημένη και απαραίτητη για τη λειτουργία του συστήματος ΑΤΡάση είναι ένα συστατικό συνδεδεμένο στενά αλλά όχι ενσωματωμένο στην εσωτερική μεμβράνη και παίζει ρόλο στην παροχή ενέργειας κατά τη λειτουργία της μεταφοράς ενώ πιθανόν εμπλέκεται και στα πρώτα στάδια της επιλεκτικής έκκρισης (Moraes et al., 2008). Ο μηχανισμός με τον οποίο η ενέργεια από την υδρόλυση του ATP μετατρέπεται και καθοδηγεί την πρωτεϊνική έξοδο μέσω του T3SS παραμένει άγνωστος. Οι πρόσφατες δομές της ΑΤΡάσης της EPEC EscN (Zarivach et al., 2007) και της μαστιγιακής ΑΤΡάσης FliI (Imada et al., 2007) φανερώνουν την δομική ομοιότητά τους με τις F₁-ΑΤΡάσες παρά με τις AAA⁺-ΑΤΡάσες που έχει επίσης υποστηριχθεί (Akeda & Galan 2005). Οι μονομερείς δομές τους αποτελούνται από τρεις λειτουργικές επικράτειες: ένα αμινοτελικό β-βαρέλι έξι πτυχών που μπορεί να συμμετέχει στο σχηματισμό του εξαμερούς της ΑΤΡάσης, την επικράτεια της ΑΤΡάσης με την τυπική δομή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων α/β Rossmann-fold μαζί με ένα μοτίβο Walker A/B και τέλος μια καρβοξυτελική επικράτεια που εμφανίζει τη χαμηλότερη δομική ομολογία με τις F₁-ΑΤΡάσες. Η ποικιλόμορφη αυτή επικράτεια είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος καθώς μπορεί να αποτελεί το σημείο αγκυροβόλησης των συμπλόκων σαπερόνης-τελεστή. Σε σύγκριση με τις F₁-ΑΤΡάσες, οι έλικες στο καρβοξυτελικό άκρο της EscN είναι κομμένες ή λείπουν και μπορούν να συμπληρωθούν από έλικες των σαπερονών όπως της CesT ή της SycN (Zarivach et al., 2007). Η ΑΤΡάση EscN προβλέπεται να υφίσταται ως εξαμερές στο C-δακτύλιο δίπλα από τον κεντρικό πόρο του συστήματος (Zarivach et al., 2007)

Η ΑΤΡάση του μαστιγίου FliI παρουσία ATP σχηματίζει μια εξαμερή δακτυλιοειδή δομή με εξωτερική διάμετρο 100Å και εσωτερική κοιλότητα 25-30Å (Imada et al., 2007). Η ΑΤΡάση του T3SS του φυτοπαθογόνου *P. syringae* pv. phaseolicola HrcN σχηματίζει τόσο μονομερή όσο και ολιγομερή, με το δωδεκαμερές να επιδεικνύει την μεγαλύτερη ενεργότητα ΑΤΡάσης. Δομικές μελέτες ηλεκτρονικής κρυο-μικροσκοπίας ανάλυσης 16 Å (Εικ. 1.5) (Pozidis et al., 2003, Muller et al., 2006) υπέδειξαν την ύπαρξη ενός διπλού εξαμερούς το οποίο διαθέτει μια εσωτερική κοιλότητα διαμέτρου 20-38Å και εξωτερική διάμετρο 115±10Å, μεγέθη συγκρίσιμα με αυτά της FliI. Σε συμφωνία επίσης με το παράδειγμα της FliI, ο ολιγομερισμός της HrcN ευνοείται από την πρόσδεσή της στη μεμβράνη και η ολιγομερής μορφή επιδεικνύει περισσότερη ενεργότητα ΑΤΡάσης σε σχέση με το μονομερές *in vitro*. Η πρωτεΐνη YscL συσχετίζεται βάσει ομολογίας με την πρωτεΐνη FliH του μαστιγίου η οποία αποτελεί τον αρνητικό ρυθμιστή της ΑΤΡάσης FliI. Οι δυο πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο της μορφής (FliH)₂-FliI ενώ και οι δυο έχει φανεί ότι αλληλεπιδρούν με τις καρβοξυτελικές κυτταροπλασματικές επικράτειες των πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης FlhA, FlhB (Macnab 2004). Δεδομένου ότι οι ομόλογες στη *Yersinia* των FliN, FliH, YscQ και YscL αντίστοιχα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, πιθανολογείται ότι ο αρνητικός ρυθμιστής του συστήματος χρησιμεύει επιπροσθέτως στην πρόσδεση της ΑΤΡάσης στο κανάλι μεταφοράς (Gonzalez-Pedrajo et al., 2006).

Ομοίως με το μαστιγιακό σύστημα, οι ΑΤΡάσες του T3SS στη *Yersinia* και στη *Shigella* αποτελούν τμήματα πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων. Στη *Yersinia* η YscN συνδέεται με τις YscQ, YscL (Jackson et al., 2000), και ομοίως στη *Shigella* η ΑΤΡάση Spa47 αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες Spa33 και MxiK (ομόλογες των YscQ, YscK αντίστοιχως)(Jouihri et al., 2003). Η πρωτεΐνη YscQ παρουσιάζει ομοιότητα

στο καρβοξυτελικό της άκρο με τις πρωτεΐνες του C-δακτυλίου του μαστιγίου FliM και FliN. Ο δακτύλιος αυτός είναι μια διακριτή δομή του μαστιγίου με τη μορφή κούπας, η οποία είναι προσδεδεμένη στην κυτταροπλασματική πλευρά του MS-δακτυλίου. Ο καθορισμός της δομής του καρβοξυτελικού τμήματος της HrcQ_B, ομόλογο της YscQ στην *P. syringae* pv. phaseolicola, φανέρωσε ότι αντίθετα με τις FliM/FliN που εμφανίζουν μια στοιχειομετρία 37:111, η HrcQ_B σχηματίζει ένα διμερές διμερών (Fadouloglou et al., 2004). Παρόλα αυτά η δομή της HrcQ_B μοιάζει με αυτή της FliN. Η συνάθροιση αυτή υπομονάδων της HrcQ_B προβλέπεται να παράγει επιφάνειες πρόσδεσης της HrcQ_A με την παραγωγή τελικά μιας δομής που μοιάζει με τον C-δακτύλιο. Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας YscQ πιθανόν σχηματίζουν πολυμερισμένους δακτυλίους στη βάση της δομής της βελόνας σχηματίζοντας μια πλατφόρμα στρατολόγησης άλλων πρωτεϊνών (π.χ. της ATPάσης) καθώς έχει δειχθεί ότι στο μαστίγιο τουλάχιστον η FliN αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο FliH-FliI (Gonzalez-Pedrajo et al., 2006).

Οι V- και F- ATPάσες οι οποίες συνδέονται φυλογενετικά με τις ATPάσες του T3SS εμφανίζουν περιστροφικό τρόπο δράσης ενώ τόσο τα μαστιγιακά νημάτια όσο και οι βελόνες του T3SS εμφανίζουν ελικοειδή αρχιτεκτονική. Οι ενδείξεις αυτές πιθανώς υποδεικνύουν ότι τα υποστρώματα δεν ωθούνται προς το κανάλι έκκρισης παρά «βιδώνονται» μέσα και διαμέσου του. Με τον τρόπο αυτό ένα εσωτερικό σπείραμα λόγω της ελικοειδούς συναρμολόγησης θα μπορούσε να λειτουργεί ως άτρακτος καθοδήγησης των υποστρωμάτων προς την άκρη της βελόνας, παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα την οπισθοδρόμηση των υποστρωμάτων η οποία θα έφρασσε το κανάλι (Wilharm et al., 2007).



Εικ. 1.5. Τρισδιάστατη απεικόνιση ηλεκτρονικής κρυο-μικροσκοπίας της ATPάσης του T3SS HrcN από την *P. syringae* pv. phaseolicola. Απεικονίζονται δυο εξαμερικά σύμπλοκα συνδεδεμένα με το καρβοξυτελικό τους άκρο. Εικόνα τροποποιημένη από την πηγή: Cornelis (2006).

1.1.6 Αλλαγή ειδίκευσης υποστρώματος και έλεγχος μήκους της βελόνας – Μοντέλα – η βελόνα ως αισθητήρας και ρυθμιστής

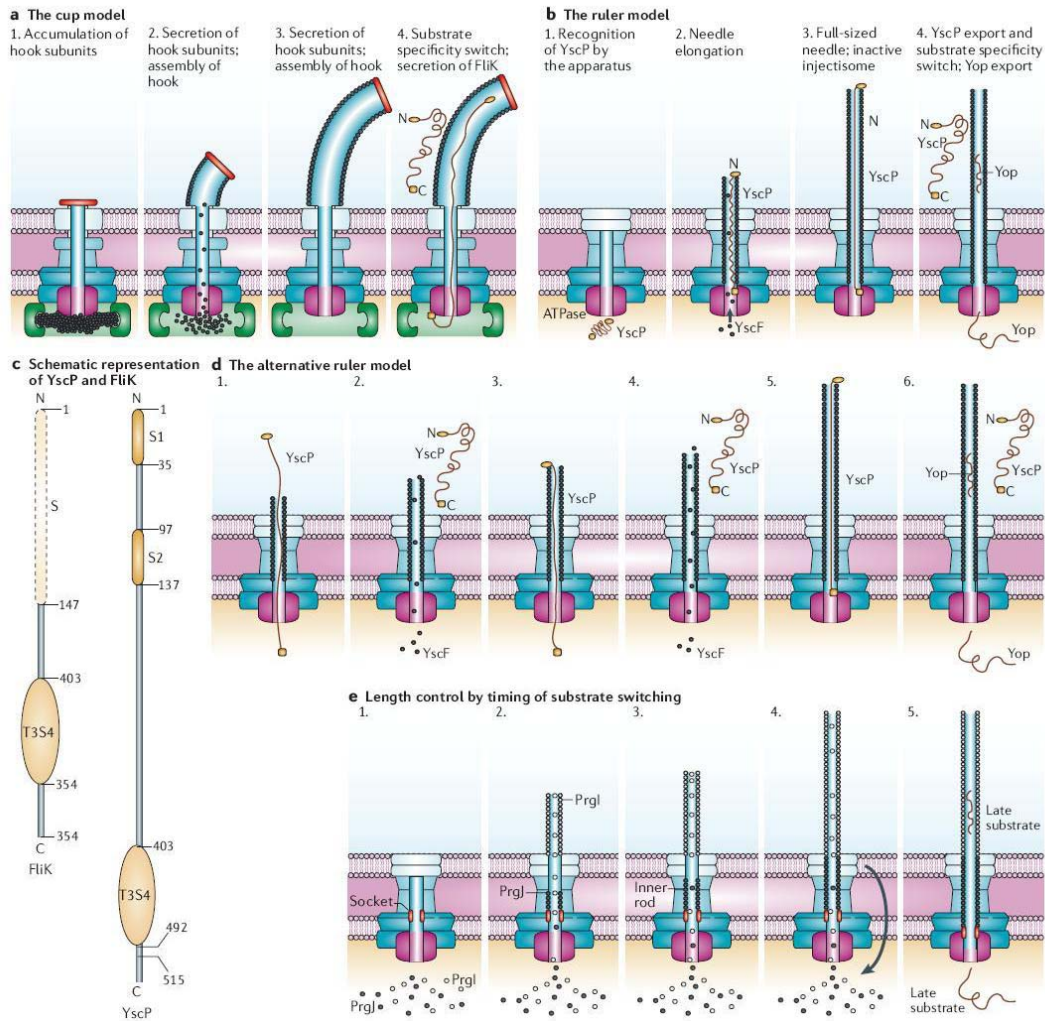
Ο καθορισμός του μήκους της βελόνας είναι μια ρυθμιζόμενη διαδικασία. Στη *Y. enterocolitica* το μήκος της βελόνας φτάνει στα 58±10 nm ενώ το άγκιστρο του μαστιγίου φτάνει επίσης περίπου στα 55 nm (Journet et al., 2003). Και στα δυο συστήματα η απώλεια μιας πρωτεΐνης, της FliK στο μαστίγιο και της YscP στη *Yersinia* οδηγεί σε ανεξέλεγκτη αύξηση του άγκιστρου και της βελόνας αντίστοιχα

(Tamano et al., 2000, Williams et al., 1996). Έχουν περιγραφεί διαφορετικοί μηχανισμοί ελέγχου του μήκους για το άγκιστρο και τη βελόνα του T3SS.

Το μοντέλο του «κυπέλου» υποθέτει ότι οι υπομονάδες του αγκίστρου συσσωρεύονται στην κοιλότητα του βασικού σωματίου και έτσι ο όγκος της κοιλότητας καθορίζει το μήκος του αγκίστρου. Όταν το κύπελλο αδειάσει η FliK αλληλεπιδρά με την κυτοπλασμική πλευρά του συστήματος μεταφοράς και αλλάζει την ειδίκευση μεταφοράς υποστρώματος από τις πρωτεΐνες του αγκίστρου στις πρωτεΐνες του νηματίου (Makishima et al., 2001). Το μοντέλο αυτό υπονοεί ότι το βασικό σωματίο της βελόνας διαθέτει C-δακτύλιο, κάτι που δεν έχει ακόμα καταδειχθεί.

Το μοντέλο του «χάρακα» έχει προταθεί για να ερμηνεύσει τον έλεγχο του μήκους της βελόνας στην *Y. enterocolitica*. Εσωτερικές ενθέσεις και ελλείψεις διατηρώντας το πλαίσιο ανάφωσης στο γονίδιο *yscP* οδηγούν σε μεγαλύτερες και μικρότερες βελόνες αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχει μια γραμμική σύνδεση μεταξύ του μεγέθους της πρωτεΐνης YscP και του μήκους της δομής της βελόνας, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως μοριακός χάρακας. Κατά το μοντέλο αυτό η μεταφορά των υπομονάδων της βελόνας επιτρέπεται μέχρι η δομή της βελόνας να φτάσει σε μήκος εκείνο της αδίπλωτης πρωτεΐνης YscP. Στο σημείο αυτό η πρωτεΐνη προκαλεί αλλαγή στην ειδίκευση υποστρώματος η οποία σταματά την εξαγωγή υπομονάδων βελόνας και η YscP πια εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο απομακρυνόμενη από το βακτηριακό κύτταρο (Journet et al., 2003).

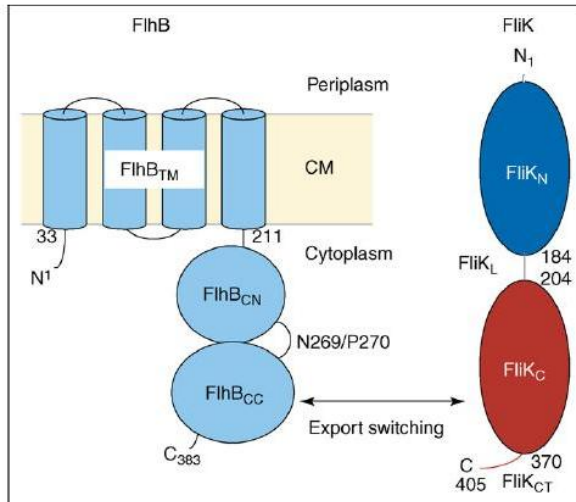
Οι Marlovits et al. (2004) τέλος, πρότειναν ένα εναλλακτικό μηχανισμό για το πώς η ειδίκευση υποστρώματος αλλάζει από τις υπομονάδες της εσωτερικής ράβδου και της βελόνας στα υποστρώματα που εκκρίνονται αργότερα. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η ολοκλήρωση της εσωτερικής ράβδου (inner rod) καθορίζει τη στιγμή της αλλαγής ειδίκευσης υποστρώματος και άρα και το μήκος της βελόνας. Συγκεκριμένα, με την ολοκλήρωση της εσωτερικής ράβδου και τη σταθερή αγκυροβόληση της βελόνας πραγματοποιούνται αλλαγές διαμόρφωσης στην κυτταροπλασματική πλευρά της βάσης, καταλήγοντας στον επαναπρογραμματισμό της συσκευής και στην έναρξη της έκκρισης των πρωτεϊνών-τελεστών. Όλα τα παραπάνω μοντέλα απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 1.6.



Εικ. 1.6. Τα τέσσερα διατυπωμένα μοντέλα του μηχανισμού αλλαγής ειδικεύσης υποστρώματος. **a.** το μόντελο του κυπέλου. **b.** το μοντέλο του χάρακα. **c.** σχηματική αναπαράσταση των επικρατειών επί του «μοριακού χάρακα» των πρωτεϊνών YscP και FliK. Υποδεικνύονται οι περιοχές του αμινοτελικού σήματος έκκρισης και του καρβοξυτελικού μοριακού διακόπτη αλλαγής ειδικεύσης. **d.** το εναλλακτικό μοντέλο του χάρακα. **e.** το μοντέλο της εσωτερικής ράβδου. Πηγή: Cornelis, 2006

Ειδικά για την περίπτωση του μαστιγίου και την αλλαγή ειδικεύσης υποστρώματος έχει ανατεθεί ένας βασικός ρόλος στην πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης FliH. Η πρωτεόλυση της FliH είναι αυτοκαταλύομενη (Ferris et al., 2005) και σε συνδυασμό με την πρόσφατη περιγραφή μιας νέας οικογένειας πρωτεϊνών που απαντάται σε κάποια είδη, οι οποίες μοιάζουν με την υπο-επικράτεια FliH_{CC} και καλούνται πρωτεΐνες FliH_X, υποδεικνύει έναν φυσιολογικό ρόλο για το θραύσμα που παράγεται με την αυτοπρωτεόλυση. Επιπροσθέτως, η παρουσία των πρωτεϊνών FliH_X μπορεί να σημαίνει ότι η επίδραση της συγκέντρωσης αυτής της επικράτειας μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη διαδικασία ελέγχου της αλλαγής υποστρώματος (Pallen et al., 2005). Έχει προταθεί ότι το καρβοξυτελικό άκρο της FliH διακρίνεται από δύο καταστάσεις ειδικεύσης υποστρώματος και μια αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης διαμεσολαβούμενης από την αυτο-πρωτεόλυση και την

αλληλεπίδραση μεταξύ των θραυσμάτων FlhB_{CN} και FlhB_{CC} ρυθμίζει τη διαδικασία της αλλαγής ειδικεύσης (Εικ. 1.7). Η FliK έχει προταθεί ότι ξεκινά την αλλαγή αυτή (Minamino & Macnab 2000). Στο ερώτημα γιατί η FlhB υποβάλλεται σε αυτο-πρωτεόλυση έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία τα παρακάτω: α) είναι το γεγονός αλλαγής ειδικεύσης β) είναι μηχανισμός συγχρονισμού και γ) είναι ο τρόπος με τον οποίο η FlhB αποκτά ευκαμψία στερεοδιαμόρφωσης ή/και λειτουργικότητας. Οι πιθανότητες αυτές δεν είναι αμοιβαία αποκλειόμενες (Ferris & Minamino 2006).



Εικ. 1.7. Απεικόνιση των δύο πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αλλαγή ειδικεύσης υποστρώματος στο μαστίγιο, FlhB και FliK. Υποδεικνύεται η τοπολογία της μεμβρανικής FlhB και η μεγάλη κυτταροπλασματική της επικράτεια, αποτελούμενη από τα δυο αλληλεπιδρώντα πρωτεολυτικά της θραύσματα, FlhB_{CN} & FlhB_{CC}. Πηγή: Ferris & Minamino (2006).

Για ένα δεδομένο βακτηριακό στέλεχος το μήκος της βελόνας είναι σταθερό με μια ποικιλομορφία της τάξεως του 20%. Ωστόσο το μήκος αυτό ποικίλει από το ένα βακτηριακό είδος στο άλλο, ακόμα και σε διαφορετικούς βιοτύπους του ίδιου είδους. Για παράδειγμα, στη *S. typhimurium* το μήκος της βελόνας είναι 80 nm για την πρώτη νησίδα παθογένειας (SPI-1) και 150 nm για τη δεύτερη (SPI-2). Για τη *S. flexneri* είναι 45 nm και για τα είδη *Yersinia* φάνηκε ότι κυμαίνεται στα 58 nm για τη *Y. enterocolitica* και 45 nm για τη *Y. pestis*. Η διαφοροποίηση του ελέγχου του μήκους της βελόνας υποδεικνύει πόσο κρίσιμη παράμετρο αποτελεί για τη λειτουργία της. Φαίνεται πως το μήκος της βελόνας έχει διαφοροποιηθεί εξελικτικά σε σχέση με άλλες δομές στην επιφάνεια του κυττάρου του ξενιστή. Όταν η βελόνα είναι πολύ κοντή για να γεφυρώσει την απόσταση μεταξύ των δυο κυτταροπλασμάτων, οι πρωτεΐνες-τελεστές δεν χάνονται στον ενδιάμεσο χώρο. Αντ' αυτού, δεν εκκρίνονται καθόλου, κι αυτό δείχνει ότι η βελόνα αυτή καθ' αυτή λειτουργεί ως αισθητήρας για την έναρξη της έκκρισης. Έχει προαναφερθεί πως έχουν εντοπιστεί διακριτές μεταλλαγές στην υπομονάδα της βελόνας οι οποίες οδηγούν σε συστατική έκκριση. Είναι λογική λοιπόν η υπόθεση ότι οι μεταλλαγές αυτές οδηγούν στην συναρμολόγηση βελονών των οποίων η διαμόρφωση μοιάζει με την διεγερμένη κατάσταση (Galan & Wolf-Watz 2006). Καθώς τα μονομερή της βελόνας συναρμολογούνται με ελικοειδή τρόπο και δεν έχουν βρεθεί σοβαρές αλλαγές στο ελικοειδές πακετάρισμα των παραπάνω μεταλλαγμάτων, έχει προταθεί ότι η αίσθηση μέσω της βελόνας (πιθανόν της λιπιδικής στιβάδας του ζωικού κυττάρου-ξενιστή ή του κυτταρικού τοιχώματος του φυτικού ξενιστή) μπορεί να πραγματοποιείται μέσω ευαίσθητων αλλαγών στο πακετάρισμα χωρίς ουσιαστικές αλλαγές στις ελικοειδείς παραμέτρους με το σήμα να καταλήγει στη βάση της βελόνας και τέλος ενδοκυττάρια όπου ενεργοποιεί ή αποκαταστέλλει την έκκριση (Deane et al., 2006). Μια υποψήφια πλατφόρμα ενδοκυττάριας μετάδοσης του σήματος ενεργοποίησης από τη βελόνα

είναι το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που στη *Yersinia* αποτελείται από τις πρωτεΐνες YopN, SycN, YscB, TyeA. Το σύμπλοκο αυτό είναι απαραίτητο για την παρεμπόδιση της έκκρισης των τελεστών απουσία των σημάτων ενεργοποίησης (Day & Plano 1998, Schubot et al., 2005). Απουσία του συμπλόκου, η έκκριση των τελεστών είναι συστατική και οι τελευταίοι χάνονται στον εξωκυττάριο χώρο χωρίς να μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Ομόλογα αυτών των πρωτεϊνών υπάρχουν και σε άλλα συστήματα έκκρισης τύπου III κάτι που υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο αυτό είναι συντηρημένο.

Στο φυτοπαθογόνο *R. solanacearum* η ενεργοποίηση των γονιδίων του T3SS πραγματοποιείται μέσω της πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης PrhA που δρα ως αισθητήρας εξαρτώμενος από επαφή για τη λήψη σήματος από το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (Aldon et al., 2000). Για τα άλλα φυτοπαθογόνα το σήμα ενεργοποίησης της έκκρισης παραμένει άγνωστο. Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι τα ρυθμιστικά γονίδια hrpR/hrpS καταστέλλονται μεταγραφικά σε μεταλλάγματα που δεν παράγουν την πιλίνη HrpA πράγμα που υποδηλώνει ότι ο πύλος εμπλέκεται στην αντίληψη και τη μετάδοση του εξωτερικού σήματος (Wei et al., 2000).

1.1.7 Οι σαπερόνες του T3SS

Η συναρμολόγηση και λειτουργία του T3SS απαιτεί μια σειρά από μικρές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που ονομάζονται σαπερόνες του T3SS. Διακρίνονται σε τρεις κυρίως διαφορετικές κατηγορίες που προσδένουν α) μόρια-τελεστές (σαπερόνες τάξης I) β) τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν τον πόρο μεταφοράς (σαπερόνες τάξης II) γ) τις υπομονάδες που πολυμερίζονται εξωκυττάρια (σαπερόνες τάξης III). Οι σαπερόνες ποτέ δεν εκκρίνονται και πιθανότατα ανακυκλώνονται μέσα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα.

Σαπερόνες τάξης I. Κάποιες πρωτεΐνες-τελεστές διαθέτουν μια ειδική σαπερόνη ενώ για πολλούς τελεστές δεν έχουν ανακαλυφθεί σαπερόνες. Υπάρχει διαθέσιμος ένας μεγάλος όγκος βιβλιογραφίας που περιγράφει τη δομή αυτών των μορίων και τον τρόπο αλληλεπίδρασης με τα υποστρώματά τους. Συχνά τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις σαπερόνες αυτές βρίσκονται ακριβώς δίπλα από τα γονίδια των υποστρωμάτων τους. Είναι μικρές, όξινες (pI 4.0-5.0) διμερείς πρωτεΐνες που προσδένουν την επικράτεια που καλείται CBD (chaperone-binding domain) που εδράζεται στα πρώτα 100 αμινοτελικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών-τελεστών, καθοδικά του πιθανού αμινοτελικού σήματος έκκρισης (Cornelis 2006). Οι σαπερόνες τάξης I δεν διαθέτουν σημαντική ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ τους αλλά παρουσιάζουν συντηρημένη τρισδιάστατη δομή (Birtalan & Ghosh, 2001). Ακολουθούν παρόμοιο τρόπο αναδίπλωσης με δευτεροταγή δομή πέντε β-κλώνων και τριών α-ελίκων. Η επικράτεια CBD τυλίγεται γύρω από το ομοδιμερές σαπερόνης σε μια εκτεταμένη πεταλοειδή διαμόρφωση διατηρώντας τη δευτεροταγή δομή της, επί της εξίσου συντηρημένης υδρόφοβης επιφάνειας που σχηματίζεται επί του ομοδιμερούς σαπερόνης (Birtalan et al., 2002). Η ομάδα του Parsot (2003) έκανε το διαχωρισμό εντός της τάξης I των σαπερονών δυο υποκατηγοριών, των τάξεων IA & IB. Οι σαπερόνες της πρώτης κατηγορίας προσδένουν αυστηρά ένα είδος τελεστή ενώ οι της τάξης IB άνω του ενός. Όντως, η διαλεύκανση της δομής της σαπερόνης InvB σε σύμπλοκο με το CBD του υποστρώματός της SipA φανέρωσε ότι το CBD είναι προσδεμένο γύρω από τη μια από τις δυο υπομονάδες σαπερόνης οι οποίες βρίσκονται σε μικρή κλίση μεταξύ τους, παράγοντας μια διαφοροποιημένη δομή σε

σχέση με αυτή των κλασικών ΙΑ σε σύμπλοκο με το υπόστρωμά τους (Lilic et al., 2006).

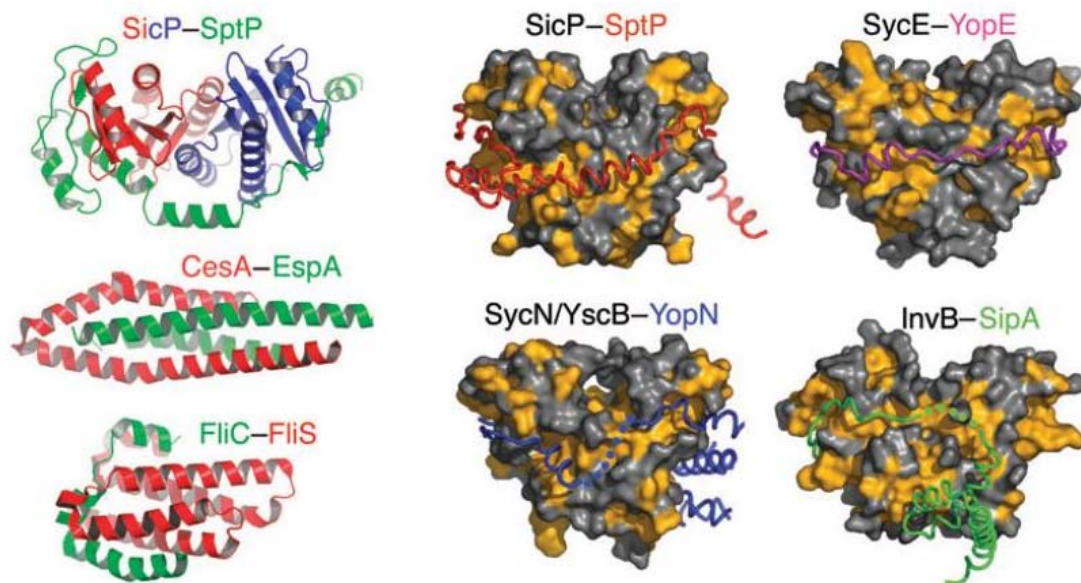
Η λειτουργία των σαπερονών τάξης I παραμένει θέμα αντιπαράθεσης στην ογκώδη βιβλιογραφία. Μια καλή ανασκόπηση των διαφόρων ευρημάτων και υποθέσεων ως προς τη λειτουργία των σαπερονών τάξης I παρουσιάζει ο Cornelis (2006). Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι σαπερόνες πιθανόν μέσω τις συντηρημένης τρισδιάστατης δομής τους δρουν ως σήμα στόχευσης των τελεστών οδηγώντας τους στην εκκριτική μηχανή ή παίζουν κάποιο ρόλο στην εγκαθίδρυση μιας μορφής ιεραρχίας έκκρισης. Άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι απαιτούνται για την αποθήκευση των τελεστών σε μια μορφή έτοιμη για έκκριση πριν από την ενεργοποίησή της. Αυτό γίνεται εύκολα κατανοητό καθώς η πρώτη ραγδαία φάση μεταφοράς τελεστών μέσα στον ξενιστή απαιτεί την παρουσία μιας προσυντεθειμένης δεξαμενής τους που αποθηκεύεται στο κυτταρόπλασμα αναμένοντας το σήμα έκκρισης ώστε να μεταφερθούν ακαριαία και να προλάβουν την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Τελευταία έχει φανεί τουλάχιστον για τους τελεστές YopO και YopE ότι το CBD τους συμπίπτει με τις θέσεις εντοπισμού τους στη μεμβράνη του ξενιστή. Έτσι, η πρόσδεση της σαπερόνης σε αυτές τις επικράτειες τις καλύπτει και παρεμποδίζει την συσσωμάτωση των τελεστών στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Η πρόσδεση της σαπερόνης επί του τελεστή μπορεί να εκθέτει το σήμα έκκρισής του που εντοπίζεται ακριβώς ανοδικά του CBD. Φάνηκε πρώτη φορά για τις σαπερόνες CesT & SigE (*Salmonella*) πως η πρόσδεσή τους στα μόρια των τελεστών δεν τους αποδιπλώνει συνολικά και διατηρεί την ενζυμική ενεργότητά τους αντίστοιχα. Ομοίως, από την συγκρυσταλλωμένη δομή της YopN προσδεδεμένης επί του ετεροδιμερούς σαπερόνης της SycN/YscB, πέραν του εκτεταμένου CBD της το υπόλοιπο τμήμα της είναι διπλωμένο. Η πρόσδεση της σαπερόνης επί του υποστρώματός της άρα δεν το αποδιπλώνει συνολικά αλλά είναι πιθανόν να το στοχεύει στην ΑΤΡάση του συστήματος η οποία θα το αποδιπλώσει με την κατανάλωση ενέργειας και θα το προωθήσει στην εκτεταμένη του πλέον μορφή στο κανάλι έκκρισης, παράλληλα απελευθερώνοντας και πιθανόν ανακυκλώνοντας το μόριο της σαπερόνης. Παράδειγμα σαπερόνης πιθανόν τάξης I (όπως φαίνεται από ανάλυση αναγνώρισης αναδίπλωσης) του T3SS από το φυτοπαθογόνο *P. syringae* με επιπρόσθετο ρυθμιστικό ρόλο είναι αυτό της HrpG, η οποία προσδένει και καταστέλλει έναν αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος, την πρωτεΐνη HrpV (Wei et al., 2005). Το υπόστρωμα ή η κατηγορία στην οποία ανήκει η σαπερόνη αυτή δεν έχουν ανακαλυφθεί ακόμα. Έχει προταθεί ότι η HrpG καταστέλλει την αρνητική ρύθμιση της HrpV μέσω πρόσδεσης, μετά την απελευθέρωση μέσω έκκρισης του υποθετικού υποστρώματός της (Buttner & Bonas 2006).

Σαπερόνες τάξης II. Οι υδρόφοβες πρωτεΐνες του πόρου μεταφοράς είναι τοξικές για το βακτηριακό κύτταρο και οι σαπερόνες αυτής της τάξης εξουδετερώνουν αυτήν την τοξικότητα (Neyt & Cornelis 1999). Οι σαπερόνες τάξης II διακρίνονται από την ύπαρξη τετρατρικοπεπτιδικών επαναλήψεων (TPRs, Pallen et al., 2003) και η αναδίπλωσή τους προβλέπεται να είναι καθ' όλο το μόριο α-ελικοειδής. Τα TPRs είναι ατελείς επαναλήψεις τυπικά 34 καταλοίπων και εντοπίζονται σε πρωτεΐνες θηλαστικών όπως είναι ο μιτοχονδριακός υποδοχέας Tom70 όπου προσδένονται οι κυτταροπλασματικές σαπερόνες Hsp90 και Hsp70. Είναι επίσης παρούσες σε ρυθμιστές της έκκρισης τύπου III όπως στις πρωτεΐνες HilA της *S. enterica* και HrpB της *R. Solanacearum*. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των σαπερονών αυτών με τα υποστρώματά τους αλλά ως γενικός κανόνας διαφαίνεται η χρήση ενός μορίου σαπερόνης και για τα δύο μόρια του πόρου για κάθε σύστημα

(παραδείγματα η σαπερόνη SycD που προσδένει τις πρωτεΐνες του πόρου YopB & YopD στη *Yersinia*, η IrgC που προσδένει τις IpaB & IpaC στη *Shigella* και η σαπερόνη SicA που προσδένει τα μόρια του πόρου της *S. typhimurium* SPI-1 SipB & SipC). Είναι ενδιαφέρον ότι η SicA παρουσιάζει εκτός των άλλων και σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση των πρωτεϊνών-τελεστών. Αυτό είναι λογικό καθώς η παρουσία ελεύθερων μορίων σαπερόνης των μορίων του πόρου αποτελεί σήμα για το παθογόνο βακτήριο ότι υπάρχει πλέον λειτουργικός πόρος μεταφοράς και άρα το σύστημα έχει καταστεί λειτουργικό (Page & Parsot 2002).

Σαπερόνες τάξης III. Τα εξωκυττάρια ελικοειδή συστατικά των δομών όπως είναι η βελόνα πρέπει να παρεμποδίζονται να πολυμεριστούν πρόωρα εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση των σαπερονών τάξης III οι οποίες προσδένονται στο καρβοξυτελικό άκρο των υπομονάδων και καλύπτουν τις θέσεις πολυμερισμού τους. Παραδείγματα τέτοιων σαπερονών είναι η μαστιγιακή σαπερόνη FlgN η οποία προσδένει τα μόρια FlgK και FlgL (Aldridge et al., 2003) που δομούν το άγκιστρο, η μαστιγιακή σαπερόνη FliT που προσδένει την FliD που δομεί το κάλυμμα του νηματίου (Fraser et al., 1999) και η σαπερόνη FliS που προσδένει τη FliC (flagellin)(Aunray et al., 2001). Στην ίδια κατηγορία κατατάσσονται και τα ετεροδιμερή σαπερόνης που προσδένουν τις θέσεις πολυμερισμού των υπομονάδων βελόνας στη *Yersinia* και στη *P. aeruginosa*, παγιδεύοντάς τες στην μονομερή τους κατάσταση σε μια αναλογία μορίων 1:1:1 και είναι αντίστοιχα οι σαπερόνες YscE και YscG που προσδένουν την YscF (Sun et al., 2008) και PscE και PscG που προσδένουν την PscF (Quinaud et al., 2005). Αλλού στη βιβλιογραφία αυτή η τελευταία κατηγορία σαπερονών αναφέρεται ως τάξης IV καθώς δε φαίνεται να μοιάζει δομικά με κάποιες από τις παραπάνω περιγεγραμμένες κατηγορίες σαπερονών και για τον ίδιο λόγο η σαπερόνη CseA που προσδένει την υπομονάδα της EspA στην EPEC αναφέρεται ως τάξης V (Wilharm et al., 2007).

Στοιχεία ότι η ATPάση του T3SS λειτουργεί ως ενεργειακό μέσο αποδίπλωσης των υποστρωμάτων έκκρισης προκύπτουν ευθέως πειραματικά. Η ομάδα των Akeda & Galan (2005) έδειξε ότι η προσθήκη *in vitro* της ATPάσης του T3SS από τη *Salmonella* στο απομονωμένο σύμπλοκο σαπερόνης-τελεστή SicP/SptP οδηγεί σε απομάκρυνση της σαπερόνης από τον τελεστή κατά τρόπο εξαρτώμενο από ATP. Παράλληλα το μόριο του τελεστή αποδιπλώθηκε, καθώς φάνηκε ότι έγινε ευαίσθητο στη δράση πρωτεασών.



Εικ. 1.8. Αριστερά, απεικονίσεις κορδέλας των δομών τριών διαφορετικών τάξεων σαπερονών του T3SS σε σύμπλοκο με τα υποστρώματά τους. **Κέντρο και Δεξιά,** απεικονίσεις επιφάνειας της αλληλεπίδρασης των CBD των υποστρωμάτων έκκρισης με το διμερές σαπερόνης. Πηγή: Stebbins (2005).

1.1.8 Οι λειτουργίες των μορίων τελεστών – η φύση του αμινοτελικού σήματος έκκρισης

Το οπλοστάσιο των τελεστών που μεταφέρεται στα κύτταρα του ξενιστή ποικίλει στα διάφορα παθογόνα βακτήρια και έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να ταιριάζει με τις απαιτήσεις του τρόπου ζωής του κάθε παθογόνου μέσα στον κάθε ξενιστή (Ghosh 2004). Η δράση των τελεστών επιτρέπει στα ζωοπαθογόνα βακτήρια να επιτίθενται σε μη φαγοκυτικά κύτταρα ή να αναστέλλουν τη φαγοκύτωση από φαγοκύτταρα, να καταστέλλουν προ-ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή, να επάγουν την απόπτωση, να εμποδίζουν την αυτοφαγία ή να τροποποιούν την ενδοκυττάρια κυκλοφορία (Cornelis 2006). Οι διάφορες βιοχημικές δραστηριότητες των τελεστών περιλαμβάνουν δράσεις πρωτεασών, κινασών, φωσφατασών πρωτεϊνών και λιπιδίων, παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων και πρωτεΐνες ενεργοποίησης GTPασών ή πρωτεϊνών Rho, παράγοντες πολυμερισμού και πακεταρίσματος ακτίνης, πρωτεΐνες πρόσδεσης τουμπουλίνης (Stebbins 2005) κλπ.

Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv tomato DC3000 διαθέτει 29 διαφορετικά μόρια τελεστές, οι οποίοι πιθανόν δρουν με ένα συνολικό-συνεργατικό τρόπο επί των μονοπατιών του ξενιστή προς όφελος του παθογόνου (Buttner & Bonas 2006). Για κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές έχουν καταδειχθεί ενζυμικές ενεργότητες όπως αυτή της πρωτεάσης κυστεϊνών ή της φωσφατάσης. Για τις περισσότερες όμως περιπτώσεις η δράση των τελεστών των φυτοπαθογόνων βακτηρίων είναι άγνωστη. Καθώς η μεταλλαξιγένεση (απαλοιφή) τελεστών δεν επιδρά σημαντικά στη βακτηριακή παθογένεια, οι μοριακοί μηχανισμοί που την καθορίζουν είναι δύσκολο να καθοριστούν. Παρά τον θεωρητικά βασικό ρόλο τους στην μολυσματικότητα, τα

μόρια των τελεστών αρχικά αναγνωρίστηκαν ως προϊόντα από τα γονίδια αμολυσματικότητας (*avr*, *avirulence genes*), καθώς προάγουν ειδικές αποκρίσεις άμυνας σε φυτά που καθορίζονται από τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας (*R*, *resistance genes*). Η ανθεκτικότητα του φυτού που διαμεσολαμβάνεται από τους παράγοντες *Avr* συνδέεται συχνά με την αντίδραση υπερευαισθησίας (*HR*, *hypersensitive response*), που είναι ένας ραγδαίος προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στη θέση μόλυνσης που περιορίζει την αύξηση και εξάπλωση του παθογόνου (Dangl & Jones 2001).

Το αμινοτελικό άκρο των τελεστών (κατάλοιπα 1-50) φέρει το σήμα έκκρισης και μεταφοράς τους. Η περιοχή που εντοπίζεται μεταξύ των καταλοίπων 50-150 περίπου αποτελεί το CBD για εκείνα τα μόρια που έχουν ειδική σαπερόνη, ενώ το υπόλοιπο μόριο φέρει τις επικράτειες δράσης του τελεστή (Blocker et al., 2006). Αν και οι τελεστές του T3SS δεν φέρουν κλασικά πεπτίδια-σήματα έκκρισης, έχει φανεί ότι τουλάχιστον τα 15 αμινοτελικά κατάλοιπά τους είναι απαραίτητα για την έκκριση (Tampakaki et al., 2004). Η φύση του σήματος παραμένει ακόμα θέμα αμφιλεγόμενο. Συστηματική μεταλλαξιγένεση των αμινοτελικών κωδικονίων για διάφορα μόρια τελεστών φυτικών και ζωικών παθογόνων δεν επέδρασε στην ικανότητα έκκρισής τους και τότε διατυπώθηκε η υπόθεση ότι πιθανόν το σήμα να εδράζεται στο mRNA του τελεστή και όχι στην πρωτεΐνη. Τελευταία έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η παρουσία διαταραγμένων και εύκαμπτων περιοχών στο αμινοτελικό άκρο των τελεστών μπορεί να επαρκεί ως σήμα έκκρισης, ενώ η πρόσδεση ειδικής σαπερόνης προσφέρει την απαραίτητη ειδίκευση έκκρισης (Gazi et al., 2009). Έχουν αναγνωριστεί κάποια κοινά χαρακτηριστικά στο αμινοτελικό άκρο τελεστών από φυτικά και ζωικά παθογόνα μερικά από τα οποία είναι η παρουσία πέντε αμινοτελικών υδρόφιλων καταλοίπων, η απουσία όξινων καταλοίπων στις 12 πρώτες θέσεις όπως και η αμφιπαθικότητα και η συχνή εμφάνιση καταλοίπων σερίνης και γλουταμίνης στις πρώτες 50 θέσεις του αμινοτελικού άκρου (Buttner & Bonas 2006). Όποιο κι αν είναι το σήμα έκκρισης λειτουργεί οικουμενικά, καθώς, σε αρκετές περιπτώσεις, τελεστές από ένα σύστημα T3SS μπορούν να εκκριθούν από το T3SS άλλου παθογόνου ή ακόμα και από το μαστίγιο.

1.1.9 Οι τελεστές του φυτοπαθογόνου μοντέλου *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

Το φυτοπαθογόνο *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 αποτελεί σημαντικό μοντέλο έρευνας της παθογένειας, στην οποία κεντρικό ρόλο διαδραματίζει το TTSS και οι πρωτεΐνες-τελεστές (type III effectors) που εκκρίνονται μέσω αυτού. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια γενικά, το T3SS κωδικοποιείται από τη γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity/hypersensitive response and conserved*, Bogdanove et al. 1996), ενώ οι πρωτεΐνες-τελεστές τύπου III κωδικοποιούνται από γονίδια με διάφορες ονομασίες (e.g. *avr*, *hop*, *xop*, *pop*) (Lindeberg et al. 2005). Σύμφωνα με συγκλίνουσες απόψεις της τελευταίας κυρίως πενταετίας, η αλληλεπίδραση παθογόνου-φυτού σηματοδοτεί την ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας σε δύο επίπεδα: Κατά την είσοδό της στους μεσοκυττάριους χώρους των φύλλων μέσω των στοματίων ή πληγών, φυτοπαθογόνα βακτήρια προδίδουν την παρουσία τους μέσω μιας σειράς μοριακών μοτίβων συσχετιζόμενων με παθογόνα/μικρόβια (*pathogen/microbe-associated molecular patterns*, PAMPs ή MAMPs), όπως είναι η FliC (*flagellin*), η στοιβάδα του λιποπολυσακχαρίτη, η πεπτιδογλυκάνη και ο παράγοντας επιμήκυνσης Tu (*elongation factor Tu*). Τα μοτίβα αυτά αναγνωρίζονται από μια σειρά υποδοχέων-κινασών (*receptor kinases*) που

λειτουργούν ως υποδοχείς αναγνώρισης μικροβιακών μοριακών προτύπων (PRRs (pattern recognition receptors) και στη συνέχεια σηματοδοτούν την ενεργοποίηση της διαμεσολαβούμενης από τις PAMPs ανθεκτικότητας (PTI, PAMP-triggered immunity). Τα παθογόνα αντιμετωπίζουν το μηχανισμό αυτό άμυνας με την ένεση μέσω T3SS των πρωτεϊνών τελεστών που καταστέλλουν την ανθεκτικότητα PTI (Ma & Guttman 2008). Τα φυτά με τη σειρά τους μπορούν να αναγνωρίσουν την παρουσία ή δράση ενός ή περισσότερων πρωτεϊνών-τελεστών μέσω των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R. Πολλές πρωτεΐνες R ανιχνεύουν τροποποιήσεις των στόχων του ξενιστή που πραγματοποιούνται από τους εξειδικευμένους τελεστές και όχι αυτή καθαυτή την παρουσία τους και δρουν ως φρουροί ή ανιχνευτές σημάτων από πρωτεΐνες-κλειδιά του ξενιστή που μαρτυρούν εισβολή παθογόνου. Η επακόλουθη ανθεκτικότητα που υποκινείται μέσω τελεστών, ETI (effector-triggered immunity) τυπικά διαχωρίζεται από την PTI από την εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Τα φυτά χρησιμοποιούν εκατοντάδες PRR και R πρωτεΐνες σε αυτή τη δυο-φάσεων άμυνα εναντίον εκατομμυρίων βακτηρίων που τους επιτίθενται μέσω μορίων τελεστών παθογένειας (Ma & Guttman 2008, Cunnac et al., 2009).

Η πλήρης περιεκτικότητα του γενώματος της *P. syringae* pv. tomato DC3000 σε υποστρώματα έκκρισης/τελεστές τύπου III έχει αναδειχθεί από το συνδυασμό βιοπληροφορικής (ομολογίες, λειτουργικά μοτίβα), γενετικής (μεταλλαξιγένεση, κλωνοποίηση/μεταφορά από ένα στέλεχος σε άλλα), βιοχημικής/λειτουργικής ανάλυσης (έκκριση εντός ή εκτός του φυτικού κυττάρου), και άλλων μεθόδων γονιδιωματικής ανάλυσης. Χαρακτηριστικά των εν λόγω γονιδίων είναι τα εξής:

α) όλα τα γνωστά ενεργά γονίδια τελεστών φέρουν στον υποκινητή τους το χαρακτηριστικό μοτίβο «hrp box» και ελέγχονται μεταγραφικά από τον εναλλακτικό παράγοντα σ HrpL (Lan et al., 2006).

β) οι αμινοτελικές περιοχές των μορίων τελεστών που κωδικοποιούν παρουσιάζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως υπεραντιπροσώπευση ή αποφυγή χαρακτηριστικών καταλοίπων, και τα γονίδια κάποιων από αυτούς εδράζονται δίπλα στα γονίδια των αντίστοιχων ειδικών σαπερονών τους, όπως έχει παρατηρηθεί και στα ζωικά παθογόνα (Schechter et al., 2006).

γ) τα γονίδια των τελεστών εδράζονται σε περιοχές που φέρουν «μοριακά σημάδια» οριζόντιας μεταφοράς, ορισμένα από τα οποία χαρτογραφούνται εντός της νησίδας hrp/hrc, άλλα ένθεν και ένθεν αυτής και άλλα είναι διάσπαρτα στο βακτηριακό γονιδίωμα (Lindeberg et al., 2008).

δ) πλήρους μήκους μόρια τελεστών σε σύντηξη στο καρβοξυτελικό τους άκρο με πρωτεΐνες-μάρτυρες μεταφοράς στον ξενιστή όπως η Cya (adenyl cyclase) ή η πρωτεΐνη AvrRpt2 (χωρίς το δικό της σινιάλο στόχευσης) μεταφέρονται μέσα στα φυτικά κύτταρα (Schechter et al., 2004).

Αρκετοί από τους τελεστές που πληρούν κάποια ή όλα από τα παραπάνω κριτήρια δεν είναι λειτουργικοί αλλά μάλλον πρόκειται για ψευδογονίδια με ενθέσεις μεταθετών στοιχείων ή άλλες μεταλλαγές που έχουν διακόψει τις αλληλουχίες του υποκινητή ή τις κωδικές τους αλληλουχίες. Τα γονίδια για περισσότερους από τους μισούς τελεστές εντοπίζονται σε συναθροίσεις, μερικές εκ των οποίων, όπως ο συντηρημένος τύπος τελεστών (CEL, conserved effector locus) περιέχουν «οικουμενικά» και αρχαία γονίδια τελεστών ενώ άλλες περιέχουν υπερποικιλότητες γονιδιακές περιοχές (Cunnac et al., 2009).

Τα ρεπερτόρια των τελεστών των φυτοπαθογόνων βακτηρίων θεωρούνται ως ο κύριος παράγοντας καθορισμού του φάσματος ξενιστών κάθε παθογόνου. Αυτός ο ρόλος θα μπορούσε να αποδοθεί είτε σε εξειδικευμένη προς τον ξενιστή δράση

παθογένειας (host-specific virulence activity) ή στην ικανότητα των φυτών να αντιλαμβάνονται τους τελεστές και να ενεργοποιούν τους αμυντικούς τους μηχανισμούς (avirulence activity). Όντως, «ασύμβατοι ξενιστές» εκδηλώνουν υπερευαίσθητη νέκρωση σε περισσότερους τελεστές από ό, τι συμβατοί (Wroblewski et al 2009). Φαίνεται ότι η παθολογική εξειδίκευση καθορίζεται κυρίως από την έλλειψη (πολλών) τελεστών στο παθογόνο και η ανθεκτικότητα των μη-ξενιστών φαίνεται να καθορίζεται τουλάχιστον μερικώς από την έλλειψη αναγνώρισης πολλαπλών τελεστών από το φυτό (Sarkar et al 2006, Lu et al. 2008, Wroblewski et al. 2009).

1.2 Το μαστιγιακό T3SS

1.2.1 Το μαστίγιο ως κινητήριο οργανίδιο

Το μαστίγιο ως οργανίδιο κίνησης χρησιμοποιεί ενέργεια από την διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων (pmf, proton motive force) στη βακτηριακή μεμβράνη ή, σε μερικά είδη, από την διαβάθμιση της συγκέντρωσης ιόντων νατρίου. Η ηλεκτροχημική δύναμη μετατρέπεται σε ροπή που καταλήγει σε περιστροφή του μαστιγιακού κινητήρα ο οποίος προσδένεται μέσω του MS-δακτύλιου στο βασικό σωματίο και κατόπιν επεκτείνεται στο άγκιστρο και στο νημάτιο. Η περιστροφή αυτού του ελικοειδούς νηματίου μετατρέπει τη ροπή σε ώθηση και προωθεί το κύτταρο. Το σύστημα διαθέτει έναν διακόπτη που μπορεί να περιστρέψει το μαστίγιο δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα. Οι δύο φορές κίνησης έχουν διαφορετικό αντίκτυπο για το κύτταρο καθώς η μεν πρώτη καταλήγει σε πρόσθια κίνηση, η δε δεύτερη σε τυχαίο επαναπροσανατολισμό. Χημικά σήματα δύνανται να τροποποιήσουν τις πιθανότητες αυτών των δύο περιστροφικών κατευθύνσεων και να παράξουν την ωφέλιμη συμπεριφορά που καλείται χημειοτακτισμός (Macnab 2004).

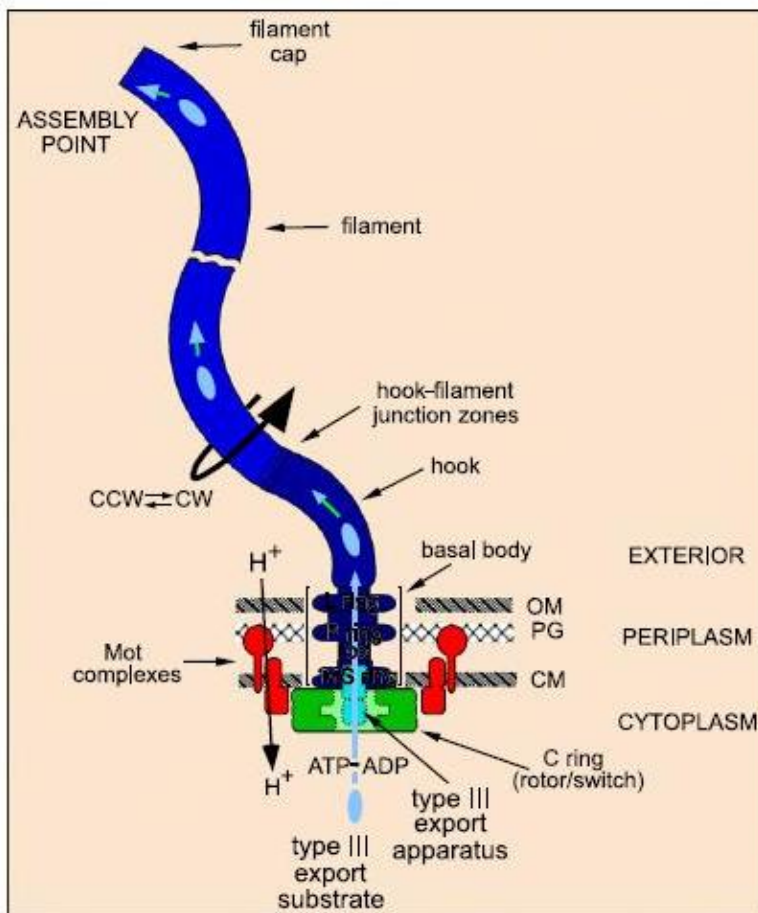
1.2.2 Το μαστιγιακό γενετικό σύστημα

Η ρύθμιση των γονιδίων του μαστιγίου παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εξαγωγής και συναρμολόγησής του. Αρχικά επάγεται το κύριο οπερόνιο του οποίου τα δύο γονίδια *flhC* και *flhD* πρέπει να εκφραστούν ώστε να ενεργοποιηθούν όλα τα υπόλοιπα γονίδια του συστήματος. Τα οπερόνια τάξης 2 που εκφράζονται στη συνέχεια περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για δομικές πρωτεΐνες του μαστιγίου, κάποια ρυθμιστικά μόρια και συστατικά του μονοπατιού έκκρισης του μαστιγιακού T3SS. Τέλος τα τάξης 3 οπερόνια περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν για δομικά συστατικά που συναρμολογούνται αργότερα στο μορφογενετικό μονοπάτι πχ, τη FliC (flagellin), τις πρωτεΐνες Mot και τις πρωτεΐνες χημειοτακτισμού (Che) (Kutsukake et al., 1990, Apel & Surette 2008). Η αποκαταστολή της έκφρασης των όψιμων οπερονίων πραγματοποιείται όταν η πρωτεΐνη FlgM η οποία καταστέλλει την έκφρασή τους με στρατολόγηση του ειδικού για το μαστίγιο παράγοντα σ (σ^{28} , (FliA) εκκρίνεται έξω από το βακτηριακό κύτταρο (Kutsukake & Iino 1994).

1.2.3 Η δομή του μαστιγίου

Τα μη κινητά τμήματα του μαστιγίου είναι: α) ο MS-δακτύλιος, η ράβδος (rod) και οι δακτύλιοι L και P, που συνολικά συνιστούν το αποκαλούμενο βασικό

σωμάτιο (basal body), β) το άγκιστρο (hook) και οι ζώνες σύνδεσης του άγκιστρου με το νημάτιο και γ) το νημάτιο (filament) με το κάλυμμά του (cap). Ο κινητήρας (motor) αποτελείται από: α) το περιστροφικό τμήμα/διακόπτη που αλλιώς καλείται C-δακτύλιος (C-ring) που στην ουσία αποτελεί μια “περιφερειακή” της μεμβράνης δομή στην κυτταροπλασματική πλευρά του MS-δακτυλίου β) τα στοιχεία του στάτορα (stator) ή τα σύμπλοκα Mot που είναι ενσωματωμένα στην εσωτερική μεμβράνη, είναι υπεύθυνα για την πρωτογενή παραγωγή ροπής και περικλείουν τους δακτυλίους C και MS και τέλος γ) τη μαστιγιακή μηχανή έκκρισης τύπου III που αποτελείται από μεμβρανικά στοιχεία στο κέντρο του δακτυλίου MS- και από διαλυτά ή περιφερειακά της μεμβράνης στοιχεία όπως η ATPάση που καθοδηγούν τη διαδικασία έκκρισης (Εικ. 1.9)(Macnab 2003, Macnab 2004). Έτσι, οτιδήποτε εκτός του δακτυλίου MS- πρέπει να εξαχθεί στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης, υπομονάδα μετά την υπομονάδα και να μεταφερθεί στο σημείο συναρμολόγησής του στο άκρο της αυξανόμενης δομής.



Εικ. 1.9. Απεικόνιση του μαστιγίου της *Salmonella*. OM, εξωτερική μεμβράνη. IM, εσωτερική μεμβράνη. PG, πεπτιδογλυκάνη. CW, κίνηση της φοράς των δεικτών του ρολογιού. CCW, κίνηση αντίθετη της φοράς των δεικτών του ρολογιού. Πηγή: Macnab (2004). Οι τρεις δακτύλιοι του βασικού σώματος απεικονίζονται εκ των έσω προς τα έξω (MS, L και P).

1.2.4 Το μορφογενετικό μονοπάτι του μαστιγίου

Η μορφογένεση πραγματοποιείται σε τέσσερα στάδια. Στο πρώτο, οι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης δηλαδή οι πρωτεΐνες του δακτυλίου MS- (FliF) οι πρωτεΐνες Mot (MotA, MotB) και έξι πρωτεΐνες της συσκευής έκκρισης (FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ & FliR) ενσωματώνονται στη μεμβράνη πιθανόν μέσω του μονοπατιού έκκρισης Sec. Ο δακτύλιος MS, σε απεικονίσεις ηλεκτρονικής κρυσ-

μικροσκοπίας παρουσιάζει 24-26x συμμετρία. Στο στάδιο αυτό επίσης συναρμολογείται ο δακτύλιος C (πρωτεΐνες FliM, FliN, FliG) και τα διαλυτά περιφερειακά μόρια που θεωρείται ότι βρίσκονται σε δυναμική σύνδεση με τα μεμβρανικά συστατικά. Η πρωτεΐνη FliG συνδέει το C δακτύλιο με τον MS δακτύλιο. Στο δεύτερο στάδιο σχηματίζεται η ράβδος από τις υπομονάδες της που εκκρίνονται μέσω του T3SS. Στο τρίτο στάδιο εκκρίνονται μέσω του μονοπατιού Sec οι πρωτεΐνες του περιπλαστικού δακτυλίου P και εκείνες του δακτυλίου L της εξωτερικής μεμβράνης και μετά από την αποκοπή του σινιάλου έκκρισης σχηματίζουν τους αντίστοιχους δακτυλίους γύρω από τη ράβδο. Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο εξάγονται οι υπομονάδες του άγκιστρου, της ζώνης σύνδεσης άγκιστρου-νηματίου, του νηματίου και του καλύμματος του νηματίου (Macnab 2004).

1.2.5 Τα συστατικά της μηχανής έκκρισης

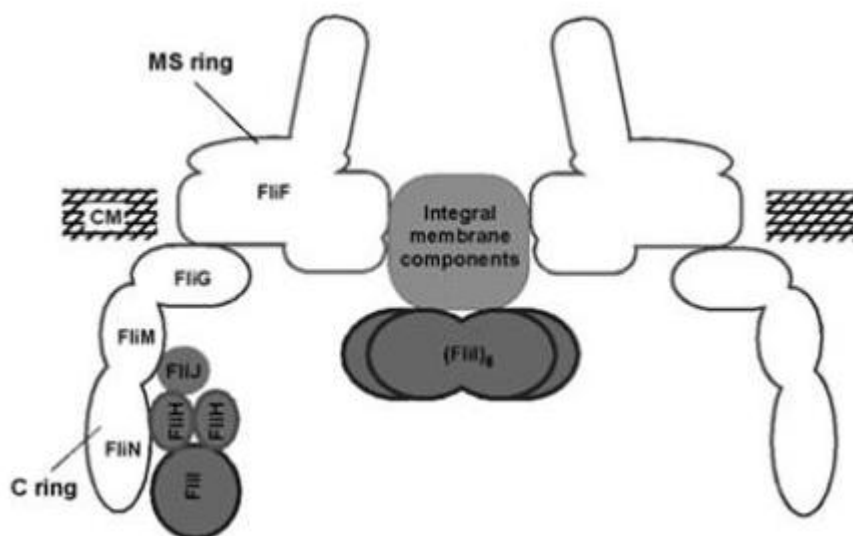
Εννιά πρωτεΐνες είναι σημαντικές για τη μαστιγιακή έκκριση, οι FliH, FliI, FliJ, FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ & FliR. Οι τρεις πρώτες είναι διαλυτές ενώ οι υπόλοιπες εδράζονται στην εσωτερική μεμβράνη μέσα στο κεντρικό πόρο του MS-δακτυλίου (Minamino & Macnab 1999). Οι FlhA και FlhB διαθέτουν μεγάλες καρβοξυτελικές περιοχές που αλληλεπιδρούν με τα διαλυτά συστατικά της μηχανής έκκρισης. Παρά τον όγκο πειραματικών δεδομένων σχετικών με αυτές τις πρωτεΐνες και τις πολλές γνωστές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, ο μηχανιστικός τους ρόλος παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη του συστήματος είναι η ATPάση FliI, ο ρυθμιστής της FliH, η FlhB που παίζει κάποιο ρόλο στην αλλαγή ειδικεύσης υποστρώματος και η υποθετική σαπερόνη γενικού «νοικοκυριού» FliJ.

1.2.6 Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών της συσκευής έκκρισης

Η ATPάση FliI παρουσία του ρυθμιστή της FliH υπάρχει με τη μορφή του συμπλόκου (FliH)₂FliI, όπου το καρβοξυτελικό άκρο του ρυθμιστή αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο της ATPάσης, με την καρβοξυτελική επικράτεια που φέρει και τη δραστηριότητα της ATPάσης να μην εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση (Minamino & Macnab 2000). Μια κεντρική μικρή περιοχή στη FliH είναι υπεύθυνη για τον ομοδιμερισμό της. Παρουσία ATP ή αναλόγων του και παρουσία φωσφολιπιδίων η FliI σχηματίζει ομοεξαμερή (Claret et al., 2003). Επίσης η FliI αλληλεπιδρά όπως έχει προαναφερθεί με τις FlhA & FlhB. Οι δύο τελευταίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τον εαυτό τους. Το καρβοξυτελικό τμήμα της FliJ αλληλεπιδρά με την FliH και με το καρβοξυτελικό κυτταροπλασματικό τμήμα της FlhA (Fraser et al., 2003).

Η FliM είναι τοποθετημένη μεταξύ των FliG & FliN και αλληλεπιδρά και με τις δυο. Από απεικονίσεις κρυο-μικροσκοπίας έχει προκύψει ότι 26 μονομερή της FliM αλληλεπιδρούν με 26 μονομερή της FliG που με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με 26 μονομερή της FliF του MS δακτυλίου (Tomas et al., 2006, Apel & Surette 2008). Το αμινοτελικό τμήμα της FliM εμπλέκεται στην αλλαγή φοράς περιστροφής, το μεσαίο στην αλληλεπίδραση με τη FliG και το καρβοξυτελικό στην αλληλεπίδραση με τη FliN (Toker et al., 1997). Επίσης έχει βρεθεί ότι η FliM αλληλεπιδρά με τη γενική σαπερόνη FliJ. Η στοιχειομετρία μεταξύ των FliM:FliN έχει υπολογιστεί ως 1:4 (Brown et al. 2005). Η πρωτεΐνη FliN αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό της τμήμα και συγκεκριμένα με την υδρόφοβη περιοχή επί της

επιφάνειάς της με το ρυθμιστή της ATPάσης FliH και η επικράτεια αυτής της αλληλεπίδρασης επί της FliN δεν αλληλεπικαλύπτεται με την επικράτεια αλληλεπίδρασης με την FliM. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 1.10. Με τον τρόπο αυτό η FliN πιθανόν προσελκύει το σύμπλοκο της ATPάσης και του ρυθμιστή της στο C-δακτύλιο και το βασικό σωματίο του μαστιγίου, όπου αυξάνει τοπικά η συγκέντρωσή της και σχηματίζει τη λειτουργική εξαμερή δομή της. Επίσης, καθώς ο ρυθμιστής της ATPάσης προσδέεται στην υδρόφοβη εκτεθειμένη επικράτεια της FliN -επικράτεια που μοιάζει με την υδρόφοβη εκτεθειμένη επικράτεια των ειδικών σαπερονών-, πιθανόν η FliN να παίζει το ρόλο σαπερόνης-συνεργάτη, παραλαμβάνοντας το υπόστρωμα που αποδιπλώθηκε με την κατανάλωση ενέργειας από την ATPάση και προωθώντας το στο κανάλι έκκρισης (Gonzalez-Petrajó et al., 2006).



Εικ. 1.10. Σχηματική χωρική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του C- δακτυλίου, της μηχανής έκκρισης και των κυτταροπλασματικών περιφερειακών πρωτεϊνών του μαστιγίου. Πηγή: Gonzalez-Pedrajo et al (2006).

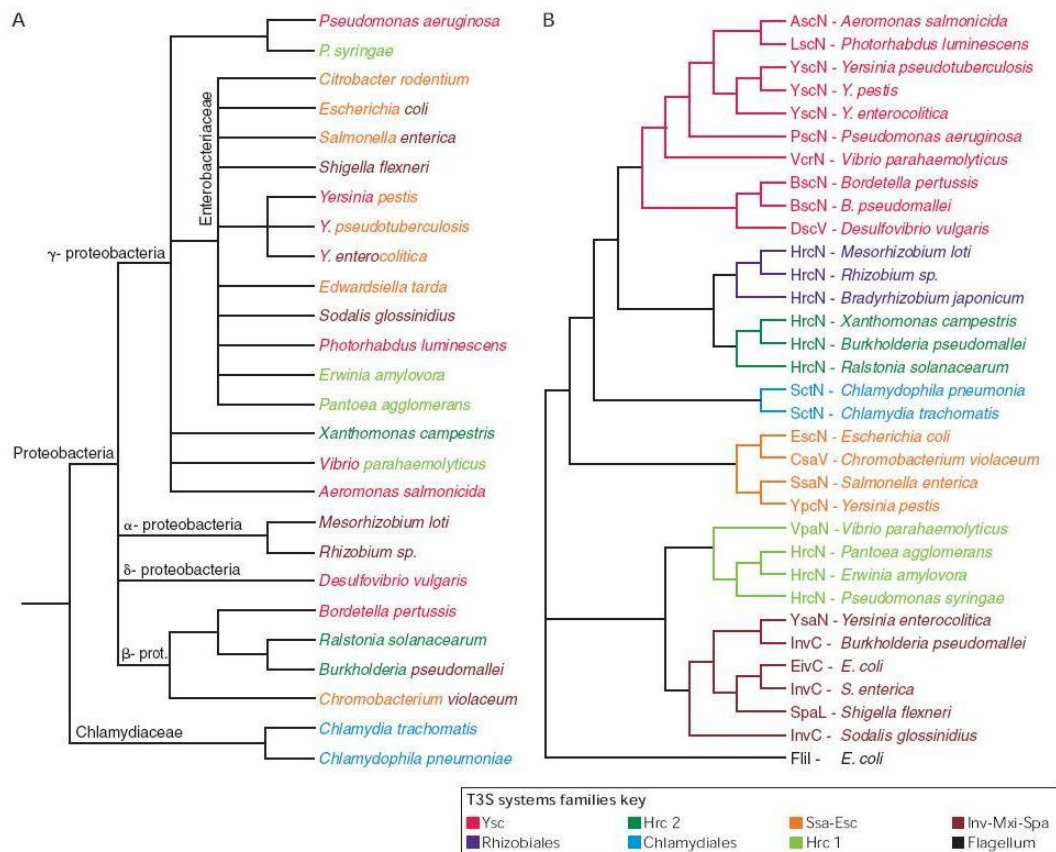
1.3 Οικογένειες T3SS και εξελικτικές θεωρήσεις

Το T3SS παρουσιάζει κοινή εξελικτική καταγωγή με το βακτηριακό μαστίγιο, καθώς παρουσιάζουν δομικές και λειτουργικές ομοιότητες. Για παράδειγμα, και τα δύο χαρακτηρίζονται από την παρουσία όμοιων βασικών σωματίων των οποίων πολλές πρωτεΐνες είναι ομόλογες μεταξύ τους ή χρησιμοποιούν ειδικές σαπερόνες για υποστρώματα έκκρισης (Aunray et al., 2001) ή μοριακά συστήματα ρύθμισης του μήκους εξωκυττάρων εξαρτημάτων τους (Minamino & Pugsley 2005). Αν και το μαστίγιο είναι οργανίδιο κίνησης, περιέχει μια συσκευή έκκρισης για την εξαγωγή των εξωκυττάρων υπομονάδων του όπως των πρωτεϊνών δόμησης του αγκίστρου και του νηματίου πριν τον πολυμερισμό τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα το μαστίγιο είναι ικανό να εκκρίνει και μη μαστιγιακές πρωτεΐνες κάτι που υποδεικνύει ότι το σύστημα μπορεί να μετατραπεί σε καθαρά εκκριτικό (Lee & Galan 2004). Παρόμοια με το μαστίγιο, τα T3SS εκκρίνουν τις δομικές μονάδες που θα

πολυμεριστούν στα εξωκυττάρια εξαρτήματά τους πριν την έκκριση των τελεστών της μόλυνσης.

Οι Troisfontaines & Cornelis (2005) στην εργασία ανασκόπησής τους περί εξελικτικών θεωρήσεων των συστημάτων T3SS διεξήγαγαν φυλογενετικές αναλύσεις βάσει διαφόρων συστατικών πρωτεϊνών τους, οι οποίες κατέληξαν στο ίδιο δέντρο, κάτι που υποδεικνύει ότι όλα τα γονίδια εξελίχτηκαν ως μεγάλα άθικτα γενετικά τμήματα. Διακρίθηκαν έτσι επτά οικογένειες, των οποίων δεν είναι συντηρημένα μόνο τα γονίδια αλλά και η γενετική τους οργάνωση (συντένεια). Το δέντρο αυτό είναι τελείως διαφορετικό από το φυλογενετικό δέντρο βακτηριακής εξέλιξης βάσει ανάλυσης 16s rRNA κι αυτό σημαίνει ότι τα συστήματα τύπου III στα διάφορα βακτήρια πιθανότατα έχουν προκύψει μέσω οριζόντιας μεταφοράς. Η ομαδοποίηση των T3SS σε διαφορετικές οικογένειες μπορεί να αντικατοπτρίζει σε κάποιο βαθμό την ποικιλομορφία των σχέσεων ξενιστή-παθογόνου (εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, τους προσβαλλόμενους ιστούς ή το είδος των συμπτωμάτων). Τα μαστιγιακά συστατικά σχηματίζουν ξεχωριστό κλαδί από τα ομόλογά τους στα διάφορα T3SS κι αυτό δείχνει πέραν της εξελικτικής τους απόστασης πως μετά την απόκλισή τους τα δυο συστήματα δεν συμμετείχαν σε ανταλλαγές μεταξύ τους.

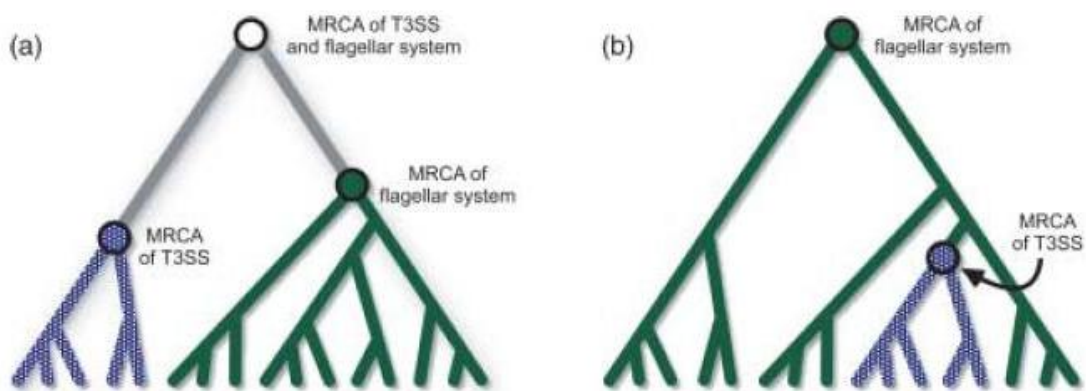
Διάφορα βακτήρια διαθέτουν δυο T3SS και όταν δυο τέτοια συστήματα συνυπάρχουν σε ένα βκτήριο, οι γενετικοί τόποι αποτελούνται γενικά από ξενόλογα γονίδια. Άρα, δυο συστήματα σε ένα είδος ποτέ δεν είναι αποτέλεσμα γενετικού ενδοπολλαπλασιασμού αλλά μάλλον το αποτέλεσμα διαφορετικών γεγονότων οριζόντιας μεταφοράς. Η παρουσία άνω του ενός T3SS σε κάποια παθογόνα μπορεί να τους δίνει εξελικτικό πλεονέκτημα, για παράδειγμα περισσότερα μόρια τελεστές, στρατολόγηση σε διάφορους ξενιστές ή σε διαδοχικά στάδια μόλυνσης (όπως συμβαίνει στη *Salmonella*). Οι κύριες οικογένειες των T3SS βάσει των φυλογενετικών αναλύσεων των Troisfontaines & Cornelis (2005) απεικονίζονται στην εικόνα 1.11



Εικ. 1.11. Α. Φυλογενετικό δέντρο των πρωτεοβακτηρίων βάσει ανάλυσης 16 rRNA. Β. Φυλόγραμμα συγγένειας των ΑΤΡασών των Τ3SS και της FliH του μαστιγίου της *E.coli*. Οι 7 οικογένειες των Τ3SS απεικονίζονται με ισάριθμα διαφορετικά χρώματα. Τα ίδια χρώματα χρησιμοποιούνται και στο δέντρο του rRNA ώστε να φανεί η διαφορά συσχετισμού των δυο αναλύσεων. Είδη με δύο ή τρία χρώματα στο δέντρο του rRNA υποδεικνύουν την ύπαρξη ισάριθμων διαφορετικών ειδών Τ3SS. Πηγή: Troisfontaines & Cornelis (2005).

Η φύση της εξελικτικής σχέσης μεταξύ Τ3SS και μαστιγίου είναι αντικείμενο μεγάλης αντιπαράθεσης. Από τις πρώτες μελέτες που ανέδειξαν τις ομολογίες αλληλουχίας μεταξύ των δύο συστημάτων θεωρήθηκε ευρέως ότι το Τ3SS προέκυψε εξελικτικά από το μαστίγιο (Hueck 1998). Εναλλακτικά τα δυο συστήματα θα μπορούσαν να έχουν προκύψει από ένα κοινό προγονικό σύστημα το οποίο πιθανόν να είχε ταυτόχρονα λειτουργία κίνησης και πρωτεϊνικής μεταφοράς (Εικ. 1.12). Οι υποστηρικτές της άποψης που θέλει το μαστίγιο πρόγονο του Τ3SS στηρίζονται στη μεγάλη διασπορά του μαστιγίου σε όλους τους βακτηριακούς κλάδους σε αντίθεση με την πολύ πιο περιορισμένη διασπορά του Τ3SS (Troisfontaines & Cornelis 2005). Επίσης, υπέρ της θεωρίας τίθεται και η άποψη περί νωρίτερης ανάγκης των βακτηρίων για κίνηση παρά για επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων, τα οποία εμφανίστηκαν δισεκατομμύρια χρόνια μετά από τα προκαρυωτικά. Ενδείξεις για την παράλληλη καταγωγή των δυο συστημάτων προέρχονται από γονιδιακές γενεαλογικές αναλύσεις. Εάν τα Τ3SS είχαν εξελιχθεί από το μαστίγιο θα ήταν αναμενόμενη η ομαδοποίησή τους σε έναν παραφυλετικό μαστιγιακό κλάδο ενώ αν

είχαν προκύψει παράλληλα θα ήταν αναμενόμενη η ύπαρξη δυο ανεξάρτητων προγόνων. Έρευνες υποστηρίζουν τη μονοφυλετικότητα των δύο συστημάτων, ενώ δίκτυα πρωτεϊνικών ομολογιών πάντα ομαδοποιούν τα κεντρικά δομικά συστατικά του T3SS ξεχωριστά από τα αντίστοιχα του μαστιγίου κι αυτό είναι ένδειξη ότι τα δυο συστήματα πιθανόν προέκυψαν μετά από διπλασιασμό από έναν κοινό πρόγονο (Gophna et al., 2003). Άλλωστε, η μεγάλη διαφοροποίηση της γονιδιακής συσσώματωσης μεταξύ των δυο συστημάτων αποδυναμώνει τη θεωρία περί εξελικτικής καταγωγής του T3SS από το μαστίγιο. Στο T3SS τα γονίδια είναι συγκεντρωμένα στις νησίδες παθογένειας οι οποίες περικλείονται εντός αλληλουχιών επαναλήψεων και διαφορετικού περιεχομένου σε GC, πράγμα που υποδεικνύει ότι οι νησίδες αυτές είναι ευκίνητες και εμπλέκονται σε γεγονότα οριζόντιας μεταφοράς. Αντίθετα στο μαστίγιο δεν υπάρχει αυτή η γενετική οργάνωση καθώς τα γονίδια είναι συσσωματωμένα σε πολύ χαμηλότερο βαθμό συχνά με μεγάλες αποστάσεις μεταξύ των γονιδιακών ομάδων (Macnab 2004).



Εικ. 1.12. Οι πιθανές εξελικτικές σχέσεις μεταξύ του μαστιγίου και του T3SS. (a) τόσο το μαστίγιο όσο και το T3SS εξελίχθηκαν ανεξάρτητα από έναν κοινό πρόγονο. (b) το T3SS κατάγεται εξελικτικά από το μαστίγιο. Τα δεδομένα συνηγορούν υπέρ της πρώτης άποψης. MRCA: ο πιο πρόσφατος κοινός πρόγονος. Πηγή: McCann & Guttman, (2008).

1.4 Εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες και η λειτουργία τους

Έχουν ανακαλυφθεί χιλιάδες εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών, εμφανιζόμενες σε ποσοστό 6-33% στα βακτήρια, 9-37% στα αρχαία και 35-51% στους ευκαρυώτες (Dunker et al., 2000). Ένας πιθανός λόγος για τα αυξημένα ποσοστά στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι η αυξημένη ανάγκη για πρωτεϊνική σηματοδότηση, ρύθμιση και έλεγχο (Dunker et al., 2001). Οι εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες συνήθως υστερούν σε κατάλοιπα που προωθούν την αναδίπλωση όπως είναι τα W, C, F, Y, V, L, N και είναι πλούσιες σε κατάλοιπα που προωθούν την αποδίπλωση A, R, G, Q, S, P, E, K (Dunker et al., 2002). Η προστασία της αδίπλωτης πρωτεΐνης μέσω μοριακής σύνδεσης καθιστά εμφανή την παρουσία της όταν με την απομάκρυνση του αλληλεπιδρώντος μορίου η πρωτεΐνη καθίσταται ευαίσθητη σε

δράση πρωτεασών και μειώνεται η βιωσιμότητά της μέσα στο κύτταρο. Παρουσία των αλληλεπιδρώντων μορίων τους, το ενεργειακό τοπίο για τις αδίπλωτες πρωτεΐνες δύναται να μεταβληθεί, οδηγώντας τις σε αναδίπλωση κατά την πρόσδεση. Ο μοριακός συνωστισμός πολλές φορές μπορεί να οδηγήσει την ισορροπία μιας αδίπλωτης περιοχής προς την διπλωμένη κατάσταση. Αντίθετα, απουσία του μορίου πρόσδεσης, η αδίπλωτη πρωτεΐνη μπορεί να μην λάβει μια καθορισμένη τεταρτοταγή δομή αλλά να αποκτά παροδικά πολλούς προσανατολισμούς σε σχέση με το κύριο σώμα του μορίου.

Οι διάφορες μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα από εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες είναι η πρόσδεση σε άλλες πρωτεΐνες πχ κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες, αναστολείς της μετάφρασης, ή σε μόρια νουκλεϊκών οξέων, πχ rRNA, mRNA, tRNA και DNA. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι συχνά αδίπλωτες στο διάλυμα μέχρι να ενσωματωθούν στη μεμβράνη οπότε και αποκτούν ελικοειδή μορφή. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που οδηγούν στο σχηματισμό πολυμερών συχνά εμπλέκουν εγγενώς αδίπλωτες επικράτειες (Namba 2001). Διάφοροι υποδοχείς υπόκεινται σε μεταβάσεις από την αδίπλωτη στη διπλωμένη κατάσταση κατά την πρόσδεση του υποστρώματός τους. Ομοίως, ευκίνητες περιοχές ενζύμων αποκτούν δομή κατά την πρόσδεση του υποστρώματός τους ή της προσθετικής ομάδας. Η εμπλοκή της αδίπλωτης κατάστασης στην μοριακή αναγνώριση αρχικά μπορεί να φαίνεται παράδοξη, αλλά στην πραγματικότητα τα οφέλη της είναι πολλαπλά καθώς προσδίδει μεγάλη ειδικευση αναγνώρισης με χαμηλή συγγένεια, ένα μόριο μπορεί να προσδέσει διαφορετικές δομές μορίων μέσω ανακατάταξης των επιφανειών αλληλεπίδρασης κλπ. (Dunker et al., 2002).

Έχει διατυπωθεί το μοντέλο της πρωτεϊνικής τετράδας, βάση του οποίου μια πρωτεΐνη μπορεί να υπάρξει σε τέσσερις καταστάσεις: την πλήρως διπλωμένη, τη μορφή εύπλαστης σφαίρας, τη μορφή προ-εύπλαστης σφαίρας και την πλήρως αποδιπλωμένη μορφή ή τυχαίο σπείραμα. Κάθε μια από τις μορφές αυτές έχει διακριτή δραστηριότητα και ρύθμιση (Dunker et al., 2001). Το είδος της φυσικής διαμόρφωσης που θα λάβει μια πρωτεΐνη μέσα στο κύτταρο εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η πρωτοταγής αλληλουχία της, η παρουσία ή απουσία χημικής τροποποίησης, η παρουσία ή απουσία αλληλεπιδρώντων μορίων και οι συνθήκες του περιβάλλοντος μέσου. Αυτοί οι παράγοντες είναι σε δυναμική κατάσταση μέσα στο κύτταρο και έτσι οι φυσιολογικές πρωτεΐνες μπορεί να μεταπίπτουν από τη μια μορφή στην άλλη. Η λειτουργία μπορεί να είναι συνδεδεμένη με οποιαδήποτε από τις μορφές αυτές (Dunker et al., 2002).

Μια σειρά ασθενειών έχει συνδεθεί με την παρουσία εγγενώς αποδιπλωμένων πρωτεϊνών, όπως το πεπτίδιο Αβ και η πρωτεΐνη ταυ της νόσου Alzheimer, η πρωτεΐνη PrP της νόσου Prion και η α-συνουκλείνη της νόσου Parkinson. Τέτοιες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχο για δομική μετάπτωση χρησιμοποιώντας φάρμακα που θα μιμούνται δομικά τον στόχο πρόσδεσης της αδίπλωτης πρωτεΐνης και θα επάγουν τροποποίηση στη δομή και τη λειτουργία της (Salma et al., 2009).

1.5 Τα σπειρωμένα σπειράματα

1.5.1 Χαρακτηριστικά δομής, σταθερότητα, ειδικευση και βιολογική λειτουργία.

Το σπειρωμένο σπείραμα είναι ένα κοινά απαντώμενο και υψηλά ποικίλο δομικό μοτίβο που εντοπίζεται σε ένα μεγάλο εύρος δομικών και ρυθμιστικών πρωτεϊνών με λειτουργίες που ποικίλουν από την συναρμολόγηση μακρομοριακών συμπλόκων μέχρι την μοριακή αναγνώριση (Lupas 1996). Η πλειονότητα των πρωτεϊνών που περιέχουν σπειρωμένα σπειράματα και που έχουν περιγραφεί πειραματικά είναι κυρίως ευκαρυωτικές και μόνο ένα πολύ μικρότερο ποσοστό είναι προκαρυωτικής προέλευσης (Gazi et al., 2009).

Ένα σπειρωμένο σπείραμα αποτελείται τυπικά από δυο έως επτά α-έλικες τυλιγμένες η μια γύρω από την άλλη οι οποίες σχηματίζουν μια υπερελίκωση και όπου οι πλευρικές αλυσίδες πακετάρονται κατά έναν τρόπο που μοιάζει με προσαρμογή «ρόζου μέσα σε οπή» («knobs into holes»). Ενώ οι κανονικές έλικες χρειάζονται 3.6 κατάλοιπα για μια πλήρη στροφή έλικας, η διαταραχή που επιβάλλεται σε κάθε μια έλικα μέσα σε ένα αριστερόστροφο σπειρωμένο σπείραμα (που είναι και το πιο σύνηθες), μειώνει την τιμή αυτή σε 3.5 κατάλοιπα ανά στροφή. Έτσι, ανά δυο στροφές έλικας σχηματίζεται μια επανάληψη επτάδας (Lupas 1996). Μια πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει από δυο έως 200 τέτοιες επαναλήψεις επτάδας. Η επτάδα συνήθως αναγράφεται ως a-b-c-d-e-f-g για τη μια έλικα και a'-b'-c'-d'-e'-f'-g' για την άλλη.

Η υπόθεση «Peptide Velcro» (Arndt et al., 2002) διακρίνει τρία δομικά στοιχεία ζωτικά για το σχηματισμό ενός ειδικού σπειρωμένου σπειράματος. Αρχικά, τα κατάλοιπα στις θέσεις a και d θα πρέπει να είναι υδρόφοβα (πχ λευκίνη, βαλίνη ή ισολευκίνη) ώστε να σταθεροποιείται το διμερές έλικας μέσω υδρόφοβων δυνάμεων και δυνάμεων van der Waals. Δεύτερον, τα κατάλοιπα στις θέσεις e και g θα πρέπει να είναι φορτισμένα (πχ γλουταμικό ή λυσίνη) ώστε να παράγονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο ελίκων που παράγουν και την ειδικευση της αλληλεπίδρασης. Τρίτον, οι εναπομείνουσες θέσεις b,c και f πρέπει όλες να καταλαμβάνονται από υδρόφιλα κατάλοιπα καθώς αυτά θα δομήσουν τις επιφάνειες που θα είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη (Εικ. 1.13). Τα πιο σταθερά σπειρωμένα σπειράματα είναι αυτά που έχουν το υψηλότερο ποσοστό υδρόφοβων καταλοίπων στις θέσεις a και d. Συχνά όμως ένα μικρό ποσοστό πολικών καταλοίπων εντοπίζεται σε αυτές τις θέσεις αυξάνοντας την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης εις βάρος της σταθερότητας (Mason & Arndt 2004).

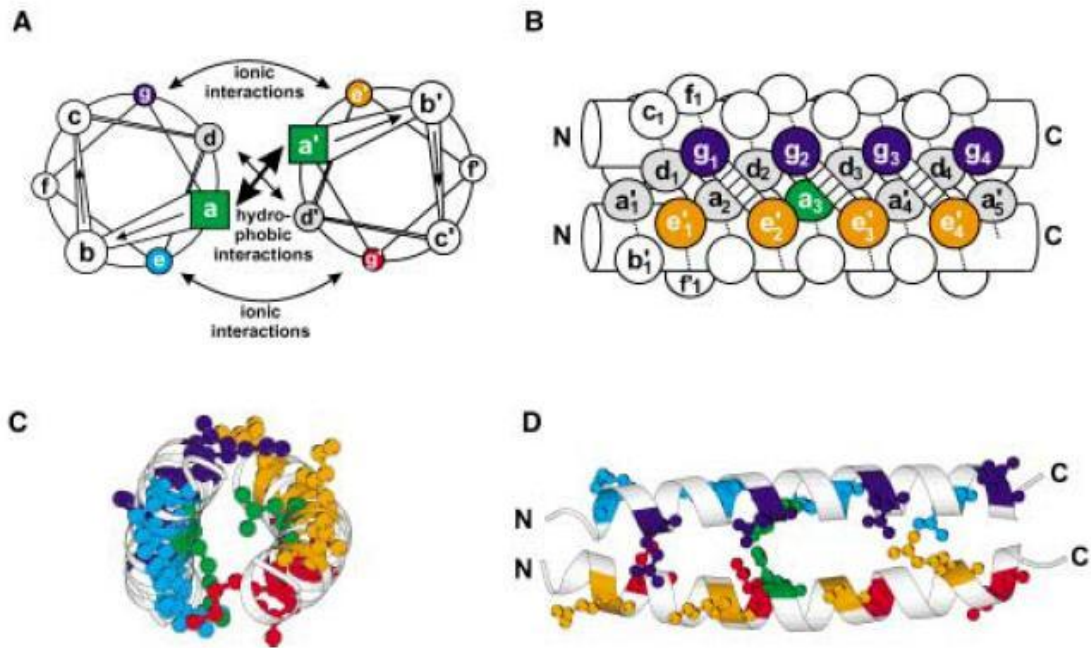
Μια πρωτεΐνη αναδιπλώνεται για να μεγιστοποιήσει το ποσό του μη πολικού υλικού που είναι θαμμένο μέσα στον πυρήνα της αναδίπλωσης (Dill 1990). Καθώς μια απομονωμένη α-έλικα είναι οριακά σταθερή σε διάλυμα, η ελικοειδής σύνδεση υπογραμμίζει την μετάβαση από την μονομερή αποδιπλωμένη κατάσταση πχ. του τυχαίου σπειράματος στη δομή του σπειρωμένου σπειράματος (Cohen & Parry 1990, Delahay & Frankel 2002). Έτσι, τα σπειρωμένα σπειράματα αποτελούν παράδειγμα μιας υποχρεωτικά ολιγομερούς δομής που υιοθετεί μια τελική αναδίπλωση κατά τον ολιγομερισμό και ως μονομερής είναι τουλάχιστον μερικώς αποδιπλωμένη. Τα σπειρωμένα σπειράματα διακρίνονται από μια περιοδικότητα μη πολικότητας/πολικότητας και η αμφιπαθική φύση τους αυτή οδηγεί δυο ή περισσότερα να συνδέονται μεταξύ τους μέσω των υδρόφοβων επιφανειών τους. Το τοπικό κυτταρικό περιβάλλον μπορεί να τροποποιήσει την ικανότητα αναδίπλωσης και πρόσδεσης πρωτεϊνών σπειρωμένων σπειραμάτων και αλλαγές ιδίως του pH

μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την αναδίπλωση και τις ελικοειδείς αλληλεπιδράσεις τους (Dutta et al., 2001, Delahay & Frankel 2002).

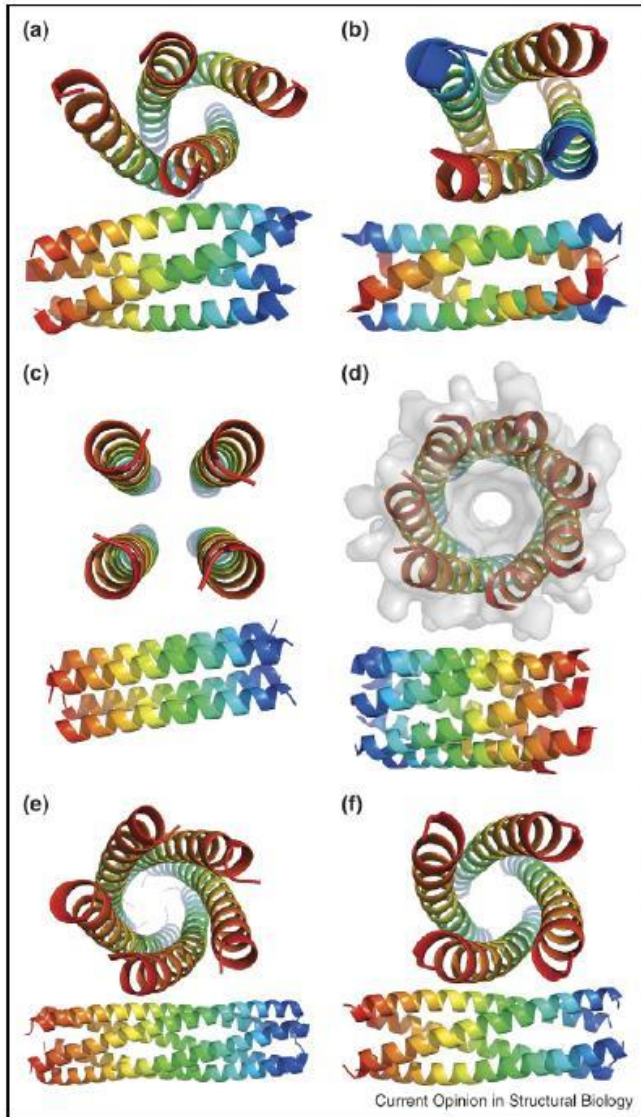
Έχει υποστηριχθεί ότι υπάρχουν αλληλουχίες μέσα σε ένα σπειρωμένο σπείραμα οι οποίες είναι υπεύθυνες για την έναρξη του σχηματισμού του. Για παράδειγμα εντός της μυοσίνης, της κινεσίνης και της τροπομυοσίνης έχουν βρεθεί αλληλουχίες δεκατριών καταλοίπων που απαιτούνται για την έναρξη της συναρμολόγησης του σπειρωμένου σπειράματος (Kammerer et al., 1998). Βάση αυτής της παρατήρησης είχε γίνει η υπόθεση ότι η αλληλουχία αυτή αποτελεί μια αυτόνομη ελικοειδή μονάδα αναδίπλωσης που διαμεσολαβεί στο σχηματισμό του σπειρωμένου σπειράματος. Ωστόσο, γνωστές τέτοιες αλληλουχίες έχει φανεί ότι διαθέτουν χαμηλά ποσοστά ελικοειδούς περιεχομένου και δεν μπορούν να αναγνωριστούν μόνο βάσει αυτού (Frank et al., 2000). Επίσης, έχουν σχεδιαστεί πολλά σπειρωμένα σπειράματα που δε φέρουν τέτοιες αλληλουχίες. Παρά τις ενδείξεις ύπαρξης αλληλουχιών έναρξης, το θέμα της αναγκαιότητάς τους για την αναδίπλωση του σπειρωμένου σπειράματος παραμένει αμφιλεγόμενο.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα υπολογιστικά προγράμματα για την αναγνώριση δομών σπειρωμένου σπειράματος (COILS, MULTICOIL κλπ), τα οποία προβλέπουν τις περιοχές των δομών, την πιθανότητα σχηματισμού σπειρωμένου σπειράματος από έλικες και την ολιγομερική τους κατάσταση. Στην επιστήμη υλικών και νανοτεχνολογίας οι ραβδόμορφες δομές και οι διακριτές μεταπτώσεις αποδιπλωμένης-αναδιπλωμένης κατάστασης έχουν εμπνεύσει ποικίλες εφαρμογές. Αλλάζοντας τα πρότυπα υδρόφοβων/πολικών καταλοίπων μιας επανάληψης επτάδας μπορεί να παραχθεί μια πλειάδα νέων δομών. Μια νέα τοπολογία, αυτή του σπειρωμένου σπειράματος επτά ελίκων σχηματίζεται όταν τα κατάλοιπα στις θέσεις e και g του φερμουάρ λευκίνης της GCN4 αντικαθίστανται από την μη πολική αλανίνη (Liu et al., 2006). Η δομή διακρίνεται από παράλληλες έλικες, μια μεγάλη δια-ελικοειδή ακτίνα και ένα συνεχές κανάλι στο κέντρο του σπειράματος (Εικ. 1.14). Ωστόσο, δεν είναι ακόμα δυνατή η πρόβλεψη των αλλαγών που θα συμβούν σε μια δομή με την εισαγωγή διαφόρων αντικαταστάσεων σε αυτήν, καθώς οι δομές των σπειρωμένων σπειραμάτων δεν καθορίζονται από απλούς κανόνες υδρόφοβου πακεταρίσματος.

Τα σπειρωμένα σπειράματα μπορούν να δράσουν ως διακόπτες διαμόρφωσης σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Έχουν σχεδιαστεί δομές που σχηματίζουν ίνες, αμυλοειδείς ή μη αμυλοειδείς με την εφαρμογή εξωτερικού ερεθίσματος pH ή θερμοκρασίας ή μετά από απλή ανάδευση. Άλλες εφαρμογές αφορούν τη χρήση σπειρωμένων σπειραμάτων για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση μιας λειτουργίας. Τα παραδείγματα αυτά είναι μερικά μόνο από τα διαθέσιμα στη βιβλιογραφία και απεικονίζουν τη δυνατότητα χρήσης των δομών αυτών σε βιοϊατρικές εφαρμογές όπως επίσης και σε εφαρμογές υλικών.



Εικ. 1.13. Ένα παράλληλο διμερές σπειρωμένο σπείραμα σε σχηματική απεικόνιση (A και B) και ως απεικόνιση κορδέλας από τη δομή ακτίνων X του φερμουάρ λευκίνης της GCN4 (C και D). Το διάγραμμα ελικοειδούς τροχού στο (A) και στο διάγραμμα (C) κοιτούν κάθετα τον άξονα των α-ελίκων από το αμινο- στο κάρβοξυ- τελικό άκρο. Τα (B) και (C) αποτελούν πλάγιες προβολές. Τα κατάλοιπα μαρκάρονται ως a-g για τη μια έλικα και a'-g' για την άλλη. Οι υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις εντός της επτάδας g και g' αποδίδονται με μπλε και κόκκινο αντίστοιχα, οι e' με γαλάζιο και πορτοκαλί αντίστοιχα. Στις σχηματικές απεικονίσεις υποδεικνύεται ο υδρόφοβος πυρήνας a/a', d/d'. πηγή: Mason & Arndt, 2004.



Εικ. 1.14. Ενδιαφέρουσες νέες δομές σπειρωμένων σπειραμάτων. Κάθε δομή απεικονίζεται αξονικά και στο πλάι. Το χρώμα υποδεικνύει τον προσανατολισμό της έλικας, με μπλε το αμινοτελικό άκρο, με κόκκινο το καρβοξυτελικό. Στα **a**, **b**, και **c** εμφανίζονται ποικιλίες σπειρωμένων σπειραμάτων προερχόμενων από την GCN4 με τροποποιημένα τα υδρόφοβα και πολικά μοτίβα. **(a)**. Όταν τα κατάλοιπα όλων των θέσεων ϵ αντικατασταθούν με βαλίνες, αποτέλεσμα είναι ένα παράλληλο τετραμερές. **(b)**. Όταν τα κατάλοιπα όλων των θέσεων γ αντικατασταθούν με βαλίνες ή αλανίνες, αποτέλεσμα είναι ένα αντιπαράλληλο τετραμερές. **(c)**. Απεικόνιση ενός δεξιόστροφου παράλληλου τετραμερούς σπειρωμένου σπειράματος. **(d)**. Όταν όλες οι θέσεις ϵ και γ αντικατασταθούν από αλανίνες προκύπτει ένα παράλληλο επταμερές. **(e** και **f)**. Ένα σπειρωμένο σπείραμα όπου όλες οι θέσεις α και δ έχουν αντικατασταθεί από φαινυλαλανίνες, οπότε προκύπτει ένα παράλληλο πενταμερές **(e)**. Αν μια από τις φαινυλαλανίνες αντικατασταθεί από μεθειονίνη, αποτέλεσμα είναι ένα τετραμερές **(f)**. Πηγή: Grigoryan & Keating, (2008).

1.5.2 Αποδίπλωση και σπειρωμένα σπειράματα στο T3SS

Δεδομένου ότι μια μικρή ομάδα πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3SS απαιτούνται για την αναδιοργάνωση του ευκαρυωτικού περιβάλλοντος προς εύνοια του βακτηρίου, θεωρείται αναμενόμενο ότι οι πρωτεΐνες αυτές επιτελούν πολλαπλές λειτουργίες και διαμεσολαβούν σε πολλές αντιδράσεις. Πρώτος ο Pallen το 1997 είχε προβλέψει με τη χρήση αλγορίθμων την ύπαρξη σπειρωμένων σπειραμάτων σε παραπάνω από τις μισές εκκρινόμενες πρωτεΐνες του T3SS, όπως σε πρωτεΐνες του πόρου μεταφοράς, του καλύμματος της βελόνας, σε διάφορους τελεστές κλπ. Σήμερα, από τις διαθέσιμες δομικές μελέτες σε συνδυασμό με προβλέψεις έχει φανεί ότι στις πρωτεΐνες του T3SS υπάρχει μια ασυνήθιστα συχνή παρουσία επαναλήψεων επτάδας στην αλληλουχία τους, ενδεικτική του σχηματισμού σπειρωμένων σπειραμάτων. Καθορισμένες δομές μονομερών συναρμολόγησης της βελόνας, του καλύμματος της βελόνας και του πόρου μεταφοράς έχουν επιβεβαιώσει τις προβλέψεις με την πιστοποίηση της παρουσίας των σπειρωμένων σπειραμάτων σε αυτές (Gazi et al., 2009). Από τις δομές αυτές και τους διαθέσιμους ηλεκτρονικούς χάρτες

μικροσκοπίας έχει πραγματοποιηθεί έγκυρη μοντελοποίηση των ολιγο- ή πολυμερών δομών που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των μονομερών με τη διαμεσολάβηση σπειρωμένων σπειραμάτων.

Για τα μόρια των τελεστών δεν είναι τόσο ξεκάθαρη η έντονη παρουσία των σπειρωμένων σπειραμάτων στις δομές τους. Ωστόσο, είναι έντονη η αμινοτελική παρουσία αποδιπλωμένων καταλοίπων στις πρώτες 15-20 θέσεις οι οποίες έχει υποστηριχθεί έντονα στη βιβλιογραφία ότι φέρουν το σήμα έκκρισης του T3SS. Συνήθως το τμήμα αυτό πρέπει να αφαιρεθεί από το μόριο του τελεστή για να μελετηθεί δομικά λόγω ευκινησίας ή στους ηλεκτρονιακούς χάρτες δεν υπάρχει αρκετή ηλεκτρονιακή πυκνότητα ώστε η περιοχή αυτή να μπορέσει να αναλυθεί (Wulf et al., 2004, Lee et al., 2004, Xing et al., 2007). Το 75% των τελεστών στην *P. syringae* pv tomato DC3000 εμφανίζουν σημαντική τάση για δομική αποδίπλωση στα πρώτα 50 κατάλοιπα της αλληλουχίας τους (Gazi et al., 2009). Άρα, η παρουσία αποδιπλωμένων καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο των τελεστών μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο ως σήμα έκκρισης.

Από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, εντονότερη εμφανίζεται η παρουσία σπειρωμένων σπειραμάτων στα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών HrpO/FliJ/YscO, οι οποίες παρά την απουσία ομολογίας σε επίπεδο αλληλουχίας διακρίνονται από κοινά δομικά χαρακτηριστικά τάσης σχηματισμού σπειρωμένων σπειραμάτων και εγγενή αποδίπλωση. Ενδείξεις από την HrpO και άλλες ανάλογες πρωτεΐνες από άλλες οικογένειες T3SS υποδεικνύουν ότι η τεράστια ευκαμψία του μορίου σε συνδυασμό με την παρουσία των σπειρωμένων σπειραμάτων ίσως είναι σημαντικά στοιχεία για την εγκαθίδρυση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στα πλαίσια της λειτουργίας του T3SS (Gazi et al., 2008). Για τη FliJ έχει υποστηριχθεί ότι παίζει ρόλο γενικής σαπερόνης στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, εμποδίζοντας μέσω αλληλεπίδρασης την συσσωμάτωση υποστρωμάτων έκκρισης.

Το μοντέλο που έχει προταθεί για την παρουσία σπειρωμένων σπειραμάτων στα εκκρινόμενα υποστρώματα του T3SS θέλει αυτές τις πρωτεΐνες ιδανικά υποστρώματα μεταφοράς από το στενό αγωγό του συστήματος. Καταρχάς, το αποδιπλωμένο αμινοτελικό άκρο των υποστρωμάτων έκκρισης αναγνωρίζεται ως ένα από τα σήματα έκκρισης και προωθείται στην ΑΤΡάση του συστήματος η οποία θα το αποδιπλώσει. Οι γεωμετρικές διαστάσεις των αποδιπλωμένων μη σφαιρικών ελικοειδών διαμορφώσεων που έχει λάβει πλέον το υπόστρωμα έκκρισης επιτρέπουν το πέρασμά του μέσα από τη βελόνα έκκρισης. Μετά την έκκριση οι έλικες αυτές, προσχηματισμένες και ικανές προς αναδίπλωση ίσως σχηματίζουν έναν πυρήνα συναρμολόγησης ο οποίος προωθεί το σχηματισμό μιας επικράτειας σφαιρικού σπειρωμένου σπειράματος (Gazi et al., 2009).

Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια έχουν διενεργηθεί εκτενείς μελέτες επί της δομής και της ρύθμισης του T3SS ζωοπαθογόνων βακτηρίων, όπως και συστηματική λειτουργική ανάλυση και δομικός χαρακτηρισμός ενός μεγάλου εύρους πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων του. Για το συγγενές σύστημα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων οι γνώσεις σχετικά με τα παραπάνω είναι, σε σύγκριση, αρκετά περιορισμένες. Κι ενώ για τις συντηρημένες πρωτεΐνες των T3SS (πρωτεΐνες Hrc) στα φυτοπαθογόνα οι μελέτες στο T3SS των ζωοπαθογόνων βακτηρίων μπορούν να χρησιμεύσουν ως πυξίδα για την διερεύνηση της δομής και λειτουργίας του συστήματος, για τα μη συντηρημένα συστατικά (πρωτεΐνες Hrp), η διερεύνηση του πεδίου είναι περιορισμένη. Αφενός οι μέχρι τούδε μελέτες στα φυτοπαθογόνα βακτήρια αφορούν λίγες σχετικά πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφική ή μετα-μεταγραφική ρύθμιση του συστήματος και αφ' ετέρου η δομική πρωτεομική ανάλυση βρίσκεται σε εμβρυικά στάδια, χαρακτηρίζεται από σοβαρά κενά μεθοδολογίας και περιορίζεται σε λίγα μόνο παραδείγματα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης HrcQb και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του εξωκυτταρικού ινιδίου/αγωγού Hrp.

Για τους λόγους αυτούς στην παρούσα διατριβή επιδιώχθηκε καταρχάς η συστηματική διερεύνηση αλληλεπιδράσεων μεταξύ ζευγών διαλυτών πρωτεϊνών του T3SS του φυτοπαθογόνου *P. syringae* pv. *phaseolicola* με μια σειρά μεθόδων γονιδιωματικής και πρωτεομικής ανάλυσης. Σε πρώτο στάδιο, εφαρμόστηκε η ετερόλογη συνέκφραση σε βακτηριακά κύτταρα και ο συγκαθαρισμός των υποψήφιων πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας. Σε δεύτερο στάδιο, επιλέχθηκε ένας αριθμός διαλυτών πρωτεϊνών του T3SS του ίδιου βακτηρίου για περαιτέρω μελέτη αξιοποιώντας άλλες διαθέσιμες μεθοδολογίες δομικής ανάλυσης, όπως η σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες και ο κυκλικός διχρωϊσμός. Οι μέθοδοι αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε περιορισμένη έκταση ή καθόλου για τη δομική ανάλυση πρωτεϊνών του T3SS τόσο των παθογόνων ζώων όσο και φυτών και μπορούν να συμπληρώσουν την υπάρχουσα γνώση που έχει προκύψει από τις κρυσταλλογραφικές ή άλλες μελέτες. Να σημειωθεί ότι οι μη διαμεμβρανικές πρωτεΐνες του T3SS χαρακτηρίζονται σε μεγάλο βαθμό από εξαιρετική ευκινησία και πλαστικότητα και αποτελούν για το λόγο αυτό δύσκολο αντικείμενο κρυσταλλογραφικής ανάλυσης.

Βιβλιογραφία

- Akeda Y. & Galan J.E. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437, 911-915.
- Aldon D., Brito B., Boucher C. & Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.*, 19, 2304-2314.
- Apel D. & Surette M.G. 2008. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 1851-1858.
- Arndt K.M., Pelletier J.N., Muller K.M., Pluckthun A. & Alber T. 2002. Comparison of *in vivo* selection and rational design of heterodimeric coiled coils. *Structure*, 10, 1235-1248
- Auvray F., Thomas J., Fraser G. M. & Hughes C. 2001. Flagellin polymerisation control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* 308, 221–229.
- Birtalan S. & Ghosh P. 2001. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nature Struct. Biol.* 8, 974–978.
- Birtalan S. C., Phillips R. M. & Ghosh P. 2002. Threedimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell.* 9, 971–980.
- Blocker A., Jouihri N., Larquet E., Gounon P., Ebel F., Parsot C., Sansonetti P. & Allaoui A. 2001. Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol Microbiol*, 39(3), 652-663
- Blocker A., Komoriya K. & Aizawa S.-I. 2003. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *PNAs*, 100(6), 3027-3030.
- Blocker A.J., Deane J.E., Veenendaal A.K.J., Roversi P., Hodgkinson J.L., Johnson S. & Lea S.M. 2008. What’s the point of the type III secretion system needle? *PNAs*, 105, 6507–6513.
- Brown P.N., Mathews M.A., Joss L.A., Hill C.P. & Blair D.F. 2005. Crystal structure of the flagellar rotor protein FliN from *Thermotoga maritime*, *J. Bacteriol.* 187, 2890–2902.
- Burghout, P., Van Boxtel R., Van Gelder P., Ringler P., Muller S. A., Tommassen J. & Koster M. 2004. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186, 4645–4654.
- Buttner D. & Bonas U. 2002. Port of entry — the type III secretion translocon. *Trends Microbiol*, 10, 186-192.

- Buttner D. & Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol*, 9, 193-200
- Claret L., Calder S.R., Higgins M. & Hughes C. 2003. Oligomerization and activation of the FliI ATPase central to bacterial flagellum assembly, *Mol. Microbiol.* 48, 1349–1355.
- Cohen C., & Parry, D.A.D. 1990. α -helical coiled-coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Proteins* 7, 1–15.
- Cornelis G.R. 2006. The type III secretion injectisome. *Nature*, 4, 811-825.
- Crago A. M., & Koronakis V. 1998. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol. Microbiol.* 30, 47–56.
- Cunnac S., Lindeberg M. & Collmer A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol*, 12, 53-60
- Dangl J.L. & Jones J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411, 826-833.
- Day J. & Plano G. 1998. A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 30, 777–788.
- Deane J.E., Roversi P., Cordes F.S., Johnson S., Kenjale R., Daniell S., et al. 2006. Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *PNAs*, 103, 12529–12533.
- Delahay M.R. & Frankel G. 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol. Microbiol.* 45(4), 905-916
- Derewenda U., Mateja A., Devedjiev Y., Routzahn K.M., Evdokimov A.G., Derewenda Z.S. & Waugh D.S. 2004. The structure of *Yersinia pestis* V-antigen, an essential virulence factor and mediator of immunity against plague. *Structure*, 12, 301–306.
- Dill K.A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, 29(31), 7133-7155
- Dunker A.K., Obradovic Z., Romero P., Garner E.C. & Brown C.J. 2000. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Gen Inform*, 11, 161-171
- Dunker A.K. & Obradovic Z. 2001. The protein trinity-linking function and disorder. *Nat. Biotechnol*, 19(9), 805-806
- Dunker A.K., Brown C.J., Lawson J.D., Iakoucheva L.M. & Obradovic Z. 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, 41(21), 6573-6582.

Dutta K., Alexandrov A., Huang H., & Pascal S.M. 2001. pH-induced folding of an apoptotic coiled-coil. *Protein Sci* 10, 2531–2540.

Edqvist P.J., Olsson J., Lavander M., Sundberg L., Forsberg A., Wolf-Watz H. & Lloyd S.A. 2003. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* 185, 2259–2266.

Fadoulglou, V.E., Tampakaki, A.P., Glykos, N.M., Bastaki, M.N., Hadden, J.M., Phillips, S.E., *et al.* 2004. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *PNAs*, **101**: 70–75.

Ferris H.U., Furukawa Y., Minamino T., Kroetz M.B., Kihara M., Namba K. & Macnab. 2005. FlhB regulates ordered export of flagellar components via autocleavage mechanism. *J Biol Chem*, 280(50), 41236-41242

Ferris H.U. & Minamino T. 2006. Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends in Microbiology*, 14(12), 519-526.

Frank S., Lustig A., Schulthess T., Engel J. & Kammerer R.A. 2000. A distinct seven-residue trigger sequence is indispensable for proper coiled-coil formation of the human macrophage scavenger receptor oligomerization domain. *J Biol Chem*. 275, 11672-11677

Fraser G. M., Bennett J. C. & Hughes C. 1999. Substrate specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol. Microbiol.* 32, 569–580.

Fraser G.M., Gonzalez-Pedrajo G.M., Tame J.R.H. & Macnab R.M. 2003. Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus, *J. Bacteriol.* 185, 3983–3988.

Galan J.E. & Wolf-Watz H. 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444, 567-573

Gazi A.D., Bastaki M., Charova S.N., Gkougkoulia E.A., Kapelios E.A., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2008. Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *JBC*, 283(49), 34062-34068.

Gazi A.D., Charova S.N., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2009. Coiled-coils in type III secretion systems: structural flexibility, disorder and biological implications. *Cellular Microbiology*, 11(5), 719-729

Gonzalez-Pedrajo B., Minamino T., Kihara M. & Namba K. 2006. Interactions between C-ring proteins and export apparatus components: a possible mechanism for facilitating type III protein export. *Mol. Microbiol.* 60(4), 984-998.

Gophna U., Ron E.Z. & Graur D. 2003. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312, 151–163.

Gosh P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68(4), 771-795.

Grigoryan G. & Keating A.E. 2008. Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 1-7.

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

Ide T., Laarmann S., Greune L., Schillers H., Oberleithner H., & Schmidt M.A. 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 3, 669-679.

Imada K., Minamino T., Tahara A. & Namba K. 2007. Structural similarity between the flagellar type III ATPase FliI and F1-ATPase subunits. *PNAs*, 104, 485–490.

Jackson M. W., & Plano G.V. 2000. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol. Lett.* 186. 85–90

Jin, Q. & He S.-Y. 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294, 2556–2558.

Johnson S., Roversi P., Espina M., Olive A., Deane J.E., Birket, S. et al. 2007. Self-chaperoning of the type III secretion system needle tip proteins IpaD and BipD. *J. Biol. Chem.* 282, 4035–4044.

Jouihri, N., Sory M. P., Page A. L., Gounon P., Parsot C., & Allaoui A. 2003. MxiK and MxiN interact with the Spa47 ATPase and are required for transit of the needle components MxiH and MxiI, but not of Ipa proteins, through the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* 49, 755–767.

Journet L., Agrain C., Broz P. & Cornelis G. R. 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302, 1757–1760.

Kammerer R.A., Schulthess T., Landwehr R., Lustig A., Engel J., Aebi U. & Steinmetz M.O. 1998. An autonomous folding unit mediates the assembly of two-stranded coiled coils. *PNAs*, 95(23), 13419-13424

Kimbrough, T. G. & Miller, S. I. 2000. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *PNAs* 97, 11008–11013.

Kubori T., Matsushima Y., Nakamura D., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E. & Aizawa S.I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 280(5363), 602-605

- Kutsukake K., Ohya Y. & Iino T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 172, 741–747.
- Kutsukake K. & Iino T. 1994. Role of the FliA–FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*, J. Bacteriol. 176, 3598–3605.
- Lavander M., Sundberg L., Edqvist P.J., Lloyd S.A., Wolf- Watz H. & Forsberg, A. 2003. Characterisation of the type III secretion protein YscU in *Yersinia pseudotuberculosis*. Adv Exp Med Biol 529, 109–112.
- Lee C.C., Wood M.D., Ng, K., Luginbuhl, P., Spraggon, G. & Katagiri, F. 2004. Crystal structure of the Type III effector AvrB from *Pseudomonas syringae*. Structure 12, 487–494.
- Lee S.H. & Galan J.E. 2004. *Salmonella* type III secretion- associated chaperones confer secretion pathway specificity. Mol Microbiol 51, 483–495.
- Lilic M., Vujanac M. & Stebbins C.E. 2006. A common structural motif in the binding of virulence factors to bacterial secretion chaperones. Mol. Cell. 21, 653–664.
- Liu J., Zheng Q., Deng Y.Q., Cheng C.S., Kallenbach N.R. & Lu M. 2006. A seven-helix coiled coil. PNAS, 103, 15457-15462.
- Lupas A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. Trends Biochem Sci. 21(10), 375-382
- Ma W. & Guttman D.S. 2008. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence factors. Curr Opin Plant Biol, 11, 412-419
- Macnab R.M. 2003. How bacteria assemble flagella, Annu. Rev. Microbiol. 57, 77–100.
- Macnab R.M. 2004. Type III flagellar export and flagellar assembly. Biochim. Biophys. Acta, 1694, 207-217.
- Makishima S., Komoriya K., Yamaguchi S. & Aizawa S. I. 2001. Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus. Science 291, 2411–2413.
- Marlovits T.C., Kubori T., Sukhan A., Thomas D.R., Galan J.E. & Unger V.M. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. Science, 306, 1040-1042.
- Mason J.M. & Arndt K.M. 2004. Coiled coil domains: stability, specificity and biological implications. Chem. Biochem. 5, 170-176.
- McCann H.C. & Guttman D.S. 2008. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. New Phytologist, 177, 33-47

- Minamino T., & Macnab R.M. 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates, *J. Bacteriol.* 181, 1388–1394.
- Minamino T. & Macnab, R.M. 2000. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate-specificity switching. *J. Bacteriol.* 182, 4906–4914
- Minamino T., & Macnab R.M. 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity, *Mol. Microbiol.* 37, 1494– 1503.
- Minamino T. & Pugsley A.P. 2005. Measure for measure in the control of type III secretion hook and needle length. *Mol Microbiol* 56: 303–308.
- Moraes T.F., Spreter T & Strynadka N.C.J. 2008. Piecing together the Type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 258-266.
- Muller S. A. et al. 2006. Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol. Microbiol.* 61, 119–125.
- Namba K. 2001. Roles of partly unfolded conformations in macromolecular self-assembly. *Genes Cells*, 6(1), 1-12
- Neyt C. & Cornelis G. R. 1999. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol. Microbiol.* 31, 143–156.
- Page A. L. & Parsot C. 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* 46, 1–11.
- Pallen M.J., Dougan G. & Frankel G. 1997. Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* 25(2), 423-425.
- Pallen M.J., Francis M.S. & Futterer K. 2003. Tetratricopeptide-like repeats in type III secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol. Lett.* 223, 53–60.
- Pallen M.J., Penn C.W. & Chaudhuri R.R. 2005. Bacterial flagellar diversity in the post-genomic era. *Trends Microbiol*, 13(4), 143-149
- Parsot C., Hamiaux C. & Page A.L. 2003. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6, 7-14.
- Pozidis C. Chalkiadaki A., Gomez-Serrano a., Stahlberg H., Brown I et al. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278, 25816–25824.
- Quinaud M., Chabert J., Faudry E., Neumann E., Lemaire D., Pastor A., Elsen S., Dessen A. & Attree I. 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 280(43), 36293-362300

- Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiäho-Lassila E. L., Kalkkinen E. L., Romantschuk M., & He S. Y. 1997. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. PNAS, 94, 3459–3464.
- Salma P., Chhatbar C. & Seshadri S. 2009. Intrinsically unstructured proteins: potential targets for drug discovery. American Journal of Infectious Diseases, 5(2), 133-141.
- Schubot F.D., Jackson M.W., Penrose K.J., Cherry S., Tropea J.E., Plano G.V. & Waugh, D.S. 2005. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. J. Mol. Biol. 346, 1147–1161.
- Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C. & Abe A. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. PNAS, 98(20), 11638-11643
- Stebbins C.E. 2005. Structural microbiology at the pathogen-host interface. Cellular Microbiology, 7(9), 1227-1236
- Sukhan, A., Kubori T., Wilson J. & Galan J. E. 2001. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion- associated needle complex. J. Bacteriol. 183, 1159–1167.
- Tamano K., Aizawa S., Katayama E., Nonaka T., Imajoh-Ohmi S., Kuwae A., Nagai S. & Sasakawa C. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. EMBO J, 19(15), 3876-3887
- Tampakaki A.P., Fadouloglou V.E., Gazi A.D., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2004. Conserved features of type III secretion. Cellular Microbiology, 6(9), 805-816.
- Thomas D.R., Francis N.R., Xu C. & DeRosier D.J. 2006. The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, J. Bacteriol. 188, 7039–7048.
- Toker A.S., Macnab R.M. 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY, J. Mol. Biol. 273, 623–634.
- Troisfontaines P. & Cornelis G.R. 2005. Type III secretion: more systems than you think. Physiology, 20, 323-339
- Wang Y.A., Yu X., Yip C., Strynadka N.C. & Egelman E.H. 2006. Structural polymorphism in bacterial EspA filaments revealed by cryo- EM and an improved approach to helical reconstruction. Structure, 14, 1189-1196.

Wang Y., Ouellette A.N., Egan C.W., Rathinavelan T., Im W. & De Guzman R.N. 2007. Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL and MxiH. *J Mol Biol* 371(5), 1304-1314

Wei W., Plovanich-Jones A., Deng W.L., Jin Q.L., Collmer A., Huang H.C. & He S.Y. 2000. The gene coding for the hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *PNAS*, 97, 2247-2252.

Wei C.F., Deng W.L. & Huang H.C. 2005. A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. syringae type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 57(2), 520-536.

Wilharm G., Dittmann S., Schmid A. & Heesemann J. 2007. On the role of specific chaperones, the specific ATPase and the proton motive force in type III secretion. *Intern. J. Med. Microbiol.* 297, 27-36.

Williams A.W., Yamaguchi S., Togashi F., Aizawa S.I., Kawagishi I. & Macnab. 1996. Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 178(10), 2960-2970

Wulf J., Pascuzzi P.E., Martin G.B. & Nicholson L.K. 2004. The solution structure of type III effector protein AvrPto reveals conformational and dynamic features important for plant pathogenesis. *Structure* 12, 1257– 1268.

Xing W.M., Zou Y., Liu Q., Hao Q., Zhou J.M. & Chai J.J. 2007. The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature* 449, 243– 247.

Yip C.K., Finlay B.B. & Strynadka N.C. 2005. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 75-81.

Yip C.K. & Strynadka N.C. 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci*, 31, 223-230.

Zarivach R., Vuckovic M., Deng W., Finlay B.B. & Strynadka N.C. 2007. Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 131-137.

Zhang L., Wang Y., Picking W.L., Picking W.D. & De Guzman R.N. 2006. Solution structure of monomeric BsaL, the type III secretion needle protein of *Burkholderia pseudomallei*. *J Mol Biol* 359, 322–330.

Κεφάλαιο 2

Αρχές μεθοδολογίας

2.1 *In silico* επεξεργασία πρωτεϊνικών αλληλουχιών

Από την βιοϋπολογιστική ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών με τη χρήση εργαλείων και κατάλληλα ανεπτυγμένων αλγορίθμων μπορεί να προκύψει χρήσιμη πληροφορία ή βάσιμες προβλέψεις σχετικά με τις φυσικοχημικές ιδιότητες αυτών, όπως το μοριακό βάρος και ο συντελεστής εξάλειψης (extinction coefficient), το θεωρητικό τους ισοηλεκτρικό σημείο (pI), η δευτεροταγής δομή τους, η τοπολογία και ο βαθμός υδροφοβικότητας και διαταραχής τους (disorder), η πιθανή τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους βάσει πρωτογενούς αλληλουχίας, η ύπαρξη συγκεκριμένων λειτουργικών μοτίβων/επικρατειών επί της αλληλουχίας τους μέσω σύγκρισης με γνωστές πρωτεΐνες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων κλπ. Αναλυτικά ακολουθούν τα βιοϋπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα θέση.

2.1.1 ProtParam

Το πρόγραμμα υπολογίζει τις διαφορές φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορούν να εξαχθούν από μια πρωτεϊνική αλληλουχία. Οι παράμετροι που υπολογίζονται περιλαμβάνουν το μοριακό βάρος, το θεωρητικό pI, τη σύνθεση σε αμινοξέα, το συντελεστή εξάλειψης, το χρόνο ημιζωής, το περιεχόμενο αστάθειας, το περιεχόμενο αλειφατικότητας και το μέσο βαθμό υδροπάθειας (hydrophathy) της πρωτεΐνης.

Ο συντελεστής εξάλειψης καθορίζει πόσο φως απορροφά η πρωτεΐνη σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Το πρόγραμμα προσθέτει τη συνεισφορά κάθε αμινοξέος σαν να ήταν ανεξάρτητο και χωρίς να θέτει υπόψη την δευτεροταγή ή τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα από τον μοριακό συντελεστή εξάλειψης των καταλοίπων τυροσίνης, τρυπτοφάνης και των κυστινών (κυστίνη είναι το αμινοξύ που σχηματίζεται όταν δυο κατάλοιπα κυστεΐνης συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό) σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, υπολογίζεται ο συντελεστής εξάλειψης της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης. Ο συντελεστής εξάλειψης υπολογίζεται από τον τύπο

$$E(\text{Prot}) = \text{Numb}(\text{Tyr}) \times \text{Ext}(\text{Tyr}) + \text{Numb}(\text{Trp}) \times \text{Ext}(\text{Trp}) + \text{Numb}(\text{Cystine}) \times \text{Ext}(\text{Cystine})$$

(Οι συνθήκες υπό τις οποίες ισχύει ο τύπος είναι: 0.02 M phosphate buffer pH 6.5, 6.0 M guanidium hydrochloride)

Ο υπολογισμός του συντελεστή εξάλειψης είναι χρήσιμος για την μέτρηση της συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης βάσει της απορρόφησής της στο υπεριώδες ($A_{280\text{nm}}$).

$$[C_{\text{mg/ml}} = A_{280\text{nm}}/E(\text{Prot})]$$

Ο χρόνος ημιζωής είναι η πρόβλεψη του χρόνου που απαιτείται ώστε να αποδομηθεί το μισό ποσό μιας πρωτεΐνης μετά την σύνθεσή της μέσα στο κύτταρο. Η πρόβλεψη δίνεται από το πρόγραμμα για τρεις οργανισμούς (human, yeast, and *E. coli*). Το πρόγραμμα υπολογίζει το χρόνο ημιζωής με τη μελέτη του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης. Έχει φανεί ότι το είδος των καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο μιας πρωτεΐνης παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητά της *in vivo*. Φαίνεται πως τα αμινοτελικά κατάλοιπα παίζουν μεγάλο ρόλο στη διαδικασία πρωτεολυτικής αποδόμησης μέσω του συστήματος της ουβικουιτίνης. Έτσι, το κάθε κατάλοιπο μπορεί να ιεραρχηθεί με βάσει το χρόνο ημιζωής που προσφέρει όταν είναι παρόν στο αμινοτελικό άκρο μιας πρωτεΐνης (“N-end rule”).

Το περιεχόμενο αστάθειας παρέχει τον υπολογισμό της σταθερότητας της πρωτεΐνης στο δοκιμαστικό σωλήνα. Η στατιστική ανάλυση 12 ασταθών και 32 σταθερών πρωτεϊνών φανέρωσε την ύπαρξη συγκεκριμένων διπεπτιδίων, η

συχνότητα των οποίων διαφέρει σημαντικά μεταξύ ασταθών και σταθερών πρωτεϊνών. Οι παράγοντες βαρύτητας αστάθειας καθορίστηκαν για κάθε ένα από 400 διαφορετικά διπεπτίδια, με τη χρήση των οποίων είναι δυνατός ο υπολογισμός του περιεχομένου αστάθειας το οποίο καθορίζεται ως εξής:

$$H = (10/L) \sum_{i=1}^{i=L-1} DIWV(x[i]x[i+1])$$

όπου,

L=το μήκος της αλληλουχίας και

DIWV(x[i]x[i+1])=ο παράγοντας βαρύτητας αστάθειας του διπεπτιδίου ξεκινώντας από τη θέση i. Μια πρωτεΐνη της οποίας το περιεχόμενο αστάθειας είναι μικρότερο από 40 θεωρείται σταθερή ενώ τιμές άνω του 40 προβλέπουν την πρωτεΐνη ως ασταθή.

Το αλειφατικό περιεχόμενο μιας πρωτεΐνης καθορίζεται ως ο σχετικός όγκος που καταλαμβάνεται από τις αλειφατικές πλευρικές ομάδες (αλανίνη, βαλίνη, ισολευκίνη και λευκίνη). Θεωρείται ως ένας παράγοντας που συνεισφέρει θετικά στην αύξηση της θερμοσταθερότητας των σφαιρικών πρωτεϊνών. Το αλειφατικό περιεχόμενο μιας πρωτεΐνης υπολογίζεται βάσει του τύπου

$$\text{Aliphatic index} = X(\text{Ala}) + a \times X(\text{Val}) + b \times [X(\text{Ile}) + X(\text{Leu})]$$

όπου οι τιμές των X(Ala), X(Val), X(Ile) & X(Leu) είναι εκφρασμένες ως mole επί τοις εκατό των αντιστοίχων καταλοίπων. Οι συντελεστές a & b αντιπροσωπεύουν τους σχετικούς όγκους των πλευρικών αλυσίδων της βαλίνης (a = 2.9) και των καταλοίπων λευκίνης/ισολευκίνης (b = 3.9) ως προς την πλευρική αλυσίδα της αλανίνης.

Τέλος, ο μέσος βαθμός υδροπάθειας για ένα πεπτίδιο ή μια πρωτεΐνη υπολογίζεται ως το άθροισμα της υδροπάθειας καθενός από τα αμινοξέα που απαρτίζουν μια πρωτεΐνη, διαιρεμένου με τον αριθμό καταλοίπων της αλληλουχίας της (Gasteiger et al). Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>

2.1.2 DAS (Dense Alignment Surface)

Οι διαμεμβρανικές έλικες των ενσωματωμένων στην πλασματική μεμβράνη πρωτεϊνών αποτελούνται από σειρές 15-30 εξαιρετικά υδρόφοβων καταλοίπων και οι σειρές αυτές διαχωρίζονται μεταξύ τους με πολικούς βρόγχους. Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός αλγορίθμων για την αναγνώριση των πιθανών διαμεμβρανικών ελίκων με βάση την πρωτογενή αμινοξική αλληλουχία και οι σύγχρονες μέθοδοι μπορούν να αναγνωρίσουν ένα ποσοστό ίσο με 90-95 % όλων των πραγματικών διαμεμβρανικών επικρατειών, με ένα βαθμό υπερτίμησης μόνο λίγων μονάδων επί τοις εκατό. Τα καλύτερα αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί ως τώρα με την ανάλυση πολλαπλών στοιχισμένων αλληλουχιών. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν διαθέσιμες ομόλογες αλληλουχίες για στοίχιση και έτσι κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μεθόδων για την διεκπεραίωση προβλέψεων βάσει της μοναδιαίας αλληλουχίας ενδιαφέροντος και μόνο. Η επονομαζόμενη μέθοδος στοίχισης πυκνότητας επιφάνειας (DAS) εισήχθη ως απόκριση στην παραπάνω ανάγκη. Η μέθοδος βασίζεται σε χαμηλής αυστηρότητας διαγράμματα κουκίδας (dot

plots) της αλληλουχίας ενδιαφέροντος σε σχέση με μια συλλογή μη ομόλογων μεμβρανικών πρωτεϊνών, με τη χρήση μιας προϋπάρχουσας ειδικής μήτρας βαθμολόγησης. Η σύγκριση της μεθόδου με αυτές της πολλαπλής στοίχισης έδειξε πως είναι ισάξιας εγκυρότητας με αυτές (Cserzo et al., 1997). Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://www.biokemi.su.se/~server/DAS/>

2.1.3 PSIPRED

Επί του παρόντος, η πρόβλεψη της δομής μιας αγνώστου πρωτεΐνης με συγκριτική μοντελοποίηση είναι μακράν η πιο αξιόπιστη τεχνική, εφαρμόσιμη όμως μόνο όταν είναι διαθέσιμη η δομή μιας πρωτεΐνης-μήτρα με μεγάλο βαθμό ομοιότητας αλληλουχίας. Απουσία μιας τέτοιας πρωτεΐνης, υπάρχουν οι μέθοδοι αναγνώρισης αναδίπλωσης οι οποίες παρέχουν μια εναλλακτική λύση για την κατασκευή χρήσιμων τριτοταγών μοντέλων. Πέραν των μεθόδων που βασίζονται στην αναγνώριση ομοιοτήτων μεταξύ πρωτεϊνών, υπάρχουν και οι μέθοδοι *ab initio* πρόβλεψης, οι οποίες προσπαθούν να προβλέψουν τη δομή μιας πρωτεΐνης χωρίς ευθεία αναφορά σε κάποια μήτρα. Μέχρι τώρα οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι *ab initio* πρόβλεψης αφορούν την πρόβλεψη στοιχείων δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Το εργαλείο PSIPRED είναι μια απλή και ακριβής μέθοδος πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής η οποία ενσωματώνει διπλής τροφοδοσίας νευρωνικά δίκτυα τα οποία εξάγουν την ανάλυση επί του αποτελέσματος που λαμβάνεται από το PSI-BLAST (Position Specific Iterated - BLAST). Το τελευταίο παράγει μια πολύ ευαίσθητη στοίχιση αλληλουχιών και ανιχνεύει ακόμα και μακρινές ομόλογες αλληλουχίες συγκρινόμενες με την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Έτσι, το προφίλ αλληλουχιών που έχει προκύψει ως αποτέλεσμα των υπολογισμών του PSI-BLAST, χρησιμοποιείται ως αρχείο έναρξης για το πρόγραμμα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής PSIPRED. Για τη μείωση των ψευδο-θετικών αποτελεσμάτων των μεθόδων αναγνώρισης αναδίπλωσης, ειδικά όσον αφορά μεγάλες αλληλουχίες, είναι σημαντικός ο αποκλεισμός προκατειλημμένων περιοχών επί της αλληλουχίας ενδιαφέροντος πριν γίνει η πρόβλεψη (Jones 1997). Ο διακομιστής του PSIPRED χρησιμοποιεί το πρόγραμμα PFILT το οποίο φιλτράρει και καλύπτει περιοχές χαμηλής περιπλοκότητας όπως διαμεμβρανικά τμήματα ή περιοχές σπειροειδών σπειραμάτων. Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>

2.1.4 FoldIndex

Ένας αυξανόμενος αριθμός πρωτεϊνών αναδεικνύονται ως εγγενώς αδίπλωτες υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι Uversky *et al.* (2000) περιέγραψαν μια απλή μέθοδο πρόβλεψης του κατά πόσον μια δεδομένη πρωτεΐνη έχει καθορισμένη δομή ή είναι εγγενώς αδίπλωτη. Η μέθοδος βασίζεται στη μέση υδροφοβικότητα των αμινοξέων της πρωτεΐνης και στην απόλυτη τιμή του καθαρού τους φορτίου. Χρησιμοποιώντας ως άξονες αυτές τις δυο παραμέτρους οι πρωτεΐνες που έχουν αποδειχθεί πειραματικά να είναι διπλωμένες ή εγγενώς αδίπλωτες διαχωρίζονται από μια ευθεία γραμμή που περιγράφεται από μια απλή εξίσωση. Αυτή η απλή διαδικασία επιτρέπει την άμεση πρόβλεψη του αν μια δεδομένη αλληλουχία είναι διαταραγμένη ή όχι. Η μέθοδος αυτή βελτιώθηκε περαιτέρω με το μετασχηματισμό της εξίσωσης των ορίων μεταξύ

διπλωμένων και αδίπλωτων πρωτεϊνών σε έναν απλό πίνακα που ονομάστηκε FoldIndex και ο οποίος διαχωρίζει επίσης τις διπλωμένες από τις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες. Οι Uversky *et al.* (2000) όρισαν α) την απόλυτη τιμή του καθαρού φορτίου $|\langle R \rangle|$, ως την απόλυτη τιμή της διαφοράς μεταξύ των αριθμών των θετικά από τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα σε τιμή pH 7.0, διαιρεμένης με τον συνολικό αριθμό καταλοίπων, και β) την απόλυτη τιμή της υδροφοβικότητας $\langle H \rangle$, ως το άθροισμα της υδροφοβικότητας όλων των καταλοίπων, διαιρεμένου με το συνολικό αριθμό καταλοίπων. Η εξίσωση των ορίων μεταξύ διπλωμένων και εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών όπως είχε πρωτοδιατυπωθεί από την ίδια ομάδα $|\langle R \rangle| = 2.785 \langle H \rangle - 1.151$

αναδιαμορφώθηκε στον αλγόριθμο FoldIndex:

$$I_F^{KD} = 2.785 \langle H \rangle - |\langle R \rangle| - 1.151.$$

Βάσει αυτού, όλες οι θετικές τιμές αναπαριστούν πρωτεΐνες ή επικράτειες επί πρωτεϊνών που πιθανόν είναι αναδιπλωμένες, ενώ οι αρνητικές τιμές αναπαριστούν εκείνες που πιθανόν είναι εγγενώς αδίπλωτες. Το FoldIndex επιτρέπει την διερεύνηση των ιδιοτήτων αναδίπλωσης αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων ή κυλιόμενων παραθύρων μέσα σε μια αλληλουχία, ώστε να πραγματοποιείται η αναγνώριση παραπλήσιων μεγάλων περιοχών με διαφορετικές ιδιότητες αναδίπλωσης σε σχέση με τη συνολική πρωτεΐνη (Prilusky *et al.* 2005). Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/index>

2.1.5 ROSETTA

Ο αλγόριθμος *ROSETTA* εκτελεί αναζητήσεις διαμόρφωσης πρωτεϊνικών μορίων με τη χρήση κινήσεων ενσωμάτωσης τμημάτων και κριτήρια αποδοχής Monte Carlo. Συγκεκριμένα, επιλέγεται ένα τυχαίο σημείο ένθεσης στην αλληλουχία και μετά ένα τυχαίο θραύσμα 3 ή 9 καταλοίπων. Οι γωνίες του σκελετού αλλάζουν ώστε να συμπίπτουν με αυτές του θραύσματος επιλογής, οι νέες συντεταγμένες υπολογίζονται από τις γωνίες του σκελετού και η κίνηση γίνεται αποδεκτή ή απορρίπτεται χρησιμοποιώντας τα κριτήρια Monte Carlo. Το κριτήριο αποδοχής Monte Carlo για την ενσωμάτωση του θραύσματος εξαρτάται από την ενέργεια και τη θερμοκρασία T . Η θερμοκρασία αρχικά τίθεται σε υψηλές τιμές ώστε σχεδόν όλες οι φυσιολογικά αποδεκτές κινήσεις γίνονται αποδεκτές, και κατόπιν μειώνεται γραμμικά σε 12000 κύκλους (προσομοίωση απόπτωσης, simulated annealing). Το βέλτιστο πρόγραμμα προσομοίωσης εξαρτάται από τους βαθμούς ελευθερίας στο θραύσμα της αλυσίδας υπό εξέταση. Σε δεύτερο στάδιο, οι υψηλής αξιοπιστίας προβλέψεις προσαρμόζονται στις αντίστοιχες επιλεγμένες γωνίες του σκελετού, όπου επιτρέπεται η προσθήκη θραυσμάτων με εξαίρεση εκείνα που εμφανίζουν απόκλιση γωνίας μεγαλύτερη των 60 Å. Κατόπιν ο αλγόριθμος Splitter διαιρεί την αλληλουχία σε μικρότερα αλληλεπικαλυπτόμενα θραύσματα και τέλος ο αλγόριθμος GArose συναρμολογεί τα προβλεπόμενα θραύσματα μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, για κάθε θραύσμα έχουν προβλεφθεί 15 διαφορετικές διαμορφώσεις, οι πέντε καλύτερες για τα γειτονικά θραύσματα συναρμολογούνται μεταξύ τους. Έτσι, ξεκινώντας από δυο σετ

αλληλεπικαλυπτόμενων προβλέψεων, παράγονται όλα τα πιθανά ανασυνδυασμένα υβριδικά μοντέλα και τα πέντε χαμηλότερης ενέργειας εισάγονται στον επόμενο γύρο, ή αποτελούν το τελικό αποτέλεσμα προς το χρήστη (Bystroff & Shao 2002). Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://isites.bio.rpi.edu/hmmstr/index.html>

2.1.6 PROSITE / SCANPROSITE

Για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής λειτουργίας, την ανακάλυψη της οικογενειακής ταυτότητας ή την ανίχνευση μακρινών ομολόγων, είναι απαραίτητη η έρευνα βάσεων δεδομένων «υπογραφών». Το ScanProsite παρέχει ένα διαδικτυακό εργαλείο για την αναγνώριση πρωτεϊνικών ομοιοτήτων με υπογραφές από την βάση δεδομένων PROSITE. Η τελευταία αποτελείται από μια μεγάλη συλλογή βιολογικά σημαντικών υπογραφών, οι οποίες περιγράφονται ως α) πρότυπα που χρησιμοποιούνται για αναγνώριση μικρών μοτίβων ή β) γενικευμένα προφίλ για την ευαίσθητη αναγνώριση μεγαλύτερων επικρατειών. Οι υπογραφές του PROSITE αποτελούν μια υψηλής ποιότητας συλλογή στενά συνδεδεμένη με τις διαδικασίες επισήμανσης και σχολιασμού (annotation) των UniProtKB/Swiss-Prot. Επιπλέον, κάθε προφίλ του PROSITE συνδέεται χειροκίνητα με μια μήτρα επισημάνσεων που λέγεται ProRule (Sigrist et al., 2002). Αυτοί οι κανόνες χρησιμεύουν εσωτερικά από την ομάδα Swiss-Prot για την αυτοματοποίηση της επισήμανσης των επικρατειών PROSITE στις καταχωρήσεις των UniProtKB/Swiss-Prot. Ένας αριθμός ProRules καθορίζει βιολογικά σημαντική πληροφορία σχετικά με συγκεκριμένα κατάλοιπα μέσα στην επικράτεια όπου αυτά απαντώνται. Αυτή η πληροφορία θέσης η οποία προκύπτει από τη χαρτογράφηση σημαντικών καταλοίπων μέσα στο προφίλ, παρέχεται με τη μορφή μονάδων επισημάνσεων περιβάλλοντος: συγκεκριμένες συνθήκες, η συγκεκριμένη αλληλουχία, η παρουσία άλλων χαρακτηριστικών, πρέπει όλα να πληρούνται για την εφαρμογή της μονάδας επισήμανσης και άρα για την πρόβλεψη του χαρακτηριστικού. Συνεπώς, αυτοί οι κανόνες επιτρέπουν την ανίχνευση χαρακτηριστικών εντός της επικράτειας, όπως ενεργά κέντρα ή δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο συνδυασμός της ευαισθησίας των προφίλ με την ειδικότητα της ανίχνευσης μοτίβων ενισχύει την ακρίβεια της υπογραφής βάσει λειτουργικών προβλέψεων (de Castro et al., 2006). Πρόσβαση στο πρόγραμμα παρέχεται από το διαδικτυακό τόπο <http://www.expasy.org/tools/scanprosite/>

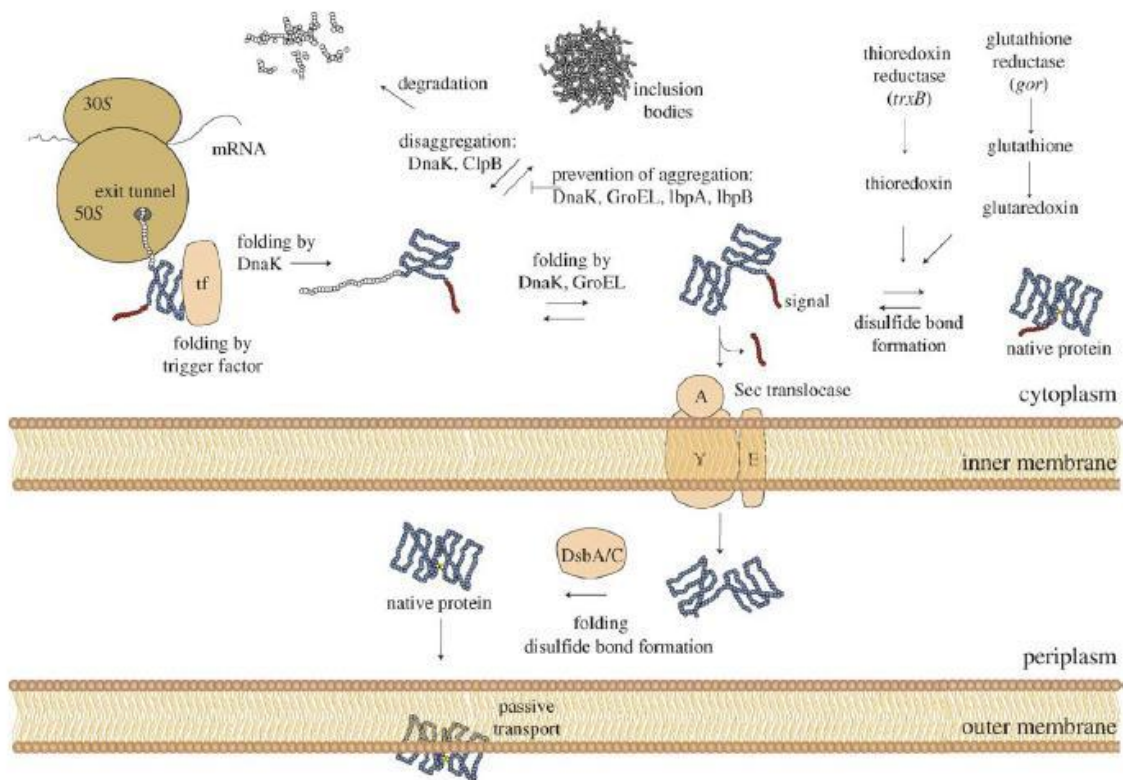
2.2 Έκφραση πρωτεϊνών από ετερόλογο σύστημα

2.2.1 Το μεταβολικό βάρος της ετερόλογης υπερέκφρασης

Πολλές ετερόλογα εκφραζόμενες πρωτεΐνες έχει φανεί εμπειρικά ότι ασκούν κάποιου επιπέδου τοξικότητα στον ξενιστή τους. Ίσως πραγματοποιείται ανταγωνισμός μεταξύ των ανασυνδυασμένων και των ενδογενών πρωτεϊνών για τις διαδικασίες πρωτεϊνικής σύνθεσης και αναδίπλωσης ο οποίος τίθεται υπέρ των πρώτων με περιορισμό της παραγωγής ενδογενών πρωτεϊνών, απαραίτητων σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον, κακώς διπλωμένες ή συσσωματωμένες πρωτεΐνες μπορεί να δρουν ως “νεροχύτης” για τις διαδικασίες αναδίπλωσης ενδογενών πρωτεϊνών (Humphreys et al. 2002). Συσσωματωμένες πρωτεΐνες πρωτεολύονται ευρέως και μπορεί να επάγουν «απόκριση στρες» η οποία καταναλώνει επιπλέον τους κυτταρικούς πόρους. Στην περίπτωση της *Escherichia coli* παρατηρείται μείωση των ρυθμών αύξησης, καταστροφή ριβοσωμάτων, σύνθεση πρωτεϊνών στρες (αντίδραση που μοιάζει με αυτή του θερμικού σοκ) και συνοδεύεται από αύξηση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας με ταυτόχρονη αύξηση των επιπέδων των σαπερονών DnaK, GrpE, GroEL και αλλαγές του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα προς την καταβολική κατεύθυνση (Schweder et al. 2002, Weber et al. 2002). Στον *S. cerevisiae* το μεταβολικό κόστος (μεταφραζόμενο ως μείωση στο μέγιστο ρυθμό αύξησης, στο ρυθμό συσσώρευσης βιομάζας και στον ειδικό ρυθμό κατανάλωσης γλυκόζης) είναι δυσανάλογα μεγάλο σε σχέση με την ποσότητα της ετερόλογα παραγόμενης πρωτεΐνης. Αυτό ίσως εξηγείται με την αυξημένη ενεργητική απαίτηση του ξένου γονιδίου ή/και τον ανταγωνισμό για περιορισμένη ποσότητα παραγόντων μεταγραφής και μετάφρασης, βιοσυνθετικών πρόδρομων μορίων ή μεταβολικής ενέργειας (Gorgens et al. 2001). Άρα γενικά θα πρέπει να επιδιώκεται βέλτιστη και όχι μέγιστη ετερόλογη έκφραση και το βέλτιστο αυτό επίπεδο μπορεί να διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη (Humphreys et al. 2002).

Σε πολλές περιπτώσεις η παροδική υπερπαραγωγή του προϊόντος ενδιαφέροντος συνοδεύεται από φαινόμενα λανθασμένης μετάφρασης, πρόωρης διακοπής της μετάφρασης, συσσωμάτωσης και αποδόμησης του προϊόντος (Schweder et al. 2002). Η συσσωμάτωση ειδικά αναφέρεται ως αναγκαίο κακό στην συντριπτική πλειονότητα των προσπαθειών για ετερόλογη υπερέκφραση πρωτεϊνών. Τα έγκλειστα σωματίδια είναι μια ομάδα δομικά περίπλοκων συσσωματωμάτων που συχνά θεωρείται ότι παράγονται ως απόκριση στο στρες της συσσώρευσης υπερποσοτήτων ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (200-300 mg/ml) στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Το αν ο σχηματισμός των εγκλείστων σωματίων αφορά έναν παθητικό μηχανισμό που συμβαίνει με τη διαμεσολάβηση υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων εκτεθειμένων αδίπλωτων αλυσίδων ή έναν πιο εξειδικευμένο τρόπο συσσωμάτωσης δεν είναι γνωστό (Sorensen & Mortensen 2005). Παρ' όλα αυτά έχει σημειωθεί πως τα έγκλειστα σωματίδια που σχηματίζονται κατά την πρωτεϊνική υπερέκφραση δεν αποτελούν αμετάκλητα συσσωματωμένη μορφή της πρωτεΐνης αλλά παροδικές δεξαμενές ημι-διπλωμένων πεπτιδίων ικανών προς πλήρη αναδίπλωση. Το φαινόμενο αναφέρεται ως αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ κατακρήμνισης *in vivo* και αναδίπλωσης η οποία όμως εύκολα αποκαθίσταται με καθήλωση της μετάφρασης (Carrio et al. 2001). Εναλλακτική στρατηγική για την αντιμετώπιση του σχηματισμού εγκλείστων σωματίων είναι η συνέκφραση μοριακών σαπερονών. Η σαπερόνη DnaK (οικογένεια σαπερονών Hsp70) εμποδίζει το σχηματισμό εγκλείστων σωματίων με την μείωση της συσσωμάτωσης και την προώθηση της πρωτεόλυσης λανθασμένα

αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Το διπλό σύστημα σαπερόνης των DnaK και ClpB (οικογένεια σαπερονών Hsp100) διαμεσολαβεί την διαλυτοποίηση ή από-συσσωμάτωση των πρωτεϊνών. Η GroEL (οικογένεια σαπερονών Hsp60) κατευθύνει τις διεργασίες μετάπτωσης της πρωτεΐνης μεταξύ διαλυτής και αδιάλυτης μορφής και συμμετέχει θετικά στην απο-συσσωμάτωση από τα έγκλειστα σωμάτια. Οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ LbpA & LbpB προστατεύουν θερμικά-αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες από μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση και έχουν ανιχνευθεί στα έγκλειστα σωμάτια (Εικ. 2.1). Τέλος, μια τρίτη στρατηγική αφορά τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων τροποποιημένων κυτταρικών σειρών *E.coli* οι οποίες επιτρέπουν την υπερέκφραση δύσκολων πρωτεϊνών που είτε αδυνατούν να εκφραστούν σε διαλυτή μορφή ή είναι μεμβρανικές (C41(DE3) & C43(DE3), Avidis) (Sorensen & Mortensen 2005).



Εικ. 2.1. Πρωτεϊνική αναδίπλωση και έκκριση στην *E. coli*. Υποδεικνύονται τα μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανσυνδυασμένη έκφραση, έκκριση και στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Πηγή: Sorensen & Mortensen, 2005

2.2.2 Έκφραση πρωτεϊνών από το ετερόλογο σύστημα της *Escherichia coli*

Περίπου το 80% των πρωτεϊνών των οποίων οι τρισδιάστατες δομές έχουν αναλυθεί και κατατεθεί στην πρωτεϊνική τράπεζα δεδομένων το έτος αναφοράς 2003 παρήχθησαν στην *E. coli* (Sorensen & Mortensen 2005). Η εκτενής γνώση της γενετικής και της μοριακής βιολογίας αυτού του βακτηρίου το καθιστούν πολύτιμο

εργαλείο για την υπερπαραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Δεν εκλείπουν όμως και βασικά μειονέκτηματα στη χρήση του, όπως είναι η αδυναμία ενσωμάτωσης σπανίων κωδικονίων στην ετερόλογη πρωτεΐνη (βλέπε παρακάτω), η αδυναμία του συστήματος να επιτελέσει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες και η μειωμένη ικανότητα σχηματισμού δυσουλφιδικών δεσμών στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα (Jana & Deb 2005).

Η έκφραση στις περισσότερες περιπτώσεις επάγεται με βάση ένα πλασμίδιο έκφρασης σε ένα συμβατό γενετικό περιβάλλον. Τα γενετικά στοιχεία ενός πλασμιδίου έκφρασης είναι η αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής (ori, origin of replication), ένα γονίδιο επιλογής που παρέχει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό, έναν επαγόμενο μεταγραφικό υποκινητή, θέσεις έναρξης της μετάφρασης καθώς και θέσεις λήξης της μεταγραφής και μετάφρασης (Sorensen & Mortensen 2005).

Στοιχεία έναρξης της αντιγραφής (ori)

Οι περισσότεροι φορείς που χρησιμοποιούνται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών φέρουν τα στοιχεία έναρξης της αντιγραφής ColE1 ή p15A. Το ColE1 υπάρχει στα πρόσφατα αναπτυγμένα πλασμίδια έκφρασης και προέρχεται από την οικογένεια πλασμιδίων pBR322 ή pUC ενώ το p15A προέρχεται από το pACYC184. Πλασμίδια με το ίδιο στοιχείο έναρξης της αντιγραφής αδυνατούν να διατηρηθούν σταθερά μέσα στο ίδιο κύτταρο και για το λόγο αυτό καλούνται ασύμβατα πλασμίδια. Για την συνέκφραση γονιδιακών προϊόντων θα πρέπει άρα να χρησιμοποιούνται πλασμίδια με διαφορετικά στοιχεία έναρξης της αντιγραφής και διαφορετικές ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά. Τα στοιχεία ColE1 και p15A και τα παράγωγά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε δοκιμές συνέκφρασης καθώς είναι συμβατά μεταξύ τους.

Υποκινητής

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια έκφρασης απαιτείται να έχουν ισχυρά επαγόμενους υποκινητές για την ρύθμιση υψηλών επιπέδων έκφρασης. Η βασική μεταγραφική δραστηριότητα απουσία του επαγωγέα μειώνεται με την παρουσία του καταστολέα. Η μεταγραφική αυτή καταστολή απουσία συνθηκών επαγωγής είναι βασική ειδικά όταν το εκφραζόμενο προϊόν εισάγει τον ξενιστή σε συνθήκες στρες και οδηγεί σε πλασμιδιακές απώλειες. Η επαγωγή του υποκινητή είναι συνήθως χημική ή θερμική ενώ ο πιο κοινός χημικός επαγωγέας είναι το σάκχαρο ισοπροπυλ-θειογαλακτοπυρανοσίνη (IPTG).

Στοιχεία έναρξης/λήξης μεταγραφής/μετάφρασης

Η έναρξη της μετάφρασης απαιτεί την παρουσία μιας θέσης πρόσδεσης του ριβοσώματος (rbs) η οποία περιέχει την αλληλουχία Shine Dalgarno (SD, βέλτιστη αλληλουχία η -UAAGGAGG-) και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Η αλληλουχία SD εντοπίζεται 7 ± 2 νουκλεοτίδια ανοδικά του κωδικονίου έναρξης (AUG) και αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του 16S rRNA κατά την έναρξη της μετάφρασης. Η δευτεροταγής δομή της θέσης πρόσδεσης του ριβοσώματος είναι κρίσιμης σημασίας για την έναρξη της μετάφρασης και η αποδοτικότητά του βασίζεται σε αυξημένα ποσοστά βάσεων αδενίνης και θυμίνης (Jana & Deb 2005). Η απόδοση της έναρξης της μετάφρασης επηρεάζεται από το πρώτο κωδικόνιο μετά το κωδικόνιο έναρξης, ενώ η αδενίνη είναι άφθονη στα υψηλά εκφραζόμενα γονίδια. Οι αλληλουχίες λήξης της μεταγραφής σταθεροποιούν το mRNA με το σχηματισμό αναχαιτιστικού βρόγχου στο 3' άκρο του. Η λήξη της μετάφρασης διαμεσολαβείται

κατά κύριο λόγο από το κωδικόνιο UAA στην *E.coli*, ενώ αυξημένη απόδοση της λήξης επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση πολλαπλών κωδικονίων λήξης ή του επιμηκυμένου κωδικονίου λήξης UAAU.

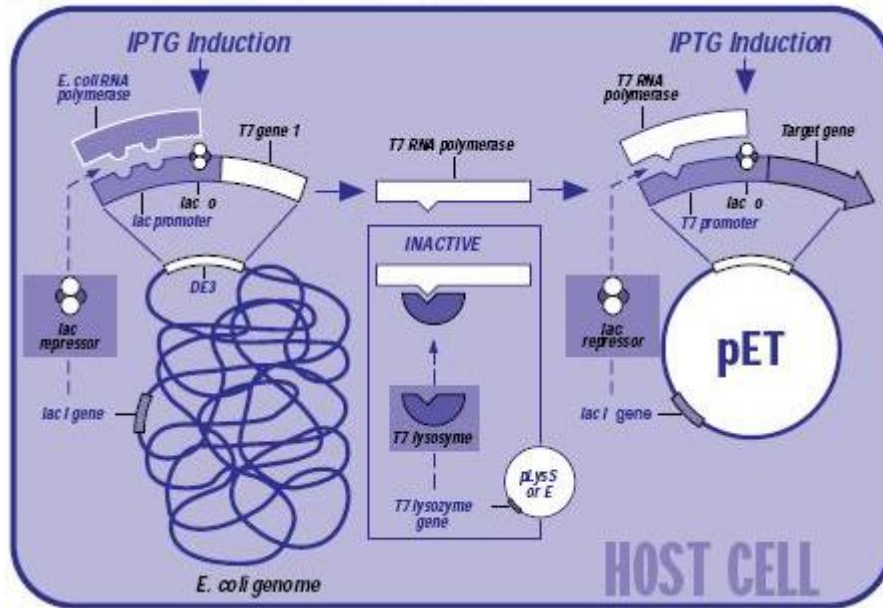
Πλασμιδιακά συστήματα έκφρασης

Το πιο πολυχρησιμοποιημένο πλασμιδιακό σύστημα έκφρασης μέχρι σήμερα είναι η οικογένεια πλασμιδίων pET (Novagen) (Εικ. 2.2). Το σύστημα περιλαμβάνει υβριδικούς υποκινητές, πολλαπλές θέσεις κλωνοποίησης για την ενσωμάτωση πολλαπλών συντηγμάτων-ετικετών στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη καθώς επίσης και θέσεων αποκοπής τους από εξειδικευμένες πρωτεάσες. Η έκφραση απαιτεί κύτταρα ξενιστές λυσογενή για το φαγικό γονίδιο DE3 το οποίο κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5, ο οποίος επάγεται με IPTG. Ο καταστολέας LacI καταστέλλει τον υποκινητή lacUV5 όπως επίσης και τον υβριδικό υποκινητή T7/lac που βρίσκεται στο πλασμίδιο έκφρασης. Ένα αντίγραφο του γονιδίου lacI εδράζεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα ενώ ένα δεύτερο εντοπίζεται σε πολλά πλασμίδια της σειράς pET. Όταν το IPTG προσδεθεί στον τετραμερή LacI προωθεί την απελευθέρωσή του από τον χειριστή lac και αποτέλεσμα αυτού είναι η έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία γίνεται διαθέσιμη για τη μεταγραφή του ανασυνδυασμένου γονιδίου επί του πλασμιδίου έκφρασης, από το οποίο ομοίως έχει απελευθερωθεί ο καταστολέας LacI λόγω πρόσδεσης του επαγωγέα IPTG (Mierendorf et al. 1994, The pET system tutorial, Novagen 2002-2003). Ο υποκινητής T7 είναι μια αλληλουχία 20 βάσεων που δεν αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση της *E. coli*. Η T7 RNA πολυμεράση μεταγράφει μεγίστως 230 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο και είναι πέντε φορές ταχύτερη από την RNA πολυμεράση της *E. coli* (50 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο).

Άλλοι φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα θέση είναι της οικογενείας pPROEX. Οι φορείς αυτοί διαφοροποιούνται μεταξύ τους στη δομή του πολυσυνδέτη τους και προσδίδουν μια ετικέτα 6 καταλοίπων ιστιδίνης στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να αποκοπεί με χρήση της πρωτεάσης TEV. Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιείται από τον υποκινητή trc με την προσθήκη IPTG (ο υποκινητής trc είναι υβριδικός και προέρχεται από τους υποκινητές trp και lac) με τη συνδρομή του χειριστή lac. Η μεταγραφή του ανασυνδυασμένου γονιδίου γίνεται από την RNA πολυμεράση της *E. coli* (Polayes 1996).

Κυτταρικές σειρές έκφρασης

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην έκφραση πρέπει να είναι απενεργοποιημένες ως προς την παρουσία των πιο επιζήμιων φυσικών πρωτεασών, να διατηρούν σταθερά το πλασμίδιο έκφρασης και να φέρουν τα γενετικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για το σύστημα έκφρασης (πχ φαγικό θραύσμα DE3). Τέτοιο στέλεχος βακτηρίων *E. coli* είναι το BL21, το οποίο έχει αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικό σε συστηματικές εφαρμογές ανασυνδυασμένης έκφρασης. Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται γρήγορα σε ελάχιστο θρεπτικό και είναι μη παθογόνα για τον άνθρωπο. Επίσης είναι παροπλισμένα για τις πρωτεάσες Lon & OmpT που δύνανται να διαταράξουν την απομόνωση άθικτης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί πολλά παράγωγα των κυττάρων BL21 που φέρουν διαφοροποιημένο γενετικό υπόβαθρο για την βελτίωση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου.



Εικ. 2.2. Τα στοιχεία ελέγχου του συστήματος pET. Πηγή: the pET system tutorial

Σταθερότητα του mRNA του ανασυνδυασμένου γονιδίου

Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται συν τοις άλλοις και από τον ρυθμό αποδόμησης του μηνυματοφόρου RNA. Ο μέσος χρόνος ημιζωής ενός μορίου mRNA στην *E. coli* κυμαίνεται από μερικά δευτερόλεπτα έως 20 λεπτά στους 37 °C. Τα μόρια mRNA αποδομούνται από τα ένζυμα RNase II, PNPase και RNase E. Η προστασία των μορίων mRNA από τα αποδομητικά ένζυμα εξαρτάται από την αναδίπλωσή τους, την προστασία τους από τα ριβοσώματα και την τροποποίησή τους με πολυαδενυλίωση. Η τελευταία, εντοπίζεται στο 3' άκρο του mRNA και αποτελεί σινιάλο προσέλκυσης των ενζύμων RNase II και PNPase. Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες κυτταρικές σειρές έκφρασης μεταλλαγμένες για το γονίδιο της RNase E που ενισχύουν την σταθερότητα του ανασυνδυασμένου mRNA ενώ προς την κατεύθυνση αυτή συνεισφέρει και η επιλογή θέσεων πρόσδεσης του ριβοσώματος που δεν λαμβάνουν απαγορευτικές δευτεροταγείς διαμορφώσεις και έτσι επιτρέπουν την άμεση πρόσδεση των ριβοσωμάτων που θα προστατεύσουν το mRNA από την αποδόμηση.

Η παρεμβολή σπανίων κωδικονίων στη βιοσύνθεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Κωδικόνια σπάνια για την *E. coli* είναι συχνά άφθονα σε ετερόλογα γονίδια από πηγές όπως ευκαρυωτικά κύτταρα, αρχαιοβακτήρια και άλλους μακρινούς εξελικτικά οργανισμούς με διαφορετικές προτιμήσεις χρήσης κωδικονίων. Η έκφραση γονιδίων που περιέχουν σπάνια κωδικόνια οδηγεί σε μεταφραστικά λάθη ως αποτέλεσμα ακινητοποίησης του ριβοσώματος σε θέσεις που απαιτούν ενσωμάτωση αμινοξέων συζευγμένων με τα -αντίστοιχα- ανεπαρκή αριθμού μόρια tRNA.

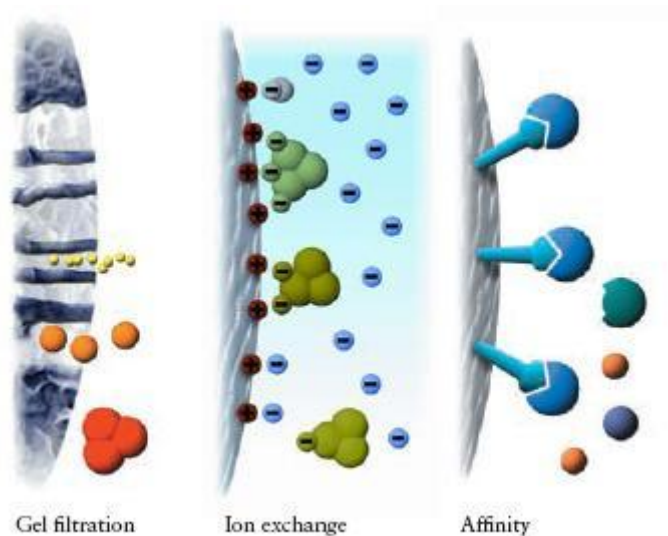
Μεταφραστικά λάθη που προκύπτουν σε τέτοιες περιπτώσεις είναι αντικαταστάσεις αμινοξέων, γεγονόςτα αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης ή πρόωρη λήξη της μετάφρασης. Τα πιο προβληματικά κωδικόνια είναι τα AGA, AGG, CGG, CGA, CGG (κωδικοποιούν για αργινίνη), το AUA (κωδικοποιεί για ισολευκίνη), το GGA (κωδικοποιεί για γλυκίνη), το CUA (κωδικοποιεί για λευκίνη), το CCC (κωδικοποιεί για προλίνη) και το AAG (κωδικοποιεί για λυσίνη). Η μεγαλύτερη προσοχή δίνεται στα σπάνια κωδικόνια AGA, AGG της αργινίνης, που αντιπροσωπεύονται στην *E. coli* σε συχνότητες ~0.14 με 0.21% αντιστοίχως. Δυο εναλλακτικές στρατηγικές χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της σπανιότητας κωδικονίων. Η μια προσέγγιση αφορά την αλλαγή με ενσωμάτωση σημειακών μεταλλαγών της αλληλουχίας-στόχος ώστε να αποτελείται από κωδικόνια που αφθονούν στο βακτήριο ξενιστής. Η δεύτερη αφορά το συμμετασχηματισμό των βακτηρίων με συμβατά πλασμίδια που κωδικοποιούν για τα σπάνια tRNA (Novy et al. 2001).

Τεχνολογία συντηγμάτων και αποκοπής ετικετών με εξειδικευμένες πρωτεάσες

Στις πρωτεΐνες σύντηξης (ή χιμαιρικές πρωτεΐνες) συνήθως περιλαμβάνεται ένα πεπτίδιο «σύντροφος» ή «ετικέτα», συντηγμένη με την πρωτεΐνη-στόχο, ενώ μεταξύ τους συχνά παρεμβάλλεται μια αλληλουχία αναγνώρισης από εξειδικευμένη πρωτεάση. Οι περισσότερες τέτοιες συνοδές αλληλουχίες χρησιμοποιούνται για τη διενέργηση πρωτοκόλλων καθαρισμού συγγένειας. Τα μεγάλα πεπτίδια-ετικέτες προσφέρουν και *in vivo* πλεονέκτημα, καθώς με την πιθανή δράση τους ως σαπερόνες μπορεί να προστατεύουν την πρωτεΐνη-στόχος από την ενδοκυτταρική πρωτεόλυση, με την αυξημένη διαλυτότητά τους να προάγουν τη διαλυτότητά της ή τέλος να χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες ανίχνευσης. Συχνά χρησιμοποιούμενες ετικέτες συγγένειας είναι η ετικέτα ιστιδινών (His-tag) που χρησιμεύει σε μεθόδους χρωματογραφίας συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (νικελίου), η ετικέτα της S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST-tag) που χρησιμεύει για τον καθαρισμό από στήλες γλουταθειόνης και η ετικέτα της πρωτεΐνης πρόσδεσης της μαλτόζης (MBP) που χρησιμοποιείται σε στήλες συγγένειας αμυλόζης. Η πρωτεΐνη MBP δρα ως ενισχυτής της διαλυτότητας της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης και προτιμάται για την υπερέκφραση στόχων επιρρεπών στη συσσωμάτωση. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι πιθανόν να δρα ως σαπερόνη για το συνοδό της μόριο, μέσω αλληλεπιδράσεων με εκτεθειμένες επικράτειες «hot spot» στην επιφάνειά της, οι οποίες σταθεροποιούν την ειδιάλως αδιάλυτη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Τυπικά είναι επιθυμητή η απομάκρυνση της ετικέτας μετά την απομόνωση του συντήγματος. Για το λόγο αυτό συνήθως οι φορείς έκφρασης φέρουν ενσωματωμένη μεταξύ της ετικέτας και της πρωτεΐνης μια θέση αναγνώρισης εξειδικευμένης πρωτεάσης. Εκτενώς χρησιμοποιούνται δυο πρωτεάσες σερίνης που ανήκουν στο ευκαρυωτικό μονοπάτι θρόμβωσης του αίματος, ο παράγοντας Xa και η θρομβίνη. Ο πρώτος αναγνωρίζει την αλληλουχία IEGR/X όπου X μπορεί να είναι οποιοδήποτε κατάλοιπο εκτός αργινίνης και προλίνης, ενώ η θρομβίνη αναγνωρίζει την αλληλουχία LVPR/G. Τέλος, εκτενώς χρησιμοποιείται τελευταία και η πρωτεάση TEV (tobacco etch virus protease) η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία ENLYFQ/G.

2.3 Μέθοδοι χρωματογραφίας για την απομόνωση ετερόλογα εκφρασμένων πρωτεϊνών



Εικ. 2.3. Αρχές διαχωρισμού για τις εξεταζόμενες μεθόδους χρωματογραφίας. Πηγή: Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods, 2004

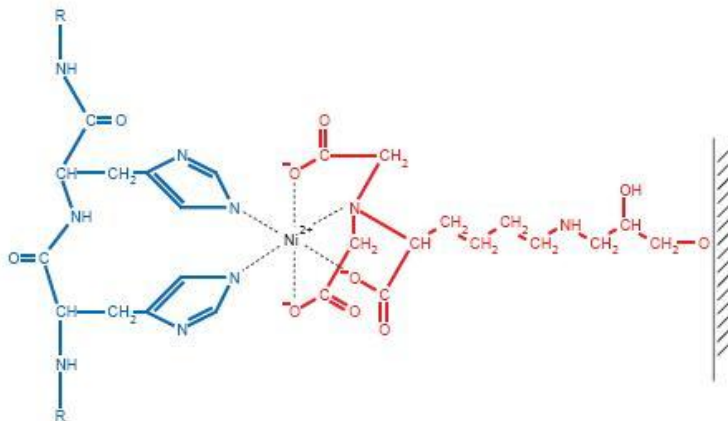
2.3.1 Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένου μετάλλου χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό πρωτεϊνών πρώτη φορά στα 1975 με τη χρήση του χηλικού παράγοντα ιμινοδιοξικό οξύ (iminodiacetic acid, IDA), ο οποίος ήταν φορτισμένος με ιόντα μετάλλου όπως Zn^{2+} , Cu^{2+} , or Ni^{2+} . Σήμερα σε αρκετές περιπτώσεις απομόνωσης πρωτεϊνών φερουσών ετικέτες ιστιδίνης χρησιμοποιείται ο παράγοντας NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ) φορτισμένος με ιόντα νικελίου (Qiagen). Ο παράγοντας αυτός είναι ένας προσροφητής τεσσάρων ιόντων και καταλαμβάνει τις τέσσερις από τις έξι θέσεις πρόσδεσης στη σφαίρα συντεταγμένων του ιόντος νικελίου, αφήνοντας ελεύθερες τις υπόλοιπες δυο να αλληλεπιδράσουν με την ετικέτα ιστιδίνης (Εικ. 2.4). Το υλικό Ni-NTA σε μια από τις εμπορεύσιμες μορφές του απαντάται προσδεδεμένο σε σφαιρίδια Sepharose CL-6B (Ni-NTA Agarose, Qiagen) και χρησιμοποιείται ευρέως για τους σκοπούς απομόνωσης συντηγμένων με ετικέτες ιστιδινών πρωτεΐνες (The Qiaexpressionist, 2003).

Η ετικέτα ιστιδινών

Η ετικέτα ιστιδινών προωθεί την πρόσδεση του συντήγματος στο φέρον ιόντα νικελίου υλικό χρωματογραφίας συγγένειας. Είναι μικρή και αφόρτιστη σε pH 8.0 και συνήθως δεν παρεμβάλλεται με την αναδίπλωση, τη δομή και τη λειτουργία της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Επιτρέπει την πρόσδεση της πρωτεΐνης σε επιφάνειες για τη διενέργηση πειραμάτων σάρωσης πρωτεϊνικών συστοιχιών, φασματοσκοπίας συντονισμού επιφάνειας πλάσματος κλπ. και τέλος επιτρέπει την ανίχνευση της (και

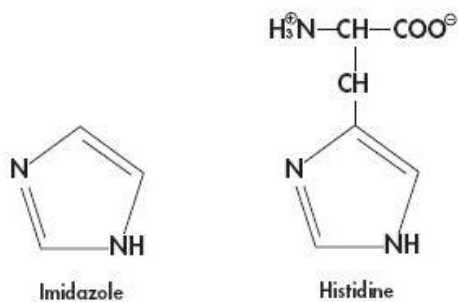
ως εκ τούτου και της συντηγμένης με αυτήν πρωτεΐνης) με τη χρήση αντισωμάτων anti-His.



Εικ. 2.4. Αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών καταλοίπων της ετικέτας ιστιδινών και της μήτρας Ni-NTA. Πηγή: The Qiaexpressionist, 2003

Απομόνωση

Η απομόνωση συντηγμάτων His-πρωτεϊνών από στήλη συγγένειας νικελίου μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές (native) ή αποδιατακτικές (denaturing) συνθήκες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες παρατηρείται συχνά η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών του κυτταρικού συστήματος έκφρασης μαζί με την πρωτεΐνη-στόχος. Για το λόγο αυτό συνήθως στα διαλύματα λύσης και πλύσης προστίθεται χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Ο δακτύλιος του μορίου του ιμιδαζολίου είναι μέρος της δομής του μορίου της ιστιδίνης. Τα κατάλοιπα ιστιδίνης αλληλεπιδρούν με το δακτύλιό τους με τα ιόντα νικελίου. Το ίδιο κάνει και το ιμιδαζόλιο με το δικό του δακτύλιο, και σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεν συναγωνίζεται τα κατάλοιπα ιστιδίνης στην πρόσδεσή τους αλλά μπορεί και εκτοπίζει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τα ιόντα νικελίου (Εικ. 2.5). Έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών πραγματοποιείται με αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε υψηλά επίπεδα (100-250mM), οπότε οι His-πρωτεΐνες αδυνατούν πια να ανταγωνιστούν το ιμιδαζόλιο για τις θέσεις πρόσδεσης του υλικού χρωματογραφίας και εκλύονται από τη στήλη (The Qiaexpressionist, 2003).



Εικ. 2.5. Χημικές δομές του καταλοίπου της ιστιδίνης και του μορίου του ιμιδαζολίου. Πηγή: The Qiaexpressionist, 2003

Απομόνωση υπό φυσιολογικές ή αποδιατακτικές συνθήκες;

Στην περίπτωση που η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος είναι επιθυμητό να διατηρήσει την τριτοταγή της δομή και άρα τη λειτουργία της ή την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες, η απομόνωση οφείλει να πραγματοποιηθεί σε φυσιολογικές συνθήκες. Η εικόνα περιπλέκεται εάν η πρωτεΐνη δεν δύναται να εκφραστεί σε διαλυτή μορφή ή η ετικέτα ιστιδινών κρύβεται στην εσωτερική δομή της πρωτεΐνης κατά την αναδίπλωσή της, οπότε θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αποδιατακτικός καθαρισμός του συντήγματος και αναδίπλωσή του κατόπιν, όπου αυτό είναι δυνατό. Μη προσβάσιμες ετικέτες ιστιδινών μπορούν πάντα να μεταφερθούν στο άλλο άκρο της πρωτεΐνης, προσέγγιση που συχνά λύνει το πρόβλημα του καθαρισμού του συντήγματος.

Απομόνωση υπό φυσιολογικές συνθήκες

Δεν υπάρχει κάποιο γενικό και αποτελεσματικό σε κάθε περίπτωση πρωτόκολλο για την απομόνωση His-πρωτεϊνών υπό φυσιολογικές συνθήκες καθώς υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση στη δομή τους κατά περίπτωση, η οποία δομή μπορεί να παρεμβληθεί στη διαδικασία πρόσδεσης. Γενικά, τα σημεία προσοχής είναι τα παρακάτω.

- Τα κύτταρα πρέπει να λύνονται ήπια με υπερήχους, ομογενοποίηση ή λυσοζύμη και για την αποφυγή φαινομένων αποδόμησης τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται πάντα στους 0–4 °C και να εμπλουτίζονται σε αναστολείς πρωτεασών.
- Μη ειδική πρόσδεση άσχετων πρωτεϊνών στο υλικό χρωματογραφίας μπορεί να συμβαίνει επειδή α) οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν γειτονικά κατάλοιπα ιστιδίνης που μπορεί να μιμούνται την ετικέτα ιστιδινών της πρωτεΐνης-στόχος (περίπτωση σπάνια σε βακτηριακές πρωτεΐνες), β) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-στόχος (με ιοντικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή δισουλφιδικούς δεσμούς) και συγκρατούνται μαζί της επί της στήλης. Τέτοια φαινόμενα καταπολεμώνται με την προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου στα διαλύματα λύσης και πλύσης, με την διατήρηση της ιοντικής ισχύος σε υψηλά επίπεδα όταν αυτό δεν έρχεται σε σύγκρουση με τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης-στόχος, με την προσθήκη αναγωγικού μέσου πχ β-μερκαπτοαιθανόλης για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ή με την προσθήκη χαμηλών συγκεντρώσεων απορρυπαντικού.

Απομόνωση υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Πρωτεΐνες εγκλωβισμένες σε έγκλειστα σωματίδια μπορούν να παραληφθούν με χρήση ισχυρών αποδιατακτικών μέσων όπως 6 M υδροχλωρική γουανιδίνη ή 8 M ουρία. Υπό τις συνθήκες αυτές, η ετικέτα ιστιδινών είναι πλήρως προσβάσιμη από τα ιόντα νικελίου και η μη ειδική πρόσδεση καταστέλλεται σημαντικά. Στις περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητο, μπορεί να γίνει απομάκρυνση του αποδιατακτικού μέσου επί της στήλης νικελίου πριν την έκλυση της πρωτεΐνης, αν και αυτή η προσέγγιση επαναδιάταξης δεν μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλες τις περιπτώσεις.

2.3.2 Χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής διαχωρίζει τα μόρια βάσει των διαφορών τους στο καθαρό επιφανειακό τους φορτίο. Οι διάφορες πρωτεΐνες διαφέρουν σημαντικά στο φορτίο τους και εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης με το φορτισμένο υλικό χρωματογραφίας, ανάλογα με τις διαφορές στο συνολικό τους φορτίο, στην πυκνότητα του φορτίου και στην κατανομή του φορτίου επί της επιφάνειάς τους. Οι φορτισμένες ομάδες ενός μορίου που συμβάλλουν στο καθαρό επιφανειακό φορτίο του κατέχουν διαφορετικές τιμές pK ανάλογα με τη δομή και το χημικό μικρο-περιβάλλον τους. Καθώς όλα τα μόρια με ιοντισμένες ομάδες μπορούν να τιτλοδοτηθούν, το καθαρό επιφανειακό τους φορτίο εξαρτάται κατά πολύ από την τιμή του pH. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών οι οποίες αποτελούνται από πολλά διαφορετικά αμινοξέα που περιέχουν ασθενείς όξινες και βασικές ομάδες, το συνολικό επιφανειακό τους φορτίο θα αλλάζει σταδιακά καθώς το pH του περιβάλλοντος μεταβάλλεται. Κάθε πρωτεΐνη διαθέτει τη δική της μοναδική σχέση καθαρού φορτίου – pH, και αυτή η σχέση αποτυπώνεται ως καμπύλη τιτλοδότησης. Η καμπύλη αυτή αντικατοπτρίζει τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται το ολικό καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης σε σχέση με το pH του περιβάλλοντος. Η χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής εκμεταλλεύεται την ύπαρξη της μοναδικής σχέσης καθαρού επιφανειακού φορτίου – pH για κάθε πρωτεΐνη. Σε μια τέτοια χρωματογραφία οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων πρωτεϊνών και του αντίθετα φορτισμένου υλικού χρωματογραφίας ελέγχονται ώστε να ευνοούν την πρόσδεση ή την έκλυση συγκεκριμένων μορίων και έτσι να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Μια πρωτεΐνη που δε διαθέτει καθόλου φορτίο σε μια τιμή pH ίση με το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI) δεν θα αλληλεπιδράσει με το φορτισμένο υλικό χρωματογραφίας. Ωστόσο, σε τιμές pH πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο η πρωτεΐνη θα προσδεθεί σε ένα θετικά φορτισμένο υλικό (ανιοντο-ανταλλάκτη), ενώ σε τιμές pH κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο θα προσδεθεί σε ένα αρνητικά φορτισμένο υλικό χρωματογραφίας (κατιοντο-ανταλλάκτη) (Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods. 2004).

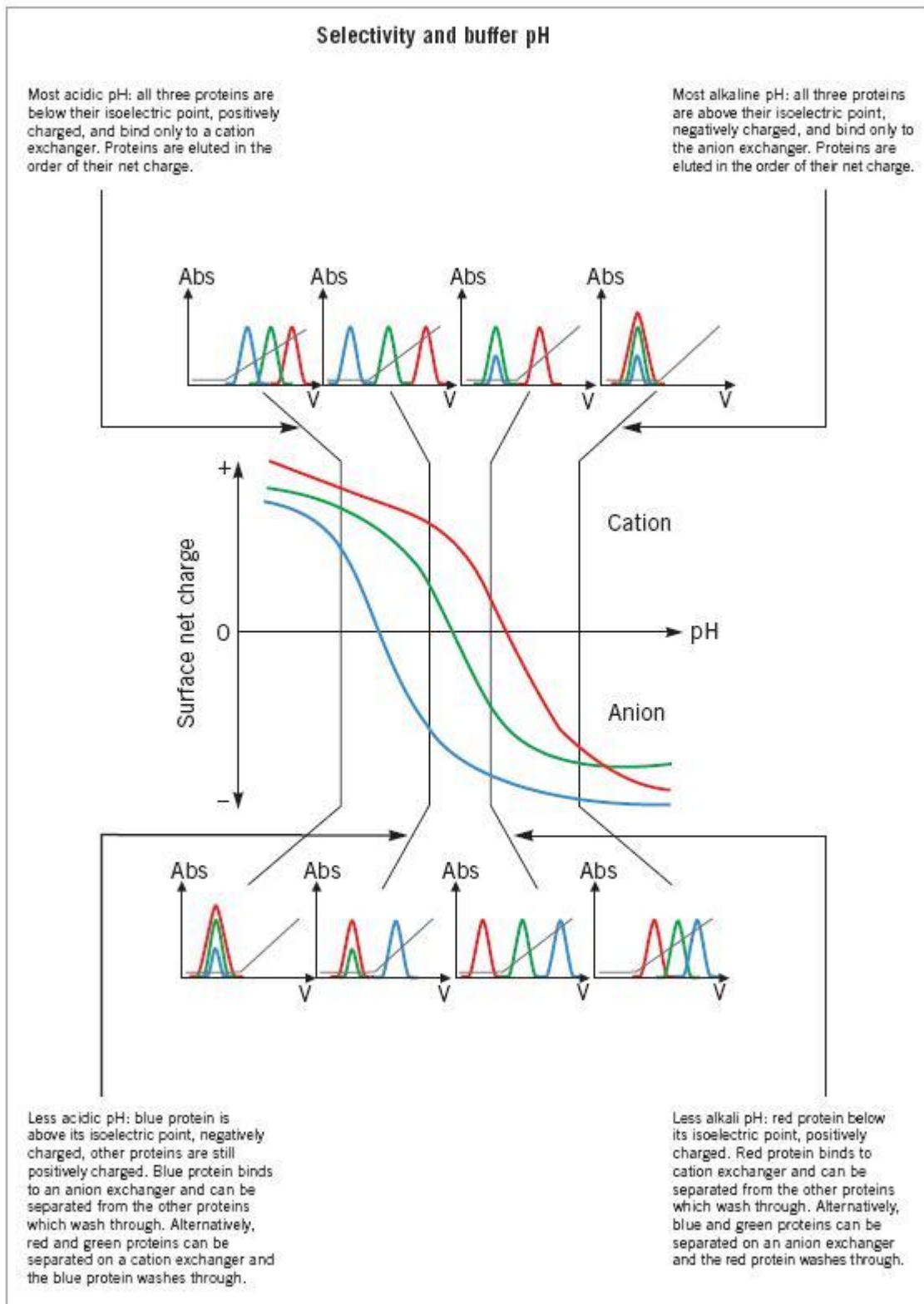
Απομόνωση

Το υλικό χρωματογραφίας ιοντο-ανταλλαγής αποτελείται από μια μήτρα σφαιρικών σωματιδίων υποκατεστημένων με ιοντικές ομάδες που είναι αρνητικά ή θετικά φορτισμένες. Η μήτρα συνήθως είναι πορώδης ώστε να παρέχει μεγάλη εσωτερική επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το δείγμα. Το υλικό πακετάρεται σε στήλες και εξισορροπείται με τον διαλύτη ο οποίος θα γεμίσει τους πόρους της μήτρας και το χώρο μεταξύ των σφαιριδίων. Η τιμή pH και η ιοντική ισχύς του διαλύτη εξισορρόπησης επιλέγονται έτσι ούτως ώστε να διασφαλιστεί ότι όταν το δείγμα θα φορτωθεί, οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος θα προσδεθούν στο υλικό και οι περισσότερες προσμίξεις θα απομακρυνθούν. Όταν όλο το δείγμα φορτωθεί πάνω στη στήλη και η στήλη πλυθεί ώστε να απομακρυνθούν όλες οι μη προσδεδεμένες πρωτεΐνες, οι συνθήκες μεταβάλλονται ώστε να πραγματοποιηθεί η έκλυση των προσδεδεμένων πρωτεϊνών. Συνηθέστερα, οι πρωτεΐνες εκλύονται με αύξηση της ιοντικής ισχύος (συγκέντρωση άλατος) του διαλύτη ή περιστασιακά με αλλαγή της τιμής του pH. Καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει, τα ιόντα άλατος (τυπικά Na^+ or Cl^-) ανταγωνίζονται με τις προσδεδεμένες ομάδες για τα φορτία στην επιφάνεια του υλικού και ένα ή περισσότερα από τα είδη προσδεδεμένων πρωτεϊνών αρχίζουν και εκλύονται από τη

στήλη. Οι πρωτεΐνες με το χαμηλότερο καθαρό φορτίο στη συγκεκριμένη τιμή pH θα είναι οι πρώτες που θα εκλουσθούν καθώς η ιοντική ισχύς αυξάνει. Ομοίως, πρωτεΐνες με το υψηλότερο φορτίο στη συγκεκριμένη τιμή pH θα διατηρηθούν περισσότερο επί της στήλης και θα εκλουσθούν τελευταίες (Εικ. 2.6). Όσο υψηλότερο το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης τόσο υψηλότερη ιοντική ισχύς απαιτείται για να εκλουσθεί. Εναλλακτικά, οι συνθήκες μπορούν να επιλεγούν έτσι ώστε να ενισχυθεί η πρόσδεση των προσμίξεων και να επιτραπεί η διέλευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος από τη στήλη (Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods, 2004).

Λειτουργικές ομάδες

Οι λειτουργικές ομάδες που υποκαθιστούν το χρωματογραφικό υλικό καθορίζουν το φορτίο του δηλαδή αν θα είναι ανιοντο- ή κατιοντο- ανταλλάκτης. Οι όροι ασθενής και ισχυρός αναφέρονται στο βαθμό στον οποίο μεταβάλλεται ο ιοντισμός τους με το pH και όχι στη δύναμη με την οποία οι λειτουργικές ομάδες προσδένουν τις πρωτεΐνες. Οι ισχυροί ιοντοανταλλάκτες δεν δείχνουν διαφοροποίηση στην ικανότητά να προσδένουν τα αντίθετα φορτία με τις αλλαγές του pH καθώς δε λαμβάνουν ή χάνουν πρωτόνια και παραμένουν πλήρως φορτισμένοι σε ένα μεγάλο εύρος pH. Ισχυροί ιοντοανταλλάκτες είναι οι Q (ανιονικοί δηλαδή θετικά φορτισμένοι οι ίδιοι), οι S και οι SP (κατιοντικοί, δηλαδή αρνητικά φορτισμένοι οι ίδιοι). Τέλος, ειδική μνεία γίνεται στο υλικό χρωματογραφίας Q σεφαρόζη (Q Sepharose Fast Flow) η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Το υλικό αυτό είναι ένας ισχυρός ανιοντο-ανταλλάκτης ικανός για αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες όλων των τιμών ισοηλεκτρικού σημείου. Η λειτουργική του ομάδα είναι μια τεταρτοταγής αμίνη η οποία παραμένει πλήρως φορτισμένη σε όλο το εύρος pH που συνήθως χρησιμοποιείται (τιμές 2-12) (Q-sepharose Fast Flow Instructions, 2002).



Εικ. 2.6. Επίδραση του pH στην πρόσδεση και έκλουση των πρωτεϊνών. Πηγή: Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods, 2004

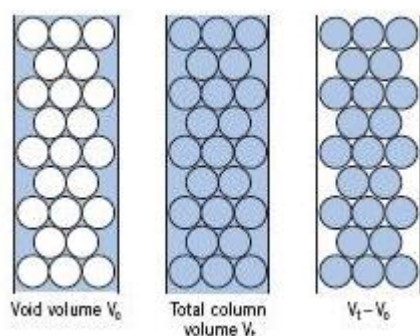
2.3.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης διαχωρίζει τα μόρια βάσει των διαφορών τους σε μέγεθος κατά το πέρασμά τους μέσα από το πακεταρισμένο σε στήλη υλικό διήθησης. Σε αντίθεση με τη χρωματογραφία ιοντο-ανταλλαγής ή συγγένειας, τα μόρια δεν προσδένονται στο υλικό χρωματογραφίας και η σύσταση του διαλύτη δεν επιδρά στην ανάλυση. Για τη διενέργηση ενός διαχωρισμού, το υλικό πακετάρεται σε στήλη. Το υλικό είναι μια πορώδης μήτρα με τη μορφή σφαιριδίων που έχουν επιλεγεί για τη χημική και φυσική σταθερότητά τους όπως επίσης και την αδράνειά τους (έλλειψη αντιδραστικότητας και προσροφητικές ιδιότητες). Το πακεταρισμένο υλικό εξισορροπείται με διαλύτη ο οποίος γεμίζει όλους τους πόρους της μήτρας και το κενό μεταξύ των σφαιριδίων. Το υγρό μέσα στους πόρους καλείται στατική φάση και είναι σε ισορροπία με το υγρό έξω από τα σφαιρίδια που ονομάζεται κινητή φάση.

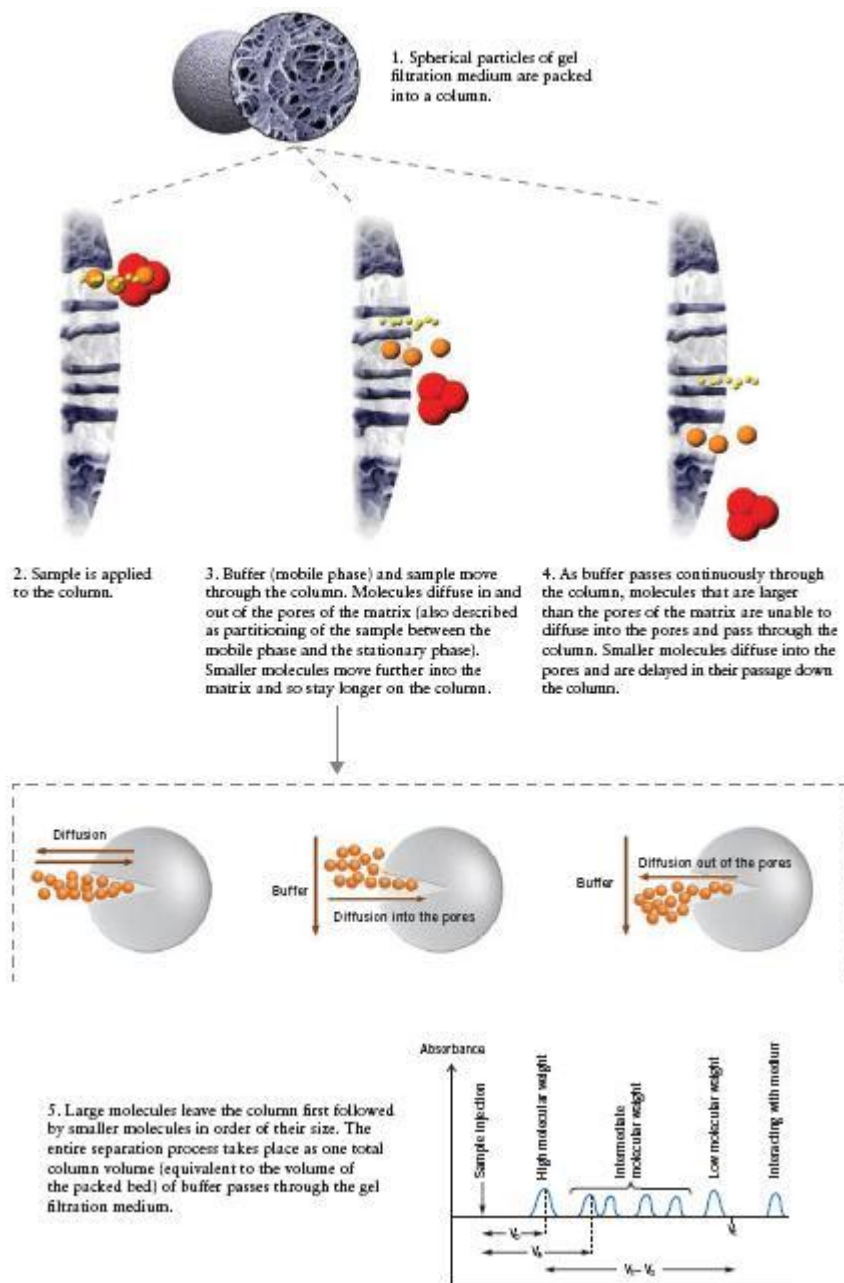
Μια απλή περιγραφή της διαδικασίας διαχωρισμού έχει ως εξής: τα σφαιρίδια του υλικού πακετάρονται σε στήλη και ακολουθεί εξισορρόπηση του υλικού με το διαλύτη. Το δείγμα κατόπιν φορτώνεται στη στήλη και ο διαλύτης κινείται μαζί του μέσα από τη στήλη. Τα μόρια διαχέονται μέσα και έξω από τους πόρους. Τα μικρά μόρια κινούνται μέσα στη μήτρα και μένουν περισσότερο μέσα στη στήλη. Καθώς ο διαλύτης περνά διαρκώς μέσα από τη στήλη τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους του υλικού δεν μπορούν να διαχυθούν μέσα στους πόρους και περνούν από τη στήλη, ενώ τα μικρότερα διαχέονται μέσα στους πόρους και καθυστερούν το πέρασμά τους από τη στήλη. Συνεπώς τα μεγάλα μόρια εκκλύονται νωρίτερα από τα μικρότερα και όλη η διαδικασία λαμβάνει χώρα ωσότου να περάσει από τη στήλη όγκος διαλύτη ίσος με έναν όγκο στήλης (Gel filtration, Principles and Methods, 2002)(Εικ. 2.8).

Διαχωρισμός ομάδων

Η μοριακή διήθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση μικρών μορίων από ένα σύνολο μεγαλύτερων όπως επίσης και ως ένας γρήγορος και απλός τρόπος αλλαγής διαλύτη στο δείγμα. Μικρά μόρια όπως περίσσεια άλατος ή ελεύθερα ισότοπα, ετικέτες κλπ μπορούν να διαχωριστούν εύκολα. Τα πολύ μεγάλα μόρια εκκλύονται στο νεκρό όγκο της κολώνας (V_0) ή πολύ κοντά σε αυτόν. Για μια καλά πακεταρισμένη στήλη ο νεκρός όγκος της στήλης συμπίπτει με το 30% του συνολικού της όγκου. Μικρά μόρια όπως τα άλατα, έχουν πλήρη πρόσβαση στους πόρους και δε διαχωρίζονται μεταξύ τους. Τα μόρια αυτά συνήθως εκκλύονται αμέσως μετά το πέρασμα όγκου διαλύτη ίσου με έναν όγκο στήλης (V_t). Οι πρωτεΐνες ανιχνεύονται βάσει της απορρόφησής τους σε μήκος κύματος ίσο με 280nm, ενώ τα άλατα ανιχνεύονται με την παρακολούθηση της αγωγιμότητας του διαλύτη.



Εικ. 2.7. Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργικών όγκων μιας στήλης μοριακής διήθησης. Πηγή: Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods, 2004



Εικ. 2.8. Η διαδικασία της μοριακής διήθησης. Πηγή: Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods, 2004

Διαχωρισμός υψηλής ανάλυσης

Με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης μπορεί να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός πολλαπλών συστατικών βάσει του διαφορετικού τους μεγέθους. Στόχος μιας τέτοιας προσέγγισης μπορεί να είναι η απομόνωση ενός ή περισσοτέρων συστατικών, ο καθορισμός του μοριακού βάρους τους ή η ανάλυση της κατανομής μοριακών βαρών μέσα σε ένα δείγμα. Καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση αυτή λαμβάνονται όταν το δείγμα έχει μερικώς καθαρισθεί από προηγούμενα στάδια μέσω

άλλων μεθόδων χρωματογραφίας, ώστε να εξαλειφθούν πρωτεΐνες παρόμοιου μεγέθους από την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Όπως και προηγουμένως, τα πολύ μεγάλα μόρια θα εκλουσθούν στον νεκρό όγκο της στήλης, τα πολύ μικρά λίγο μετά το πέρασμα ενός όγκου στήλης διαλύτη ενώ τα μόρια με μερική πρόσβαση στους πόρους της μήτρας θα εκλουσθούν από τη στήλη με φθίνουσα σειρά μεγέθους. Με την επιλογή του μεγέθους των πόρων μέσα στο κάθε σφαιρίδιο και της κατανομής του μεγέθους των σφαιριδίων είναι δυνατή η παραγωγή ενός μεγάλου εύρους μέσων με διαφορετική ικανότητα ανάλυσης. Τα σημερινά υλικά μοριακής διήθησης καλύπτουν ένα εύρος από 100 έως 80 000 000 Da, από πεπτίδια μέχρι πολύ μεγάλες πρωτεΐνες και πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Τα αποτελέσματα της μοριακής διήθησης εκφράζονται συνήθως μέσω του προφίλ έκλουσης ή αλλιώς του χρωματογραφήματος, το οποίο δείχνει την διακύμανση της συγκέντρωσης (τυπικά βάσει απορρόφησης στο UV και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος των 280nm) των συστατικών του δείγματος, καθώς αυτά εκλούνται από τη στήλη βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Η συμπεριφορά κάθε συστατικού μπορεί να εκφραστεί βάσει του όγκου έκλουσής του (V_e), ο οποίος καθορίζεται απευθείας από το χρωματογράφημα. Η έκλουση κάθε συστατικού χαρακτηρίζεται από τη σταθερά κατανομής του K_d η οποία προκύπτει ως εξής. Ο όγκος της κινητής φάσης ισούται με τον νεκρό όγκο V_0 , π.χ. τον όγκο των μορίων που παραμένουν στο διαλύτη επειδή είναι μεγαλύτερα από τους μεγαλύτερους πόρους της μήτρας και περνούν απευθείας από το πακεταρισμένο υλικό. Ο όγκος της στατικής φάσης V_s ισούται με τον όγκο του διαλύτη μέσα στη μήτρα που είναι διαθέσιμος για τα πολύ μικρά μόρια. Καθώς πρακτικά δεν είναι εύκολος ο καθορισμός του V_s , είναι πιο εύκολο να αντικατασταθεί από τον όρο $V_t - V_0$ όπου V_t ο συνολικός όγκος της στήλης. Με τον τρόπο αυτό η στατική φάση αποτελείται από τον όγκο του στερεού υλικού που σχηματίζει τη μήτρα. Η σταθερά K_d αντιπροσωπεύει το τμήμα της στατικής φάσης που είναι διαθέσιμη για τη διάχυση ενός συγκεκριμένου μοριακού είδους. Η στατική φάση V_s αντικαθιστώμενη από τον όρο $V_t - V_0$ μας δίνει άρα την τιμή K_{av} , όπου $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$. Η τιμή K_{av} επονομαζόμενη και ως σταθερά διαχωρισμού συσχετίζεται με το μέγεθος του μορίου. Μόρια παρόμοιου σχήματος και πυκνότητας επιδεικνύουν σιγμοειδή σχέση μεταξύ των τιμών τους K_{av} και του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού τους βάρους (M_r) (Gel filtration, Principles and Methods. 2002).

Καθορισμός μοριακού βάρους και ανάλυση κατανομής μοριακών βαρών

Ο καθορισμός του μοριακού βάρους βάσει της μοριακής διήθησης μπορεί να γίνει με σύγκριση της τιμής K_{av} του μορίου ενδιαφέροντος με τις αντίστοιχες τιμές γνωστών πρωτεϊνών βαθμονόμησης. Προετοιμάζεται συγκεκριμένα η καμπύλη βαθμονόμησης με τη μέτρηση των όγκων έκλουσης διαφόρων γνωστών πρωτεϊνών, υπολογίζοντας κατόπιν τις τιμές K_{av} γι' αυτές και κατασκευάζοντας τη γραφική παράσταση των τιμών K_{av} συναρτήσεως του δεκαδικού λογάριθμου του μοριακού τους βάρους. Το μοριακό βάρος μιας άγνωστης ουσίας μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη βαθμονόμησης αφότου υπολογιστεί η τιμή K_{av} γι' αυτήν με βάση τον υπολογισμό του όγκου έκλουσής της από τη στήλη μοριακής διήθησης.

2.4 Μέθοδοι απομόνωσης πρωτεϊνικών συμπλόκων

2.4.1 Σημασία ανάδειξης πρωτεϊνικών συμπλόκων

Σημαντικός στόχος της σύγχρονης βιολογικής μελέτης αποτελεί ο καθορισμός των βιοχημικών, βιοφυσικών και δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών συμπλόκων ενός οργανισμού. Οι περισσότερες πρωτεΐνες δε λειτουργούν κατά μόνας αλλά συχνά αλληλεπιδρούν με άλλες για την διεκπεραίωση της λειτουργίας τους (πχ. γονιδιακή ρύθμιση, μετάδοση σήματος, έλεγχος κυτταρικού κύκλου, μεταβολισμός, αρχιτεκτονική), με τη μορφή σταθερών ή παροδικών συμπλόκων. Από τη μελέτη ιδιαίτερα των τρισδιάστατων δομών των πρωτεϊνικών συμπλόκων, μπορεί να προκύψει ένας θησαυρός γνώσης σχετικά με τον τρόπο δράσης των επιμέρους πρωτεϊνών των συμπλόκων. Επιπλέον, η γνώση αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι κρίσιμης σημασίας, καθώς η πολυπλοκότητα του γονιδιώματος ενός οργανισμού δεν καθορίζεται από τον αριθμό των γονιδίων του αλλά συσχετίζεται περισσότερο με την πολυπλοκότητα των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που διαθέτει (Shen et al., 2005).

2.4.2 Η δομική βάση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

Η πρόσδεση μεταξύ δυο πρωτεϊνών καθορίζεται από το σχήμα και τη χημεία των αλληλεπιδρώντων επιφανειών δηλαδή την σύσταση σε αμινοξέα και την τριτοταγή δομή τους. Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να συμβούν μεταξύ ομοίων ή διαφορετικών πολυπεπτιδίων (ομο- και ετερο- ολιγομερή) και μπορούν επιπλέον να κατηγοριοποιηθούν σε υποχρεωτικά και μη- υποχρεωτικά σύμπλοκα ή βασισμένες στη διάρκεια ζωής του συμπλόκου σε παροδικές ή μόνιμες αλληλεπιδράσεις. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν, τυπικά φέρουν συμπληρωματικές επιφάνειες και οι δυνάμεις που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση είναι όμοιες με εκείνες που παίζουν ρόλο στην πρωτεϊνική αναδίπλωση: ιοντικές αλληλεπιδράσεις, αλληλεπιδράσεις διπόλου, δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και αλληλεπιδράσεις με διαμεσολαβητή μόρια νερού. Οι ενδιάμεσες επιφάνειες στην περιοχή αλληλεπίδρασης σταθερών συμπλόκων τυπικά φέρουν πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης σε αντίθεση με παροδικά σύμπλοκα που χαρακτηρίζονται από λιγότερες θέσεις επαφής. Άρα, επιπροσθέτως της γνώσης των θερμοδυναμικών και κινητικών ιδιοτήτων ενός ζεύγους αλληλεπίδρασης, η δομική πληροφορία είναι πολύ σημαντική για την κατανόηση της εξέλιξης των δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η συστηματική ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε συνδυασμό με τη δομική πληροφορία θα προσφέρουν εξαιρετική βοήθεια στην ανάπτυξη μεθόδων που θα επιτρέπουν έγκυρες προβλέψεις αλληλεπιδράσεων και των ιδιοτήτων τους (Lalonde et al. 2008).

2.4.3 Μέθοδοι ανάδειξης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

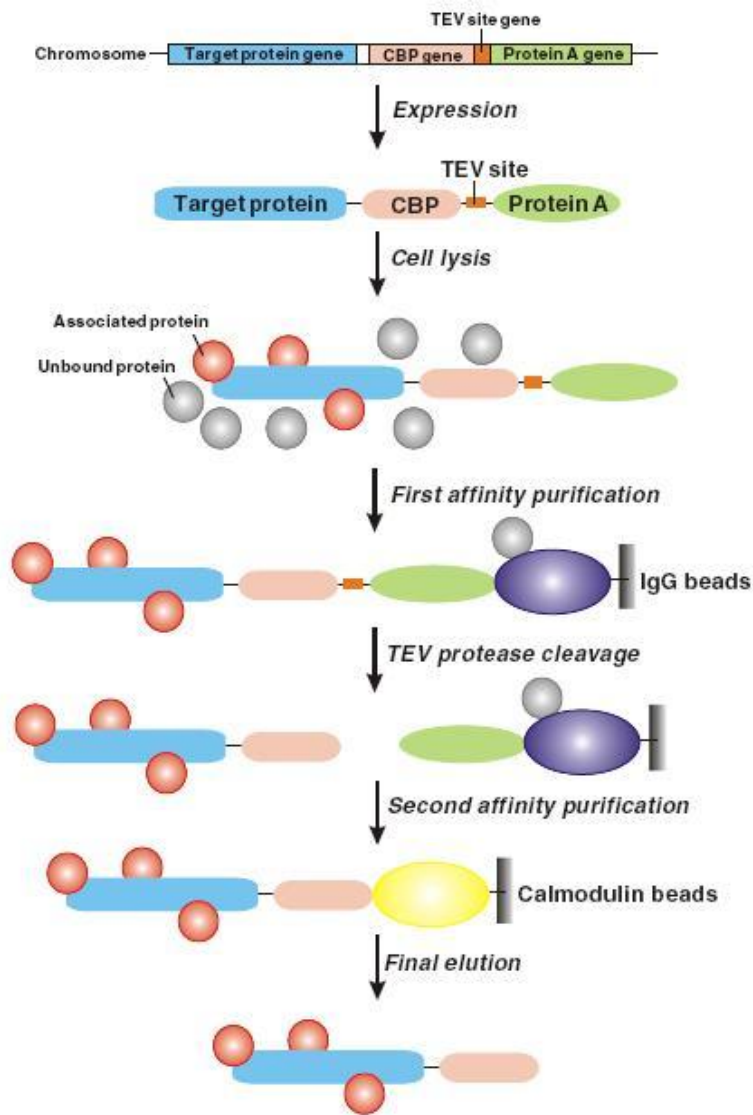
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την ανάδειξη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων όπως περιγράφονται από τις εργασίες ανασκόπησης των ομάδων Kuroda et al (2006), Lalonde et al (2008) και Miernyk et al. (2008) είναι οι παρακάτω:

- Σύστημα δύο υβριδίων στη ζύμη, στα βακτήρια και σε κύτταρα θηλαστικών.
- Συμπληρωματικότητα πρωτεϊνικών θραυσμάτων (σύστημα διαιρεμένης ουβικουιτίνης).
- Σήμανση πρωτεΐνης με ετικέτες συγγένειας και πρόσδεση με αλληλεπιδρώντα μόρια *in vitro* (πχ η μέθοδος TAP: Tandem Affinity Purification, Rigaut et al., 1999, Εικ. 2.9).
- Συν-ανοσοκατακρήμνιση (co-immunoprecipitation).
- Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση με χρήση της αρνητικά φορτισμένης χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 (Blue Native electrophoresis), μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανάδειξη μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων (Wittig & Schagger 2008)(Εικ. 2.10).
- Χημική σύνδεση παροδικών ή ασθενώς αλληλεπιδρώντων μορίων (cross-linking).
- Διαβαθμισμένη ζωνική φυγοκέντρηση (rate zonal centrifugation) για την απομόνωση μεγάλων πολύ-πρωτεϊνικών συμπλόκων.
- Μεταφορά ενέργειας συντονισμένου φθορισμού (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer).
- φασματοσκοπία συντονισμού επιφάνειας πλάσματος (surface plasmon resonance spectroscopy).

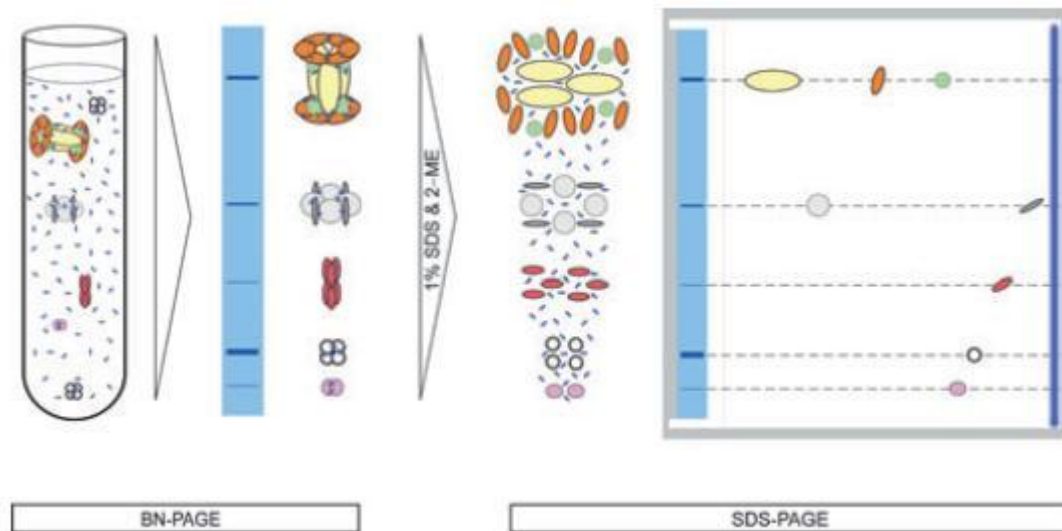
Τα άγνωστα αλληλεπιδρώντα μόρια που αναδεικνύονται από κάποια από τις παραπάνω μεθόδους προωθούνται για πέψεις με τρυψίνη και φασματοσκοπία μάζας για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας και της ταυτότητάς τους. Εναλλακτικά, μπορεί να πραγματοποιηθεί δοκιμή ενζυμικής ενεργότητας, ή αν υπάρχει υποψία για την ταυτότητα τους μπορεί να διενεργηθεί πείραμα ανοσοανίχνευσης.

Μετά την αναγνώριση των αλληλεπιδρώντων μορίων ακολουθούν οι βιοχημικές και βιοφυσικές μελέτες, όπως ποσοτικές αναλύσεις κινητικής, υπολογισμός σταθερών δέσμευσης και αποδέσμευσης, προσδιορισμός των υποπεριοχών που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση μέσω παραγωγής ελλειμμάτων, σημειακών μεταλλαγών κ.α. Τέλος, όπου η υπερέκφραση των συμπλόκων είναι δυνατή μπορεί να διενεργηθεί δομική μελέτη τους όπως υπολογισμός δευτεροταγούς δομής με κυκλικό διχρωισμό, σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες και κρυσταλλογραφία.

Μέχρι σήμερα υπάρχει κατατεθειμένη αρκετή πληροφορία σχετικά με πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που έχουν κατά καιρούς αναδειχθεί και μπορεί κάποιος να αναζητήσει στον παγκόσμιο ιστό (IntAct, bioGRID, BIND, DIP, KEGG, MINT MIPS, TAIR, KDBI). Επίσης έχουν αναπτυχθεί διάφορα ελεύθερης διακίνησης και ανοικτού κώδικα προγράμματα για την απεικόνιση και ανάλυση δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Τα πιο διάσημα από αυτά είναι το Cytoscape και το Osprey.



Εικ. 2.9. Σχηματική αναπαράσταση της μεθοδολογίας TAP. Πηγή: Kuroda et al., 2006



Εικ. 2.10. Διαχωρισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων σε δυο διαστάσεις με χρήση της μεθοδολογίας blue native και ακολούθως ανάλυση σε SDS-PAGE. Τα δείγματα επωάζονται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 για την σταθεροποίηση των εκχυλισμένων μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων και κατόπιν διαχωρίζονται με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Οι ζώνες που ανταποκρίνονται σε κάθε σύμπλοκο αποκόπτονται, επωάζονται σε SDS και αναγωγικό για την αποδιοργάνωση των συμπλόκων και κατόπιν αναλύονται σε SDS-PAGE σε δεύτερη διάσταση. Πηγή: Miernyk & Thelen, 2008

2.4.4 Η συνέκφραση και ο συγκαθαρισμός ως μέθοδος απομόνωσης πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Τα πρώτα σύμπλοκα που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά και δομικά προέκυψαν χάρη στη δυνατότητα ανασύστασης των συμπλόκων από ξεχωριστά, ετερόλογα εκφρασμένες πρωτεΐνες, ενώ συχνά απαιτούνταν αποδιάταξη και επαναδιάταξη κάποιων από αυτές (Johnston et al. 2000, Dzivenu et al., 2004). Ωστόσο, η έκφραση κάποιων πρωτεϊνών απαιτεί την ταυτόχρονη παρουσία της αλληλεπιδράσας πρωτεΐνης για σωστή αναδίπλωση, επαρκή σταθερότητα και βελτιωμένο χρόνο ημιζωής (Tan 2001, Kim et al 2004). Ακόμα και στην περίπτωση που και οι δύο πρωτεΐνες παράγονται σε ικανοποιητικό βαθμό και διαλυτότητα, μπορεί να παρουσιαστεί υψηλή μη ειδική συσσωμάτωση εσωτερικά για κάθε πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει τις ετεροδιμερείς αλληλεπιδράσεις (Dzivenu et al., 2004). Προσφάτως, οι επισφαλείς και λίγο μόνο αποδοτικές αυτές μεθοδολογίες αντικαταστάθηκαν από συστήματα συνέκφρασης των υποψηφίων προς αλληλεπίδραση μορίων είτε από συμβατά πλασμίδια έκφρασης είτε από δι- ή πολυ-κιστρονικούς φορείς έκφρασης, ανεπτυγμένους "οικιακά" από τις ίδιες τις ερευνητικές ομάδες ή πιο πρόσφατα, προμηθευμένους από το εμπόριο.

Οι προσεγγίσεις συνέκφρασης είναι χρήσιμες για εκείνες τις μελέτες όπου η παρουσία της μιας πρωτεΐνης είναι αναγκαία συνθήκη για την διαλυτοποίηση (μέσω σωστής αναδίπλωσης) την αποφυγή της αποδόμησης ή/και την πρόσδεση της δεύτερης (Perez & Gutierrez 1995, Shen et al., 2005). Σε αρκετές περιπτώσεις, η συνέκφραση σαπερονών βελτίωσε την απόδοση παραγωγής μεμονωμένων πρωτεϊνών είτε κατά τη διάρκεια της σύνθεσής τους είτε μέσω επ-αναδίπλωσής τους από την

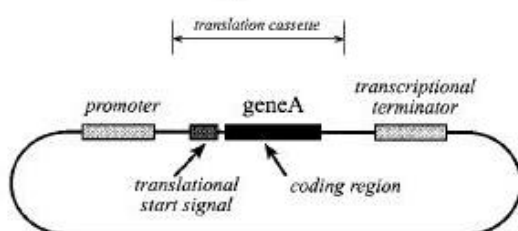
κατάσταση της συσσωμάτωσης (Carrio & Villaverde 2001, de Marco & de Marco 2004). Στην περίπτωση της συνέκφρασης συμπλόκων φαίνεται πως η παρουσία και μόνο των ενδογενών σαπερονών βοηθά στην επιτυχή συνέκφραση, συσώρευση και λειτουργική συν-αναδίπλωση (Tan 2001). Από την άλλη, δεν απαιτείται προηγούμενη απομόνωση των αλληλεπιδρώντων μορίων πριν το σχηματισμό του συμπλόκου, κάτι που κάνει τη διαδικασία απλούστερη και λιγότερο χρονοβόρα (Tan 2001). Επιπλέον, οι προσεγγίσεις native binding & αποδιάταξης/επαναδιάταξης επηρεάζονται από τις διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων και οι συνθήκες πρόσδεσης θα πρέπει να βελτιώνονται για κάθε σύμπλοκο (Shen et al., 2005). Γενικά φαίνεται πως πολλά πολυπεπτίδια μπορούν να εκφραστούν ετερόλογα στην *E.coli* μόνο στην αδιάλυτη μορφή τους και ένα σημαντικό μέρος αυτών ίσως υπάρχουν με τη λειτουργική τους μορφή μόνο στα πλαίσια υποχρεωτικών συμπλόκων. Αν αυτό αληθεύει, υποδεικνύει πως η υπερέκφρασή τους σε διαλυτή μορφή είναι δυνατή μόνο παρουσία των αλληλεπιδρώντων με αυτά μορίων. Παρ' όλα αυτά, η ετερόλογη συνέκφραση πολλαπλών πρωτεϊνών από το ίδιο κύτταρο συνεπάγεται και μια σειρά προβληματισμών, όπως είναι οι μεταβολικοί περιορισμοί που θέτει το κύτταρο καθώς φαίνεται πως οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τις κυτταρικές ύλες και διαδικασίες και πολλές φορές παρατηρείται η υπερέκφραση της μιας εις βάρος της άλλης (de Marco & de Marco 2004). Με άλλα λόγια φαίνεται πως υπάρχει ένα όριο συνολικής ανασυνδυασμένης πρωτεϊνικής έκφρασης που το κύτταρο δεν μπορεί να ξεπεράσει και μοιράζει με τρόπο λιγότερο ή περισσότερο κατανοητό στα ανασυνδυασμένα μόρια (Schweder et al., 2002).

Οι διαφορετικές μεθοδολογίες συνέκφρασης που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα αφορούν την έκφραση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών από α) δύο (ή περισσότερους) συμβατούς φορείς έκφρασης (Perez & Gutierrez 1995, Stebbins et al., 1999, Johnston et al., 2000, de Marco & de Marco 2004, Djivenu et al., 2004, Shen et al., 2005) β) δι- ή ολιγο-κιστρονικό φορέα έκφρασης ενός υποκινητή (έμπροσθεν του πρώτου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης) (Henricksen et al., 1994, Ishiai et al., 1996, Li et al., 1997, Tan 2001,) (Εικ. 2.11) και γ) δι- ή ολιγο-κιστρονικό φορέα έκφρασης με πολλαπλούς υποκινητές (ένας υποκινητής έμπροσθεν του καθενός από τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης) (McNally et al. 1988, Shuman 1990, Humphreys et al. 2002, Kim et al 2004, Duet vectors, Novagen User protocol)(Εικ. 2.12).

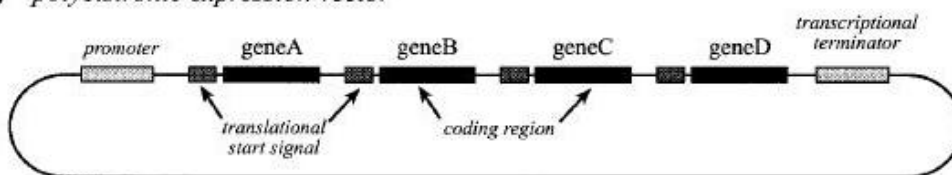
Η έκφραση από συμβατούς φορείς έκφρασης είναι περισσότερο εύχρηστη από την άποψη ότι δίνεται η δυνατότητα ανεξάρτητου ελέγχου των επιπέδων, της χρονικής έναρξης και της διάρκειας πρωτεϊνικής επαγωγής από τον κάθε φορέα ξεχωριστά (Perez & Gutierrez 1995). Επιπλέον, δύο διαφορετικά πλασμίδια έκφρασης επιτρέπουν την εύκολη ανάμιξη και παραγωγή πολλαπλών πρωτεϊνικών συνδυασμών κάτι που συμβάλλει στην ευχρηστία της μεθόδου (Johnston et al. 2000). Αφετέρου, στα μειονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το διπλό (ή πολλαπλό) στρες επί της βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς θα πρέπει να ανταπεξέλθουν σε πολλαπλή, διαφορετική ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (de Marco & de Marco 2004). Επιπλέον, οι φορείς θα πρέπει να διαθέτουν διαφορετικές αλληλουχίες έναρξης της αντιγραφής (ori, ορισμός της πλασμιδιακής «συμβατότητας»), να παράγουν το ίδιο καλά και σε παρόμοιο βαθμό τις πρωτεΐνες του συμπλόκου (Kim et al., 2004). Το τελευταίο μεταφράζεται σε παρόμοιο αριθμό αντιγράφων ανά κύτταρο ώστε να εξισορροπούνται τα ποσοστά έκφρασης των αλληλεπιδρώντων μορίων, ειδικά στις περιπτώσεις εκείνες που η στοιχειομετρία των υπομονάδων παίζει σημαντικό ρόλο για τη δομή και τη λειτουργία του συμπλόκου (Dzivenu et al., 2004).

Η δεύτερη μέθοδος συνέκφρασης αφορά τη χρήση δικιστρονικού συνηθέστερα ή ολιγο-κιστρονικού φορέα έκφρασης ενός υποκινητή (ο οποίος εδράζεται εμπροσθεν του πρώτου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης). Ο δικιστρονικός φορέας μιμείται τη δομή του βακτηριακού οπερονίου που αποτελείται από ένα σύμπλεγμα γονιδίων υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή. Θεωρητικά η έκφραση του δεύτερου γονιδίου θα πρέπει να είναι συγκρίσιμη με αυτήν του πρώτου, καθώς κάθε ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης φέρει άνωθεν του μια θέση ριβοσωμικής πρόσδεσης (rbs). Πρακτικά σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται χαμηλότερη έκφραση του δεύτερου γονιδίου σε σχέση με το πρώτο (Kim et al., 2004). Υποθέσεις που να δικαιολογούν το φαινόμενο έχουν διατυπωθεί και αφορούν διαφορετική μεταφραστική ικανότητα των δύο ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης, διαφορετική σταθερότητα των παραγόμενων πολυπεπτιδίων κλπ. Ένας δικιστρονικός φορέας έκφρασης απαιτεί έναν μόνο μάρτυρα επιλογής σε αντιβιοτικό (Dzivenu et al., 2004). Επίσης, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η σειρά των γονιδίων έκφρασης στο τεχνητό οπερόνιο ίσως παίζει ρόλο στο βαθμό επιτυχούς ανασύστασης του συμπλόκου στην *E. coli*. Για την περίπτωση όπου η διαφορά στα ποσά συσώρευσης των δύο πρωτεϊνών οφείλεται σε διαφορετική μεταφραστική ικανότητα έχει προταθεί η βελτίωση της δευτεροταγούς δομής του μηνύματος mRNA (με την εισαγωγή πχ. απλών μεταλλαγών αντικατάστασης στην 5' μη-μεταφραζόμενη περιοχή) σε περίπτωση που το δεύτερο rbs είναι "κρυμμένο" από το ριβόσωμα (Humphreys et al. 2002). Το πρόβλημα των διαφορετικών επιπέδων έκφρασης των δύο γονιδίων έρχεται να προσπελάσει το σύστημα του δικιστρονικού φορέα με πολλαπλούς υποκινητές, έναν άνωθεν του κάθε ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης (Kim et al., 2004).

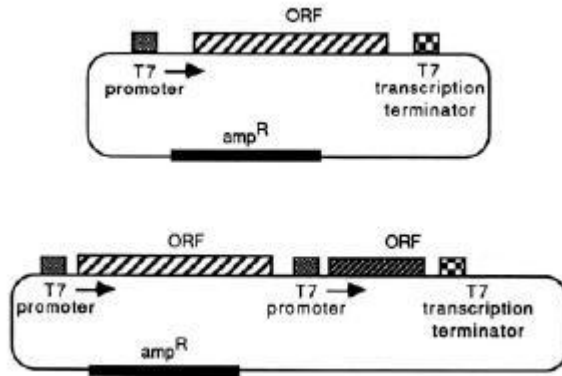
a *monocistronic expression vector*



b *polycistronic expression vector*



Εικ. 2.11. Σύγκριση μονοκιστρονικού (a) και πολυκιστρονικού φορέα έκφρασης μονού υποκινητή (b). (a) Ο μονοκιστρονικός φορέας φέρει μια αλληλουχία έναρξης και λήξης της μεταγραφής. Τα δυο αυτά στοιχεία περιβάλλουν τη μεταφραστική κασέτα που περιέχει την κωδική περιοχή, ανοδικά της οποίας εντοπίζεται η αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης (rbs). Ο πολυκιστρονικός φορέας φέρει μεταξύ των ρυθμιστικών αλληλουχιών της μεταγραφής πολλαπλές μεταφραστικές κασέτες, στο παράδειγμα αυτό τέσσερις και κάθε μια από τις κωδικές περιοχές φέρει ανοδικά τη δική της αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης. Πηγή: Tan, 2001.



Εικ. 2.12. Σύγκριση δομής μονοκιστρονικού (πάνω) και πολυκιστρονικού φορέα έκφρασης δυο υποκινητών (κάτω). Τροποποιημένη εικόνα από την πηγή: Shuman, 1990.

2.4.5 Βασικές αρχές κατασκευής δικιστρονικού φορέα

Ο Tan (2001) διατύπωσε τις βασικές αρχές που θα πρέπει να διέπουν την κατασκευή ενός δικιστρονικού φορέα έκφρασης:

- Ένας δικιστρονικός φορέας για έκφραση στην *E. coli* θα πρέπει να παράγει ένα μετάγραφο RNA το οποίο θα περιέχει την μια πίσω από την άλλη τις δυο κωδικές περιοχές, με την καθεμιά να φέρει άνωθεν του κωδικονίου έναρξης μια θέση πρόσδεσης στο ριβόσωμα (rbs). Η RNA πολυμεράση είναι ένα ένζυμο επεξεργασίας ικανό να παράγει μετάγραφα μεγαλύτερα από 10kb σε μήκος.
- Κάθε μεταφραστική κασέτα θα πρέπει να φέρει ένα rbs, ένα κωδικόνιο έναρξης και ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης.
- Το γονίδιο για κάθε πολυπεπίδιο θα πρέπει να μπορεί να υποκλωνοποιηθεί εύκολα από προϋπάρχοντα πλασμίδια σε καθεμιά από τις κασέτες με ασύμμετρη κλωνοποίηση όπου αυτό είναι δυνατό.
- Ο φορέας έκφρασης θα πρέπει να επιτρέπει όπου αυτό είναι δυνατό την απλή υποκλωνοποίηση τόσο φυσικών μορφών των πρωτεϊνών (χωρίς ετικέτα συγγένειας) όσο και συντήξεών τους με ετικέτες συγγένειας, για τη διενέργηση καθαρισμού συγγένειας του συμπλόκου.
- Το μέγεθος του φορέα έκφρασης θα πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερο για υποβοήθηση της πλασμιδιακής σταθερότητας μέσα στο κύτταρο της *E. coli*.
- Το πιθανό πρόβλημα που προκύπτει ιδίως όταν χρησιμοποιούνται μεγάλα γονίδια είναι αυτά να εμπεριέχουν κάποιο από τα ένζυμα περιορισμού που θα χρησιμοποιηθούν για την υποκλωνοποίηση κάτωθι τους του επόμενου γονιδίου. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί site-directed μεταλλαξιγένεση για την εξάλειψη αυτών των θέσεων μέσα στο πρώτο γονίδιο.

2.5 Κυκλικός διχρωισμός (CD, circular dichroism)

2.5.1 Βασικές αρχές κυκλικού διχρωισμού

Μια δέσμη φωτός χαρακτηρίζεται από χρονομεταβαλλόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία. Εάν το φως πολώνεται περνώντας μέσα από κατάλληλα πρίσματα ή φίλτρα, το ηλεκτρικό πεδίο E θα πολωθεί ημιτονοειδώς σε ένα επίπεδο. Αν το κοιτάξουμε από μπροστά, το ημιτονοειδές κύμα μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα δυο φορέων ομοίου μήκους οι οποίοι αποτυπώνουν κύκλους, από τους οποίους ο ένας περιστρέφεται με τη φορά των δεικτών του ρολογιού (E_R) και ο άλλος αντίστροφα (E_L). Τα δυο κύματα έχουν διαφορά φάσης 90° . Όταν μετά το πέρασμα από ένα δείγμα το αριστερόστροφο & δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως δεν απορροφώνται ή απορροφώνται στον ίδιο βαθμό, ο συνδυασμός τους θα αναγεννήσει το αρχικό πολωμένο φως. Στην περίπτωση όμως που το αριστερόστροφο & δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως απορροφώνται σε διαφορετικούς βαθμούς, παράγεται κύμα φωτός του οποίου το επίπεδο στρέφεται και η πρόσθεση των ανυσμάτων E_R & E_L έχει ως αποτέλεσμα ένα άνυσμα που αποτυπώνει μια έλλειψη. Τότε λέγεται πως το φως πολώνεται ελλειπτικά (Kelly et al. 2005)(Εικ. 2.13).

Ο κυκλικός διχρωισμός (CD, circular dichroism) μετρά αυτή τη διαφορά της απορρόφησης του κυκλικά πολωμένου φωτός και αναφέρεται είτε σε μονάδες ΔE (διαφορά E_R & E_L) ή σε βαθμούς ελλειπτικότητας (θ) (σε μονάδες $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) και αυτή μετρούν τα όργανα του CD. Υπάρχει μια απλή σχέση που συσχετίζει τη διαφορά απορρόφησης ΔE και την ελλειπτικότητα θ , $\theta=3298\Delta E$. Η ελλειπτικότητα ορίζεται αλλιώς ως η γωνία της οποίας η εφαπτομένη ισούται με το λόγο του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης. Το φάσμα του CD παράγεται όταν μετριέται ο διχρωισμός συναρτήσει του μήκους κύματος (Kelly et al. 2005).

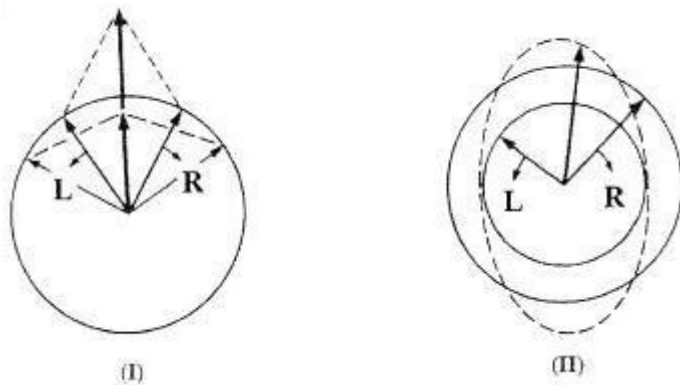
Σήμα κυκλικού διχρωισμού προκύπτει όταν το δείγμα είναι οπτικά ενεργό ή χειρικό, πράγμα που μπορεί να οφείλεται σε έναν από τους παρακάτω λόγους:

i) το χρωμοφόρο είναι χειρικό το ίδιο λόγω δομής, πχ, περιέχει άτομα άνθρακα που φέρουν τέσσερις διαφορετικές υποκαταστάσεις ή δισουλφιδικούς δεσμούς οι οποίοι είναι οπτικά ενεργοί λόγω των διέδρων γωνιών της αλυσίδας ατόμων C-S-S-C,

ii) το χρωμοφόρο είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με ένα οπτικά ενεργό κέντρο στο μόριο,

iii) το χρωμοφόρο είναι τοποθετημένο σε ασύμμετρο περιβάλλον λόγω της τρισδιάστατης αναδίπλωσης του μορίου.

Τα χρωμοφόρα που συνεισφέρουν στον κυκλικό διχρωισμό των πρωτεϊνών συνήθως είναι μη χειρικά γιατί έχουν επίπεδο συμμετρίας. Η αλληλεπίδραση μεταξύ τους στο χειρικό περιβάλλον της πρωτεΐνης εισάγει διαταραχές που οδηγούν στην οπτική ενεργότητα. Έτσι, ο κυκλικός διχρωισμός είναι μια εξαιρετική μέθοδος για τον καθορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Martin & Schilstra 2008).

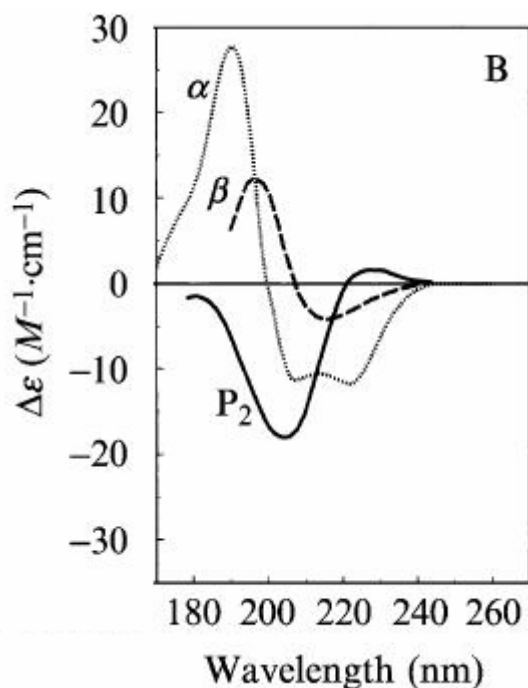


Εικ. 2.13. Η δημιουργία του φαινομένου του κυκλικού διχρωισμού. Παρουσιάζονται τα αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένα συστατικά μιας επίπεδα πολωμένης ακτινοβολίας. Στο (I) τα δυο συστατικά έχουν το ίδιο πλάτος και συνδυαζόμενα δίνουν επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία. Στο (II) τα δυο συστατικά έχουν διαφορετικό πλάτος και το αποτέλεσμα του συνδυασμού τους είναι ελλειπτικά πολωμένη ακτινοβολία. Τροποποιημένη εικόνα από την πηγή: Kelly *et al.*, 2005.

2.5.2 Σήμα στο άπω υπεριώδες (far-UV)

Για τον υπολογισμό των στοιχείων δευτεροταγούς δομής συλλέγονται φάσματα απορρόφησης στο άπω υπεριώδες, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει τα μήκη κύματος από 260 nm μέχρι το χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να φτάσει ο κάθε διαλύτης, με τα 185 nm να αποτελούν σύνηθες καλό κατώτατο όριο. Παρά το ότι πλευρικές αλυσίδες των αρωματικών καταλοίπων απορροφούν ισχυρά στην περιοχή του άπω υπεριώδους, τη μεγαλύτερη συνεισφορά έχει ο πεπτιδικός δεσμός (Martin & Schilstra 2008). Διαφορετικά δομικά στοιχεία παρουσιάζουν διαφορετικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού. Για παράδειγμα, οι α-ελικοειδείς πρωτεΐνες έχουν αρνητικά μέγιστα στα 222 nm και 208 nm και ένα θετικό στα 193 nm. Οι εντάσεις των σημάτων αυτών αντικατοπτρίζουν το βαθμό περιεχομένου σε α-έλικα. Πρωτεΐνες με καλά καθορισμένα αντιπαράλληλα β-φύλλα παρουσιάζουν αρνητικές μέγιστα στα 218 nm και θετικά στα 195 nm ενώ διαταραγμένες ή αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν πολύ χαμηλή ελλειπτικότητα κάτω από τα 210 nm και αρνητικές τιμές κοντά στα 195 nm (Εικ. 2.14). Πρωτεΐνες μικτού περιεχομένου σε α-έλικες και β-κλώνους παράγουν φάσματα που κυριαρχούνται από το α-ελικοειδές περιεχόμενό τους και άρα εμφανίζουν τα σήματα των α-ελίκων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παρατηρείται ένα ενιαίο ευρύ ελάχιστο μεταξύ των 210-220 nm λόγω της αλληλεπικάλυψης των συνεισφορών των α-ελίκων και των β-φύλλων. Τα κολλαγόνα είναι μια ιδιαίτερη περίπτωση πρωτεϊνών καθώς περιέχουν τρεις αλυσίδες που τυλίγονται η μια γύρω από την άλλη σε μια τριπλή έλικα. Κάθε αλυσίδα έχει τη διαμόρφωση που λαμβάνει η πολυ-L-προλίνη σε μια επιμήκη ελικοειδή διαμόρφωση όπου όλοι οι δεσμοί είναι σε *trans* διαμόρφωση μεταξύ τους (πολυ-L-προλίνη II). Τα φορτισμένα πολυπεπτίδια όπως το πολυ-L-γλουταμικό ή η πολυ-L-λυσίνη σε ουδέτερο pH εμφανίζουν μια παρόμοια της πολυ-L-προλίνης II διαμόρφωση (Greenfield 2006c). Πέραν των α-ελίκων, β-φύλλων και στροφών τα προγράμματα επεξεργασίας υπολογίζουν και την υπόλοιπη δομή που χαρακτηρίζεται ως ‘ανώμαλη’, ‘εγγενώς διαταραγμένη’ ή ‘φυσιολογικά διαταραγμένη’ δομή (Whitmore L. & Wallace 2007). Καθώς τα φάσματα των πρωτεϊνών εξαρτώνται από τη διαμόρφωσή τους, ο κυκλικός διχρωισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της

δευτεροταγούς δομής αγνώστων πρωτεϊνών, όπως επίσης για την παρακολούθηση των αλλαγών διαμόρφωσης λόγω αλλαγών θερμοκρασίας, pH, μεταλλαγών, παρουσίας αποδιατακτικών ή της πρόσδεσης άλλων πρωτεϊνών στις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος (Greenfield 2006c).



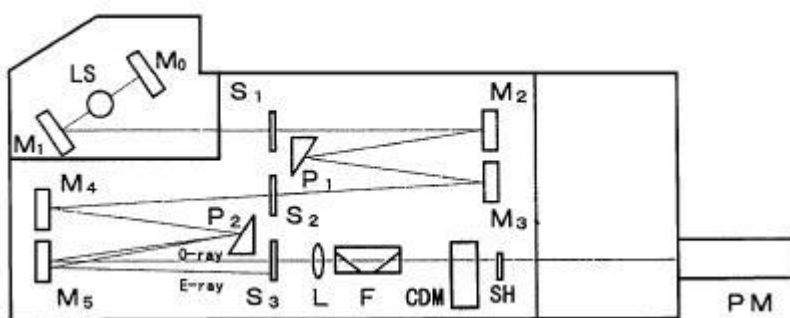
Εικ. 2.14. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού πεπτιδίων μοντέλων στις διαμορφώσεις α-έλικας (α), β-φύλλου (β) και πολυ-προλίνης II (P2).

2.5.3 Βασικός εξοπλισμός και τεχνικές λεπτομέρειες

Όργανα κυκλικού διχρωισμού είναι εμπορικά διαθέσιμα από πολλές εταιρείες. Στην προκειμένη περίπτωση προμηθευτής ήταν η Jasco Inc (Εικ. 2.15). Ένα σύστημα έλεγχου θερμοκρασίας Peltier είναι επίσης απαραίτητο, ειδικά για μελέτες θερμοεπαγόμενης αποδίπλωσης. Άλλο σημαντικό στοιχείο είναι υψηλής ποιότητας κυβέτες χαλαζία με καλή διαβίβαση του άπω υπεριώδους, με βήματα μήκους από 0.1-10 mm. Οι κυβέτες των 10 mm ενδείκνυνται για μέτρηση στο εγγύς υπεριώδες και χρήση μικρών όγκων. Οι κυβέτες από μόνες τους μπορεί να εμφανίζουν ιδιαίτερη τάση που μπορεί να δώσει υψηλό θόρυβο φάσματος και αν και ένας μέτριος βαθμός τάσης είναι ανεκτός, συνιστάται ο προσανατολισμός της κυβέτας κάθε φορά με τον ίδιο τρόπο κατά την τοποθέτησή της στο μηχάνημα. Το μηχάνημα του CD θα πρέπει να τροφοδοτείται μόνιμως με υψηλής καθαρότητας, ελεύθερο οξυγόνου άζωτο, για τουλάχιστον 20 λεπτά πριν το άνοιγμα της πηγής φωτός. Αυτό συμβαίνει διότι παρόντος του οξυγόνου δύναται να παραχθεί όζον από την αλληλεπίδρασή του με τη λάμπα ακτινοβολίας Xe το οποίο όζον καταστρέφει τις οπτικές επιφάνειες και είναι γενικά δηλητηριώδες.

Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, οι διαλύτες του κυκλικού διχρωισμού δεν πρέπει να περιέχουν οπτικά ενεργά υλικά και θα πρέπει να είναι κατά

το δυνατόν ‘διαφανή’. Τα δείγματα θα πρέπει να είναι απαερωμένα καθώς το οξυγόνο απορροφά τα φως σε μήκη κύματος κάτω των 200 nm. Τα δείγματα προς ανάλυση θα πρέπει να μην περιέχουν σωματίδια (συνιστάται φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση για απομάκρυνσή τους). Τα δείγματα προς ανάλυση θα πρέπει να είναι τουλάχιστον κατά 95 % καθαρά και να μην περιέχουν υπολείμματα νουκλεϊκών οξέων, φαινόμενο σύνθηες κατά την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Kelly et al. 2005). Για μετρήσεις δευτεροταγούς δομής οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.005 – 5 mg/ml εξαρτώμενες και από το μήκος βήματος της κυψελίδας. Το πιο δύσκολο σημείο για την παραγωγή αξιόπιστων δεδομένων CD έγκειται στον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση θα πρέπει να υπολογίζεται με τη χρήση των μοριακών συντελεστών εξάλειψης (Greenfield 2006c). Το φάσμα του διαλύτη θα πρέπει να αφαιρείται από το φάσμα του δείγματος προτού συνεχιστεί η επεξεργασία των δεδομένων CD (Martin & Schilstra 2008).



Εικ. 2.15. Διάγραμμα ενός σπεκτροπολωσίμετρου Jasco J-810. Η επίπεδα πολωμένη ακτινοβολία παράγεται μέσω της διέλευσης του φωτός από την πηγή (LS) μέσω δυο πρισμάτων (P1, P2) και μιας σειράς κατόπτρων (M₀ έως M₅) και σχισμών (S₁ έως S₃). Η κανονική ακτίνα (O) εστιάζεται μέσω των φακών (L) και περνά μέσω ενός φίλτρου (F) στον μετασχηματιστή (CDM). Τα κυκλικά πολωμένα συστατικά περνούν κατόπιν μέσα από το κλείστρο (SH) στο διαμέρισμα του δείγματος, πριν την ανίχνευσή τους από τον φωτοπολλαπλασιαστή (PM). Πηγή: Kelly et al., 2005.

2.5.4 Ανάλυση δεδομένων κυκλικού διχρωισμού

Υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την ανάλυση των δεδομένων CD για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής. Όλες οι μέθοδοι θεωρούν ότι το φάσμα μιας πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί από το γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων των επιμέρους στοιχείων δευτεροταγούς δομής μαζί με έναν παράγοντα θορύβου ο οποίος περιλαμβάνει η συνεισφορά των αρωματικών χρωμοφόρων και των προσθετικών ομάδων.

$$\theta_{\lambda} = \sum \epsilon_i S_{\lambda i} + \theta_{\text{όρυβος}},$$

όπου θ_{λ} ο κυκλικός διχρωισμός της πρωτεΐνης συναρτήσει του μήκους κύματος, ϵ_i το κάθε στοιχείο δευτεροταγούς δομής i και $S_{\lambda i}$ η ελλειπτικότητα σε κάθε μήκος κύματος του κάθε στοιχείου i (Greenfield 2006c). Υπάρχουν δυο βασικές μέθοδοι αξιολόγησης της δευτεροταγούς δομής. Η πρώτη χρησιμοποιεί πολυπεπτίδια αναφοράς με γνωστή περιεκτικότητα σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής, ενώ η δεύτερη χρησιμοποιεί ως αναφορά τα φάσματα πρωτεϊνών που έχουν χαρακτηριστεί

κρυσταλλογραφικά. Αυτά στη συνέχεια συγκρίνονται με τα φάσματα της άγνωστης πρωτεΐνης με διάφορες μεθόδους όπως τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, τη μέθοδο της ψευδο-ορθογωνίας παλινδρόμησης, την αποσύνθεση ιδιαζουσών τιμών (SVD, singular value decomposition, βλέπε παρακάτω παράγραφο 2.5.11), την μέθοδο αυτό-συνέπειας, τη μέθοδο μεταβλητής επιλογής ή με ανάλυση βάση νευρωνικών δικτύων. Στην παρούσα θέση χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα που βασίζονται στην ψευδο-ορθογωνία παλινδρόμηση (πρόγραμμα CONTINLL), στη μέθοδο αυτοσυνέπειας (πρόγραμμα SELCON3) και τέλος στη μέθοδο της μεταβλητής επιλογής (πρόγραμμα CDSSTR), η περιγραφή των οποίων ακολουθεί (Greenfield 1996, Sreerama & Woody 2000, Greenfield 2006c).

CONTINLL

Πρόκειται για παραλλαγή του προγράμματος CONTIN. Το τελευταίο προσπαθεί να προσαρμόσει (fit) το CD των αγνώστων πρωτεϊνών μέσω σύγκρισης με μια γραμμική σύνθεση των φασμάτων μιας μεγάλης βάσης δεδομένων πρωτεϊνών με γνωστή διαμόρφωση. Στη μέθοδο αυτή η συνεισφορά του κάθε φάσματος κρατείται χαμηλή εκτός κι αν συνεισφέρει σε καλή συμφωνία μεταξύ θεωρητικής ανασυσταμένης καμπύλης και πρωτογενών δεδομένων. Η μέθοδος αυτή προσφέρει σχετικά καλούς υπολογισμούς των α -ελίκων και των β -φύλλων.

SELCON3

Με το πρόγραμμα αυτό το φάσμα της πρωτεΐνης προς ανάλυση περιλαμβάνεται μέσα στο σετ πρωτεϊνών αναφοράς και γίνεται μια αρχική υπόθεση για την άγνωστη δομή. Προκύπτει έτσι ένας ισότιμος πίνακας ο οποίος λύνεται με τη χρήση του αλγορίθμου SVD και η αρχική υπόθεση αντικαθίσταται από τη λύση. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να προκύψει η αυτο-συνέπεια. Το πρόγραμμα λειτουργεί ικανοποιητικά για σφαιρικές πρωτεΐνες. Η αρχική έκδοση του προγράμματος, SELCON αξιολογούσε ποσοστά α -έλικας, παράλληλων και αντιπαράλληλων β -φύλλων, στροφές και το υπόλοιπο της πρωτεΐνης. Το SELCON2 τροποποιήθηκε ώστε να περιέχει και τη διαμόρφωση της πολυ-L-προλίνης II. Τέλος στην έκδοση SELCON3, οι διαμορφώσεις α -έλικας και β -φύλλου διαιρούνται σε κανονικά και διαταραγμένα τμήματα, με τη θεώρηση ενός συγκεκριμένου αριθμού τελικών καταλοίπων σε μια α -έλικα ή β -φύλλο ως διαταραγμένων.

CDSSTR

Με τη μέθοδο αυτή κατασκευάζεται αρχικά μια μεγάλη βάση δεδομένων από φάσματα πρωτεϊνών αναφοράς οι οποίες φέρουν γνωστά φάσματα και στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Η πρωτεϊνική δομή κατόπιν καθορίζεται με ανάλυση SVD. Μερικά από τα πρωτεϊνικά φάσματα έτσι αποκλείονται συστηματικά για τη δημιουργία νέων βάσεων δεδομένων με μικρότερο αριθμό αναφορών. Διενεργείται έτσι SVD για όλα τα μειωμένα σετ αναφορών και από αυτά που εκπληρώνουν τα κριτήρια επιλογής για μια ικανοποιητική προσαρμογή υπολογίζεται ο μέσος όρος.

Και για τα τρία προγράμματα προκύπτει η παράμετρος της καλής προσαρμογής (goodness of fit) NRMSD (normalized root mean square deviation, κανονικοποιημένη απόκλιση μέσης τετραγωνικής ρίζας) η οποία αποτελεί μέτρο του πόσο καλά ταιριάζει η υπολογισμένη δευτεροταγής δομή με τα πειραματικά δεδομένα σε όλο το εύρος μήκους κύματος ενδιαφέροντος. Ο παράγοντας αυτός υπολογίζεται από την εξίσωση

$$\text{NRMSD} = [\Sigma(\theta_{\text{exp}} - \theta_{\text{cal}})^2 / \Sigma(\theta_{\text{exp}})^2]^{1/2}$$

και οι τιμές του κυμαίνονται από 0 (άσπογο fit) έως 1 (κανένα fit). Γενικά θεωρείται ότι μια τιμή του NRMSD πάνω από 0.25 εισάγει λάθη στους υπολογισμούς ενώ πρακτικά θα πρέπει να επιδιώκονται τιμές κάτω του 0.1 ή ιδεατά κάτω του 0.05.

Η απόδοση των τριών μεθόδων κυμαίνεται σε συγκρίσιμα επίπεδα παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούν διαφορετικούς αλγόριθμους. Το CDSSTR παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση με μικρότερα σεν αναφορών και μεγαλύτερο εύρος μήκους κύματος ενώ το CONTINLL αποδίδει καλύτερα με μεγαλύτερα σεν αναφορών και μικρότερα εύρη μήκους κύματος. Συχνά είναι δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων διαφορετικών μεθόδων λόγω της χρήσης διαφορετικών σεν αναφοράς και των διαφορετικών εντολών που χρησιμοποιούνται από κάθε πρόγραμμα. Επίσης θα ήταν λάθος να υπολογίζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων από την κάθε μέθοδο, εκτός κι αν χρησιμοποιούνται ίδιες εντολές υπολογισμού δευτεροταγούς δομής από τον ίδιο αλγόριθμο. Η ανάλυση των δεδομένων CD και με τις τρεις μεθόδους βελτιώνει την αξιοπιστία των προβλέψεων για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (Kelly et al. 2005). Η ανάλυση είναι αξιόπιστη αν προκύπτουν παρόμοιοι υπολογισμοί για τα διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής από τους διαφορετικούς αλγόριθμους. Και τα τρία προγράμματα παρέχονται από το πακέτο CDPPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>).

2.5.5 Σεν αναφοράς (reference databases)

Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος των δευτεροταγών δομών που παρουσιάζονται στα σεν αναφορών τόσο πιο ακριβές το αποτέλεσμα ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης εμπειρικής ανάλυσης. Οι πρώτες προσπάθειες παραγωγής παραδειγμάτων φάσματος των διαφόρων τύπων δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιούσαν την πολυλυσίνη υπό διαφορετικές συνθήκες ώστε να αντιπροσωπεύονται οι διαμορφώσεις των ελίκων, των β-φύλλων και τυχαίες διαμορφώσεις. Κατοπινά σεν αναφορών προέκυψαν από πρωτεΐνες ή πεπτίδια γνωστής δομής, μικρού αριθμού αρχικά (τρεις πρωτεΐνες), αυξανόμενου σταδιακά σε 15 ή περισσότερες (Whitmore & Wallace 2007). Οι Sreerama & Woody (2000) συγκέντρωσαν έναν αριθμό αυτών των σεν αναφορών, τα οποία περιελάμβαναν από 17 έως 48 φάσματα από διάφορα εργαστήρια, τα οποία αποτελούν μια καλή κάλυψη των διαφορετικών τύπων δευτεροταγούς δομής.

Τα σεν δεδομένων κατασκευάζονται με τη χρήση πρωτεϊνών των οποίων η κρυσταλλική δομή έχει λυθεί και άρα τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής τους είναι γνωστά. Με τις πρόσφατες βελτιώσεις της βιοπληροφορικής που έχει συστηματοποιήσει την κατάταξη των διαφόρων δευτεροταγών δομών είναι δυνατή η παραγωγή σεν αναφορών περισσότερο περιεκτικών του υψηλού εύρους δομικών στοιχείων που είναι σήμερα γνωστά στις πρωτεΐνες. Πρόσφατα αναπτύχθηκε ένα μεγάλο σεν αναφορών που καλείται SP175 το οποίο περιέχει φάσματα των οποίων το χαμηλότερο μήκος κύματος φτάνει στα 175 nm (δεδομένα που συνελέγησαν από συγχροτρόνιο) και αποτελείται από παραπάνω από 70 διαλυτές πρωτεΐνες. Αυτές έχουν επιλεγεί έτσι ώστε όχι απλά να περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος δευτεροταγών δομών αλλά και εκτενή ποικιλία πρωτεϊνικών αναδιπλώσεων και αρχιτεκτονικών. Το σεν αναφορών SP175 έχει αποδειχθεί πως μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαρκώς και για συμβατικές αναλύσεις δεδομένων CD.

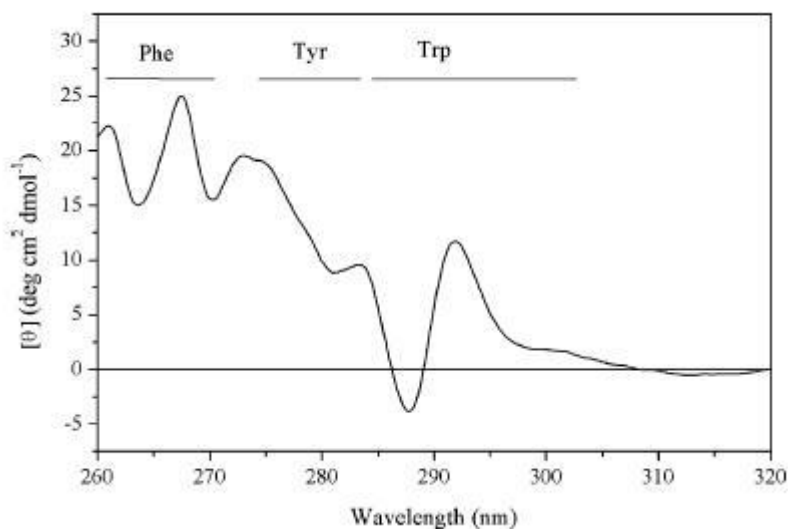
Παράλληλα με την ανάπτυξη μεγάλων και περιεκτικών σεν αναφορών, υπάρχει και η τάση κατασκευής μικρών εξαιρετικά εξειδικευμένων, με στόχο τη

βελτίωση της ανάλυσης ιδιαίτερων κατηγοριών πρωτεϊνών (πρωτεϊνών που περιέχουν ιδιαίτερα ή ασυνήθιστα δομικά στοιχεία) οι οποίες δεν αναλύονται επαρκώς με τα συμβατικά σετ αναφοράς. Μέχρι τώρα έχει αναπτυχθεί ένα τέτοιο σετ που αποτελείται από 9 πρωτεΐνες με αναδίπλωση «ελληνικού κλειδιού», χρήσιμο για την μελέτη μεταλλαγμάτων ή ομολόγων τους από άλλα είδη. Παρόμοιες προσπάθειες εξειδικευμένων σετ αναφορών θα μπορούσαν να αναφέρονται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από την παρουσία σπειρωμένων σπειραμάτων κλπ. Ένα κοινό λάθος αποτελεί η χρήση των σετ αναφοράς σε ακατάλληλες ή μη-συγγενικές πρωτεΐνες. Όλα τα σετ αναφοράς έχουν προκύψει πχ. από διαλυτές πρωτεΐνες οπότε δεν ενδείκνυται η χρήση τους για πεπτίδια (τα οποία παρουσιάζουν χαμηλή ελλειπτικότητα συνήθως και σε ισορροπία μπορεί να υιοθετούν πολλαπλές, αντί για μια, διαμορφώσεις), πρωτεΐνες με σπειρωμένα σπειράματα, στοιχεία δηλαδή που δεν περιλαμβάνονται στα σετ αναφορών, ή πρωτεΐνες με υψηλά ποσοστά διαταραγμένων δομών, οι οποίες υπο-αντιπροσωπεύονται στα σετ αναφορών καθώς οι πρωτεΐνες των τελευταίων έχουν προκύψει από καθορισμένες κρυσταλλικές δομές (Whitmore & Wallace 2007).

2.5.6 Σήμα στο εγγύς υπεριώδες (near-UV)

Το σήμα των πρωτεϊνών στο εγγύς υπεριώδες (340-255 nm) προκύπτει από τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης, τυροσίνης, φαινυλαλανίνης και κυστίνης (οι κυστεΐνες δεν απορροφούν στην περιοχή αυτή) και αντικατοπτρίζει την τριτοταγή και περιστασιακά την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Γενικά το σήμα του CD στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους είναι παραπάνω από μια τάξη μεγέθους ασθενέστερο από τα σήματα στην περιοχή του άπω υπεριώδους. Άρα η καταγραφή του απαιτεί πιο συγκεντρωμένο δείγμα ή μεγαλύτερα οπτικά μήκη βήματος (path lengths) (Martin & Schilstra 2008). Το σήμα μεμονωμένων καταλοίπων σε μια πρωτεΐνη μπορεί να είναι είτε θετικό είτε αρνητικό και μπορεί να ποικίλλει δραματικά όταν τα κατάλοιπα είναι ακινητοποιημένα ή κάνουν συζευγμένες ταλαντώσεις με γειτονικά αρωματικά κατάλοιπα οπότε δίνουν και το ισχυρότερο σήμα. Τα βασικά χαρακτηριστικά των τεσσάρων χρωμοφόρων για το εγγύς υπεριώδες έχουν ως εξής (Martin & Schilstra 2008) (Εικ. 2.16):

- Η φαινυλαλανίνη δίνει καθαρό σήμα στο εύρος 255-270 nm με κορυφές κοντά στα 262-268 nm.
- Η τυροσίνη γενικά δίνει ένα μέγιστο στην περιοχή των 275-282 nm με πιθανό όμο 6 nm κοντά στα μεγαλύτερα μήκη κύματος.
- Η τρυπτοφάνη συχνά εμφανίζει ένα ισχυρό σήμα πάνω από τα 280 nm με τη μορφή τριών κορυφών, μια στα 288-293 nm, άλλη μια κατά 7 nm μετατοπισμένη προς τα χαμηλότερα μήκη κύματος και μια τελευταία γύρω στα 265 nm.
- Η κυστίνη δίνει σήμα που ξεκινά από τα 320 nm και εμφανίζει μια ή δυο ευρείες κορυφές πάνω από τα 240 nm, οι οποίες συχνά είναι αρνητικές.



Εικ. 2.16. Το φάσμα CD στο εγγύς υπεριώδες για το ένζυμο διϋδροκινάση II από τον *Streptomyces coelicolor*. Τα πεδία των μηκών κύματος που υποδεικνύονται αντικατοπτρίζουν τα σήματα της Phe, Tyr και Trp. Πρέπει να σημειωθεί ότι μπορεί να υπάρξει σημαντική αλληλεπικάλυψη μεταξύ των σημάτων Tyr και Trp. Πηγή: Kelly *et al.*, 2005

2.5.7 Κυκλικός διχρωισμός και πρωτεϊνική αποδίπλωση

Όταν οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται χάνουν τις υψηλά οργανωμένες δευτεροταγείς δομές τους και το φάσμα τους αλλάζει. Κάποιες πρωτεΐνες τείνουν να ξεδιπλώνουν τελείως και το φάσμα τους στην πλήρως αποδίπλωμένη κατάσταση μοιάζει με αυτό ενός μίγματος μικρών πεπτιδίων. Κάποιες άλλες πρωτεΐνες όμως αποδιατάσσονται μόνο μερικώς και μένουν με σημαντικό περιεχόμενο υπολειμματικής α-έλικας, οπότε μπαίνουν σε μια κατάσταση εύπλαστης σφαίρας (molten globule). Οι αλλαγές στο CD συναρτήσει της θερμοκρασίας σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό της θερμοδυναμικής της αποδίπλωσης δηλαδή την ενθαλπία κατά van't Hoff (ΔH) και την εντροπία (ΔS) της αποδίπλωσης, το μέσο σημείο μετάπτωσης της αποδίπλωσης (T_M) και την ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης (ΔG). Η θερμοδυναμική της πρωτεϊνικής αποδίπλωσης μπορεί να διερευνηθεί είτε με την παρακολούθηση της ελλειπτικότητας σε ένα μήκος κύματος είτε με την συλλογή πλήρων φασμάτων συναρτήσει της θερμοκρασίας. Το CD δε δίνει πληροφορία σχετικά με την κινητική αναδίπλωσης συγκεκριμένα για κάθε κατάλοιπο (Greenfield 2006b).

2.5.8 Χαρακτηρισμός της αποδίπλωσης με την παρακολούθηση των αλλαγών ελλειπτικότητας σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος συναρτήσει της θερμοκρασίας

Στην απλή περίπτωση όπου μια πρωτεΐνη μεταπίπτει από την αναδιπλωμένη (F) στην αποδιπλωμένη κατάσταση (U), σε κάθε θερμοκρασία T η σταθερά αναδίπλωσης K υπολογίζεται ως εξής:

$$K=[F]/[U]$$

Όπου [F] & [U] οι συγκεντρώσεις της αναδιπλωμένης και αποδιπλωμένης μορφής αντίστοιχα. Η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης είναι:

$$\Delta G=-RT\ln K$$

Όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($1.98 \text{ cal mol}^{-1}$) και T η απόλυτη θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin. Το ποσοστό της πρωτεΐνης που είναι αναδιπλωμένο σε κάθε θερμοκρασία είναι α ,

$$\alpha=[F]/[F]+[U]$$

$$\alpha=(\theta_t-\theta_u)/(\theta_f-\theta_u)$$

όπου θ_t η παρατηρούμενη ελλειπτικότητα σε κάθε θερμοκρασία, θ_f η ελλειπτικότητα της πλήρους αναδιπλωμένης μορφής και θ_u η ελλειπτικότητα της αποδιπλωμένης μορφής.

Για την προσαρμογή των δεδομένων CD σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος συναρτήσει της θερμοκρασίας χρησιμοποιείται η εξίσωση Gibbs-Helmoltz η οποία περιγράφει την αναδίπλωση συναρτήσει της θερμοκρασίας. Αν παρακολουθούμε την αποδίπλωση ενός μονομερούς τότε οι εξισώσεις που ισχύουν είναι οι παρακάτω.

$$\Delta G=\Delta H(1-T/T_M) - \Delta C_p ((T_M-T) + T\ln(T/T_M))$$

$$K=\exp(-\Delta G/(RT))$$

$$\alpha = K/(1+K)$$

$$[\theta]_t = \alpha([\theta]_F - [\theta]_U) + [\theta]_U$$

T_M είναι η θερμοκρασία όπου $\alpha=0.5$, ΔH η διαφορά της ενθαλπίας και ΔC_p η αλλαγή της θερμοχωρητικότητας κατά τη μετάβαση από την αναδιπλωμένη στην αποδιπλωμένη μορφή. Συνήθως η ΔC_p τίθεται ίση με μηδέν για τους αρχικούς υπολογισμούς της θερμοδυναμικής αναδίπλωσης μιας μονομερούς πρωτεΐνης.

Η σταθερά αναδίπλωσης K_f για μια μονομερή πρωτεΐνη άρα είναι

$$K_f = \alpha/(1-\alpha),$$

Για ένα ομοδιμερές, $K_f = \alpha/(2P_t (1-\alpha))^2$ και

Για ένα ομοτριμερές, $K_f = \alpha/(3P_t (1-\alpha))^3$

όπου P_t η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην πλήρως αναδιπλωμένη κατάσταση,

Η εντροπία αποδίπλωσης ΔS στη θερμοκρασία όπου $K=1$ μπορεί να υπολογισθεί από τη σχέση: $\Delta S = \Delta H - T\Delta S$ (Greenfield 2006a).

2.5.9 Χαρακτηρισμός της αποδίπλωσης μιας πρωτεΐνης με την διερεύνηση των φασμάτων της συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Ο μηχανισμός αποδίπλωσης για πολλές σφαιρικές πρωτεΐνες είναι μια διαδικασία δύο καταστάσεων, όπου στην κατάσταση ισορροπίας υπάρχουν μόνο η αναδιπλωμένη και αποδιπλωμένη μορφή. Η φύση αυτή των δύο καταστάσεων της διαδικασίας αποδίπλωσης μπορεί να παρακολουθηθεί με τη χρήση διαφορετικών μαρτύρων. Αν η διαδικασία είναι όντως δυο καταστάσεων, τότε η μετάπτωση θα πρέπει να είναι ταυτόσημη είτε παρακολουθώντας το CD στο άπω είτε στο εγγύς υπεριώδες. Υπό ορισμένες συνθήκες μερικές πρωτεΐνες σχηματίζουν μια ενδιάμεση κατάσταση εύπλαστης σφαίρας που δεν είναι ούτε πλήρως αναδιπλωμένη ούτε πλήρως αποδιπλωμένη. Η ενδιάμεση αυτή μορφή διατηρεί τα περισσότερα από τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής της και γενικά εμφανίζει ένα φάσμα CD στο άπω υπεριώδες που μοιάζει με αυτό της αναδιπλωμένης μορφής, αλλά έχει ισχυρά ρευστή τριτοταγή δομή με αποτέλεσμα το φάσμα CD στο εγγύς υπεριώδες να θυμίζει αυτό της πλήρους αδίπλωτης μορφής (Vassilenko & Uversky 2002, Martin & Schilstra 2008). Μερικές πρωτεΐνες, ειδικά αυτές που αποτελούνται από περισσότερες της μιας επικράτειες, πιθανόν να μην αποδιπλώνονται με μια μετάπτωση. Κατά την υπέρθεση των φασμάτων συναρτήσει του μήκους κύματος σε διάφορες θερμοκρασίες, τα φάσματα μπορεί να έχουν ένα, περισσότερα του ενός ή κανένα σημείο τομής. Το σημείο αυτό λέγεται ισοδιχρωικό σημείο και η ύπαρξη ενός τέτοιου σημείου υποδηλώνει ότι κατά την θερμική αποδίπλωση της πρωτεΐνης δυο είναι οι κύριες μορφές που συσσωρεύονται, η ανα- και η από-διπλωμένη. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει κάποιο ισοδιχρωικό σημείο ή παρατηρούνται περισσότερα του ενός τότε πιθανόν υπάρχει συσσώρευση και ενδιάμεσης μορφής ή μορφών της πρωτεΐνης.

Η πληροφορία σχετικά με το μονοπάτι αποδίπλωσης προκύπτει κατά τη συλλογή πλήρων φασμάτων κατά τη θερμική αποδίπλωση μιας πρωτεΐνης σε διάφορες θερμοκρασίες (το ανώτερο όριο θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται είναι οι 90 °C, το κατώτερο εξαρτάται από την πρωτεΐνη). Το σετ των φασμάτων στη συνέχεια μπορεί να αποσυντεθεί με τη χρήση της αποσύνθεσης ιδιαιζουσών τιμών (SVD) για την απόκτηση πληροφορίας σχετικά με τον αριθμό των μορφών που συμμετέχουν στο σετ φασμάτων (πλήρως αναδιπλωμένη, πλήρως αποδιπλωμένη, ενδιάμεσες καταστάσεις όπου αυτές υπάρχουν, Greenfield 2006b, Εικ. 2.17).

2.5.10 Η θεωρία πίσω από το SVD

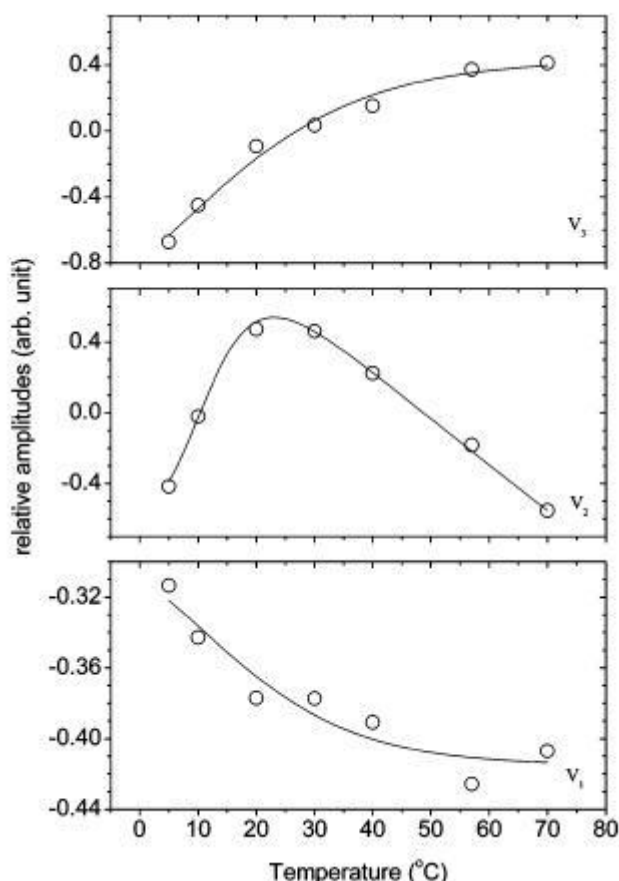
Ένα φάσμα μπορεί να αναπαρασταθεί ως μια στήλη αριθμών (διανυσμάτων) όπου το κάθε στοιχείο αποτελεί την απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Όταν ένα μείγμα από διαφορετικά είδη συστατικών είναι παρόντα κατά τη μέτρηση του φάσματος, το φάσμα είναι το άθροισμα της συμβολής κάθε ενός από τα είδη αυτά. Η συλλογή φασμάτων σε διάφορες θερμοκρασίες κατά την θερμοεπαγόμενη αποδίπλωση της πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί ως ένας πίνακας, ο οποίος έχει τόσες στήλες όσες οι θερμοκρασίες που μετρήθηκαν και τόσες σειρές όσα τα μήκη κύματος των φασμάτων που ελήφθησαν. Έτσι, κάθε στήλη περιλαμβάνει πληροφορία μόνο όσον αφορά το φάσμα της πρωτεΐνης σε μια

θερμοκρασία και κάθε σειρά μόνο την πληροφορία της ελλειπτικότητας σε ένα μήκος κύματος σε όλες τις θερμοκρασίες. Η διαδικασία του SVD διαχωρίζει τις δυο πληροφορίες σε δυο πίνακες, τον U (οι στήλες του περιέχουν τα ορθοκανονικά¹ διανύσματα των στηλών του A) & τον V (οι στήλες του περιέχουν τα ορθοκανονικά διανύσματα των σειρών του A). Ένας τρίτος πίνακας παράγεται, ο S , έτσι ώστε η ανασύσταση του αρχικού πίνακα με τα δεδομένα A ισούται με δεδομένα πινάκων ως

$$A=USV^T$$

όπου ο όρος V^T αποτελεί τον αντίστροφο του πίνακα V . Ο πίνακας S είναι τετράγωνος και διαγώνιος, δηλαδή έχει ίσο αριθμό σειρών και στηλών και όλα του τα στοιχεία είναι ίσα με μηδέν εκτός από τα στοιχεία της διαγωνίου του από πάνω αριστερά προς κάτω δεξιά. Οι τιμές των διαγώνιων αυτών στοιχείων αποτελούν τη βαρύτητα, τη σχετική σπουδαιότητα κάθε διανύματος στους πίνακες U & V , αλλιώς τις «ιδιάζουσες τιμές» (singular values) των στηλών τους. Η πρώτη στήλη του πίνακα U αντιπροσωπεύει τη μορφή με την κυριότερη αντιπροσώπευση των φασματικών αλλαγών. Ο τρόπος με τον οποίο αυτή η μορφή μεταβάλλεται με την αύξηση της θερμοκρασίας περιέχεται στην πρώτη στήλη του πίνακα V , που περιέχει τόσες σειρές όσες και οι θερμοκρασίες. Η πρώτη τιμή του διαγώνιου πίνακα S υποδεικνύει τη βαρύτητα του σχετικού ποσού πληροφορίας στην πρώτη στήλη των πινάκων U και V . Κάθε διαδοχική στήλη των πινάκων U και V αντιπροσωπεύει και ένα μεγάλο ποσοστό της εναπομείνουσας πληροφορίας του αρχικού πίνακα δεδομένων. Όλη η απαραίτητη πληροφορία για την περιγραφή των μορφών κατά την θερμοεπαγόμενη αποδίπλωση περιλαμβάνεται σε ένα μικρό αριθμό αρχικών στηλών των πινάκων U και V . Οι υπόλοιπες στήλες δεν περιέχουν αληθινό σήμα αλλά θόρυβο (Hendler & Shrager 1994). Ο γραμμικός συνδυασμός των πρώτων λίγων και πιο σημαντικών στηλών των πινάκων U , V και των αντίστοιχων ιδιοτιμών του πίνακα S παρέχει την καλύτερη προσέγγιση ελαχίστων τετραγώνων του αρχικού πίνακα δεδομένων A (Konno 1998).

¹ Ορθοκανονικά διανύσματα. Τα διανύσματα που είναι ταυτόχρονα κάθετα μεταξύ τους και κανονικά. Η κανονικοποίηση κάθε μη-μηδενικού διανύσματος γίνεται με διαίρεση κάθε συντεταγμένης του με το μήκος του διανύσματος. Οι νέες μετασχηματισμένες τιμές συντεταγμένων του διανύσματος αν υψωθούν στο τετράγωνο, το άθροισμά τους θα ισούται με μηδέν. Το κανονικό πλέον διάνυσμα θα έχει την ίδια φορά με το αρχικό.



Εικ. 2.17. Τα πλάτη των τριών κύριων συστατικών που απαιτούνται για την ανασύσταση του φάσματος αποδιπλώσεως συναρτῆσει της θερμοκρασίας. Η κατάσταση V_1 αναφέρεται στην αναδιπλωμένη μορφή, η V_2 στην ενδιάμεση και η V_3 στην αποδιπλωμένη μορφή. Πηγή: Balakrishnan et al., 2006

2.6 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS, small angle X-ray scattering)

2.6.1 Εισαγωγή

Η σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS) δηλαδή κοντά στην πρωτογενή δέσμη είναι μια βασική μέθοδος για την δομική ανάλυση της συμπυκνωμένης ύλης. Παρέχει δομική πληροφορία περί της ανομοιογένειας της ηλεκτρονικής κατανομής με χαρακτηριστικές διαστάσεις από ένα έως αρκετές εκατοντάδες nm. Η καταγραφή των δεδομένων SAXS αποτελεί μεγάλη πρόκληση καθώς πολύ κοντά στην πρωτογενή δέσμη παρατηρείται μια ποικιλία φαινομένων παρασιτικής σκέδασης (Tsuruta & Johnson 2006). Από τα 1960 ακόμα η μέθοδος έγινε σημαντική για τη μελέτη βιολογικών μακρομορίων σε διάλυμα καθώς επέτρεπε την παραλαβή χαμηλής διακριτικής ικανότητας δομικής πληροφορίας σχετικά με το συνολικό σχήμα και την εσωτερική δομή απουσία κρυστάλλων. Η πρόοδος στην ανάπτυξη οργάνων και νέων μεθόδων ανάλυσης που έχουν βελτιώσει σημαντικά την

διακριτική ικανότητα και την αξιοπιστία των δομικών μοντέλων των SAXS κάνει την μέθοδο σημαντικό συμπληρωματικό εργαλείο μεθόδων υψηλής ανάλυσης όπως το NMR και η κρυσταλλογραφία. Κι αυτό διότι αφενός, δεδομένα χαμηλής ανάλυσης (15 Å) είναι ευαίσθητα σε δομές που οργανώνονται σε μεγάλες αποστάσεις ή σε δομές αρκετά ευκίνητες που δεν συμβάλλουν στα υψηλής ανάλυσης δεδομένα, κι αφετέρου λόγω της απαίτησης καλών κρυστάλλων για την κρυσταλλογραφία και μικρών μοριακών βαρών για το NMR, ένα σημαντικό ποσό πρωτεϊνών δεν μπορεί να αναλυθεί με αυτές τις μεθόδους (Svergun & Koch 2003).

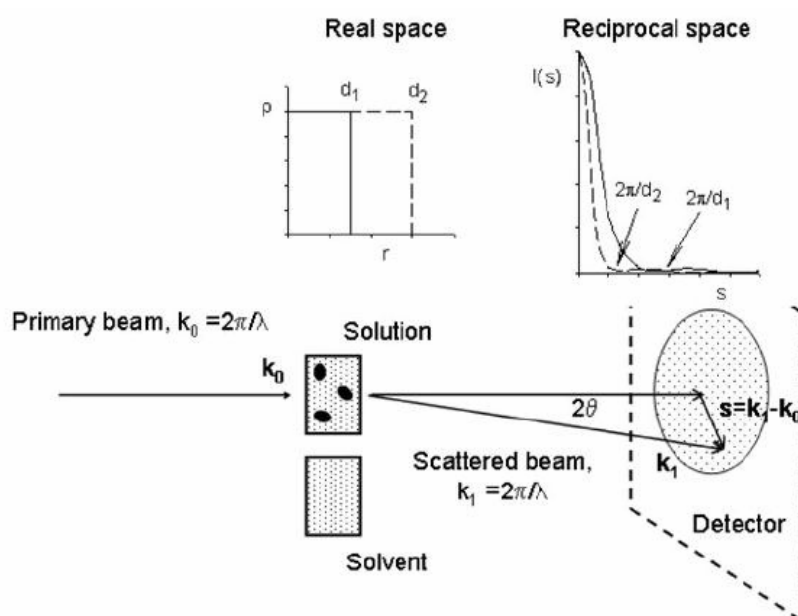
Τα πειράματα SAXS τυπικά απαιτούν ένα ομοιογενές διάλυμα μακρομορίων σε φυσιολογικό διαλύτη χωρίς την χρήση εξειδικευμένων προσθέτων. Για διαλύματα πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν μονοδιάσπαρτα συστήματα ταυτόσημων σωματιδίων, ο τυχαίος προσανατολισμός τους στο διάλυμα οδηγεί σε σφαιρική προσέγγιση κατά μέσο όρο της σκέδασης κάθε σωματιδίου, παράγοντας ένα πρότυπο σε μια διάσταση. Η κύρια δυσκολία και ταυτόχρονα μεγαλύτερη πρόκληση των SAXS ως δομικής μεθόδου είναι η εξαγωγή πληροφορίας σχετικά με την τρισδιάστατη δομή του αντικειμένου από τα μονοδιάστατα αρχικά δεδομένα. Στο παρελθόν μόνο γενικές παράμετροι των σωματιδίων, όπως ο όγκος και η γυροσκοπική ακτίνα μπορούσαν να καθοριστούν από τα πρωτογενή δεδομένα, ενώ η τρισδιάστατη ανάλυση περιοριζόταν σε απλά γεωμετρικά σχήματα πχ ελλείψεις, κύλινδροι κλπ. Η δεκαετία του '90 έφερε επανάσταση στις μεθόδους ανάλυσης των δεδομένων SAXS επιτρέποντας την ανάλυση *ab initio* και τον καθορισμό της δομής επικρατειών καθώς και την λεπτομερή μοντελοποίηση μακρομοριακών συμπλόκων με τη μέθοδο βελτίωσης άκαμπτου σώματος (Svergun & Koch 2003).

Τα δεδομένα σκέδασης της παρούσας θέσης τροποποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια προγραμμάτων του πακέτου προγραμμάτων ATSAS, ανεπτυγμένο από την ομάδα του D. Svergun (Konarev et al. 2006)(DESY, EMBL - παράρτημα Αμβούργου). Το πακέτο επιτρέπει στο χρήστη την διενέργεια της βασικής ανάλυσης και μοντελοποίησης βάση των δεδομένων SAXS. Η περιγραφή των επιμέρους προγραμμάτων επεξεργασίας του πακέτου παρατίθενται εν τη ροή του κειμένου.

2.6.2 Βασικές αρχές της μεθόδου

Φωτόνια ακτίνων X ενέργειας E έχουν μήκος κύματος $\lambda=1.256/E$ όπου το λ εκφράζεται σε nm και το E σε keV. Για δομικές μελέτες χρησιμοποιούνται σχετικά υψηλής ενέργειας ακτίνες X με ενέργειες περίπου στα 10 keV και μήκος κύματος περίπου στα 0.10 - 0.15 nm. Όταν ένα αντικείμενο φωτίζεται από μονοχρωματικό φως με διάνυσμα κύματος $k_0=|k_0|=2\pi/\lambda$ τα άτομα μέσα στο αντικείμενο αλληλεπιδρούν με την προσπίπτουσα ακτινοβολία και γίνονται πηγές σφαιρικών κυμάτων. Θεωρώντας μόνο την ελαστική σκέδαση όπου δεν πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας δηλαδή, όπου το μέτρο του σκεδαζόμενου κύματος $k_1=|k_1|=k_0$, η απόσταση ατομικής σκέδασης είναι $f_x=N_e r_0$, όπου N_e ο αριθμός των ηλεκτρονίων και $r_0=2.82 \times 10^{-13}$ η ακτίνα Thomson. Η σκέδαση περιγράφεται από έναν μετασχηματισμό Fourier από τον αληθινό χώρο των εργαστηριακών συντεταγμένων r στον αντίστροφο χώρο των διανυσμάτων σκέδασης $s=(s, \Omega)=k_1-k_0$. Κύρια ιδιότητα του μετασχηματισμού Fourier είναι η αντίστροφη σχέση μεταξύ πραγματικού και αντίστροφου χώρου έτσι ώστε όσο μικρότερο το πραγματικό μέγεθος τόσο μεγάλο αντικατοπτρίζεται στον αντίστροφο χώρο. Τα πλάτη σκέδασης των ακτίνων X που αναπαριστούν το μετασχηματισμό Fourier της κατανομής ηλεκτρονικής πυκνότητας ενός σφαιρικού ατόμου είναι συναρτήσεις $f(s)$ του ανύσματος σκέδασης (s ,

momentum transfer) (Εικ. 2.18), $s=4\pi\lambda^{-1}\sin\theta$, όπου 2θ η γωνία σκέδασης (Svergun & Koch 2003).



Εικ. 2.18. Σχηματική αναπαράσταση ενός πειράματος SAXS και ο μετασχηματισμός Fourier από τον πραγματικό στον αντίστροφο χώρο. Τροποποιημένη εικόνα από την πηγή: Svergun & Koch, 2003

2.6.3 Σκέδαση διαλυμάτων μακρομορίων

Για την περιγραφή της σκέδασης από συγκεντρώσεις ατόμων γίνεται η εισαγωγή του όρου «κατανομή πυκνότητας της απόστασης σκέδασης $\rho(r)$ » που ισούται με τη συνολική απόσταση σκέδασης των ατόμων ανά μονάδα όγκου. Τα πειράματα σκέδασης μακρομορίων σε διάλυμα απαιτούν ξεχωριστές μετρήσεις των δειγμάτων και του διαλύτη (Εικ. 2.19). Θεωρώντας ότι ο διαλύτης είναι μια ουδέτερη μήτρα με σταθερή πυκνότητα σκέδασης ρ_s , η διαφορά του πλάτους σκέδασης ενός σωματιδίου σε σχέση με το αντίστοιχο πλάτος του όγκου του διαλύτη καθορίζεται από το μετασχηματισμό Fourier της επιπλέον πυκνότητας της σκεδαζόμενης απόστασης $\Delta\rho(r)=\rho(r)-\rho_s$

$$A(s) = \int_v \Delta\rho(r) \exp(isr) dr$$

όπου η ολοκλήρωση επιτελείται στον όγκο του σωματιδίου. Σε ένα πείραμα σκέδασης δεν είναι δυνατή απευθείας η μέτρηση του πλάτους σκέδασης αλλά μόνο η ένταση σκέδασης $I(s)=A(s)A^*(s)$, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού φωτονίων που σκεδαζονται στην κατεύθυνση s . Εάν κάποιος θεωρήσει ένα σύνολο από όμοια σωματίδια η ολική σκέδαση εξαρτάται από την κατανομή των σωματιδίων και τις ιδιότητες συνάφειας της ακτινοβολίας. Εάν τα σωματίδια είναι τυχαία κατανομημένα και οι θέσεις τους και ο προσανατολισμός τους μη συσχετιζόμενοι μεταξύ τους

προστίθενται οι μέσες εντάσεις σκέδασης και όχι τα πλάτη σκέδασης. Συνεπώς, η ολική ένταση είναι μια συνεχής ισοτροπική εξίσωση ανάλογη της έντασης ενός σωματιδίου που έχει υπολογιστεί η μέση σκέδασή του προς όλες τις κατευθύνσεις. Αν τα σωματίδια του δείγματος είναι τυχαία κατανομημένα αλλά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, οι τοπικοί συσχετισμοί μεταξύ γειτονικών σωματιδίων πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη.

Το μεγαλύτερο ποσό έντασης που σκεδάζεται από ένα αντικείμενο γραμμικού μεγέθους d συγκεντρώνεται στο εύρος του ανύσματος σκέδασης μέχρι το ποσό $s=2\pi/d$ (Εικ. 2.19). Άρα, αν το πρότυπο σκέδασης μετριέται στον αντίστροφο χώρο μέχρι το s_{\max} παρέχει πληροφορία σχετικά με τον πραγματικό χώρο του αντικειμένου με διακριτική ικανότητα μέχρι $\delta=2\pi/s$. Όταν αναφερόμαστε σε μοναδιαίους κρυστάλλους, λόγω της ανακατανομής της διαθλασμένης σκέδασης σε ανακλάσεις, τα δεδομένα μπορούν να συλλεγούν σε μεγάλη διακριτική ικανότητα ($d \sim \lambda$). Για σφαιρικά κατά μέσο όρο υπολογισμένα πρότυπα σκέδασης από διαλύματα, το $I(s)$ είναι συνήθως μια ακαριαία εξασθενούμενη συνάρτηση του ανύσματος σκέδασης και έτσι μπορούν να παραχθούν μόνο χαμηλής διακριτικής ικανότητας μοτίβα (Svergun & Koch 2003).

2.6.4 Συνολικές παράμετροι

Η ένταση ενός σφαιρικά υπολογισμένου μέσου όρου σκέδασης για ένα σωματίδιο, με τη χρήση της εξίσωσης μετασχηματισμού Fourier γίνεται

$$I(s) = \langle A(s)A^*(s) \rangle_{\Omega} = \left\langle \int_V \int_V \Delta\rho(r)\Delta\rho(r') \exp\{is(r-r')\} dr dr' \right\rangle_{\Omega} \quad (1)$$

Θέτοντας υπόψη ότι $\langle \exp(isr) \rangle_{\Omega} = \sin(sr)/sr$ και ολοκληρώνοντας σε σφαιρικές συντεταγμένες λαμβάνεται η παρακάτω συνάρτηση

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} r^2 \gamma(r) \frac{\sin sr}{sr} dr \quad (2)$$

$$\text{όπου } \gamma(r) = \left\langle \int \Delta\rho(u)\Delta\rho(u+r) du \right\rangle_{\Omega}$$

είναι η σφαιρικά υπολογισμένη κατά μέσο όρο συνάρτηση κατανομής της περίσσειας πυκνότητας σκέδασης και που ισοδυναμεί με μηδέν για αποστάσεις μεγαλύτερες της μεγίστης διαμέτρου του σωματιδίου D_{\max} . Πρακτικά χρησιμοποιείται η συνάρτηση $p(r)=r^2\gamma(r)$ που αναφέρεται στην κατανομή των αποστάσεων μεταξύ στοιχείων όγκου μέσα στο σωματίδιο εξισορροπημένη ως προς της κατανομή της περίσσειας πυκνότητας. Αυτή η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων υπολογίζεται από τον αντίστροφο μετασχηματισμό

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^{\infty} s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} dr \quad (3)$$

Η συμπεριφορά της έντασης σκέδασης σε πολύ μικρές ($s \rightarrow 0$) και πολύ μεγάλες ($s \rightarrow \infty$) τιμές του ανύσματος σκέδασης σχετίζεται άμεσα με γενικές παραμέτρους του σωματιδίου. Για παράδειγμα, για $s \rightarrow 0$ εάν γίνει εισαγωγή της ανάλυσης McLaurin $\sin(sr)/sr \approx 1 - (sr)^2/3! + \dots$ στην εξίσωση (3) θα ληφθεί η παρακάτω σχέση

$$I(s) = I(0) \left[1 - \frac{1}{3} R_g^2 s^2 + O(s^4) \right] \cong I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right) \quad (4)$$

όπου το $I(0)$ (ή αλλιώς ευθεία σκέδαση) είναι ανάλογο του τετραγώνου της συνολικής περισσειας μήκους σκέδασης του σωματιδίου

$$I(0) = \iint_V \Delta\rho(r)\Delta\rho(r') dr dr' = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) dr = (\Delta\rho)^2 V^2$$

όπου η γυροσκοπική ακτίνα R_g είναι η κανονικοποιημένη δεύτερη παράγωγος της κατανομής αποστάσεων του σωματιδίου γύρω από το κέντρο της κατανομής πυκνότητας της απόστασης σκέδασης. Η γυροσκοπική ακτίνα ορίζεται ως η μέση τετραγωνική ρίζα των αποστάσεων όλων των ηλεκτρονίων από το κέντρο βαρύτητάς τους

$$R_g = \left[\int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr \right]^{-1/2} \left[2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \right]$$

Η εξίσωση 4 λέγεται και εξίσωση ή προσέγγιση Guinier και είναι το πιο σπουδαίο εργαλείο στην ανάλυση σκέδασης από ισοτροπικά συστήματα στα πρώτα στάδια αυτής. Για ιδεατά μονοδιάσπαρτα συστήματα το διάγραμμα Guinier εκφρασμένο ως $\ln(I(s))$ ως προς το s^2 θα πρέπει να είναι μια εξίσωση ευθείας της οποίας το σημείο τομής με τον άξονα του $\ln(I(s))$ δίνει την τιμή του $I(0)$ ενώ η κλίση της δίνει την τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας R_g . Η γραμμικότητα του διαγράμματος Guinier μπορεί να θεωρηθεί ως έλεγχος της ομογένειας του διαλύματος και αποκλίσεις από αυτήν υποδεικνύουν ελκτικές ή απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων που οδηγούν σε φαινόμενα παρεμβολής και πολυδιάσπαρτα συστήματα ή ακραία απόκλιση από το σφαιρικό σχήμα. Η προσέγγιση Guinier ισχύει μόνο για πολύ μικρές γωνίες στο εύρος $s < 1.3/R_g$. (Εικ. 2.19)

Ενώ η γυροσκοπική ακτίνα R_g χαρακτηρίζει τη γεωμετρία του σωματιδίου, η ευθεία σκέδαση $I(0)$ σχετίζεται με τη μοριακή του μάζα. Η πειραματική τιμή της $I(0)$ είναι ανάλογη με το τετράγωνο της μέσης περισσειας πυκνότητας του σωματιδίου, τον αριθμό των σωματιδίων στον όγκο που σκεδάζει και την ένταση της εκπεμπόμενης δέσμης (Tsuruta & Johnson 2006). Η μέση περισσεια πυκνότητας υπολογίζεται από τη χημική σύνθεση και τον ειδικό όγκο του σωματιδίου, ο αριθμός των σωματιδίων από τη γεωμετρία και τη συγκέντρωση του δείγματος και η ένταση της δέσμης υπολογίζεται άμεσα (με τη χρήση θαλάμου ιονισμού) ή έμμεσα, με τη χρήση ενός τυπικού δείγματος αναφοράς. Πρακτικά, η μοριακή μάζα υπολογίζεται ικανοποιητικά μέσω σύγκρισης με ένα δείγμα αναφοράς (συνήθως για πρωτεΐνες χρησιμοποιούνται διαλύματα BSA) και η ακρίβεια του υπολογισμού αυτού συνήθως περιορίζεται από την ακρίβεια μέτρησης της συγκέντρωσης του δείγματος η οποία απαιτείται για την κανονικοποίηση των υπολογισμών.

Η εξίσωση Guinier ισχύει για σφαιρικά σωματίδια. Για πολύ επιμηκυσμένα σωματίδια υπολογίζεται η γυροσκοπική ακτίνα της διατομής R_c βάσει μιας

παρόμοιας εξίσωσης $sI(s)$ συναρτήσει του s^2 ενώ για πεπλατυσμένα σωματίδια υπολογίζεται η γυροσκοπική ακτίνα του πάχους R_t από το διάγραμμα $s^2I(s)$ συναρτήσει του s^2 .

Για τη μελέτη της ασυμπτωτικής συμπεριφοράς του $I(s)$ στις μεγάλες γωνίες, εάν θέσουμε υπόψη ότι $\gamma(D_{\max})=0$, η εξίσωση (2) γράφεται

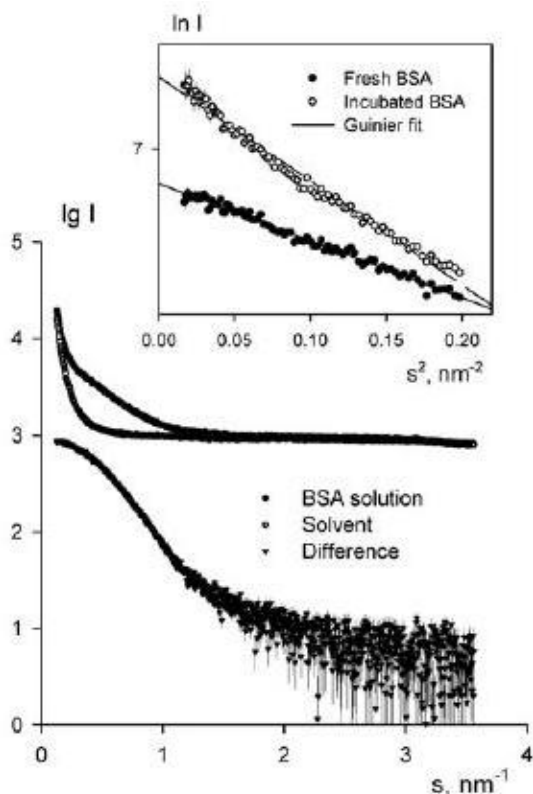
$$I(s) \cong 8\pi^{-4} \gamma'(0) + O_1 s^{-3} + O_2 s^{-4} + O(s^{-5})$$

όπου O_1, O_2 είναι τριγωνομετρικές μορφές της μορφής $\sin(sD_{\max})$. Ο κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την εξασθένηση της έντασης στις μεγάλες γωνίες είναι ανάλογος του s^{-4} και αυτός είναι γνωστός ως ο νόμος του Porod. Επιπλέον, για ομογενή σωματίδια, ο όρος $\gamma'(0)$ ισούται με $-(\Delta\rho)^2 S/4$, όπου S η επιφάνεια του σωματιδίου. Για την αφαίρεση της μέσης περιόσμησης πυκνότητας του σωματιδίου χρησιμοποιείται η σταθερά του Porod

$$Q = \int_0^{\infty} s^2 I(s) ds = 2\pi^2 \int_V (\Delta\rho(r))^2 dr$$

Για ομογενή σωματίδια ισχύει ότι $Q=2\pi^2(\Delta\rho)^2 V$ και θέτοντας υπόψη ότι $I(0)=(\Delta\rho)^2 V^2$, ο όγκος του Porod υπολογίζεται ως $V=2\pi^2 I(0)Q^{-1}$. Τα δεδομένα στις μεγάλες γωνίες ακολουθούν τη γραμμικότητα στο διάγραμμα $s^4 I(s)$ συναρτήσει των συντεταγμένων s^4 : $s^4 I(s) \approx Bs^4 + A$, και η αφαίρεση της σταθεράς B από το $I(s)$ δίνει μια προσέγγιση της σκέδασης του ομογενούς σώματος.

Το εσωτερικό τμήμα της καμπύλης σκέδασης που περιέχει πληροφορία για το ολικό σχήμα του μορίου μπορεί να προσεγγιστεί με μια καμπύλη Gauss όπως και η εξίσωση Guinier. Λόγω της αντίστροφης σχέσης, η σκέδαση στις μεγάλες γωνίες σχετίζεται με δομικά στοιχεία στο εσωτερικό του σωματιδίου. Ο Kratky έδειξε ότι για ένα μόριο που μοιάζει με αλυσίδα, η σκέδαση στις μεγάλες γωνίες είναι αντιστρόφως ανάλογη του s . Άρα, σε ένα διάγραμμα Is^2 συναρτήσει του s ή αλλιώς στο διάγραμμα Kratky, παρατηρείται μια συνεχής γραμμική αύξηση. Αντιθέτως για ένα σφαιρικό μόριο, η σκέδαση στις μεγάλες γωνίες ακολουθεί το νόμο του Porod δηλαδή η ένταση I είναι ανάλογη του s^{-4} ώστε το Is^2 μειώνεται ακαριαία καθώς αυξάνει το s . Έτσι στην περίπτωση του σφαιρικού σωματιδίου εμφανίζεται μια καλά καθορισμένη κορυφή στο διάγραμμα Kratky. Ένα σπειρωμένο, αδίπλωτο ή ένα σφαιρικό μόριο μπορούν απευθείας με τον τρόπο αυτό να αναγνωριστούν.



Εικ. 2.19. Τυπικό πρότυπο σκέδασης ακτίνων-X από ένα διάλυμα BSA, σκέδαση διαλύτη και δείγματος και η διαφορά τους. Η μικρότερη φωτογραφία αναπαριστά το διάγραμμα Guinier για φρέσκο και επωασμένο δείγμα BSA σε θερμοκρασία δωματίου όπου προκλήθηκε μη ειδική συσσωμάτωση (δεν λαμβάνεται ευθεία στο διάγραμμα Guinier). Πηγή: Svergun & Koch, 2003.

2.6.5 Το πρόγραμμα PRIMUS

Το πρόγραμμα PRIMUS συγκαταλέγεται στο πακέτο προγραμμάτων ATSAS και επιτρέπει την πρωτογενή επεξεργασία των δεδομένων. Συγκεκριμένα φέρει εργαλεία για την παραγωγή των αρχείων ανύσματος σκέδασης και απόκρισης του ανιχνευτή από πρότυπα διάθλασης και δείγματα βαθμονόμησης όπως και για τη μετατροπή των δεδομένων έτσι όπως προκύπτουν από τη δέσμη ακτίνων X του αποθηκευτικού δακτυλίου DORIS III (HASYLAB, συγχροτρόνιο DESY, Hamburg) στη μορφή ASCII αρχείων (κατάληξη αρχείου .dat). Ένα αρχείο .dat περιέχει μετά την επικεφαλίδα τρεις στήλες, όπου στην πρώτη αναφέρονται οι τιμές του άξονα του ανύσματος σκέδασης, οι τιμές έντασης $I(s)$ στη δεύτερη και προαιρετικά οι τιμές κανονικής απόκλισης $\sigma(s)$. Το άνυσμα σκέδασης $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$, όπου 2θ η γωνία σκέδασης και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Οι διαδικασίες επεξεργασίας που έπονται είναι ανεξάρτητες από τα αρχικά πρωτογενή δεδομένα. Μπορούν να πραγματοποιηθούν απλές αριθμητικές πράξεις όπως αφαίρεση, διαίρεση, υπολογισμός μέσου όρου. Διάφορα αρχεία δεδομένων μπορούν να προσαρμοστούν στην ίδια κλίμακα, να κατακερματιστούν ή να συνδυαστούν με τη χρήση προσαρμογής ελαχίστων τετραγώνων στο εύρος αλληλεπικάλυψης. Η επιλογή αυτή είναι χρήσιμη για την κατασκευή σύνθετων καμπύλων από δεδομένα μετρημένα σε διαφορετικές γωνίες. Για όλες τις επεξεργασίες υπολογίζεται το εύρος λάθους με τη

χρήση καθιερωμένων εξισώσεων. Το πρόγραμμα παρέχει δυνατότητα υπολογισμού των γενικών παραμέτρων μονοδιάσπαρτων και πολυδιάσπαρτων συστημάτων από τα δεδομένα σκέδασης, π.χ. την γυροσκοπική ακτίνα και την ένταση της ευθείας σκέδασης $I(0)$ μέσω της προσέγγισης Guinier. Παρόμοια εργαλεία χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των γυροσκοπικών ακτίνων του πάχους ή της διατομής επίπεδων ή κυλινδρικών σωματιδίων. Επίσης υπολογίζονται η σταθερά του Porod, Q , και ο αποκλεισμένος όγκος Porod του σωματιδίου. Η σταθερά που απαιτείται για την επιβολή της εξασθένησης κατά s^{-4} της έντασης, υπολογίζεται αυτόματα από την ασύμπτωτη του Porod στις μεγάλες γωνίες (Konarev et al. 2003).

2.6.6 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων και ανισομετρία σωματιδίου

Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $p(r)$ περιγράφει όπως έχει προαναφερθεί την κατανομή των αποστάσεων μεταξύ στοιχείων όγκου μέσα στο σωματίδιο και άρα παρέχει πληροφορία ως προς τη γεωμετρία του (Εικ. 2.20). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $p(r)$ περιέχει την ίδια πληροφορία με την ένταση της σκέδασης $I(s)$ με τη διαφορά ότι η αναπαράσταση στον πραγματικό χώρο είναι πιο διαισθητική και συχνά εξάγεται πληροφορία για το σχήμα του σωματιδίου με την απευθείας οπτική προσέγγιση της συνάρτησης $p(r)$. Τα σφαιρικά σωματίδια εμφανίζουν κωδωνοειδή μορφή του $p(r)$ με μέγιστο στο $D_{\max}/2$. Επιμηκυσμένα σωματίδια παρουσιάζουν ασύμμετρη κατανομή με μέγιστο στις μικρές αποστάσεις που αντιστοιχεί στην ακτίνα της διατομής τους. Πεπλατυσμένα σωματίδια εμφανίζουν πεπλατυσμένο μέγιστο που επίσης είναι μετατοπισμένο σε αποστάσεις μικρότερες του $D_{\max}/2$. Για ένα κοίλο σωματίδιο παρατηρείται ένα μέγιστο μετατοπισμένο προς αποστάσεις μεγαλύτερες του $D_{\max}/2$. Σωματίδια με καλά καθορισμένες υπομονάδες εμφανίζουν πολλαπλά μέγιστα που τα πρώτα αντιστοιχούν στις ενδομοναδιαίες αποστάσεις ενώ τα δεύτερα στην απόσταση μεταξύ των υπομονάδων (Εικ. 2.21). Πολύ ανισόμετρα σωματίδια επιδεικνύουν καμπύλες σκέδασης χωρίς κάποια χαρακτηριστικά οι οποίες φθίνουν πολύ πιο αργά σε σχέση με τα σφαιρικά σωματίδια. Συχνά οι διάφορες αποστάσεις εμφανίζονται ως μέγιστα ή ώμοι στα πρότυπα σκέδασης. Ο αξιόπιστος υπολογισμός του $p(r)$ είναι αναγκαία προϋπόθεση για την περαιτέρω ανάλυση του προσδιορισμού τρισδιάστατων μοντέλων.

Ο άμεσος μετασχηματισμός Fourier των πειραματικών δεδομένων με τη χρήση της εξίσωσης (3) δεν είναι δυνατός καθώς δεν είναι γνωστή η ακριβής τιμή του $I(s)$ η οποία δεν μπορεί να θεωρηθεί ταυτόχρονα στις απείρως μεγάλες και απείρως μικρές γωνίες. Το πρόβλημα αυτό καλείται φαινόμενο τέλους (termination effect). Για τη μείωση του φαινομένου αυτού η συνάρτηση της έντασης εξάγεται στο 0 μέσω της προσέγγισης Guinier και στις μεγάλες γωνίες μέσω του νόμου του Porod. Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται ο έμμεσος μετασχηματισμός Fourier, όπου υπολογίζεται μόνο η $I(s)$ για ένα πεπερασμένο αριθμό N σημείων (s_i) στο μεσοδιάστημα $[s_{\min}, s_{\max}]$ αντί του $[0, \infty]$. Με την αναπαράσταση του $p(r)$ στα όρια $[0, D_{\max}]$ με τον ευθύ συνδυασμό K ορθογώνιων συναρτήσεων $\phi_k(r)$

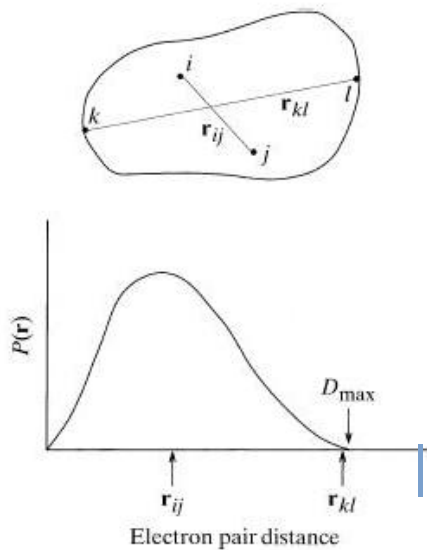
$$p(r) = \sum_{k=1}^K c_k \phi_k(s_i)$$

όπου οι συντελεστές c_k καθορίζονται από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων ελαχιστοποιώντας της εξίσωση

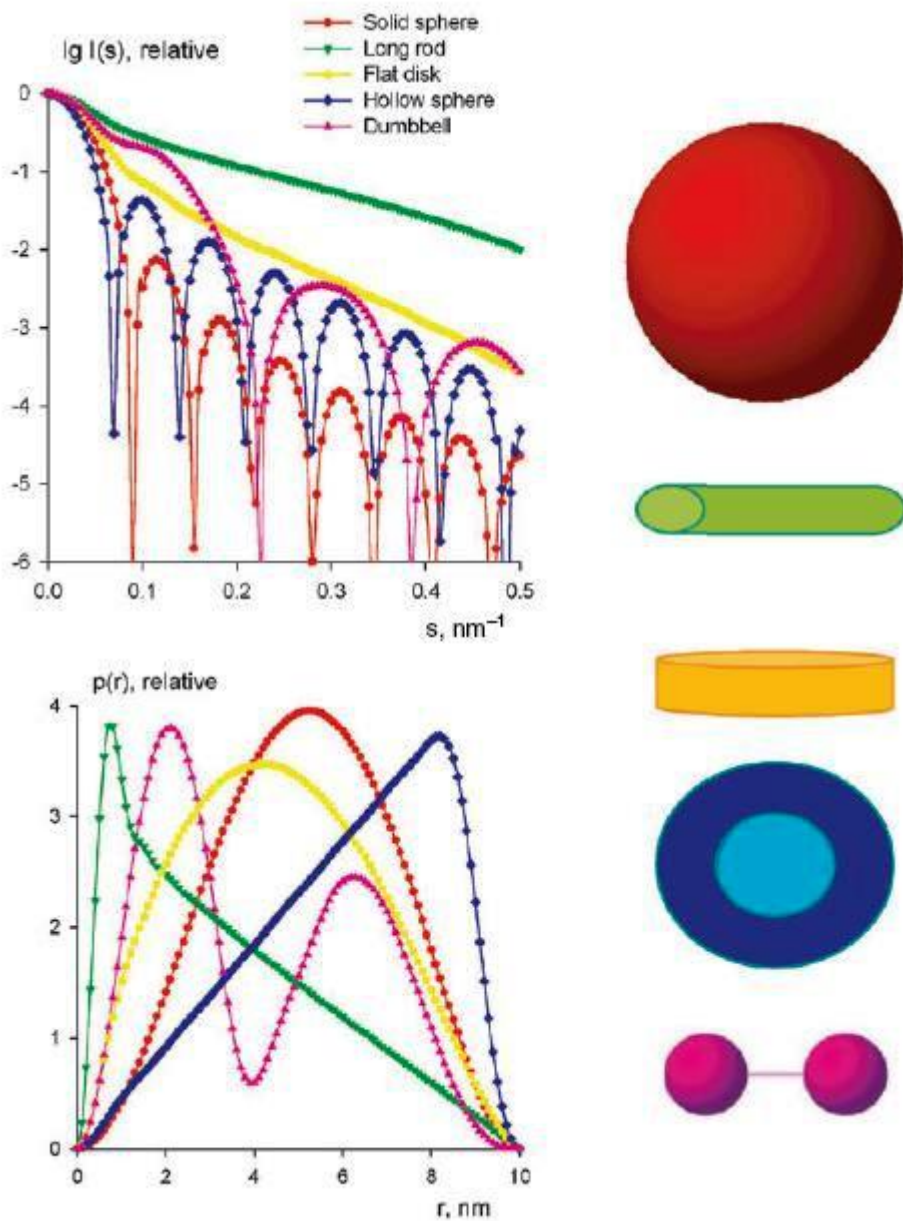
$$\Phi_a(c_k) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_i) - \sum_{k=1}^K c_k \psi_k(s_i)}{\sigma(s_i)} \right] + a \int_0^{D_{\text{max}}} \left[\frac{dp}{dr} \right]^2 dr$$

όπου ο παράγοντας $\psi_k(q)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier της εξίσωσης $\phi_k(r)$. Η παράμετρος κανονικοποίησης $a \geq 0$ ελέγχει την ισορροπία μεταξύ της εγκυρότητας του αποτελέσματος προσαρμογής στα πειραματικά δεδομένα (πρώτος προσθετέος) και του βαθμού εξομάλυνσης της συνάρτησης $p(r)$ (δεύτερος προσθετέος). Το πρόγραμμα GNOM (βλέπε παρακάτω) παρέχει την απαραίτητη καθοδήγηση με τη χρήση αντιληπτικών κριτηρίων που περιγράφουν την ποιότητα της λύσης. Είτε βρίσκει την καλύτερη λύση αυτόματα είτε σηματοδοτεί ότι οι ισχυρισμοί για το σύστημα $p(r)$ ή τιμή D_{max} είναι λανθασμένοι.

Η μέθοδος του έμμεσου μετασχηματισμού συνήθως είναι ανώτερη άλλων τεχνικών καθώς θέτει ισχυρούς περιορισμούς, όπως είναι τα όρια και η ομαλότητα της συνάρτησης $p(r)$. Μια εκ των προτέρων πρώτη γνώση του D_{max} μπορεί να βελτιωθεί επαναλαμβανόμενα. Η απευθείας σκέδαση $I(0)$ και η τιμή R_g μπορούν να υπολογιστούν άμεσα από τις συναρτήσεις $p(r)$ και πιο αξιόπιστα σε σχέση με την προσέγγιση Guinier, αφού οι υπολογισμοί μέσω $p(r)$ είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην αποκοπή δεδομένων στις μικρές γωνίες (συγκεκριμένα, η συνθήκη $s < 1.3/R_g$ αντικαθίσταται από την λιγότερο αυστηρή συνθήκη $s_{\text{min}} < \pi/D_{\text{max}}$) ή στην παρουσία συσσωματωμάτων που επιμολύνουν την καμπύλη σκέδασης στις μικρές γωνίες (Svergun & Koch 2003, Tsuruta & Johnson 2006).



Εικ. 2.20. Ο ορισμός της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων των ζευγών ηλεκτρονίων $P(r)$. Πρόκειται για ιστόγραμμα όλων των αποστάσεων των ηλεκτρονιακών ζευγών μέσα σε ένα σωματίδιο. Η μεγαλύτερη διάσταση του μορίου D_{max} καθορίζεται από το σημείο όπου η συνάρτηση μηδενίζεται. Πηγή: Tsuruta & Johnson, 2006



Εικ. 2.21. Οι εντάσεις σκέδασης και οι συναρτήσεις κατανομής αποστάσεων για τα διάφορα γεωμετρικά σώματα. Πηγή: Svegun & Koch, 2003

2.6.7 Το πρόγραμμα GNOM

Πρόκειται για ένα πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier που λύνει την εξίσωση ολοκληρώματος

$$I_{\text{exp}}(s) = \int_{r_{\text{min}}}^{r_{\text{max}}} p(r) K(s, r) dr$$

όπου $p(r)$ η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων καθορισμένη στα όρια $[\Gamma_{\min}, \Gamma_{\max}]$, και $K(s,r)$ είναι ο εσωτερικός πυρήνας του αντίστοιχου μετασχηματισμού Fourier. Το πρόγραμμα, πέραν του υπολογισμού της σταθερής συνάρτησης κατανομής στον πραγματικό χώρο, πραγματοποιεί ευθυγράμμιση, αφαίρεση θορύβου και υπολογισμούς των διαφορών σταθερών των SAXS (Semenyuk & Svergun 1991). Η επιλογή της παραμέτρου κανονικοποίησης a πραγματοποιείται αυτόματα από τη μέθοδο γενικής ασυμφωνίας και η βελτίωσή της πραγματοποιείται είτε με βάση ενός κριτηρίου ημι-ευνοϊκότερης συνθήκης ή χειρωνακτικά. Τα αντιληπτικά κριτήρια που εντίθενται στο πρόγραμμα παρέχουν την συνάρτηση κατανομής χωρίς περαιτέρω ενέργειες από πλευράς χρήστη (βλέπε παρακάτω).

2.6.8 Τα αντιληπτικά κριτήρια στο GNOM

Ο μετασχηματισμός των πειραματικά μετρημένων εντάσεων σκέδασης σε συνάρτηση κατανομής αποστάσεων στον πραγματικό χώρο αποτελεί ένα δύσκολο πρόβλημα καθώς ένα μικρό λάθος στον αντίστροφο χώρο των πειραματικών δεδομένων μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλο λάθος στον πραγματικό χώρο της κατανομής αποστάσεων. Η μη αρνητική σταθερά κανονικοποίησης a παίζει σπουδαίο ρόλο στη σταθερότητα της λύσης. Εάν $a=0$, η λύση είναι πλήρως ασταθής. Πολύ μεγάλες τιμές a δίνουν λύσεις που ικανοποιούν την προσαρμογή στον πραγματικό χώρο αλλά προσθέτουν μεγάλες αποκλίσεις στα πειραματικά δεδομένα στον αντίστροφο χώρο. Σύμφωνα με τη θεωρία κανονικοποίησης θα πρέπει αν υπάρχει μια ιδεατή τιμή a μεταξύ των ακραίων τιμών. Δεν υπάρχει γενικό πρωτόκολλο για την επιλογή σωστής τιμής a . Συχνά οι χρήστες των έμμεσων μεθόδων απλά εμπιστεύονται οπτικά το αποτέλεσμα προσαρμογής στον αντίστροφο και πραγματικό χώρο για τις διαφορετικές τιμές a και επιλέγουν εκείνη που δίνει καλύτερη προσαρμογή και στους δυο χώρους. Εναλλακτικά ή συμπληρωματικά, η χρήση των αντιληπτικών κριτηρίων που έχουν ενσωματωθεί στο πρόγραμμα GNOM συνεισφέρουν στην επιλογή σωστής τιμής a . Τα αντιληπτικά κριτήρια είναι τα παρακάτω (Svergun 1992).

Κυματώσεις (oscillations)

Γενικά έχει επικρατήσει η θεώρηση ότι η καλύτερη συνάρτηση $p(r)$ είναι οπτικά ομαλή. Ένα μέτρο ομαλότητας παρέχει ο λόγος $\|p'_a\|/\|p_a\|$ όπου p'_a η πρώτη παράγωγος του p_a . Αν το κριτήριο

$$\text{OSCILL} = (\|p'_a\|/\|p_a\|)/(\pi/\Delta D)$$

είναι κοντά στο 1, η $p_a(r)$ είναι μια ομαλή μονής επικράτειας συνάρτηση, π.χ. μια σφαίρα δίνει OSCILL ίσο με 1.1. Μια τιμή OSCILL ≈ 2 αντιστοιχεί είτε σε μια κυματώδη μονής επικράτειας κατανομή είτε σε ομαλή διπλής επικράτειας.

Συστηματικές αποκλίσεις (systematic deviations)

Το πιο σημαντικό κριτήριο στον αντίστροφο χώρο συνδέεται με τις συστηματικές αποκλίσεις της ανασυσταμένης συνάρτησης από τα πειραματικά δεδομένα. Απουσία συστηματικών αποκλίσεων στον αντίστροφο χώρο η τιμή του κριτηρίου

$$\text{SYSDEV} = N_s/(N/2)$$

θα πρέπει να τείνει στο 1.

Ασυμφωνία (discrepancy)

Το κριτήριο μετρά εάν οι παραμένουσες τιμές που λαμβάνονται υπόκεινται σε πειραματικά λάθη. Η τιμή του **DISCRP** για την καλύτερη λύση θα πρέπει να είναι κάπως μικρότερη του 1 σύμφωνα με το κριτήριο χ^2 . Πρακτικά καλές τιμές είναι αυτές μεταξύ 0.7 και 0.95.

Σταθερότητα (stability)

Το κριτήριο αυτό μετρά πόσο αλλάζει η λύση με μεταβολές του α . Κοντά στις σωστές τιμές του α , το κριτήριο **STABIL** αναμένεται να έχει τιμές πολύ μικρότερες του 1.

Θετικότητα (positivity)

Σε πολλές περιπτώσεις η συνάρτηση $p(r)$ αναμένεται να είναι μη αρνητική. Το φυσικό μέτρο της μη αρνητικότητας της συνάρτησης μετριέται από το κριτήριο **POSITV** που για μη αρνητικές συναρτήσεις θα πρέπει να είναι ίσο με 1.

Εγκυρότητα του κεντρικού τμήματος της συνάρτησης $p(r)$ (validity in the central part of $p(r)$)

Φυσιολογικά, όταν το εύρος $[D_{\min}, D_{\max}]$ υποδεικνύεται σωστά η περισσότερη πληροφορία εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα της κατανομής που αποκρίνεται στις μεγαλύτερες τιμές $p(r)$. Οι τιμές αυτές θα πρέπει όχι μόνο να είναι οι μεγαλύτερες αλλά και λογικές. Για την αποφυγή ασταθών λύσεων που ταλαντώνονται γύρω από το 0, εισάγεται το κριτήριο **VALCEN** που για μια συμπαγή σφαίρα για παράδειγμα έχει τιμή 0.95.

Για τιμές α πολύ υψηλές, η προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα είναι φτωχή και άρα **DISCRP** >> 1, **SYSDEV** << 1. Για τιμές του α πολύ μικρές όπου η λύση είναι ασταθής, **OSCILL** >> 1, **POSITV** \approx 0.5. Για χαμηλές τιμές του α το κριτήριο **VALCEN** έχει επίσης μικρή τιμή. Τέλος το κριτήριο **STABIL** εμφανίζει ελάχιστο στο εύρος των εύλογων τιμών του α αλλά παρόλα αυτά εμφανίζει χαμηλές τιμές και για πολύ υψηλές και πολύ χαμηλές τιμές του α . Γενικά αποδεκτές τιμές των **DISCRP** & **SYSDEV** για την καλύτερη προσαρμογή στον αντίστροφο χώρο απαιτούν χαμηλές τιμές α ενώ για να προκύψουν καλές τιμές **OSCILL** & **POSITV** στον πραγματικό χώρο του $p(r)$ απαιτούνται υψηλότερες τιμές α . Επιπλέον, κοντά στην σωστή λύση το **VALCEN** αποκτά μέγιστη τιμή ενώ το **STABIL** θα πρέπει να είναι μικρό. Ο συνδυασμός αυτών των παραμέτρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή μιας μέτρησης που θα συνοψίζει την ποιότητα της λύσης. Στον υπολογισμό της τελικής εκτίμησης (total estimation) μεγαλύτερη βαρύτητα πέφτει στα κριτήρια **OSCILL**, **STABIL** και **SYSDEV**, ενώ οι επιτρεπόμενες αποκλίσεις είναι μεγαλύτερες για τα **DISCRP** και **OSCILL** καθώς οι τιμές τους μπορεί να ποικίλλουν σημαντικά με αλλαγές του α . Η τιμή της τελικής εκτίμησης έχει εύρος από 0 (πλήρως απορριπτέα λύση) μέχρι 1 (ιδανική λύση).

2.6.9 Ανάλυση *ab initio* του σχήματος του σωματιδίου και της δομής επικρατειών – τα προγράμματα DAMMIN & GASBOR

Η αναδόμηση ενός τρισδιάστατου μοντέλου ενός αντικειμένου από το μονοδιάστατο πρότυπο σκέδασής του είναι ένα δύσκολο πρόβλημα. Η μετάφραση των δεδομένων πραγματοποιείται υπό όρους ομοιογενούς σώματος. Στο παρελθόν η μοντελοποίηση σχήματος συνέβαινε με τη μέθοδο των πολλαπλών δοκιμών και ακυρώσεων (trial-and-error), με τον υπολογισμό της σκέδασης γνωστών σχημάτων και τη σύγκρισή τους με τα πειραματικά δεδομένα. Τα μοντέλα ήταν είτε τριών παραμέτρων γεωμετρικά σώματα όπως πρίσματα, τριαξονικές ελλείψεις, ελλειπτικοί ή κοίλοι κυκλικοί κύλινδροι κλπ. ή δομές φτιαγμένες από συγκεντρώσεις κανονικά πακεταρισμένων σφαιριδίων. Τα μοτίβα σκέδασης των μοντέλων αυτών υπολογίζονταν με τη χρήση αναλυτικών ή ημι-αναλυτικών μεθόδων με εξαίρεση την περίπτωση των μοντέλων σφαιριδίων όπου χρησιμοποιούνταν η εξίσωση Debye

$$I(s) = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^K f_i(s) f_j(s) \frac{\sin(sr_{ij})}{sr_{ij}}$$

όπου K ο αριθμός των σφαιριδίων, $f_i(s)$ το πλάτος σκέδασης από το νούμερο i σφαιρίδιο και $r_{ij} = |r_i - r_j|$ η απόσταση μεταξύ ενός ζεύγους σφαιριδίων. Αυτός ο τύπος μοντελοποίησης επέτρεπε την κατασκευή πολύπλοκων μοντέλων τα οποία όμως έπρεπε να βελτιωθούν με παραπάνω πληροφορία (Svergun & Koch 2003).

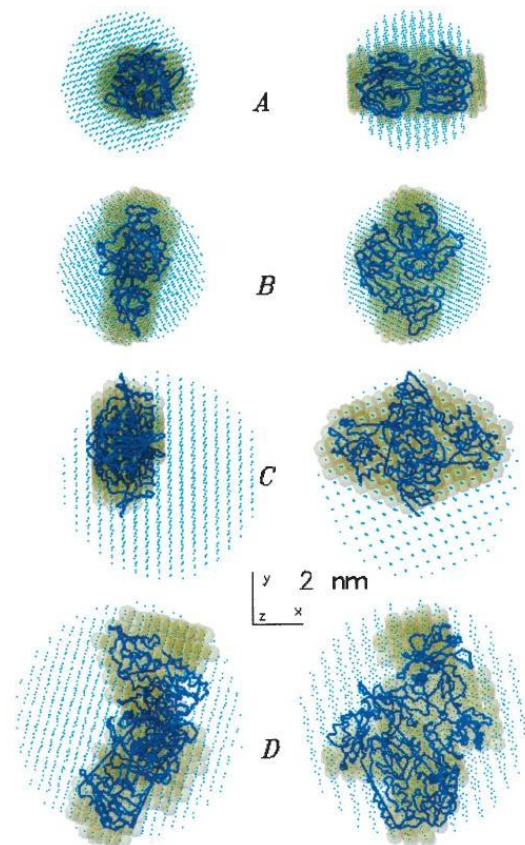
Στην πράξη, ένας συνήθως σφαιρικός όγκος διαμέτρου D_{\max} γεμίζει με πυκνά πακεταρισμένα σφαιρίδια αριθμού M ακτίνας πολύ μικρότερης (r_0). Κάθε σφαιρίδιο μπορεί να ανήκει είτε στο διαλύτη (αποκτά δείκτη=0) είτε στο σωματίδιο (αποκτά δείκτη=1) και το σχήμα περιγράφεται ως μια δυαδική αλληλουχία X μήκους M . Ξεκινώντας από μια τυχαία κατανομή από 1 και 0 σφαιρίδια, το μοντέλο τροποποιείται τυχαία με τη χρήση μιας ομοιάζουσας με Monte-Carlo αναζήτησης για την ανεύρεση μιας αλληλουχίας X που να ταιριάζει με τα πειραματικά δεδομένα. Καθώς τα μοντέλα αναζήτησης συνήθως περιλαμβάνουν χιλιάδες σφαιριδίων, η λύση θα πρέπει να περιοριστεί. Στη διαδικασία προσομοίωσης απόπτωσης (simulated annealing) που πραγματοποιείται από το πρόγραμμα DAMMIN (Εικ. 2.22) προστίθεται ένας αυστηρός όρος «ποινής» $P(X)$ στην συνάρτηση $f(X) = \chi^2 + P(X)$ για την διασφάλιση ότι το τελικό σχήμα θα είναι συμπαγές και συνεχόμενο. Αντί της χρήσης της εξίσωσης Debye, η ένταση υπολογίζεται με τη χρήση σφαιρικών αρμονικών για την επίτευξη της διαδικασίας (Svergun 1999).

Ο αρχικός περιορισμός των μεθόδων καθορισμού σχήματος, δηλαδή η ιδέα περί ομοιογενούς πυκνότητας σωματιδίου περιορίζει τη διακριτική ικανότητα στα 2 - 3 nm και επίσης μειώνει και την αξιοπιστία των μοντέλων καθώς μόνο περιορισμένη ποσότητα των αρχικών δεδομένων χρησιμοποιείται τελικά. Για σωματίδια ενός είδους σωματιδίου και μιας καμπύλης σκέδασης, μια εναλλακτική μέθοδος ανακατασκευής πρωτεϊνικών μοντέλων έχει προταθεί όπου η πρωτεΐνη αναπαρίσταται ως μια συγκέντρωση ψευδών καταλοίπων. Ο αριθμός των καταλοίπων M συνήθως είναι γνωστός από την αλληλουχία της πρωτεΐνης ή τη μετάφραση του DNA και σκοπός πια είναι η ανεύρεση των συντεταγμένων των M ψευδών καταλοίπων που θα ταιριάζουν με τα πειραματικά δεδομένα και θα κατασκευάζουν μια δομή που θα μοιάζει με πρωτεΐνη. Η μέθοδος εφαρμόζεται στο πρόγραμμα GASBOR και ξεκινά από ένα τυχαία κατανομημένο νέφος ψευδών καταλοίπων σε ένα σφαιρικό όγκο αναζήτησης διαμέτρου D_{\max} . Τα ψευδή κατάλοιπα ανατοποθετούνται τυχαία μέσα

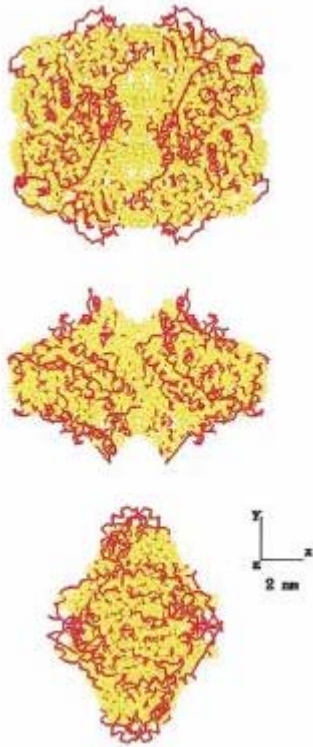
στον όγκο αναζήτησης με τη χρήση ενός πρωτοκόλλου προσομοίωσης ανόπτησης αλλά το κριτήριο του συμπαγούς στον καθορισμό σχήματος αντικαθίσταται εδώ από την απαίτηση το μοντέλο να διακρίνεται από μια χωρική διεύθετη συμβατή με αλυσίδα αμινοξέων των ψευδών καταλοίπων (Εικ. 2.23). Συγκεκριμένα, καθώς τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα των γειτονικών αμινοξέων σε μια πρωτοταγή αλληλουχία απέχουν μεταξύ τους κατά ≈ 0.38 nm, απαιτείται ότι κάθε ψευδές κατάλοιπο θα πρέπει να έχει γείτονες σε απόσταση 0.38 nm. Σε σχέση με τα προγράμματα καθορισμού σχήματος όπως είναι το DAMMIN, η μοντελοποίηση με ψευδή κατάλοιπα βελτιώνει την διακριτική ικανότητα, ερμηνεύει καλύτερα την εσωτερική δομή, χρησιμοποιεί μεγαλύτερο μερίδιο των πειραματικών δεδομένων και γενικά παράγει πιο λεπτομερή και αξιόπιστα μοντέλα (Svergun et al. 2001).

Η αξιοπιστία των μεθόδων ανακατασκευής *ab initio* μοντέλων μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη πληροφορίας για το σωματίδιο. Οι περιορισμοί συμμετρίας για παράδειγμα επιτρέπουν την επίσπευση των υπολογισμών και μειώνουν δραστικά τον αριθμό των παραμέτρων των μοντέλων. Ο αριθμός συμμετρικών ομάδων που περιέχονται στα προγράμματα *ab initio* ανακατασκευής μοντέλων διαρκώς αυξάνεται και επί του παρόντος περιέχουν σημειακές συμμετρίες P_n , όπου $n=1$ έως 19 άξονες συμμετρίας περιστροφής, ομάδες P_{2n} όπου $n=1$ έως 12 και επίσης τις κυβικές ομάδες συμμετρίας P_{23} & P_{432} . Τελευταία προστέθηκε και η εικοσαεδρική συμμετρία για τη μελέτη π.χ. ιικών σωματιδίων.

Επίσης, αν είναι γνωστή η πληροφορία σχετικά με την ανισομετρία του σωματιδίου μπορεί να τεθεί υπόψη των προγραμμάτων (επιλογές ωοειδούς ή πεπλατυσμένης ανισομετρίας). Επίσης τα προγράμματα μπορούν να χρησιμοποιήσουν μη σφαιρικούς όγκους αναζήτησης όπως ελλειψοειδείς, κυλινδρικούς, κοίλους κυλινδρικούς ή παραλληλεπίπεδους.



Εικ. 2.22. Καθορισμός σχήματος πρωτεϊνών σε διάλυμα από το πρόγραμμα DAMMIN. Με τελείες αναπαρίστανται οι όγκοι αναζήτησης, με ημιδιαφανείς σφαίρες ακτίνας r_0 τα ανακατασκευασμένα μοντέλα, τα οποία βρίσκονται σε υπέρθεση με τα αντίστοιχα ατομικά μοντέλα. Οι προσανατολισμοί δεξιά είναι περιστραμμένοι κατά 90 μοίρες. Πηγή: Svergun, 1999.



Εικ. 2.23. Το ατομικό μοντέλο της τετραμερούς πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης σε υπέρθεση με το μοντέλο ψευδών καταλοίπων από το πρόγραμμα GASBOR. Πηγή: Svergun *et al.*, 2001.

2.6.10 Υπέρθεση ανεξάρτητων μοντέλων - παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου – το πακέτο προγραμμάτων DAMAVER

Διαφορετικά περιστατικά έναρξης των μεθόδων Monte Carlo αποφέρουν πολλαπλές λύσεις ανεξάρτητων μοντέλων που ταιριάζουν στον ίδιο βαθμό με τα πειραματικά δεδομένα. Το πρόβλημα της καλύτερα ταιριασμένης υπέρθεσης τρισδιάστατων δομών είναι κεντρικό στις μελέτες της δομικής βιολογίας που αφορούν αναγνώριση μοτίβων και κατηγοριοποίησή τους. Θεωρώντας μετασχηματισμούς άκαμπτου σώματος, το πρόβλημα μορφοποιείται ως εξής: δεδομένων δυο σετ σημείων που αναπαριστούν π.χ. δυο δομικά μοντέλα, πρέπει να ανευρεθεί η περιστροφή και η κίνηση του δεύτερου σετ που ελαχιστοποιεί την ασυμφωνία μεταξύ των δύο σετ (Kozin & Svergun 2001). Το πακέτο προγραμμάτων DAMAVER αφορά απλούς, αξιόπιστους και γρήγορους αλγόριθμους που όχι μόνο προσαρμόζουν τα μοντέλα μεταξύ τους αλλά παρέχουν και αριθμητικό υπολογισμό της ομοιότητάς τους. Τα ανεξάρτητα μοντέλα μπορούν να υπερτεθούν και να υπολογισθεί ο μέσος όρος ώστε να υπολογιστεί η σταθερότητα της λύσης και να παραχθεί το πιο πιθανό μοντέλο. Το πρόγραμμα SUPCOMB του πακέτου DAMAVER ευθυγραμμίζει δυο μοντέλα χαμηλής ή υψηλής ανάλυσης τα οποία αναπαριστώνται από συλλογές σημείων και καθορίζει ένα μέτρο ανομοιότητας των δυο μοντέλων, ελαχιστοποιώντας μια παράμετρο κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας (NSD², normalized spatial discrepancy). Όλα τα ζεύγη των ανεξάρτητων

² Ο ορισμός του NSD έχει ως εξής: για κάθε σημείο s_{1i} από το σετ $S_1 = \{s_{1i}, i=1, \dots, N_1\}$, η ελάχιστη τιμή των αποστάσεων μεταξύ του s_{1i} και όλων των σημείων του σετ $S_2 = \{s_{2i}, i=1, \dots, N_2\}$ ορίζεται ως $\rho(s_{1i}, S_2)$. Το NSD μεταξύ των σετ S_1 και S_2 ορίζεται ως ο κανονικοποιημένος μέσος όρος

μοντέλων ευθυγραμμίζονται με το SUPCOMB και το μοντέλο που παράγει τη χαμηλότερη μέση ασυμφωνία με τα υπόλοιπα λαμβάνεται ως μοντέλο αναφοράς (πιο πιθανό μοντέλο). Τα μοντέλα των οποίων η μέση τιμή NSD ξεπερνά κατά δυο φορές τη διασπορά του NSD αποκλείονται. Όλα τα υπόλοιπα ευθυγραμμίζονται με το μοντέλο αναφοράς και η συνολική συγκέντρωση αναχαρτογραφείται σε ένα πυκνά δομημένο πλέγμα. Το μέσο μοντέλο που αποκρίνεται στο αλληλοσυνδεόμενο σύνολο των πιο «κατοικημένων» σημείων αξιολογείται μέσω φιλτραρίσματος του χάρτη για την ανάδειξη του όγκου που απευθύνεται στο μέσο αποκλεισμένο όγκο όλων των ανακατασκευών. Αν και το μέσο μοντέλο που προκύπτει έτσι διατηρεί τα πιο σταθερά στοιχεία της λύσης, η σκέδαση που υπολογίζεται από το μοντέλο αυτό συνήθως δεν ταιριάζει με τα πειραματικά δεδομένα. Το πακέτο προγραμμάτων DAMAVER φέρει έναν αλγόριθμο που καλείται DAMSTART. Αυτός παράγει ένα αρχείο που αναπαριστά την ολική περιοχή διασποράς όπου τα κεντρικά σφαιρίδια με τις υψηλότερες πυκνότητες που κατέχουν το μισό του μέσου αποκλεισμένου όγκου όλων των ανακατασκευών, ακινητοποιούνται ως σφαιρίδια του σωματιδίου. Το αρχείο αυτό στη συνέχεια χρησιμοποιείται στο πρόγραμμα DAMMIN ως όγκος αναζήτησης για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων και το σχήμα που προκύπτει αποτελεί τη βελτιωμένη μορφή του πιο πιθανού μοντέλου.

2.6.11 Προετοιμασία δειγμάτων

Το ελάχιστο όριο συγκέντρωσης πρωτεΐνης που μπορεί να μετρηθεί είναι περίπου 1 mg/ml. Υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξάνουν το πραγματικό σήμα από το θόρυβο και μειώνουν τους χρόνους έκθεσης αλλά μπορεί να παρατηρηθεί διασωματιδιακή παρεμβολή. Το δείγμα θα πρέπει να είναι μονοδιάσπαρτο γιατί στην αντίθετη περίπτωση θα ληφθεί ο μέσος όρος σκέδασης όλων των πληθυσμών μορίων. Χημικά συστατικά που μπορεί να αλλοιώνουν την απορρόφηση των ακτίνων X από το δείγμα θα πρέπει να αφαιρούνται πριν την έκθεση. Για τον υπολογισμό της σκέδασης του δείγματος θα πρέπει να αφαιρεθεί η σκέδαση της κυψελίδας, του διαλύτη και η παρασιτική σκέδαση λόγω της εγγύτητας στην πρωτογενή δέσμη. Η συγκέντρωση των δειγμάτων θα πρέπει να είναι κατά το δυνατόν σωστότερα υπολογισμένη καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του μοριακού βάρους του σωματιδίου. Βλάβη λόγω ακτινοβόλησης (radiation damage) μπορεί να εμφανιστεί σε ευαίσθητα δείγματα με τη μορφή αποδόμησης ή συσσωμάτωσης στις μικρές γωνίες και πιστοποιείται με πολλαπλή ακτινοβόληση του ίδιου δείγματος και συγκριτική απεικόνιση των καμπυλών σκέδασης των πολλαπλών ακτινοβολήσεων. Η ηλεκτροφόρηση και η μέτρηση της βιολογικής ενεργότητας του δείγματος μετά την έκθεση πιστοποιεί εναλλακτικά την ακεραιότητα του δείγματος. Η βλάβη λόγω

$$\rho(S_1, S_2) = \left\{ (1/2) \left[(1/N_1 d_2^2) \sum_{i=1}^{N_1} \rho^2(s_{1i}, s_2) + (1/N_2 d_1^2) \sum_{i=1}^{N_2} \rho^2(s_{2i}, s_1) \right] \right\}^{1/2}$$

όπου N_i ο αριθμός των σημείων στο S_i και d_i η μέση απόσταση μεταξύ δυο γειτονικών σημείων στο S_i . Για ιδεατά υπερτιθέμενα όμοια αντικείμενα, το NSD τείνει στο 0. Υπερβαίνει την τιμή 1 όταν τα αντικείμενα διαφέρουν συστηματικά το ένα από το άλλο.

ακτινοβόλησης κατά τη διάρκεια της έκθεσης μπορεί συχνά να αποφευχθεί με την εξασθένηση της πρωτογενούς δέσμης ή με τη χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων αναγωγικού μέσου που απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες (Tsuruta & Johnson 2006).

Βιβλιογραφία

Balakrishnan G., Hu Y., Case M.A. and Spiro T.G. 2006. Microsecond melting of a folding intermediate in a coiled-coil peptide, monitored by T-jump/UV Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 110, 19877-19883

Bystroff C. and Shao Y. 2002. Fully automated *ab initio* protein structure prediction using I-SITES, HMSSTR and ROSETTA. *Bioinformatics*, 18, S54-S61

Carrion M.M. and Villaverde A. 2001. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters* 489, 29-33

Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G. and Elofsson A. 1997. Prediction of transmembrane α -helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Prot. Engin.* 10(6), 673-676

de Castro E., Sigrist C.J.A., Gattiker A., Bulliard V., Langendijk-Genevaux P.S., Gasteiger E., Bairoch A. and Hulo N. 2006. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research* 34, W362-W365

De Marco A. and de Marco V. 2004. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *J. Biotechnol.* 109, 45-52

Duet vectors, Novagen User protocol, TB340 Rev. E 0305, 1-12

Dzivenu O.K., Park H.H. and Wu H. 2004. General co-expression vectors for the overexpression of heterodimeric protein complexes in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* 38, 1-8

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., and Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. From: *The Proteomics Protocols Handbook*, 52, 571-608, edited by: J. M. Walker © Humana Press Inc., Totowa, NJ

Gel filtration, Principles and Methods. 2002. Amersham Biosciences handbook.

Gorgens J.F., van Zyl W.H., Knoetze J.H. and Hahn-Hagerdal B. 2001. The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase

production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. *Biotech. Bioengin.* 73(3), 238-245

Greenfield N.J. 1996. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* 235, 1-10

Greenfield N.J. 2006a. Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism. *Nat. Prot.* 1(6), 2891-2899

Greenfield N.J. 2006b. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat. Prot.* 1(6), 2527-2535

Greenfield N.J. 2006c. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Prot.* 1(6), 2876-2890

Hendler R.W. and Shrager R.I. 1994. Deconvolutions based on singular value decomposition and the pseudoinverse: a guide for beginners. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 28, 1-33

Henricksen L.A., Umbricht C.B. and Wold M.S. 1994. Recombinant replication protein A: expression, complex formation and functional characterization. *JBC*, 269(15), 11121-11132

Humphreys D.P., Carrington B., Bowering L.C., Ganesh R., Sehdev M., Smith B.J., King L.M., Reeks D.G., Lawson A. and Popplewell A.G. 2002. A plasmid system for optimization of Fab' production in *Escherichia coli*: importance of balance of heavy chain and light chain synthesis. *Prot. Expr. Purif.* 26, 309-320

Ion exchange and chromatofocusing, Principles and Methods. 2004. Amersham Biosciences handbook.

Ishiai M. Sanchez J.P., Amin A.A., Murakami Y. and Hurwitz J. 1996. Purification, gene cloning and reconstitution of the heterotrimeric single stranded DNA-binding protein from *Schizosaccharomyces pombe*. *JBC*, 271(34), 20868-20878

Jana S. and Deb J.K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 289-298

Johnston K., Clements A., Venkataramani R.N., Trievel R.C. and Marmorstein R. 2000. Coexpression of proteins in bacteria using T7-based expression plasmids: expression of heterodimeric cell-cycle and transcriptional regulatory complexes. *Prot. Expr. Purif.* 20, 435-443

Jones D.T. 1999. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202

Kelly S.M., Jess T.J. and Price N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119-139

Kim K.J., Kim H.E., Lee K.H., Han W., Yi M.J., Jeong J. and Oh B.H. 2004. Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. *Prot. Sci.* 13, 1698-1703

Konarev P.V., Petoukhov M.V., Volkov V.V., Svergun D.I. 2006 ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis *J. Appl. Cryst.* 39, 277-286

Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J. and Svergun D.I. 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 36, 1277-1282

Konno T. 1998. Conformational diversity of acid-denatures cytochrome *c* studied by a matrix analysis of far-UV spectra. *Prot. Sci.* 7, 975-982.

Kozin M.B. and Svergun D.I. 2001 Automated matching of high- and low- resolution structural models. *J. Appl. Cryst.* 34, 33-41

Kuroda K., Kato M., Mima J. and Ueda M. 2006. Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 127-136

Lalonde S., Ehrhardt D.W., Loque D., Chen J., Rhee S.Y. and Frommer W.B. 2008 Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations. *The Plant J.* 53, 610-635

Li C., Schwabe J.W., Banayo E. and Evans R.M. 1997. Coexpression of nuclear receptor partners increases their solubility and biological activities. *PNAs* 94, 2278-2283

Martin S.R. and Schilstra M.J. 2008. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Meth Cell Biol.* 84, Ch.10, 263-293

McNally E.M., Goodwin E.B., Spudich J.A. and Leinwand L.A. 1988. Coexpression and assembly of myosin heavy chain and myosin light chain in *Escherichia coli*. *PNAs* 85, 7270-7273.

Mierendorf R., Yeager K. and Novy R. 1994. The pET system: your choice of expression. *Innovations*, 1, 1-3

Miernyk J.A. and Thelen J.J. 2008 Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *The Plant J.* 53, 597-609

Novy R., Drott D., Yaeger K. and Mierendorf. 2001. Overcoming the codon bias of *E.coli* for enhanced protein expression. *Innovations*, 12, 1-3.

Perez J.P. and Gutierrez J. 1995. An arabinose-inducible expression vector, pAR3, compatible with ColE1-derived plasmids. *Gene*, 158, 141-142.

Polayes D. 1996. Prokaryotic protein expression and purification with the PROEX HT expression system. *Focus*, 18(2), 50-53

Prilusky J., Felder C.E., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg E.H., Man O., Beckmann J.S., Silman I. and Sussman J.L. 2005. FoldIndex: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinf. Appl. Note* 21(16), 3435-3438

Q-sepharose Fast Flow Instructions, 2002. Amersham Biosciences.

Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M. and Seraphin B. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotech.* 17, 1030-1032

Schweder T., Lin H.Y., Jurgen B., Breitenstein A., Riemschneider S., Khalameyzer V., Gupta A., Buttner K. and Neubauer P. 2002. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 330-337

Semenyuk A.V. and Svergun D.I. 1991. GNOM – a program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Cryst.* 24, 537-540

Shen W., Yun S., Tam B., Dalal K. and Pio F.F. 2005. Target selection of soluble protein complexes for structural proteomics studies. *Proteome Science*, 3(3), 1-9

Shuman S. 1990. Catalytic activity of vaccinia mRNA capping enzyme subunits coexpressed in *Escherichia coli*. *JBC*, 265(20), 11960-11966

Sigrist C.J.A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A. and Bucher P. 2002. PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinf.* 3(3), 265-274

Sorensen H.P. and Mortensen K.K. 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 115, 113-128

Sreerama N. and Woody R.W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287, 252-260

Stebbins C.E., Kaelin W.G. Jr, Pavletich N.P. 1999. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science*, 284, 455-461

Svergun D.I. 1992. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Cryst.* 25, 495-503

Svergun D.I. 1999 Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing *Biophys J.* 76, 2879-2886

- Svergun D.I. and Koch M.H.J. 2003 Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys* 66, 1735-1782
- Svergun D.I., Petoukhov M.V., Koch M.H.J. 2001 Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* 80, 2946-2953
- Tan S. 2001. A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. *Prot. Expr. Purif.* 21, 224-234
- The pET system tutorial, Novagen 2002-2003 catalog, 88-92
- The Qiaexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2003. Qiagen.
- Tsuruta H. and Johnson J.E. 2006 Small-angle X-ray scattering. *International Tables for Crystallography*, Vol. F, Ch. 19.3, 428-437
- Uversky V.N., Gillespie J.R. & Fink A.L. 2000. Why are “natively unfolded” proteins instructed under physiologic conditions? *Prot: Str Funct Genet* 41, 415-427
- Vassilenko K.S. and Uversky V.N. 2002. Native-like structure of molten globules. *Biochim. Biophys. Akta.* 1594, 168-177
- Weber J., Hoffmann F. and Rinas U. 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 2. Redirection of metabolic fluxes. *Biotechn. Bioengin.* 80(3), 320-330
- Whitmore L. and Wallace B.A. 2007. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 89(5), 392-400
- Wittig I. and Schagger H. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8, 3974-3990

Κεφάλαιο 3

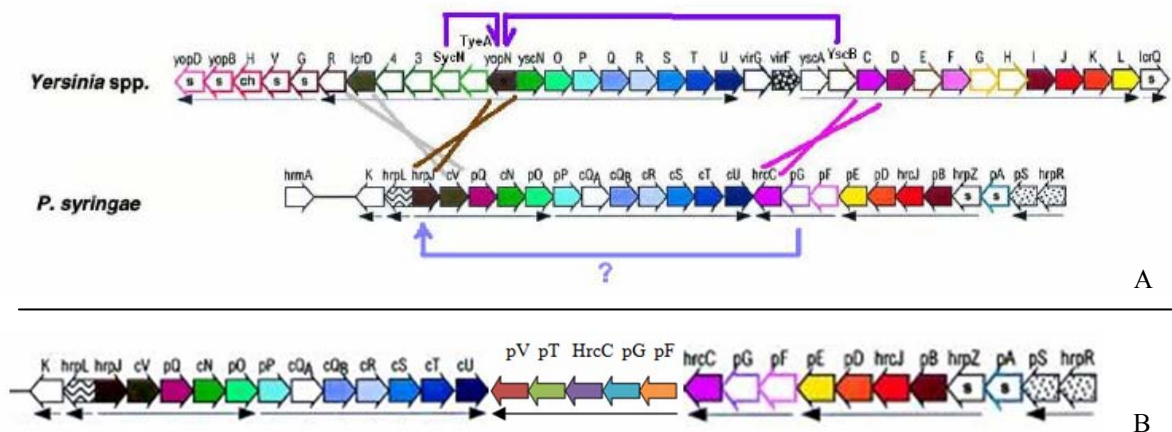
Ανάδειξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ
πρωτεϊνών του εκκριτικού
συστήματος τύπου III του
φυτοπαθογόνου *Pseudomonas*
syringae pv. *phaseolicola*.

3.1 Εισαγωγή

3.1.1 Οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης HrpG

Η πρωτεΐνη HrpG πιθανόν ανήκει στην τάξη I των σαπερονών του T3SS, όπως προκύπτει από βιοπληροφορική αναγνώριση αναδίπλωσης (Wei *et al.*, 2005). Από αναλύσεις σχήματος και δευτεροταγούς δομής όμως και παρά το γεγονός ότι η διμερής ελλειμματική της μορφή από την οποία απουσιάζουν τα 14 καρβοξυτελικά κατάλοιπα μοιάζει με το γενικό σχήμα των τάξης I σαπερονών, προκύπτει ότι το σωματίδιο παρουσιάζει μεγαλύτερη διάμετρο και υψηλότερα ποσοστά σε α-έλικες, οπότε η κατάταξή της στην τάξη I σαπερονών καθίσταται επισφαλής. Η HrpG από πειράματα εγγενούς ηλεκτροφόρησης στο πρόσφατο παρελθόν έχει φανεί να αλληλεπιδρά με την πιθανή σαπερόνη γενικών καθηκόντων HrpO όπως επίσης και με την καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης της εσωτερικής μεμβράνης HrcU (HrcUc) (Γαζή, Α. 2007)

Η διερεύνηση της γονιδιακής θέσης της HrpG εντός της νησίδας παθογένειας του T3SS οδηγεί σε ενδιαφέρουσες υποθέσεις. Το γονίδιο *hrpG* βρίσκεται ανοδικά εκείνου της συντηρημένης πρωτεΐνης HrcC των T3SS. Στο T3SS της *Yersinia*, ανοδικά της ομόλογης με την HrcC πρωτεΐνης YscC, εντοπίζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη YscB, η οποία έχει δειχθεί ότι σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη SycN και το οποίο συνιστά τη σαπερόνη της πρωτεΐνης YopN. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη SycN βρίσκεται ανοδικά εκείνου που κωδικοποιεί για την LcrD και καθοδικά του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη YopN. Στο σύστημα T3S της *Pseudomonas syringae* η ομόλογη της YopN είναι η πρωτεΐνη HrpJ και της LcrD η πρωτεΐνη HrcV. Μεταξύ των γονιδίων τους δεν υπάρχουν ανοικτά μεταφραστικά πλαίσια και, επομένως, δεν μπορεί να αντιστοιχισθεί κάποια πρωτεΐνη με τη SycN με βάση την τοπική συντένεια (Εικ.3.1).



Εικ3.1. Α. Γονιδιακή απεικόνιση των T3SS από τη *Yersinia* και τη *P. syringae*. Καθώς δεν υπάρχουν ORFs μεταξύ HrpJ και HrcV, δεν αντιστοιχίζεται κάποιο ORF με την SycN με βάση την τοπική συντένεια. Το γονίδιο της YscB όμως βρίσκεται ανοδικά του γονιδίου της YscC (*hrcC* homologue) στην *Yersinia*. Σε στελέχη του γένους *P. syringae* στην αντίστοιχη θέση βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη HrpG. Εικόνα τροποποιημένη από την πηγή Hueck, C.J. 1998 και Γαζή Α.Δ., ετήσια αναφορά προόδου 2004. **Β.** Πλήρης απεικόνιση της γονιδιακής οργάνωσης του T3SS του βακτηρίου *P. syringae*. Τα προθέματα c και p στο χάρτη υποδηλώνουν Hrc και Hrp πρωτεΐνες, αντίστοιχα

Η πρωτεΐνη YopN έχει δείχθει ότι αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του T3SS στη *Yersinia*, λειτουργώντας σα διακόπτης μέσω αλληλεπίδρασης με έναν δεύτερο αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος, την πρωτεΐνη TyeA που κωδικοποιείται από καθοδικά παρακείμενο γονίδιο. Το σύμπλοκο YopN-TyeA αποτρέπει την έκκριση υποστρωμάτων μέσω του T3SS πριν την επαφή του βακτηρίου με το ευκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστή (Cheng et al., 2001). Η ίδια η YopN αποτελεί παραταύτα υπόστρωμα έκκρισης μέσω του T3SS, χωρίς να μεταφέρεται η ίδια εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου. Με την απομάκρυνσή της από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα αποκαταστέλλεται η έκκριση άλλων πρωτεϊνών μέσω του T3SS. Κατά τη διαμονή της μέσα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα η YopN διατηρείται σε μια κατάσταση ικανή για έκκριση μέσω της αλληλεπίδρασής της με το ετεροδιμερές σύμπλοκο σαπερόνης της SycN-YscB (Jackson et al., 1998, Day & Plano 1998).

Η πρωτεΐνη HrpJ αναδείχθηκε ως ομόλογη της YopN αρκετά νωρίς βάσει ομολογίας πρωτοταγούς αλληλουχίας (Alfano & Collmer 1997, Hueck 1998) και φαίνεται να παίζει παρόμοιο ρόλο ως αρνητικός ρυθμιστής του συστήματος στην *P.syringae* καθώς απαιτείται για τη μεταφορά των τελεστών μέσα στο φυτικό κύτταρο και την έκκριση της χαρπίνης (Fu et al., 2006). Σχετικά πρόσφατα, καταδείχτηκε ότι, ομοίως με την YopN, αποτελεί η ίδια υπόστρωμα έκκρισης. Αντίθετα με τη YopN, η HrpJ φαίνεται να μεταφέρεται εντός του φυτικού κυττάρου, όπου όμως η λειτουργία της παραμένει άγνωστη (Fu et al., 2006). Στο σύστημα T3S της *P.syringae* δεν υπάρχει ομόλογη της TyeA, αλλά φαίνεται πως η HrpJ αποτελεί ένα ενιαίο μόριο στη θέση του συμπλόκου YopN-TyeA καθώς είναι μεγαλύτερη από τη YopN κατά 75 κατάλοιπα (368 κατάλοιπα έναντι 293), ενώ η πρωτεΐνη TyeA έχει μήκος 92 κατάλοιπα. Στο βακτήριο *Desulfovibrio vulgaris* η YopN έχει μέγεθος 374 κατάλοιπα και το καρβοξυτελικό της άκρο παρουσιάζει ομολογία με την TyeA (Εικ. 3.2A). Ομοίως, η HrpJ έχει εμφανή καρβοξυτελική ομολογία με την πρωτεΐνη TyeA (Εικ. 3.2B).

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις προκύπτει, ως υπόθεση εργασίας, ότι η HrpJ πιθανόν να αποτελεί ομόλογο σύντηγμα των YopN-TyeA της *Yersinia*, με παρόμοιο ρυθμιστικό ρόλο στην παρεμπόδιση της έκκρισης πριν την επαφή με τον ευκαρυωτικό ξενιστή και πιθανόν να απαιτεί την παρουσία ειδικής σαπερόνης κατά τη διαμονή της στο κυτταρόπλασμα της *P.syringae*. Βάσει της γονιδιακής της θέσης, η πρωτεΐνη HrpG θεωρήθηκε ως πιθανή υποψήφια σαπερόνη της HrpJ.

```

YopN      MSIDLRGVSGPAPQLANVQDGPDGAAGTLLGRAATVVDSPLSLLADAAEELTFAADTTD 60
TyeA      -----

YopN      DFELSERKERKSTEDAMAERIELYKELMHQAGKGEGLDRDKDSLKQQGREQARQZALSQ 120
TyeA      -----

YopN      FPDFSDAWAALHDALQAFDDDPAIPDGVREAVRGAIADLEAEHGPAPRAAGVHGALASAGF 180
TyeA      -----

YopN      ADLGDADALRDLRYRGTVCDFTTVEQVFATINERYGDERFDVAIGFLYRALSSDLGSDMPS 240
TyeA      -----

YopN      MDGTHLESVNTSLGQLRLLKSAHALCADVMTRWENVHGVKDCPLTAQGLLEQVVVALRSEN 300
TyeA      -----MAYDLSEFMGDIVLVDKR 19
               . . . : : ** * . . .

YopN      FLGALHIDRIAAQAKAPDIEHEVFLQELLRMTRNVPAQLFDGTAGRMKLLDAVQDAVDR 360
TyeA      WAGIHDIIEHLANAFSLPTPEIKVRFYQDLKRMFRLFPGLGVFSDDEEQRNLLQMCQNAIDM 79
               : * . : : * * . * * * * * * * * * * * * * * * : * . . . * : * : * * : * : *

YopN      AIDREDAFLAAQEG 374
TyeA      AIESEEEELSELD- 92
               ** : * : * : :

```

A


```

HrpJ      MKIVAPPILPHTHTVTPIRAVTPAARAIPGTLSSSEKGTSSQQVSRFAAALVRNSRILRQRE 60
TyeA      -----

HrpJ      LIASRNALQSRRAVKLGLGYQLLMSANDTGLDNAARLLRKKLLQENDTELEQVLEFADGDA 120
TyeA      -----

HrpJ      AKAHVVLQAARKQAEEDGAEGEYVALTQTLKQLRKFPGPHARAGINTARAFGRQNVNKR 180
TyeA      -----

HrpJ      RTALRNLYGVAVSGQPNTGLIEALINEQEETGDFDLNLRDMRRAIADLLSAITPSASHE 240
TyeA      -----MAYDLSEFMG----- 10
                : * * * * :

HrpJ      QLRTLMHGLTTARHVTTLLRGCEHLLGRMRNKNPDLKVDPPAFKHLTLTANGMNVNQIT 300
TyeA      DIVALVD---KRWAG---IHDIEHLANAFSLPTPEIKVR----- 43
                : : * : . * : . : : * * * . : . * : * *

HrpJ      LQLTQHIGGARLKNQLAFNLNGLRPMMLQPLILLWKDMKSRQAALNNLLTMAELTQQEQK 360
TyeA      -----FYQDLKRMFRLFPLGVFSDDEEQRQNLQ-MCQNAIDMAIESEE 85
                * : . * : * : * : : : * : * * * * : : : : : : :

HrpJ      QLFEGLAG 368
TyeA      EELSELD- 92
                : : . *

```

B

Εικ. 3.2. Στοιχίση αλληλουχιών των πρωτεϊνών YopN από το *D. vulgaris* και TyeA από τη *Y. pestis* (A) και HrpJ από τη *P. syringae* και TyeA από τη *Y. pestis* (B) με το πρόγραμμα ClustalW2. Το σύμβολο ‘*’ υποδεικνύει συντηρημένο κατάλοιπο, το ‘.’ συντηρητική αντικατάσταση καταλοίπου και το ‘.’ ημισυντηρητική αντικατάσταση καταλοίπου.

Η πρωτεΐνη HrpG δείχθηκε σχετικά πρόσφατα ότι αλληλεπιδρά με τον αρνητικό ρυθμιστή της μεταγραφής του T3SS της *P. syringae* HrpV (Deng et al., 1998, Preston et al., 1998, Wei et al., 2005) Η HrpV επίσης φάνηκε ότι αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα HrpS, ο οποίος ετεροδιμερίζεται με τον μεταγραφικό παράγοντα HrpR και το σύμπλοκο HrpS-HrpR στη συνέχεια ενεργοποιεί την έκφραση του εναλλακτικού παράγοντα σ^L (HrpL) ο οποίος και ενεργοποιεί τη μεταγραφή όλων των γονιδίων του T3SS που φέρουν τα χαρακτηριστικά στοιχεία «κουτιά *hrp*» (*hrp* boxes) στην περιοχή του υποκινητή τους (ανοδικά όλων των χαρτογραφημένων οπερονίων στη νησίδα παθογένειας T3SS και των γονιδίων τελεστών [T3SS effectors]) (Xiao et al., 1994, Hutcheson et al., 2001, Wei et al., 2005, Tang et al., 2006). Η αλληλεπίδραση της HrpG με την HrpV φαίνεται να αποκαταστέλλει την αρνητική ρύθμιση που ασκείται από πλευράς της τελευταίας, πιθανόν αποδεσμεύοντάς την από το σύμπλοκο HrpV-HrpS, απελευθερώνοντας έτσι την πρωτεΐνη HrpS και επιτρέποντας τον ετεροδιμερισμό της με την πρωτεΐνη HrpR ώστε τελικά να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του συστήματος (Buttner & Bonas 2006).

3.1.2 Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ΑΤΡάσης, του αρνητικού ρυθμιστή της και της σαπερόνης γενικών καθηκόντων του T3SS.

Η πρωτεΐνη FliI, όπως έχει προαναφερθεί στο κεφάλαιο της εισαγωγής, αποτελεί την ΑΤΡάση του βακτηριακού μαστιγίου και έχει δειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη FliH. Η τελευταία αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της FliI καθώς παρεμποδίζει την υδρόλυση ATP από τη FliI *in vitro* (Minamino & Macnab 2000). Η πρωτεΐνη FliH με τη σειρά της αλληλεπιδρά με τη γενική κυτταροπλασματική σαπερόνη του συστήματος FliJ (Fraser et al., 2003) και με την FliN του μαστιγιακού C-δακτυλίου. Με τον τρόπο αυτό πιθανόν προσλαμβάνονται τα υποστρώματα έκκρισης από την FliJ και οδηγούνται προς την ΑΤΡάση η οποία, αγκυροβολημένη στο C-δακτύλιο, τα αποδιπλώνει και τα ενύει στον αγωγό έκκρισης. Κατ’ αναλογία με το σύστημα του βακτηριακού μαστιγίου, στο σύστημα T3SS της *P. syringae* η

πρωτεΐνη HrcN αποτελεί την ΑΤΡάση του συστήματος (Pozidis et al., 2003) ενώ η HrpE έχει αναγνωρισθεί ως ομόλογη της FliH (Hueck et al., 1998, Pozidis et al., 2003). Η αλληλεπίδραση μεταξύ HrcN-HrpE έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Μπαστάκη & Πανόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Πολύ πρόσφατα, η πρωτεΐνη HrpE φάνηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HrpO (Gazi et al., 2008) υποδηλώνοντας λειτουργική αναλογία με τη FliJ με την οποία έχει παρόμοια φυσικοχημική (εξαιρετικά υψηλή προβλεπόμενη διαταραχή μέσω του αλγορίθμου FoldIndex και προβλεπόμενη ως αδίπλωτη, υψηλό περιεχόμενο σε επαναλήψεις επτάδας) αλλά ακόμα άγνωστο ρόλο.

3.1.3 Οι αλληλεπιδράσεις της HrpP

Η πρωτεΐνη HrpP είναι ένα διαλυτό στοιχείο του T3SS με πιθανό ρυθμιστικό ρόλο, πιθανώς ρόλο ενός διακόπτη αλλαγής ειδικεύσης υποστρώματος στο T3SS, κατ' αναλογία με τις πρωτεΐνες FliK και YscP του βακτηριακού μαστιγίου (Morello et al., 2009). Στο στέλεχος *P. syringae* pv *tomato* DC3000, η πρωτεΐνη HrpP εκκρίνεται και μεταφέρεται εντός του φυτικού κυττάρου (Ramos et al., 2007) όπου όμως η λειτουργία της είναι άγνωστη. Εκτενής εξέταση της πρωτεΐνης και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της αναλύεται στο κεφάλαιο 4 της παρούσας εργασίας. Στο παρόν πακέτο εργασίας παρουσιάζονται αποτελέσματα αναζήτησης πιθανών αλληλεπιδρώντων με την πρωτεΐνη HrpP μελών του T3SS. Η υπόθεση εργασίας ήταν ότι, κατά την έξοδο της από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη θα πρέπει να συσχετιστεί με μόρια σαπερόνης, όπως επίσης και με ρυθμιστικές ή/και δομικές πρωτεΐνες του C-δακτυλίου.

3.1.4 Ο σκοπός των πειραμάτων που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο.

Με βάση όλες τις παραπάνω πληροφορίες και παρατηρήσεις σχεδιάστηκε σειρά πειραμάτων βασισμένων σε διαφορετικές προσεγγίσεις που αποσκοπούσαν στους παρακάτω στόχους:

1. Επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ HrpG-HrpO και HrpG-HrcUc και διερεύνηση της σταθερότητας του συμπλόκου σε ήπιες και αυστηρές *in vitro* μεταχειρίσεις.
2. Κατάδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ HrpG-HrpJ.
3. Παρασκευή διαλυτών συμπλόκων των πρωτεϊνών HrpG-HrpV και HrpV-HrpS ώστε να υποβληθούν σε ανάλυση σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS).
4. Συν-υπερέκφραση και απομόνωση των συμπλόκων των πρωτεϊνών HrcN-HrpE και HrcN-HrpE-HrpO της *P. syringae* pv. *phaseolicola* από το ετερόλογο σύστημα της *E. coli* και μελέτη της ολιγομερικής τους συμπεριφοράς.
5. Συν-υπερέκφραση και απομόνωση του συμπλόκου HrpE-HrpO για υποβολή του σε ανάλυση σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες.
6. Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης HrpP με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες του συστήματος έκκρισης.

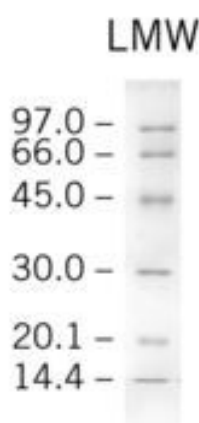
3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Υλικά

Για τους μοριακούς χειρισμούς σε επίπεδο DNA χρησιμοποιήθηκαν περιοριστικές ενδονουκλεάσες από τις εταιρείες Minotech, New England Biolabs και Takara. Για τον απλό πολλαπλασιασμό ενθεμάτων με PCR χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοσταθερές πολυμεράσες Taq από τη Minotech, η EXT και η Phusion από τη εταιρεία Fynnzymes. Για την αποφυγή μεταλλαγών στα προϊόντα της PCR, όπως επίσης και για την απομόνωση μεγάλου μήκους κωδικών περιοχών χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμεράσες με 5'-3' δράση ενδονουκλεάσης Deep Vent (New England Biolabs), Pfu (PROMEGA) και το Expand Long template PCR system της Roche. Για την παραγωγή τμημάτων με τυφλά άκρα μετά από πέψη χρησιμοποιήθηκε η Klenow DNA πολυμεράση (PROMEGA) και για τη συγκόλληση τυφλών άκρων η T7 DNA λιγάση (PROMEGA). Τα παραπάνω ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν βάσει οδηγιών των εταιρειών που τα προμηθεύουν. Οι αλληλουχίες εκκινητών σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν από το εργαστήριο της μικροχημείας του IMBB-ITE. Από το ίδιο εργαστήριο πραγματοποιήθηκαν οι αλληλουχήσεις των παρηγγμένων κλώνων. Ως πλασμιδιακοί φορείς υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκαν οι pPROEX-HTa & pPROEX-HTb (Invitrogen), οι pET16b & pET26b (Novagen), ο pPROPET που κατασκευάστηκε ιδιοχείρως με βάση τον φορέα pET26b και τον πολυσυνδέτη του pPROEX-HTa και ο pAR3 συμβατός³ φορέας συνέκφρασης πρωτεϊνών (ATCC, the American Type Culture Collection, Cat. No 87026). Ως μοριακοί δείκτες μεγάλου DNA χρησιμοποιήθηκαν ιδιόχειρα θραύσματα DNA μετά από απλή ή διπλή πέψη DNA του βακτηριοφάγου λ (Minotech) με τα ένζυμα EcoRI/HindIII, PstI και BstEII. Οι φασματοφωτομετρήσεις διαλυμάτων DNA και πρωτεϊνών για τον καθορισμό της συγκέντρωσής τους έγιναν σε νανοφασματοφωτόμετρο (NanoDrop) στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, αντίστοιχα, ενώ η οπτική απεικόνιση των θραυσμάτων DNA μετά από ηλεκτροφόρηση έγινε σε υπεριώδες φως μετά από χρώση των ηλεκτωμάτων με βρωμιούχο αιθίδιο. Η απομόνωση γραμμικών θραυσμάτων DNA έγινε με χρήση του Qiaquick gel extraction kit της εταιρείας Qiagen. Οι μικροπαρασκευές υψηλής καθαρότητας πλασμιδιακών DNA για περαιτέρω χειρισμούς πραγματοποιήθηκαν με χρήση του Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen) ενώ οι μικροπαρασκευές ρουτίνας πλασμιδιακού DNA έγιναν με το πρωτόκολλο του βρασμού (Sathasivan 2001). Για μετασχηματισμό και ακόλουθη έκφραση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5a για τα πλασμίδια τύπου pPROEX και χημικώς δεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21[DE3] για τα υπόλοιπα πλασμίδια έκφρασης. Το θρεπτικό μέσο των καλλιεργειών *E.coli* ήταν το Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Ως αντιβιοτικά επιλογής /αντεπιλογής χρησιμοποιήθηκαν η αμπικιλίνη (Bristol-Myers Squibb) για τα πλασμίδια τύπου pPROEX σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, η καναμυκίνη (Sigma)

³ Όπως έχει προαναφερθεί στο κεφάλαιο 2, συμβατά θεωρούνται δύο ή περισσότερα πλασμίδια που φέρουν διαφορετικές αλληλουχίες έναρξης της αντιγραφής (*ori*) κατά πρώτο λόγο, και δευτερευόντως προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικό αντιβιοτικό. Το *ori* του φορέα έκφρασης pAR3 προέρχεται από το πλασμίδιο 15A, που είναι γενετικά συμβατό (compatible) με παράγωγα του πλασμιδίου ColE1 όπως είναι οι φορείς έκφρασης τύπου pET ή pPROEX.

για τα πλασμίδια pET26b και pPROPET σε τελική συγκέντρωση 40 µg/ml και η χλωραμφενικόλη (Sigma) για το πλασμίδιο pAR3 σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml. Για την επαγωγή έκφρασης των ενθεμάτων χρησιμοποιήθηκε κατά κανόνα το IPTG (isopropyl-thio-β-D galactoside, Roche) σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM με εξαίρεση το πλασμίδιο pAR3 από το οποίο η επαγωγή έκφρασης του γονιδιακού ενθέματος έγινε με την προσθήκη L-arabinose (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml (Perez & Gutierrez 1995). Οι αναστολείς πρωτεασών που προστέθηκαν στα δείγματα των λυμένων κυττάρων ήταν PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) από τη Sigma και λευπεπτίνη από τη Roche. Τα υλικά χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Ni-NTA agarose (Qiagen) για τα πειράματα χρωματογραφίας συγγένειας και Q-sepharose (Amersham Biosciences) για τις στήλες ανιοντοανταλλαγής. Μάρτυρας μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών ήταν ο LMW (Low Molecular Weight) από την εταιρεία Amersham GE Healthcare (Εικ.3.3). Τα χημικά των διαλυμάτων απομόνωσης των πρωτεϊνών κατά τις χρωματογραφίες, όπως επίσης και τα χημικά ηλεκτροφόρησης, ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck, Sigma, Fluka και Scharlau. Η πρωτεάση rTEV παρήχθη από το εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του τμήματος Βιολογίας Παν. Κρήτης.



Εικ. 3.3. Η ηλεκτροφορητική εικόνα του πρωτεϊνικού μοριακού μάρτυρα μεγεθών LMW. 97 kDa: β-φωσφορυλάση, 66 kDa: αλβουμίνη, 45 kDa: οβαλβουμίνη, 30 kDa: καρβονική ανυδράση, 20.1 kDa: αναστολέας της τρυψίνης, 14.4 kDa: α-λακταλβουμίνη. Πηγή: GE Healthcare product information.

3.2.2 Μέθοδοι

3.2.2.1 Επαγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες παρήχθησαν από τα αντίστοιχα πλασμίδια ως εξής. Από γλυκερολικό παγωμένο στους -80°C απόθεμα, τα βακτηριακά κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν στους 37°C ολονύκτια σε θρεπτικό μέσο LB με την προσθήκη κατάλληλου αντιβιοτικού. Μετά την παρέλευση 14-16 ωρών έγινε εμβολιασμός φρέσκου θρεπτικού μέσου LB με αντιβιοτικό σε αναλογία αραιώσης μολύσματος από την ολονύκτια κορεσμένη καλλιέργεια προς θρεπτικό μέσο 1:40, ώστε η αρχική οπτική πυκνότητα OD_{600} της νέας καλλιέργειας να είναι περίπου ίση με 0.1. Στις καλλιέργειες συνέκφρασης περισσότερων της μιας πρωτεϊνών προστέθηκε επιπλέον 0.2% γλυκόζη ως πρόσθετη πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια η αραιωμένη καλλιέργεια μεταφέρθηκε στους 37°C σε επωαστήρα ανάδευσης 225 rpm έως ότου η οπτική πυκνότητα να φτάσει το 0.6-0.8, συνήθως μετά από 3 ώρες. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε

1 ml κυτταρικού αιωρήματος για να χρησιμοποιηθεί ως μη επαγμένο δείγμα-μάρτυρας, προστέθηκε ο επαγωγικός παράγοντας στις ενδεδειγμένες τελικές συγκεντρώσεις και οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν σε επωαστήρα ανάδευσης ρυθμισμένο στους 22 °C για την επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης για 4 ώρες. Μετά το πέρας της επαγωγής μετρήθηκε εκ νέου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, αφαιρέθηκε 1 ml κυττάρων ως επαγμένο δείγμα, ο υπόλοιπος όγκος καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε και οι κυτταρικές πάστες φυλάχθηκαν στους -20 °C (όταν η λύση των κυττάρων επρόκειτο να γίνει μέσα σε λιγότερο από 24 ώρες) ή στους -80 °C για πιο μακρόχρονη αποθήκευση.

3.2.2.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών φερουσών ετικέτα ιστιδινών με χρωματογραφία συγγένειας.

Τα κύτταρα των καλλιεργειών επαγωγής υπεβλήθησαν σε λύση υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Τα διαλύματα λύσης που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν μετά από διερεύνηση διαλυτότητας κατά περίπτωση πρωτεΐνης ή ζεύγους πρωτεϊνών και ειδική αναφορά γίνεται στην παράγραφο των αποτελεσμάτων ξεχωριστά για κάθε περίπτωση. Συνοπτικά, τα διαλύματα περιείχαν έναν ρυθμιστικό παράγοντα με τιμή pH 8 (Tris-Cl) ή 11 (CAPS), 50-300 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο και, ανάλογα με την περίπτωση, επικουρικούς παράγοντες διαλυτοποίησης όπως 0.1-1% Triton X-100, 5-10 mM γλυκερόλη και αναγωγικού, όπως 5-20 mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Ο όγκος του διαλύματος λύσης τυπικά ήταν 100-150 ml ανά λίτρο καλλιέργειας. Το διάλυμα ήπιας λύσης Η στις περιπτώσεις απομόνωσης των συμπλόκων HrpG-HrcUc και HrpG-HrpO αποτελούνταν από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 2-μερκαπτοαιθανόλη (5 mM για τις HrpG^{-C14}-HrcUc, 20 mM για τις HrpG^{-C14}-HrpO), 10% γλυκερόλη, 0.1% Triton X-100 ενώ το αυστηρότερον συνθηκών διάλυμα λύσης Α (το οποίο περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση άλατος για αποφυγή ιοντικών αλληλεπιδράσεων και υψηλότερη συγκέντρωση 2-μερκαπτοαιθανόλης για αποφυγή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών) αποτελούνταν από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, NaCl (300 mM για τις HrpG^{-C14}-HrcUc, 150 mM για τις HrpG^{-C14}-HrpO), 10 mM ιμιδαζόλιο, 20 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.1% Triton X-100. Πριν τη λύση σε κάθε περίπτωση προστέθηκαν αναστολείς πρωτεασών. Τα διαλύματα πλύσης της στήλης συγγένειας δεν περιείχαν συνήθως επικουρικούς παράγοντες διαλυτοποίησης ή αναγωγικά, εκτός από κάποιες περιπτώσεις όπου γίνεται ιδιαίτερη αναφορά. Τυπικά ήταν τριών αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου, 10, 20 και 30 mM (washes, W1, W2 και W3, αντίστοιχα) και όγκου ίσου με 10 όγκους στρώματος το καθένα. Το διάλυμα έκλουσης περιείχε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου με βήμα 50 mM εκτός του πρώτου κλάσματος που θεωρείται κλάσμα πλύσης παρά έκλουσης και περιείχε 80 mM ιμιδαζόλιο (80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο). Σε κάποιες περιπτώσεις η έκλυση επιλέχθηκε να γίνει σε μια συγκέντρωση ιμιδαζολίου και δη στη μέγιστη (300 mM) σε τρεις ή τέσσερις επαναλήψεις. Τυπικά το διάλυμα έκλουσης δεν περιείχε επικουρικούς παράγοντες διαλυτοποίησης ή αναγωγικά. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υπερήχων για 5-7' συνολικά, με εφαρμογή κύκλων υπερήχων ανά 30" και με όμοια μεσοδιαστήματα ψύξης. Καθ' όλη τη διάρκεια της λύσης το διάλυμα των κυττάρων παρέμενε στον πάγο. Μετά το πέρας της λύσης, παρελήφθη το υπερκείμενο κλάσμα μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 40' στους 4 °C. Για τη συγκρότηση της στήλης συγγένειας χρησιμοποιήθηκαν στήλες χρωματογραφίας, μικρές ή μεγάλες ανάλογα με

τον όγκο καλλιέργειας και υλικού χρωματογραφίας Ni-NTA agarose που θα χρησιμοποιούνται. Ο όγκος του υλικού χρωματογραφίας συγγένειας καθορίστηκε εμπειρικά από την απόδοση της καλλιέργειας στις υπό μελέτη πρωτεΐνες και κυμάνθηκε από 0.5 έως 5 ml. Το υλικό χρωματογραφίας πακεταρίστηκε στη στήλη και εξισορροπήθηκε με επαρκή όγκο διαλύματος λύσης πριν την εφαρμογή του διαυγούς υπερκειμένου επί της στήλης. Μετά την εφαρμογή του υπερκειμένου λύσης στη στήλη, συνελέγη η έκπλυση (flowthrough), πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές πλύσεις της στήλης και συνελέγησαν τα εκπλύματα. Τέλος πραγματοποιήθηκε έκλυση των προσδεδωμένων στη στήλη πρωτεϊνών με διαδοχικά στάδια αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου ή με πολλαπλές επαναλήψεις της μέγιστης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου.

3.2.2.3 Καθαρισμός πρωτεϊνών φερουσών ετικέτα ιστιδινών με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής.

Η μέθοδος αυτή καθαρισμού εφαρμόστηκε μόνο για την απομόνωση του συμπλόκου HT₆⁴-HrcN+HrpE. Τα στάδια λύσης μέχρι την παρασκευή του διαυγούς διαλύματος λύσης είναι τα ίδια με παραπάνω, με τις εξής διαφοροποιήσεις. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ml υλικού ανιοντοανταλλαγής Q-sepharose σε μικρή στήλη. Κύτταρα από καλλιέργεια όγκου 150 ml υποβλήθηκαν σε ρήξη σε 20ml διαλύματος λύσης που περιείχε 25 mM CAPS pH 11.0, 2 mM MgCl₂, 10% γλυκερόλη και 1 mM EDTA (Buchanan & Walker 1996, Bernal & Stock 2004). Το ίδιο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την εξισορρόπηση της στήλης ανιοντοανταλλαγής. Το διάλυμα πλύσης ήταν όμοιο με το διάλυμα λύσης, από το οποίο όμως αφαιρέθηκε το EDTA και προστέθηκαν 150 mM NaCl. Πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις πλύσεων, όγκου ίσου με 5 όγκους στήλης έκαστη και τέλος οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl από 200 mM έως 700 mM, με βήμα των 100 mM, με δυο επαναλήψεις εκλούσεων για κάθε συγκέντρωση NaCl.

3.2.2.4 Αναδίπλωση και απομόνωση πρωτεϊνικού συμπλόκου πάνω στη στήλη συγγένειας.

Η μέθοδος αυτή καθαρισμού εφαρμόστηκε μόνο για την απομόνωση *in vitro* του συμπλόκου HT₆-HrpJ+HrpG. Κύτταρα που υπεβλήθησαν σε επαγωγή της πρωτεΐνης HT₆-HrpJ από καλλιέργεια 10 ml υποβλήθηκαν σε λύση υπό αποδιατακτικές συνθήκες με ανάδευση σε διάλυμα λύσης όγκου 2 ml, που περιείχε 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο και 8 M ουρία. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία δωματίου για 30' στις 12.000 rpm για την παραλαβή του διαυγούς υπερκειμένου λύσης. Το τελευταίο εφαρμόστηκε σε

⁴ Διάκριση των διαφορετικών μορφών πρωτεϊνών φερουσών ετικέτας ιστιδινών όπως χρησιμοποιήθηκαν και αναφέρονται στο κείμενο:

HT₆-Protein: ετικέτα έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Δότης της ετικέτας, ο φορέας έκφρασης pPROEX ή ο MCS1 του φορέα pPROPET.

Protein-HT₆: ετικέτα έξι ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Δότης της ετικέτας, ο φορέας έκφρασης pET26b.

HT₁₀-Protein: ετικέτα δέκα ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Δότης της ετικέτας, ο φορέας έκφρασης pET16b.

μικρή στήλη χρωματογραφίας με 0.5 ml στρώματος υλικού Ni-NTA agarose, εξισορροπημένης με 10 όγκους διαλύματος λύσης. Η προσδεδεμένη πρωτεΐνη κατόπιν αναδιπλώθηκε επί της στήλης με διαδοχικές πλύσεις υποδιπλασιασμένης από βήμα σε βήμα συγκέντρωσης ουρίας ξεκινώντας από 6 M και καταλήγοντας σε 0.125 M ουρίας. Μετά το τελευταίο βήμα πλύσης προστέθηκε στη στήλη καθαρισμένη χωρίς ετικέτα ιστιδινών η πρωτεΐνη HrpG σε διάλυμα όγκου 10 ml, αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Η στήλη αφέθηκε κλειστή σε ηρεμία για 45' ώστε να επιτελεστεί η συνεπώαση. Κατόπιν η έκπλυση (flowthrough) συλλέχθηκε, ακολούθησαν τέσσερις πλύσεις της στήλης, όγκου ίσου με 20 όγκους στήλης έκαστη και τέλος το σύμπλοκο εκλούσθηκε σε διαδοχικά στάδια αυξανόμενων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου από 80 έως 300 mM ιμιδαζόλιο.

3.2.2.5 Εγγενής ηλεκτροφόρηση συνεπώσεων πρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανάδειξη αλληλεπιδράσεων.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων σε εγγενή οριζόντια πηκτώματα αγαρόζης επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλόκων αρνητικά ή θετικά φορτισμένων. Κάθε πρωτεΐνη ανάλογα με το ισοηλεκτρικό της σημείο (pI) και το pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης μπορεί να έχει αρνητικό ή θετικό φορτίο. Πρωτεΐνες με pI χαμηλότερο του pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης έχουν αρνητικό φορτίο και κινούνται προς την άνοδο του εφαρμοζόμενου πεδίου ενώ το αντίθετο συμβαίνει αν το pI της πρωτεΐνης είναι υψηλότερο από το pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Καθώς τα φρεάτια φόρτωσης τοποθετούνται στη μέση του πηκτώματος, οι μοναδιαίες πρωτεΐνες ή τα σύμπλοκά τους μπορούν να κινηθούν προς την άνοδο ή την κάθοδο ανάλογα με το φορτίο τους χωρίς να είναι απαραίτητη προηγούμενη γνώση του pI της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης ή των συμπλόκων της.

Τα τεχνικά βήματα της διαδικασίας είχαν ως εξής. Χωριστά εκφρασμένες και απομονωμένες με χρωματογραφία συγγένειας πρωτεΐνες με ετικέτες ιστιδινών επώαστηκαν ολονύκτια μεταξύ τους. Σε κάθε μίγμα προστέθηκαν 8-10 μg από κάθε πρωτεΐνη, ενώ στους αρνητικούς μάρτυρες προστέθηκαν 8-10 μg πρωτεΐνης μαζί με τον διαλύτη της άλλης πρωτεΐνης σε τελικό όγκο ίσο με τον όγκο του αντίστοιχου μίγματος. Μετά από την επώαση, σε όλα τα δείγματα προστέθηκε διάλυμα φόρτωσης σε αναλογία όγκου 1:1 (20% γλυκερόλη, 0.2% bromophenol blue, 0.12 M Tris) με τιμή pH ίση με την τιμή pH του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και κατόπιν φορτώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 50 V για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (Kim et al., 2000). Μετά το πέρας της πραγματοποιήθηκε χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος με τα τυπικά διαλύματα χρώσης και αποχρωματισμού που χρησιμοποιούνται για τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης (βλέπε παρακάτω παράγραφο).

3.2.2.6 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

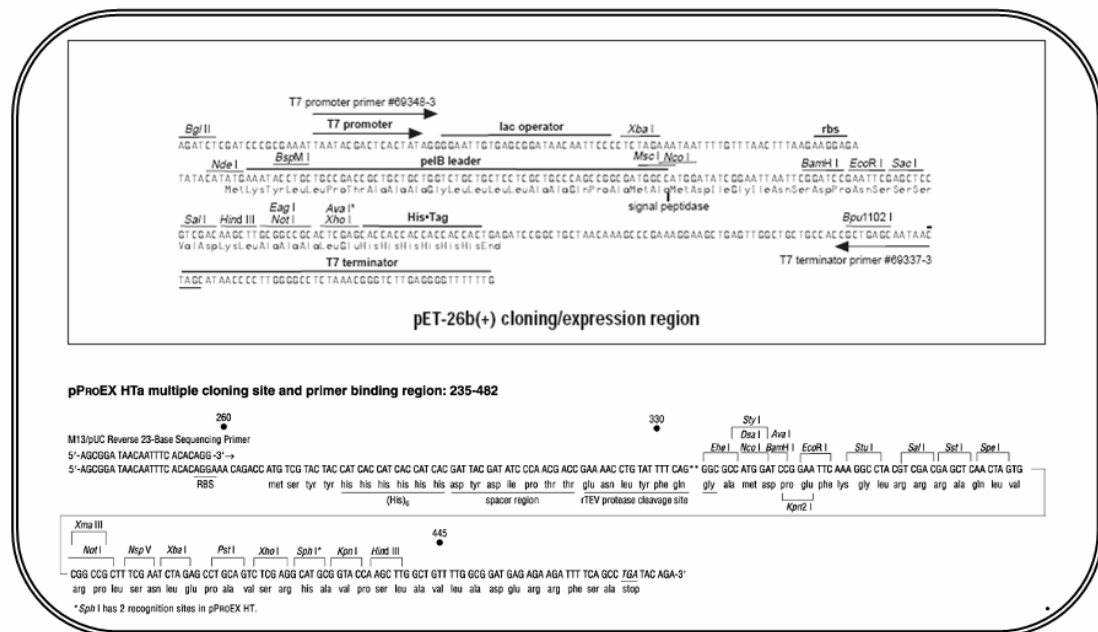
Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιήθηκε τυπικά σε πηκτώματα πυκνότητας 15% βάσει των πρωτοκόλλων και των συνταγών που περιγράφονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο Sambrook et al. (1989) Το αποδιατακτικό διάλυμα φόρτωσης (5x) αναμίχθηκε σε αναλογία 1:4 με τα δείγματα, ακολούθησε βρασμός τους για 5' και

φόρτωσή τους στα πηκτώματα. Όταν το μέτωπο της χρωστικής έφτασε στο κάτω άκρο του πηκτώματος η ηλεκτροφόρηση διακόπηκε και τα πηκτώματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα χρώσης με ανάδευση για 10' για να αποχρωματισθούν στη συνέχεια σε διάλυμα αποχρωματισμού ολονύκτια.

3.3 Αποτελέσματα

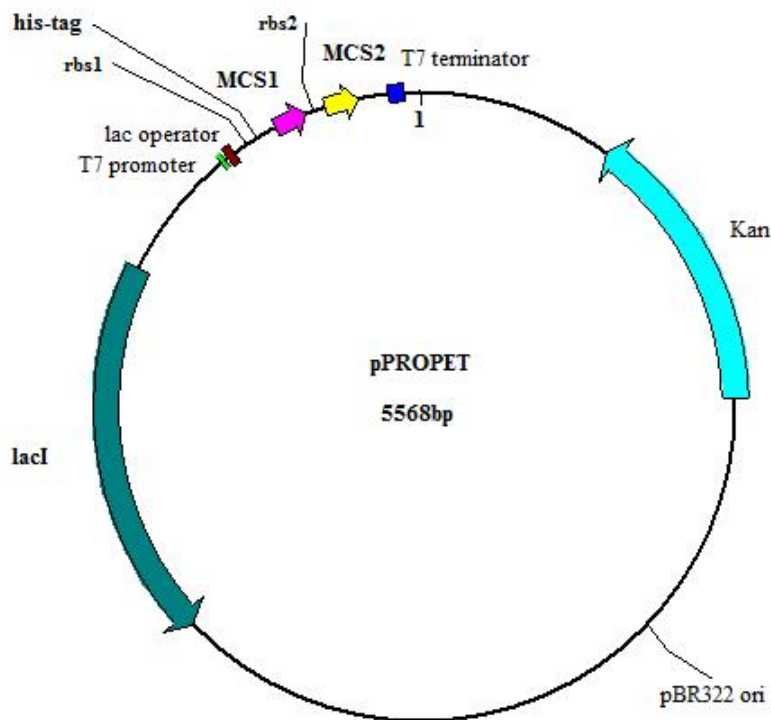
3.3.1 Κατασκευή δικιστρονικού φορέα pPROET

Ο σχεδιασμός του δικιστρονικού φορέα πραγματοποιήθηκε σε πολλαπλά βήματα. Ως πλασμιδιακός σκελετός αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ο φορέας έκφρασης pET26b ο οποίος προσφέρει τα *cis* ρυθμιστικά στοιχεία αντιγραφής του πλασμιδίου και μεταγραφής των ανασυνδυασμένων γονιδίων, δηλαδή την αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής, τις αλληλουχίες του υποκινητή T7, του χειριστή *Plac* και του τερματιστή T7. Τέλος προσφέρει το *rbs* (ribosome binding site) άνωθεν του δεύτερου γονιδίου. Η κασέτα που περιέχει το *rbs*, το τμήμα που κωδικοποιεί για την αμινοτελική ετικέτα ιστιδινών, τη θέση αναγνώρισης της πρωτεάσης rTEV και τον πολυσυνδέτη από το φορέα pPROEX-HTa απομονώθηκε με PCR και υποκλωνοποιήθηκε στη θέση *Xba*I του pET26b με συγκόλληση τυφλών άκρων (το ένζυμο πολυμερισμού της PCR Pfu αφήνει τυφλά άκρα στα θραύσματα που παράγει, ο φορέας μετά την κοπή με *Xba*I υποβλήθηκε σε αντίδραση γεμίματος άκρων με τη χρήση της Klenow DNA πολυμεράσης), ώστε με τον τρόπο αυτό προστέθηκε μια δεύτερη κασέτα έκφρασης άνωθεν της ενδογενούς κασέτας έκφρασης του pET26b υπό κοινό μεταγραφικό έλεγχο (Εικ. 3.4).

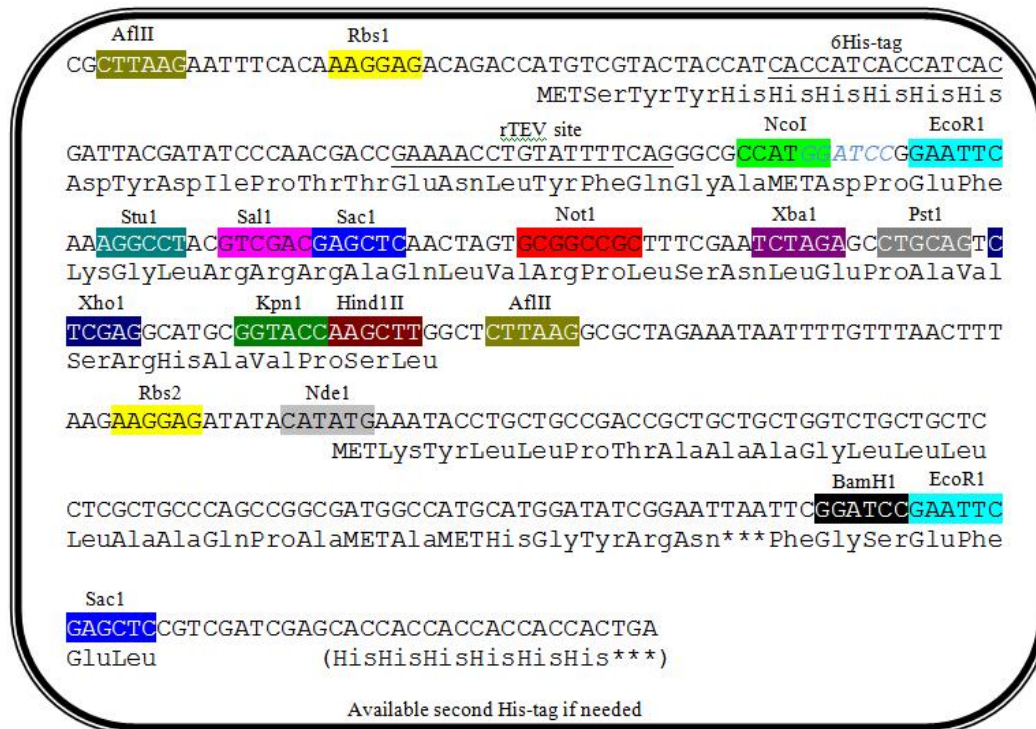


Εικ. 3.4. Οι πολυσυνδέτες μαζί με τα ρυθμιστικά στοιχεία έναρξης της μεταγραφής και τις βοηθητικές αλληλουχίες των δυο φορέων έκφρασης pPROEX-HTa και pET26b

Για την εξάλειψη διπλών θέσεων περιορισμού στους πολυσυνδέτες, πριν από την ένθεση της κασέτας του pPROEX-HTa πραγματοποιήθηκαν δυο τροποποιήσεις επί του πολυσυνδέτη του pET26b. Η πρώτη αφορούσε την εξάλειψη της θέσης *NcoI* με κοπή στη θέση αυτή, γέμισμα των άκρων και επανασυγκόλληση, και η άλλη αφορούσε την εξάλειψη των θέσεων *Sall*, *HindIII*, *NotI* & *XhoI*, με διπλή πέψη με *Sall/XhoI* και συγκόλληση των συμβατών άκρων που προέκυψαν. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι επί του άνω εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της κασέτας έκφρασης του pPROEX-HTa η αλληλουχία *rbs* AGGA τροποποιήθηκε σε AAGGAG ώστε να είναι πανομοιότυπη με την ενδογενή αλληλουχία *rbs* του pET26b (να σημειωθεί ότι η αλληλουχία *rbs* AAGGAG είναι πιο ισχυρή σε σχέση με την AGGA (Ringquist et al., 1992). Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ο φορέας pPROPET (PROEX-pET hybrid plasmid) (Εικ. 3.5, 3.6).



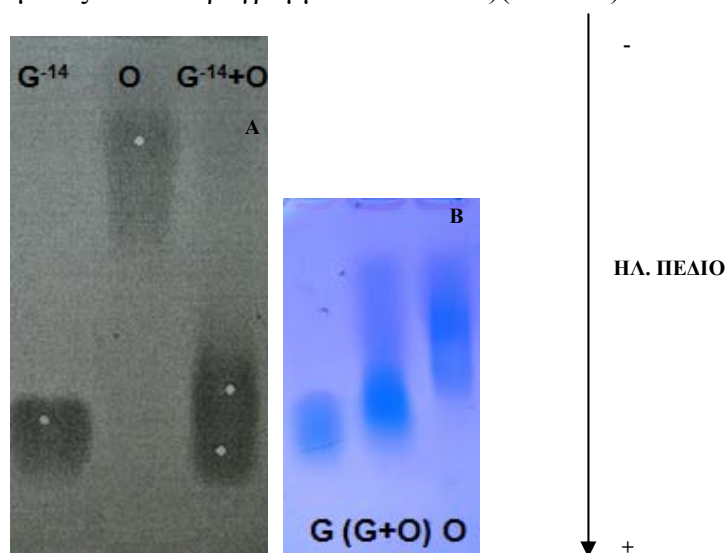
Εικ. 3.5. Ο πλασμιδιακός χάρτης του υβριδικού δικιστρονικού φορέα pPROPET. Απεικονίζονται τα στοιχεία έναρξης της αντιγραφής (*pBR322 ori*), το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη (*Kan*), το γονίδιο του καταστολέα *lacI* (*lacI*) και τα στοιχεία του υποκινητή T7 (T7 promoter), του χειριστή *lacO* (*lac* operator), το *rbs* άνωθεν του πρώτου πολυσυνδέτη (*rbs1*), η αλληλουχία που κωδικοποιεί για την ετικέτα ιστιδινών άνωθεν του πρώτου ανασυνδυασμένου γονιδίου (*his-tag*), ο πρώτος πολυσυνδέτης (MCS1), το *rbs* άνωθεν του δεύτερου πολυσυνδέτη (*rbs2*), ο δεύτερος πολυσυνδέτης (MCS2) και ο τερματιστής T7 (T7 terminator).



Εικ. 3.6. Ο υβριδικός διπλός πολυσυνδέτης του φορέα rPROPET. Απεικονίζονται τα άκρα του πρώτου πολυσυνδέτη, οριοθετούμενα από τις θέσεις *AflIII* οι οποίες εμπεριέχονταν στους εκκινητές απομόνωσης της πρώτης κασέτας από τον φορέα rPROEX-HTa, και οι διαθέσιμες θέσεις περιορισμού. Τυπικά η κλωνοποίηση στον άνω πολυσυνδέτη πραγματοποιούνταν με χρήση των θέσεων *NcoI* άνωθεν & *NotI*, *XhoI* ή *HindIII* κάτωθεν, οπότε η θέση *BamHI* αλληλεπικαλυπτόμενη με τη θέση *NcoI* (μπλε πλάγια γράμματα στο σχήμα) εξαλείφονταν και η δεύτερη θέση *BamHI* του δεύτερου πολυσυνδέτη γινόταν με τον τρόπο αυτό μοναδική, όπως και οι θέσεις *EcoRI* & *SacI*. Το πρώτο ανασυνδυασμένο γονίδιο κλωνοποιούνταν έτσι ώστε το εναρκτήριο κωδικόνιο του να είναι στο ίδιο πλαίσιο διαβάσματος με την ετικέτα ιστιδινών (το ATG του γονιδίου συμπάπτει με το ATG της θέσης *NcoI*) και το δεύτερο ανασυνδυασμένο γονίδιο κλωνοποιούνταν με το τερματικό του κωδικόνιο άθικτο ώστε η εκφραζόμενη πρωτεΐνη δεν έφερε την ετικέτα ιστιδινών της οποίας η αλληλουχία DNA είναι διαθέσιμη στο τέλος του υβριδικού πολυσυνδέτη.

3.3.2. Εγγενής ηλεκτροφόρηση συνεπώσεων πρωτεϊνών σε πήκτωμα αγαρόζης για την ανάδειξη αλληλεπιδράσεων υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δυο διακριτά πειράματα. Σε πρώτο στάδιο επιχειρήθηκε επανάληψη του πειράματος εγγενούς ηλεκτροφόρησης που έδειξε το σχηματισμό συσσωματωμάτων μεταξύ των πρωτεϊνών HrpG και HrpO (Γαζή, Α.Δ. 2007). Στο νέο πείραμα, 8 μg από την καθεμιά από τις ξεχωριστά εκφρασμένες και καθαρισμένες πρωτεΐνες HT₆-HrpG και HT₆-HrpO αναμίχθηκαν και συνεπώστηκαν ολονύκτια πριν την εγγενή ηλεκτροφόρησή τους. Στην ίδια διαδικασία υποβλήθηκαν και οι αρνητικοί μάρτυρες, δηλαδή κάθε πρωτεΐνη χωριστά επωασμένη στον διαλύτη της άλλης. Το pH τόσο του διαλύματος φόρτωσης των δειγμάτων όσο και του πηκτώματος αγαρόζης και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης επιλέχθηκε να είναι 6.8. Στην τιμή αυτή του pH η πρωτεΐνη HT₆-HrpG βάσει του θεωρητικού της ισοηλεκτρικού σημείου *pI* (4.74) προβλέπεται να έχει φορτίο ίσο με -9.12 ενώ η πρωτεΐνη HT₆-HrpO (*pI* = 6.63) προβλέπεται να έχει φορτίο ίσο με -1.33 (τιμές υπολογισμένες από το πρόγραμμα DNAMAN)(Εικ. 3.7)

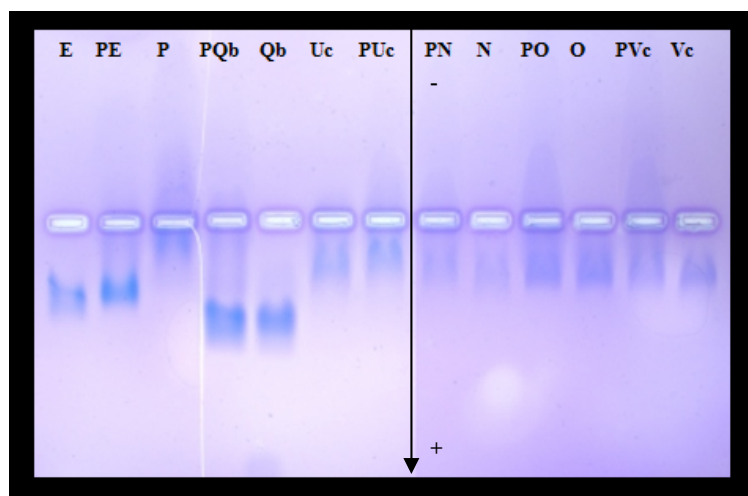


Εικ. 3.7. Εγγενείς ηλεκτροφορήσεις συνεπώσεων των ζευγών HrpG^{-C14} + HrpO και HT₆-HrpG + HT₆-HrpO. **A. HrpG^{-C14} + HrpO.** Στις δυο πρώτες διαδρομές ηλεκτροφορήθηκαν οι μάρτυρες, στην τρίτη το μίγμα. Μια νέα ζώνη έχει εμφανισθεί πάνω από τη ζώνη της HrpG^{-C14} ενώ έχει εξαφανισθεί πλήρως η ζώνη της HrpO. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε pH 8.9 όπου η HrpG^{-C14} έχει θεωρητικό επιφανειακό φορτίο -16.73. Εικόνα τροποποιημένη από την Διδ. Διατριβή Α.Δ.Γαζή 2007. **B. HT₆-HrpG + HT₆-HrpO.** Στις ακραίες διαδρομές ηλεκτροφορήθηκαν οι μάρτυρες του πειράματος, στη μεσαία το μίγμα. Η ζώνη της HT₆-HrpO μετατοπίστηκε εμφανώς προς τα κάτω, ενώ η ζώνη της HT₆-HrpG έχει ατονήσει και μια νέα ζώνη έχει εμφανισθεί από πάνω της. Με μαύρο κατακόρυφο βέλος εικονίζεται η φορά του εφαρμοζόμενου ηλ. πεδίου.

Το δεύτερο πείραμα αφορούσε την ανάδειξη αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης HrpP, όπου προετοιμάστηκαν μίγματα της HrpP-HT₆⁵ με τις διαλυτές πρωτεΐνες-στόχους HrpE-HT₆, HT₁₀-HrcQb, HT₁₀-HrcVc, HT₁₀-HrcN, HT₆-HrpO. Για το κάθε μίγμα αναμίχθηκαν 10 μg από κάθε πρωτεΐνη και συνεπώαστηκαν ολονύκτια πριν την εγγενή ηλεκτροφόρησή τους. Στην ίδια διαδικασία υποβλήθηκαν και οι αρνητικοί μάρτυρες της κάθε πρωτεΐνης χωριστά. Το pH τόσο του διαλύματος φόρτωσης των δειγμάτων όσο και του πηκτώματος αгарόζης και του διαλύματος ηλεκτροφόρησης επιλέχθηκε να είναι 6.8. Η τιμή και το είδος του φορτίου που φέρει κάθε πρωτεΐνη ανάλογα με το θεωρητικό της ισοηλεκτρικό σημείο *pI* σε αυτήν την τιμή pH αναγράφεται στον πίνακα 3.1. Το πήκτωμα της εγγενούς ηλεκτροφόρησης απεικονίζεται στην Εικ. 3.8.

Πίνακας 3.1. Τα θεωρητικά ισοηλεκτρικά σημεία των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν και το θεωρητικό φορτίο τους σε pH 6.8 (στοιχεία από το πρόγραμμα DNAMAN).

	Θεωρητικό <i>pI</i>	Θεωρητικό φορτίο σε pH 6,8
HrpP-HT	6,71	-0,66
HrpE-HT	5,28	-6,96
HT-HrcQb	4,38	-20
HT-HrcUc	7,05	1,68
HT-HrcVc	6,17	-7,35
HT-HrcN	6,86	0,57
HT-HrpO	6,63	-1,33



Εικ. 3.8. Εγγενής ηλεκτροφόρηση των μιγμάτων της HrpP-HT₆ με τις διάφορες πρωτεΐνες-στόχους. Με μαύρο κατακόρυφο βέλος εικονίζεται η φορά του εφαρμοζόμενου ηλ. πεδίου. Από όλα τα ζεύγη που δοκιμάστηκαν μόνο στα HrpP-HT₆ + HrpE-HT₆ και HrpP-HT₆ + HT₁₀ - HrcQb παρατηρείται μεταβολή του πρότυπου ηλεκτροφόρησης της HrpP (γίνεται πιο ηλεκτροαρνητική στα μίγματα απ' όταν ηλεκτροφορείται μόνη της).

⁵ Τα πλασμίδια από τα οποία εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες HrpE-HT₆, HrpP-HT₆ είναι προϊόντα της παρούσας διατριβής. Τα πλασμίδια των πρωτεϊνών HT₁₀-HrcQb, HT₁₀-HrcVc, HT₁₀-HrcN είναι προϊόντα της Διδ. Διατριβής της Α.Ταμπακάκη, 1999. Το πλασμίδιο που εξέφρασε την πρωτεΐνη HT₆-HrpO είναι προϊόν της Διδ. Διατριβής της Α.Δ.Γαζή, 2007.

3.3.3 Αναδίπλωση και απομόνωση πρωτεϊνικού συμπλόκου πάνω στη στήλη συγγένειας.

Το σύμπλοκο HT₆-HrpJ⁶ + HrpG⁷ απομονώθηκε με την μέθοδο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.2.4, σύμφωνα με την οποία η HT₆-HrpJ προσδέθηκε στην αποδιατεταγμένη της μορφή στη στήλη συγγένειας, ακολούθησε επαναδιάταξή της με σταδιακή απομάκρυνση της ουρίας, προσθήκη κατόπιν της HrpG, ξέπλυμα της στήλης από την περίσσεια της HrpG και συνέκλωση του συμπλόκου. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 3.9) και υποδεικνύει την επιτυχή απομόνωση του συμπλόκου των δυο πρωτεϊνών.



Εικ. 3.9. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του ανασυσταμένου επί στήλης συγγένειας Ni-NTA agarose συμπλόκου των πρωτεϊνών HT₆-HrpJ+HrpG. Στις διαδρομές όπου ηλεκτροφορήθηκαν οι εκλούσεις (E1 έως E6) έχουν σημειωθεί οι ζώνες του συμπλόκου. Με ροζ βέλος η HT₆-HrpJ, με πορτοκαλί η HrpG. Gft: το κλάσμα έκπλυσης της HrpG από τη στήλη. W2-W4: πλύσεις 2 και 4 μετά τη διέλευση της HrpG από τη στήλη. Στην τέταρτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. MW HT₆-HrpJ: 43.72 kDa. MW HrpG: 15.78 kDa.

3.3.4 Απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλόκων με χρωματογραφία συγγένειας.

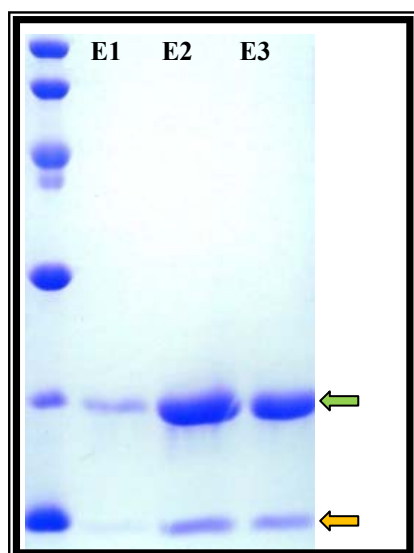
3.3.4.1 Το ζεύγος HrpG-HrpV.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HrpG-HrpV εκφράστηκε ως δικιστρόνιο και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας από δυο διαφορετικά πλασμίδια, το pPROEX/HrpG/HrpV και το pET26b/HrpG/HrpV. Στην πρώτη περίπτωση την ετικέτα ιστιδινών έφερε η HrpG στο αμινοτελικό της άκρο ενώ στη δεύτερη την

⁶ Το πλασμίδιο pPROEX/HrpJ που εκφράζει την πρωτεΐνη HT₆-HrpJ είναι προϊόν της Διδ. Διατριβής της Α.Δ.Γαζή, 2007.

⁷ η πρωτεΐνη HrpG ήταν προσφορά της Δρ. Α.Δ.Γαζή.

ετικέτα έφερε η HrpV στο καρβοξυτελικό της άκρο. Και τα δυο πλασμίδια κατασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία ως εξής. Το pPROEX/HrpG/HrpV προήλθε από την κατασκευή pPROEX/HrpG⁸, με υποκλωνοποίηση, καθοδικά του γονιδίου HrpG, του γονιδίου HrpV. Το τελευταίο απομονώθηκε με PCR από την κατασκευή pET16B/HrpV⁹. Ο άνω εκκινητής σχεδιάστηκε έτσι ώστε πριν το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης του γονιδίου της HrpV να υπάρχει η αλληλουχία *rbs* AGGA (ίδια με το τυπικό *rbs* του φορέα pPROEX άνωθεν του γονιδίου HrpG) ώστε να εξασφαλισθεί η μετάφραση του γονιδίου HrpV. Οι θέσεις κλωνοποίησης επί του πλασμιδίου-δέκτη ήταν τυφλό άνω άκρο και *Hind*III κάτω άκρο και ομοίως τροποποιήθηκε και το ένθεμα. Η πλασμιδιακή κατασκευή pPROEX/HrpG/HrpV μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), ακολούθησε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 200 ml, λύση των κυττάρων σε 30ml διαλύματος που περιείχε 20mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη και απομόνωση του συμπλόκου από στήλη νικελίου, στρώματος 0.5 ml. Μετά από την ολοκλήρωση του καθαρισμού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των εκλούσεων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και από την εικόνα του φάνηκε ότι το σύμπλοκο απομονώθηκε με τη μέθοδο αυτή (Εικ. 3.10). Με τον τρόπο αυτό η πρωτεΐνη HrpG απομονώθηκε σε περίσσεια σε σχέση με τη δεύτερη πρωτεΐνη του δικιστρονίου HrpV.



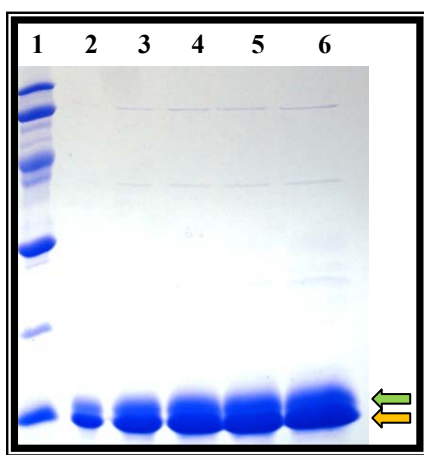
Εικ. 3.10. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου HT₆-HrpG – HrpV. Με πράσινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpG, με πορτοκαλί η θέση της HrpV. Οι τρεις εκλούσεις πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά με εφαρμογή διαλύματος έκλυσης που περιείχε 300 mM ιμιδαζόλιο. Η πρωτεΐνη HT₆-HrpG έχει απομονωθεί σε περίσσεια σε σχέση με την πρωτεΐνη HrpV. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. MW HT₆-HrpG: 18.9 kDa. MW HrpV: 13.44 kDa

Το πλασμίδιο pET26b/HrpG/HrpV προέκυψε από το πλασμίδιο pPROEX/HrpG/HrpV με απομόνωση του δικιστρονίου HrpG/HrpV με PCR και υποκλωνοποίηση στον pET26b στις θέσεις *Nde*I/*Xho*I. Στον κάτω εκκινητή ο οποίος υβριδίζει με το 3' άκρο του HrpV εξαλείφθηκε το ενδογενές κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης του HrpV ώστε η μετάφραση να συμπεριλάβει και την ετικέτα ιστιδινών

⁸ Το πλασμίδιο pPROEX/HrpG είναι προϊόν της Διδ. Διατριβής της Α.Δ.Γαζή, 2007.

⁹ Η κατασκευή pET16B/HrpV είναι της κ. Μ.Μπαστάκη

που προσφέρει ο φορέας pET26b. Το πλασμίδιο μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 200ml και καθαρισμός του συμπλόκου από στήλη νικελίου. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε όγκο 30 ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.1% Triton X-100 και ακολούθησε απομόνωση του συμπλόκου από στήλη νικελίου όγκου στρώματος 0.5 ml. Τέσσερις εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο πραγματοποιήθηκαν και από τη δεύτερη έκλυση ηλεκτροφορήθηκαν διαφορετικοί όγκοι εκλούσεων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Η εικόνα του πηκτώματος φαίνεται παρακάτω (Εικ.3.11). Με τη μεταφορά της ετικέτας ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της HrpV αυξήθηκε η ποσότητά της και εμφανίζεται σε αναλογία περίπου 2:1 σε σχέση με την HrpG.



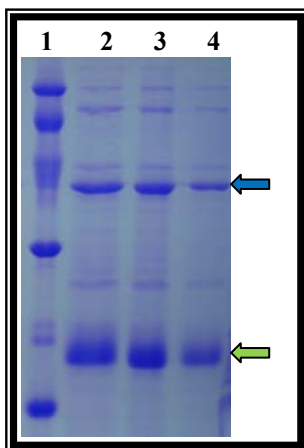
Εικ. 3.11. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου HrpG – HrpV-HT₆. Με πράσινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της HrpG, με πορτοκαλί η θέση της HrpV-HT₆. Ηλεκτροφορήθηκαν όγκοι 2,4,6,8 και 10 μl από τη δεύτερη έκλυση στις διαδρομές 2,3,4,5 και 6 αντίστοιχα. Αυτή τη φορά απομονώθηκε περίπου διπλάσια ποσότητα από την πρωτεΐνη HrpV-HT₆ σε σχέση με την HrpG. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. MW HrpG: 15.78 kDa. MW HrpV-HT₆: 14.52 kDa

3.3.4.2 Το ζεύγος HrpG-HrpJ.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT₆-HrpG + HrpJ εκφράστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας ως δικιστρόνιο από το πλασμίδιο pPROPET/HrpG/HrpJ. Το πλασμίδιο αυτό προέκυψε με υποκλωνοποίηση του γονιδίου της HrpG στον πολυσυνδέτη MCS1 του πλασμιδίου pPROPET στις θέσεις *NcoI/XhoI* (το άκρο κοπής της *XhoI* μετατράπηκε σε τυφλό). Το γονίδιο της HrpG απομονώθηκε με PCR και τα άκρα του ήταν *BspHI* άνω (συμβατή με την *NcoI* του φορέα) και τυφλό κάτω. Ο κλώνος που προέκυψε αποτέλεσε δέκτη ένθεσης του γονιδίου της HrpJ στον δεύτερο πολυσυνδέτη. Το γονίδιο HrpJ προέκυψε με PCR από το πλασμίδιο pET16b/HrpJ¹⁰ και είχε άνω άκρο *NdeI* και κάτω άκρο τυφλό. Το διπλό πλασμίδιο κατόπιν μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 200ml και καθαρισμός του συμπλόκου από στήλη νικελίου. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε όγκο 30ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 και ακολούθησε απομόνωση του συμπλόκου από στήλη νικελίου όγκου στρώματος 0.5 ml. Τρεις εκλούσεις στα 300 mM ιμιδαζολίου πραγματοποιήθηκαν και η εικόνα τους φαίνεται στο πήκτωμα

¹⁰ Το πλασμίδιο pET16b/HrpJ είναι προϊόν της διδακτορικής διατριβής της Α.Ταμπακάκη, 1999.

που ακολουθεί (Εικ.3.12). Η αναλογία των πρωτεϊνών στο καθαρισμένο σύμπλοκο είναι περίπου 2 HrpG:1HrpJ

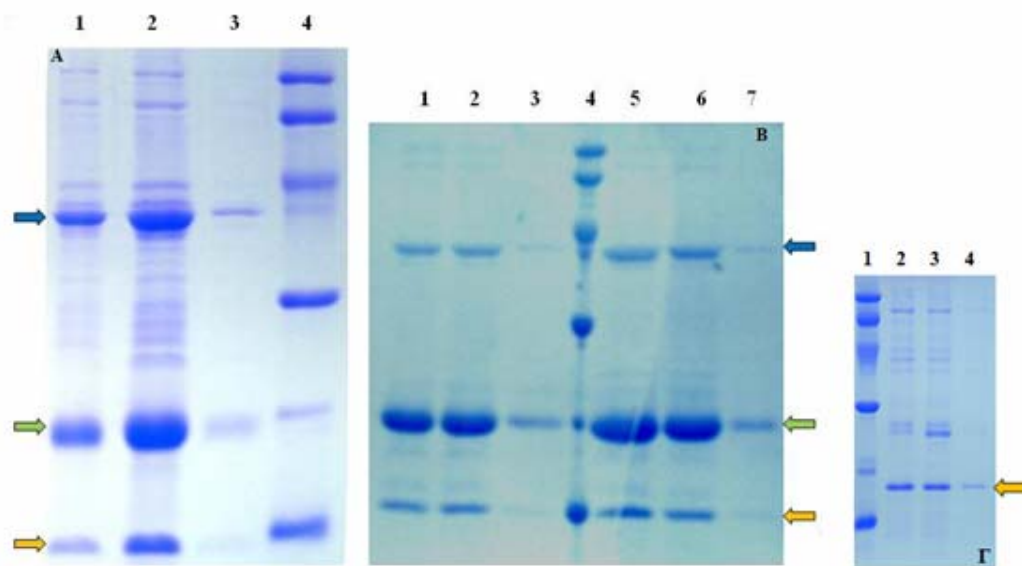


Εικ. 3.12. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου HT₆-HrpG – HrpJ (διαδρομές 2,3,4). Με πράσινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpG, με μπλε η θέση της HrpJ. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. MW HT₆-HrpG: 18.9 kDa. MW HrpJ: 40.58kDa

3.3.4.3 Η τριπλέτα HrpG-HrpV-HrpJ.

Για να εξεταστεί το ενδεχόμενο οι θέσεις πρόσδεσης των HrpV & HrpJ επί της HrpG να είναι αλληλεπικαλυπτόμενες, πραγματοποιήθηκαν δυο ανεξάρτητα πειράματα συγκαθαρισμού, το ένα βασισμένο στην ιδέα παρασκευής ενός τρικιστρονικού πλασμιδίου με χρήση του φορέα pPROPET, ενώ το άλλο βασίστηκε στην συνέκφραση των τριών πρωτεϊνών από συμβατούς φορείς. Στην πρώτη προσέγγιση, παρασκευάστηκε το τρικιστρονικό πλασμίδιο pPROPET/HrpG/HrpV/HrpJ με τον παρακάτω τρόπο. Η κασέτα HrpGV απομονώθηκε με PCR και με άκρα *Bsp*HI/*Hind*III από το πλασμίδιο pPROEX/HrpG/HrpV και μεταφέρθηκε στον πρώτο πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα pPROPET στις θέσεις *Nco*I/*Hind*III. Επί του νέου πλασμιδίου έγινε η ένθεση του γονιδίου της HrpJ στον δεύτερο πολυσυνδέτη, με τη χρήση των συμβατών άκρων *Nde*I/τυφλό. Το τριπλό πλασμίδιο κατόπιν μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 300 ml και καθαρισμός του συμπλόκου από στήλη νικελίου. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε όγκο 40 ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 και ακολούθησε απομόνωση του συμπλόκου από στήλη νικελίου όγκου στρώματος 0.5 ml. Τρεις εκλούσεις στα 300 mM ιμιδαζολίου πραγματοποιήθηκαν και η εικόνα τους φαίνεται στο πήκτωμα που ακολουθεί (Εικ. 3.13A). Ως αρνητικός μάρτυρας προετοιμάστηκε το δικιστρονικό πλασμίδιο pPROPET/HrpV/HrpJ από το οποίο επιχειρήθηκε έκφραση και καθαρισμός παράλληλα και με τον ίδιο τρόπο όπως από το τρικιστρονικό πλασμίδιο (το πλασμίδιο-μάρτυρας προετοιμάστηκε με ένθεση του γονιδίου της πρωτεΐνης HrpV όπως προέκυψε από PCR με άκρα *Bsp*HI/*Hind*III στον πρώτο πολυσυνδέτη (MCS1) του pPROPET και επί του πλασμιδίου αυτού έγινε η δεύτερη ένθεση του γονιδίου *hrpJ* με τον ίδιο τρόπο όπως εντέθηκε στο τρικιστρόνιο (Εικ. 3.13Γ). Στην δεύτερη προσέγγιση έγινε συνέκφραση των τριών πρωτεϊνών από τα πλασμίδια pPROEX/HrpG/HrpV και pAR3/HrpJ. Τα δυο πλασμίδια μεταφέρθηκαν ταυτόχρονα με διπλή επιλογή ανθεκτικότητας σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3),

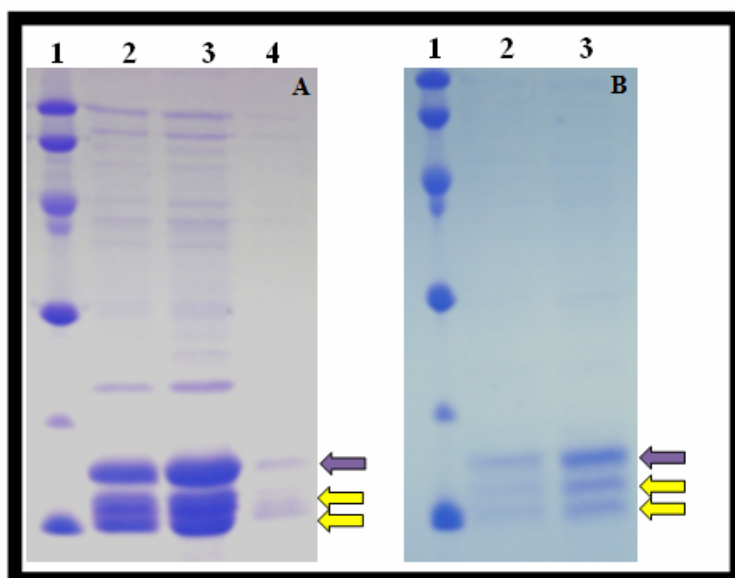
πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 200 ml και στη συνέχεια η καλλιέργεια διαιρέθηκε στα δύο και ακολούθησε καθαρισμός του συμπλόκου από στήλη νικελίου όγκου στρώματος 0.5 ml με λύση σε δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης, όγκου 15 ml έκαστο. Το διάλυμα λύσης Α περιείχε 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 και το Β περιείχε 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.1% Triton X-100. Τρεις εκλούσεις στα 300 mM ιμιδαζολίου πραγματοποιήθηκαν για κάθε επιμέρους καθαρισμό και η εικόνα τους φαίνεται στο πήκτωμα που ακολουθεί (Εικ. 3.13B). Και από τις δυο αυτές προσεγγίσεις συγκαθαρισμού και στα δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης το σύμπλοκο των τριών πρωτεϊνών απομονώθηκε και παρουσιάζει την ίδια εικόνα ανεξαρτήτως μεταχείρισης. Η HrpG απομονώθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με τις HrpV και HrpJ.



Εικ. 3.13. Αποδιατακτικά πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων των συγκαθαρισμών του συμπλόκου HT₆-HrpG – HrpV - HrpJ. **Α.** Συγκαθαρισμός του συμπλόκου από το τρικιστρονικό πλασμιδίο pPROPET/HrpG/HrpV/HrpJ. Στις διαδρομές 1,2,3 έχουν ηλεκτροφορηθεί οι τρεις διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. Στην τέταρτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. **Β.** Συγκαθαρισμός του συμπλόκου από τη συνέκφραση του δικιστρονικού πλασμιδίου pPROEX/HrpG/HrpV με το συμβατό πλασμιδίο pAR3/HrpJ σε δυο διαφορετικά διαλύματα λύσης. Στις διαδρομές 1,2,3 έχουν ηλεκτροφορηθεί οι διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο από τον καθαρισμό σε διάλυμα λύσης Α, ενώ στις διαδρομές 5, 6 και 7 οι διαδοχικές εκλούσεις από τον καθαρισμό σε διάλυμα λύσης Β. Στην τέταρτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. **Γ.** Ο αρνητικός μάρτυρας του πειράματος της εικόνας Α. Από την έκφραση του πλασμιδίου pPROPET/HrpV/HrpJ καθαρίστηκε μόνο μια μικρή ποσότητα από την HT₆-HrpV. Με πράσινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpG, με μπλε η θέση της HrpJ και με πορτοκαλί η θέση της πρωτεΐνης HrpV. MW HT₆-HrpG: 18.9 kDa. MW HrpV: 13.44 kDa. MW HrpJ: 40.58 kDa

3.3.4.4 Το ζεύγος HrpG^{-C14}-HrcUc.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT₆-HrpG^{-C14} + HrcUc εκφράστηκε από το δικιστρονικό πλασμίδιο pPROPET/HrpG^{-C14}/HrcUc το οποίο κατασκευάστηκε ως εξής. Το ένθεμα HrpG^{-C14} προϊόν PCR με άκρα φέροντα θέσεις *NcoI/NotI* υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του πρώτου πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα pPROPET και το νέο πλασμίδιο αποτέλεσε δέκτη του δεύτερου ενθέματος, HrcUc. Το τελευταίο ελήφθη μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *NdeI/BamHI* από το πλασμίδιο pET16b/HrcUc¹¹ και υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του δεύτερου πολυσυνδέτη. Το πλασμίδιο μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 300 ml και κατόπιν η καλλιέργεια διαιρέθηκε στα δυο. Πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια δυο παράλληλοι καθαρισμοί. Ο ένας έγινε υπό ήπιες συνθήκες λύσης, σε όγκο 30 ml από το διάλυμα H (βλέπε παράγραφο 3.2.1) και το διαυγές διάλυμα λύσης επώαστηκε με 0.5 ml υλικού Ni-NTA agarose με ανάδευση για 2 ώρες στους 4 °C. Ο δεύτερος καθαρισμός πραγματοποιήθηκε υπό πιο αυστηρές συνθήκες, όπου η λύση πραγματοποιήθηκε σε 20 ml διαλύματος λύσης A (βλέπε παράγραφο 3.2.1) και ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε αμέσως χωρίς προηγούμενη επώαση του διαυγούς διαλύματος λύσης με το υλικό χρωματογραφίας. Επίσης, όλα τα διαλύματα πλύσης και έκλουσης περιείχαν 20 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη στη δεύτερη μεταχείριση. Το συμπέρασμα από τη διενέργηση των δυο διαφορετικών καθαρισμών του συμπλόκου ήταν ότι υπό ήπιες συνθήκες απομονώθηκε περισσότερη ποσότητα και από τις δυο πρωτεΐνες σε σχέση με τις αυστηρές συνθήκες καθαρισμού. Παρά την υποβολή του συμπλόκου σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και αρκετά αναγωγικού περιβάλλοντος το σύμπλοκο δε διασπάστηκε παρά την μείωση της ποσοτικής απόδοσης. Και στα δυο πειράματα συγκαθαρισμού οι πρωτεΐνες στα απομονωμένα σύμπλοκα ήταν σε φαινομενική αναλογία 1:1 (Εικ. 3.14).



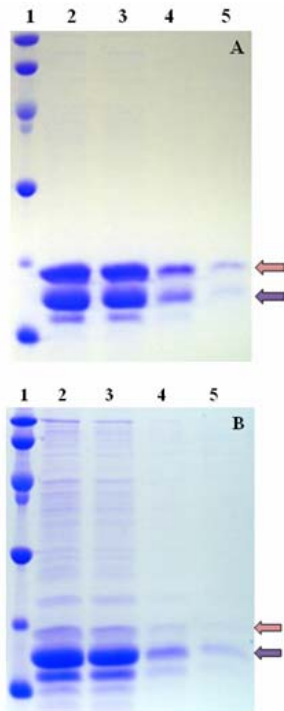
¹¹ το πλασμίδιο pET16b/HrcUc είναι προϊόν της διδακτορικής διατριβής της Α.Ταμπακάκη, 1999.

Εικ. 3.14. Αποδιατακτικά ηλεκτόματα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου HT₆-HrpG^{-C14} – HrcUc στις δυο διαφορετικές συνθήκες καθαρισμού. Η πρωτεΐνη HrcUc (το διαλυτό κυτταροπλασματικό τμήμα της συντηρημένης μεμβρανικής πρωτεΐνης HrcU) ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών του T3SS FlhB/YscU/EscU/HrcU της οποίας τα μέλη φέρουν ένα σινιάλο αυτοπρωτεόλυσης στο διαλυτό κυτταροπλασματικό τους κομμάτι (βλέπε Κεφ. 1 εισαγωγή). **A.** Καθαρισμός σε ήπιες συνθήκες. Στις διαδρομές 2,3 και 4 ηλεκτροφορήθηκαν οι διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. **B.** Καθαρισμός σε αυστηρές συνθήκες. Με δυο μόνο εκλούσεις στα 300 mM ιμιδαζόλιο απελευθερώθηκε το λίγο πρωτεϊνικό υλικό που είχε δεσμευθεί στη στήλη. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. Με μωβ βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpG^{-C14}, με κίτρινο οι θέσεις των θραυσμάτων πρωτεόλυσης της HrcUc. Τα θραύσματα αυτά έχουν μοριακό βάρος 10.5 και 7.9 kDa. MW HT₆-HrpG^{-C14}: 17.38 kDa.

3.3.4.5 Το ζεύγος HrpG^{-C14}-HrpO.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT₆-HrpG^{-C14} + HrpO εκφράστηκε από το δικιστρονικό πλασμίδιο pPROPET/HrpG^{-C14}/HrpO το οποίο κατασκευάστηκε ως εξής. Το ένθεμα HrpG^{-C14} προϊόν PCR με άκρα φέροντα θέσεις *NcoI/NotI* υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του πρώτου πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα pPROPET και το νέο πλασμίδιο αποτέλεσε δέκτη του δεύτερου ενθέματος, HrpO. Το τελευταίο ελήφθη μετά από διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού *NdeI/BamHI* από το πλασμίδιο pET16b/HrpO¹² και υποκλωνοποιήθηκε στις αντίστοιχες θέσεις του δεύτερου πολυσυνδέτη. Το διπλό πλασμίδιο κατόπιν μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 200ml και κατόπιν η καλλιέργεια διαιρέθηκε στα δυο. Πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια δυο παράλληλοι καθαρισμοί. Ο ένας έγινε υπό ήπιες συνθήκες λύσης, σε όγκο 15 ml από το διάλυμα Η και το διαυγές διάλυμα λύσης επώαστηκε με 0.5 ml υλικού Ni-NTA αγαρόζης με ανάδευση για 1 ώρα στους 4 °C. Ο δεύτερος καθαρισμός πραγματοποιήθηκε υπό πιο αυστηρές συνθήκες, όπου η λύση πραγματοποιήθηκε σε 15 ml διαλύματος λύσης Α και ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε αμέσως χωρίς προηγούμενη επώαση του διαυγούς διαλύματος λύσης με το υλικό χρωματογραφίας. Από τη σύγκριση των δυο μεταχειρίσεων προκύπτει το συμπέρασμα ότι με την αύξηση της αλατότητας από τα 50 στα 150 mM και την εξάλειψη του βήματος της συνεπώασης το σύμπλοκο HT₆-HrpG^{-C14} + HrpO διασπάται σε μεγάλο βαθμό (Εικ. 3.15).

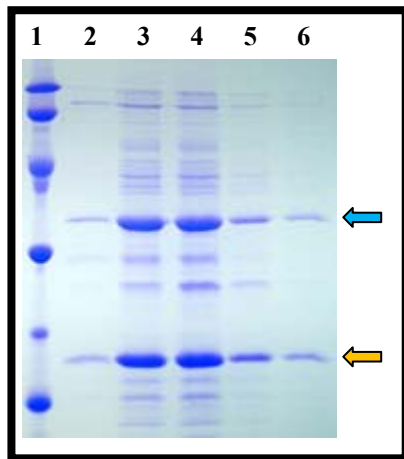
¹² το πλασμίδιο pET16b/HrpO είναι προϊόν της διδακτορικής διατριβής της Α.Ταμπακάκη, 1999.



Εικ. 3.15. Αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου $HT_6\text{-HrpG}^{C14}$ – $HrpO$ στις δυο διαφορετικές συνθήκες καθαρισμού. **A.** Καθαρισμός σε ήπιες συνθήκες. Στις διαδρομές 2,3,4 και 5 ηλεκτροφορήθηκαν οι διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. Οι δυο πρωτεΐνες καθαρίστηκαν με καλή απόδοση σε αναλογία 1:1 **B.** Καθαρισμός σε αυστηρές συνθήκες. Στις διαδρομές 2,3,4 και 5 ηλεκτροφορήθηκαν οι διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. Η περισσότερη ποσότητα της $HrpO$ αποδεσμεύθηκε από την $HrpG$. Με μωβ βέλος υποδεικνύεται η θέση της $HT_6\text{-HrpG}^{C14}$, με ροζ η θέση της $HrpO$. MW $HT_6\text{-HrpG}^{C14}$: 17.38 kDa. MW $HrpO$: 17.37 kDa.

3.3.4.6 Το ζεύγος $HrpV\text{-HrpS}$.

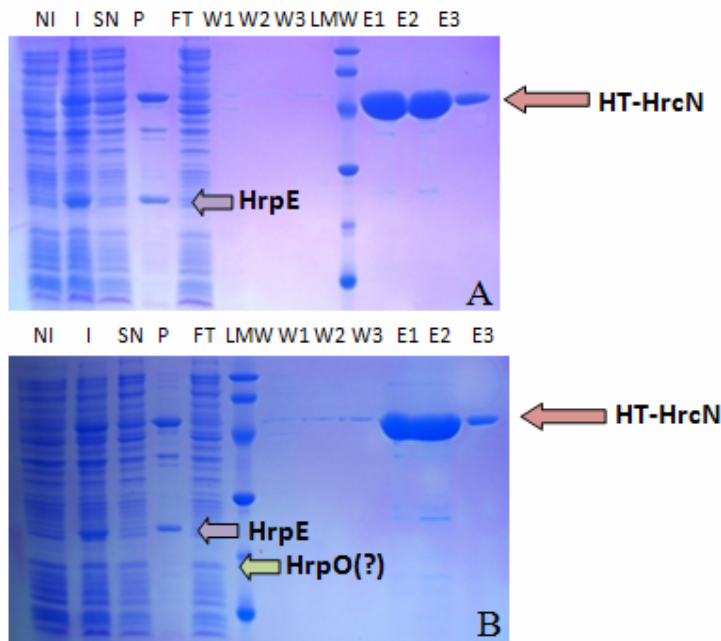
Το σύμπλοκο πρωτεϊνών $HT_6\text{-HrpV} + HrpS$ εκφράστηκε από το δικιστρονικό πλασμίδιο $pPROPET/HrpV/HrpS$ το οποίο κατασκευάστηκε ως εξής. Το ένθεμα $HrpV$ προϊόν PCR με άκρα φέροντα θέσεις *BspHI/HindIII* υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις *NcoI/HindIII* του πρώτου πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα $pPROPET$ και το νέο πλασμίδιο αποτέλεσε δέκτη του δεύτερου ενθέματος, $HrpS$. Το τελευταίο ελήφθη με PCR με μήτρα το γενωμικό DNA *P. syringae* pv *phaseolicola* και τα άκρα του τροποποιήθηκαν ώστε το άνω να είναι *NdeI* και το κάτω τυφλό. Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις *NdeI/EcoRI* (τυφλό) του δεύτερου πολυσυνδέτη. Το διπλό πλασμίδιο κατόπιν μεταφέρθηκε σε κύτταρα έκφρασης *E. coli* BL21(DE3), πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 1 λίτρου και ακολούθησε καθαρισμός του συμπλόκου από στήλη νικελίου. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε όγκο 100ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.1% Triton X-100 και ακολούθησε προσθήκη 2 ml υλικού Ni-NTA agarose και επώαση με ανάδευση στους 4 °C για 2 ώρες. Ο καθαρισμός συνεχίστηκε με βάση το γενικό περιγεγραμμένο πρωτόκολλο. Στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκαν πέντε διαδοχικές εκλούσεις στα 300 mM ιμιδαζολίου και η εικόνα τους φαίνεται στο πηκτώμα που ακολουθεί (Εικ.3.16). Η αναλογία των πρωτεϊνών στο καθαρισμένο σύμπλοκο είναι 1:1. Η υποβολή του συμπλόκου σε ανάλυση SAXS δεν κατέστη δυνατή λόγω έλλειψης διαθέσιμου χρόνου χρήσης της γραμμής ακτινοβόλησης στο σύγχροτρο DESY (Αμβούργο).



Εικ. 3.16. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων του συμπλόκου HT₆-HrpV – HrpS (διαδρομές 2,3,4,5 και 6). Με πορτοκαλί βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpV, με γαλάζιο η θέση της HrpS. Στην πρώτη διαδρομή εικονίζεται ο μάρτυρας μοριακών μεγεθών LMW. MW HT₆-HrpV: 16.55 kDa. MW HrpS: 33.24 kDa

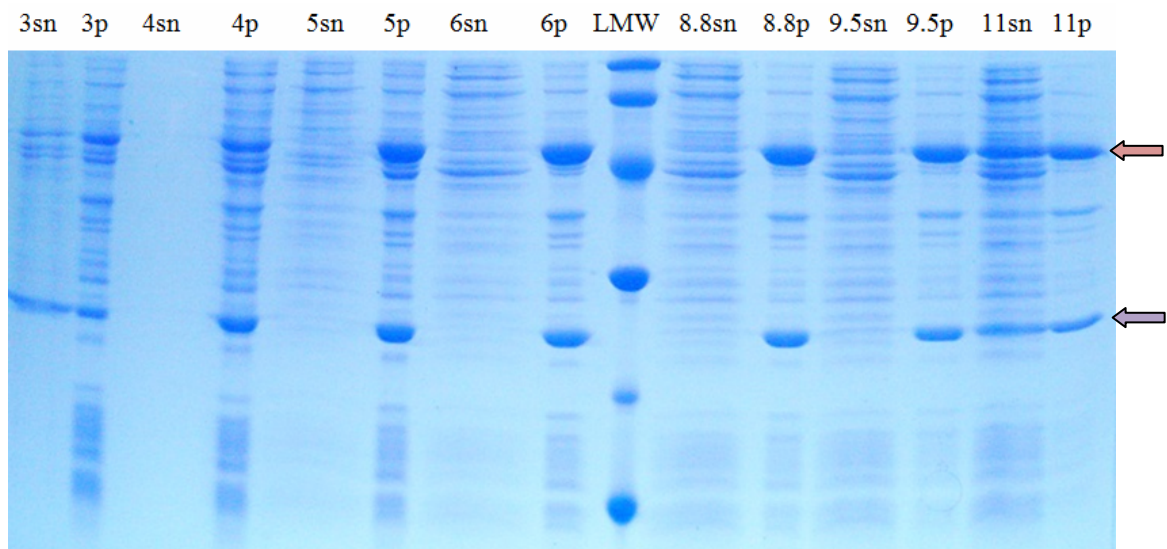
3.3.4.7 Το ζεύγος HrcN-HrpE και η τριπλέτα HrcN-HrpE-HrpO.

Για την απομόνωση του συμπλόκου HrcN-HrpE παρασκευάστηκε το πλασμίδιο pPROPET/HrcN/HrpE ενώ έγινε και προσπάθεια κατασκευής του τρικιστρονικού πλασμιδίου pPROPET/HrcN/HrpE/HrpO. Το πρώτο πλασμίδιο παρασκευάστηκε με απομόνωση με PCR του ενθέματος της HrcN από το πλασμίδιο pET16b/HrcN. Οι εκκινητές του ενθέματος είχαν σχεδιαστεί ώστε να προσδίδουν άνω άκρο BspHI και κάτω άκρο HindIII και το ένθεμα υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις NcoI/HindIII του πρώτου πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα pPROPET. Το ένθεμα HrpE απομονώθηκε με PCR από το πλασμίδιο pET16b/HrpE και είχε άκρα NdeI/BamHI για να εισέλθει στις αντίστοιχες θέσεις του δεύτερου πολυσυνδέτη (MCS2) του φορέα pPROPET. Ο κάτω εκκινητής περιείχε την αλληλουχία ενός rbs AAGGAG που θα χρησιμοποιούνταν για την έκφραση του γονιδίου της HrpO που θα κλωνοποιούνταν καθοδικά του γονιδίου της HrpE επί του pPROPET. Στην εκδοχή του τρικιστρονίου, το πλασμίδιο pPROPET/HrcN/HrpE υποβλήθηκε σε διπλή πέψη με τα ένζυμα περιορισμού BamHI/SacI ώστε να δεχτεί το τρίτο ένθεμα της HrpO το οποίο προέκυψε με PCR από το πλασμίδιο pPROEX/HrpO και έφερε τα αντίστοιχα άκρα. Οι πρώτες προσπάθειες απομόνωσης των συμπλόκων σε pH 8.0 στο τυπικό διάλυμα λύσης συμβατό τόσο με την HrcN όσο και με την HrpE (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 1% Triton X-100) κατέληξαν στην μονομερή απομόνωση της πρωτεΐνης HT₆-HrcN. Η πρωτεΐνη HrpE εντοπιζόταν διαρκώς στο αδιάλυτο κλάσμα, ενώ η έκφραση της HrpO δεν πιστοποιήθηκε (Εικ. 3.17). Για την διερεύνηση της διαλυτότητας των συνεκφραζόμενων πρωτεϊνών HT₆-HrcN, HrpE πραγματοποιήθηκε λύση μικροποσοτήτων κυττάρων σε ένα εύρος pH και τέλος επιλέχθηκε το pH 11.0, καθώς όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.18. οι πρωτεΐνες επανέρχονται στο διαλυτό κλάσμα μόνο σε αλκαλικές τιμές του pH. Οι υπόλοιποι παράγοντες που εμπεριέχονταν στα διαλύματα λύσης της διερεύνησης διαλυτότητας ήταν: 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη, 0.5% Triton X-100.



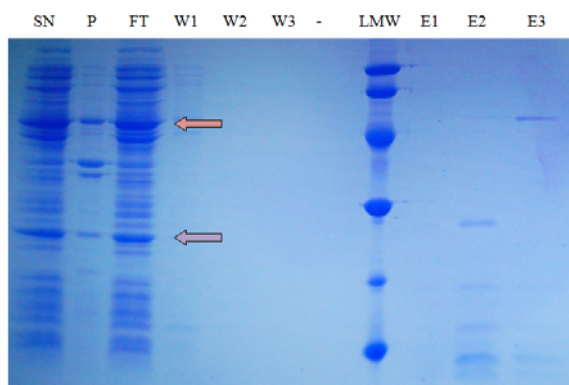
Εικ. 3.17. Αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης των σχημάτων καθαρισμού των πρωτεϊνών που εκφράζονται από τα πλασμίδια pPROPET/HrcN/HrpE (A) και pPROPET/HrcN/HrpE/HrpO (B) σε τιμή pH 8.0. Και στις δυο περιπτώσεις στις εκλούσεις λαμβάνεται μόνο η HT₆-HrcN, η HrpE εντοπίζεται στο αδιάλυτο κλάσμα ενώ η HrpO πιθανόν δεν εκφράζεται καθώς στο επαγμένο δείγμα (διαδρομή 2, εικόνα B) δε φαίνεται υπερέκφραση στο σημείο που αναμένεται να εντοπίζεται. Η HT₆-HrcN εικονίζεται με ροζ βέλος, η HrpE με μωβ και η πιθανή HrpO με πράσινο. MW HT₆-HrcN: 51.47 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa, MW HrpO: 17.37 kDa.

NI: μη επαγμένο δείγμα καλλιέργειας, I: επαγμένο δείγμα καλλιέργειας, SN: υπερκείμενο λύσης, P: αδιάλυτο κλάσμα, FT: κλάσμα έκπλυσης, W1: πρώτο κλάσμα πλύσης, W2: δεύτερο κλάσμα πλύσης, W3: τρίτο κλάσμα πλύσης, E1: πρώτη έκλουση, E2: δεύτερη έκλουση, E3: τρίτη έκλουση. LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών.



Εικ. 3.18. Αποδιατακτικό πηκτώμα πολυακρυλαμίδης της δοκιμής διαλυτότητας των πρωτεϊνών HT₆-HrcN, HrpE έτσι όπως εκφράζονται από το πλασμίδιο pPROPET/HrcN/HrpE σε διάφορα pH. Τα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 3, 4, 5 και 6 παρασκευάστηκαν με κιτρικό οξύ, το 8.8 με Tris-Cl, και τα 9.5 & 11 με CAPS. Οι πρωτεΐνες επανέρχονται στη διαλυτή φάση μόνο σε pH 11. Με ροζ βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrcN, με μωβ της HrpE. Sn: διαλυτή φάση. P: αδιάλυτο κλάσμα. LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. MW HT₆-HrcN: 51.47 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa

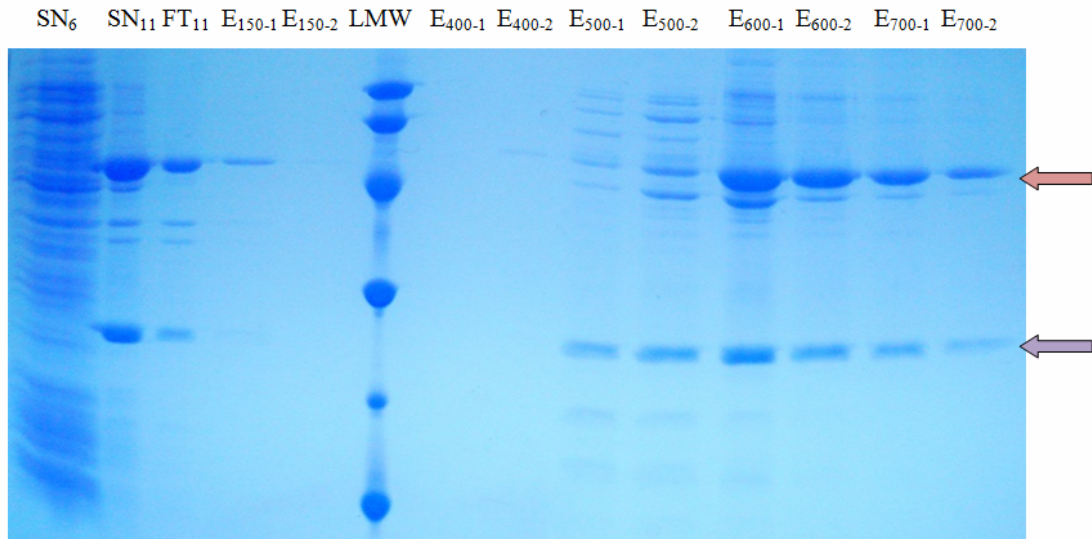
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των πρωτεϊνών από 200 ml καλλιέργειας σε διάλυμα λύσης όγκου 20 ml που περιείχε 25 mM CAPS pH 11.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 0.5% Triton X-100 και 10% γλυκερόλη με τη χρήση 0.5 ml υλικού Ni-NTA agarose. Αποτέλεσμα του καθαρισμού ήταν ότι και οι δυο πρωτεΐνες έφυγαν στην έκπλυση από τη στήλη (Εικ. 3.19). Ίσως η αλληλεπίδραση μεταξύ τους να κρύβει την ετικέτα ιστιδινών και να μην μπορεί να γίνει η πρόσδεση της HT₆-HrcN τουλάχιστον επί της στήλης.



Εικ. 3.19. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του σχήματος καθαρισμού των πρωτεϊνών HT₆-HrcN και HrpE σε pH 11. Και οι δυο πρωτεΐνες εντοπίζονται στην έκπλυση (FT). Με ροζ βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrcN, με μωβ της HrpE. Sn: διαλυτή φάση. P: αδιάλυτο κλάσμα. FT: έκπλυση, W1, 2 και 3: πλύσεις 1, 2 και 3. LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. E1,2,3: εκλούσεις 1,2 και 3. MW HT₆-HrcN: 51.47 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa

Στο σημείο αυτό αποφασίστηκε η αλλαγή συστήματος απομόνωσης και επιλέχθηκε η χρήση στήλης ανιοντοανταλλαγής Q-Sepharose. Το υλικό αυτό φέρει προσδεδεμένη μια τεταρτοταγή αμίνη η οποία παραμένει φορτισμένη σε όλο το εύρος χρησιμοποιούμενων τιμών pH(2-12) και έτσι αποτελεί έναν ισχυρό ανιοντοανταλλάκτη (βλέπε παράγραφο 2.3.2). Σε pH 11 οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος παρουσιάζουν θεωρητικά ισχυρό αρνητικό φορτίο (-33.16 για την HT₆-HrcN, -13.82 για την HrpE, τιμές υπολογισμένες από το πρόγραμμα DNAMAN) οπότε το σύστημα θεωρητικά ενδείκνυται για την απομόνωση του μίγματος. Σε πρώτο στάδιο έγινε λύση κυττάρων από 200 ml καλλιέργειας σε διάλυμα λύσης με τιμή pH 6.0 ώστε να απομακρυνθούν οι πολύ διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων έκφρασης και στη συνέχεια το αδιάλυτο κλάσμα αυτής της πρώτης κατεργασίας υπεβλήθη σε λύση και περαιτέρω καθαρισμό σε pH 11. Το διάλυμα λύσης περιείχε 25 mM CAPS pH 11, 2 mM MgCl₂, 10% γλυκερόλη και 1 mM EDTA. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 ml υλικού Q-Sepharose, και ακολούθησε καθαρισμός βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.2.3. Η εικόνα που ελήφθη από την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση του σχήματος καθαρισμού φαίνεται παρακάτω

(Εικ.3.20)



Εικ. 3.20. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του καθαρισμού από στήλη ανιοντοανταλλαγής των πρωτεϊνών HT₆-HrcN, HrpE έτσι όπως εκφράζονται από το πλασμίδιο pPROPET/HrcN/HrpE σε pH 11. Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των διαλυτών βακτηριακών πρωτεϊνών μετά από λύση σε pH 6.0 και κατόπιν η πελέτα υπεβλήθει εκ νέου σε λύση σε pH 11 και ακολούθησε καθαρισμός. Με τον τρόπο αυτό οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος απομονώθηκαν με βελτιωμένη καθαρότητα.

SN₆=το υπερκείμενο λύσης σε pH 6. SN₁₁=το υπερκείμενο λύσης σε δεύτερο στάδιο, σε pH 11. FT₁₁: η έκπλυση από τη στήλη σε pH 11. E: οι εκλούσεις σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl, υποδεικνυόμενες ως δείκτης. Στις συγκεντρώσεις από τα 500 mM NaCl και μετά ξεκινά η έκλυση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος. LMW=μάρτυρας μοριακών μαζών. Με ροζ βέλος υποδεικνύεται η πρωτεΐνη HT₆-HrcN και με μωβ η HrpE. MW HT₆-HrcN: 51.47 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa

LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. MW HT₆-HrcN: 51.47 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa

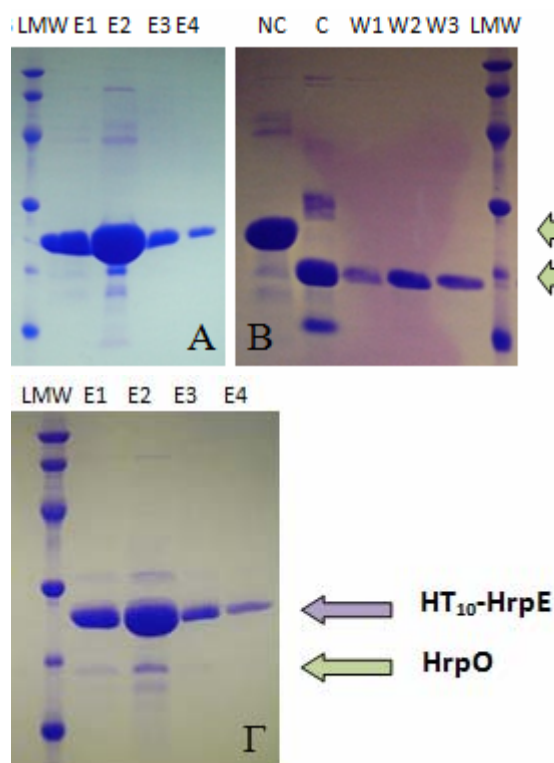
Τα τρία τελευταία και καθαρότερα εκλούσματα της στήλης ανιοντοανταλλαγής συνελέγησαν και υπεβλήθησαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης S200 για διαλεύκανση του αν τα δυο μόρια συνεκλούνται ως σύμπλοκο και σε τι μοριακά βάρη απαντώνται. Για την ανάλυση αυτή βλέπε στο κεφάλαιο 4, παρ. 4.3.1.5.

3.3.4.8 Το ζεύγος HrpO-HrpE.

Το ζεύγος HrpO-HrpE εκφράστηκε από δυο διαφορετικά πλασμίδια, το pPROPET/HrpO/HrpE και το pET16b/HrpE/HrpO. Στις δυο προσεγγίσεις άλλαξε η πρωτεΐνη που έφερε την ετικέτα ιστιδινών, στη μεν πρώτη την ετικέτα (HT₆-) έφερε η HrpO στο αμινοτελικό της άκρο, στη δεύτερη την ετικέτα έφερε η HrpE (HT₁₀-) στο αμινοτελικό της άκρο. Το πρώτο πλασμίδιο κατασκευάστηκε με υποκλωνοποίηση του ενθέματος της HrpO¹³ με άκρα *NcoI*/τυφλό στις θέσεις *NcoI*/*XhoI*(τυφλό) του πρώτου πολυσυνδέτη του φορέα και επί του νέου πλασμιδίου εντέθηκε το θραύσμα της HrpE που ελήφθη με διπλή πέψη *NdeI*/*Bam*HI από το πλασμίδιο pET16b/HrpE στις αντίστοιχες θέσεις του δεύτερου πολυσυνδέτη. Το δεύτερο πλασμίδιο παρήχθη με υποκλωνοποίηση της κασέτας HrpE-HrpO από το φορέα

¹³ Προσφορά της Δρ. Α.Δ.Γαζή

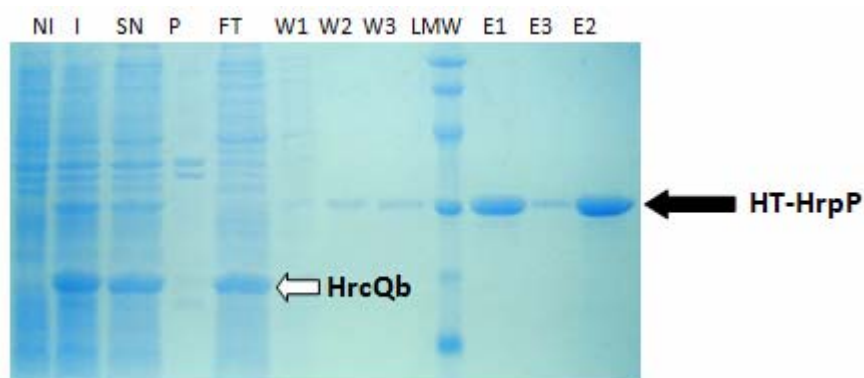
pPROPET/HrcN/HrpE/HrpO με άκρα *NdeI/SacI*(τυφλό) στις θέσεις *NdeI/BamHI*(τυφλό) του φορέα pET16b. Κύτταρα από 100 ml καλλιέργειας για κάθε μια από τις δυο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό των αντίστοιχων πρωτεϊνών και επαναωρήθηκαν σε 15 ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 0.5% Triton X-100 σε στρώμα 0.5 ml Ni-NTA agarose. Ο καθαρισμός συνεχίστηκε κατά το τυπικό και η εικόνα των εκλούσεων απεικονίζεται παρακάτω. Στην περίπτωση HT₆-HrpO-HrpE, οι δυο πρωτεΐνες βάσει του μοριακού τους βάρους (MW HT₆-HrpO: 20.48 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa) αναμένεται να συμπίπτουν κατά την αποδιατακτική τους ανάλυση οπότε δεν ήταν ξεκάθαρο στο στάδιο αυτό αν συγκαταρίστηκαν (Εικ. 3.21Α). Για το λόγο αυτό οι εκλούσεις υπεβλήθησαν σε αντίδραση κοπής της ετικέτας ιστιδινών με επώαση με την πρωτεάση rTEV και ακολούθησε εκ νέου καθαρισμός από στήλη νικελίου. Στο στάδιο αυτό φάνηκε ότι όλη η ποσότητα που φαινόταν στο αποδιατακτικό πήκτωμα μετά από τον πρώτο καθαρισμό άνηκε στην πρωτεΐνη HT₆-HrpO (Εικ.3.21Β). Στην περίπτωση δε HT₆-HrpE-HrpO τέτοιο πρόβλημα δε συναντήθηκε και φάνηκε ότι μαζί με την μεγάλη ποσότητα της HT₆-HrpE που καθαρίστηκε ελήφθη και μια μικρή ποσότητα από την HrpO (Εικ.3.21Γ).



Εικ. 3.21. Αποδιατακτικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης των εκλούσεων των καθαρισμών από τις επαγωγές των πλασμιδίων pPROPET/HrpO/HrpE (Α) και pET16b/HrpE/HrpO (Γ). Α. Η πρωτεΐνη που ελήφθη στις εκλούσεις E1,2,3 και 4 θα μπορούσε να είναι μίγμα των HT₆-HrpO-HrpE. Για το λόγο αυτό οι εκλούσεις υπεβλήθησαν σε κοπή με την πρωτεάση rTEV για απομάκρυνση της ετικέτας ιστιδινών (Β). Τελικά όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης άνηκε στην HT₆-HrpO καθώς όλη μετατοπίστηκε προς τα κάτω μετά την κοπή. Γ. Αντίθετα, στην περίπτωση των HT₁₀-HrpE-HrpO μαζί με την ποσότητα της HT₁₀-HrpE απομονώθηκε και μια μικρή ποσότητα από την HrpO. E1,2,3,4: οι διαδοχικές εκλούσεις με 300 mM ιμιδαζόλιο. NC: πρωτεΐνη πριν την κοπή με rTEV. C: πρωτεΐνη μετά την κοπή με rTEV. W,1,2,3: πλύσεις 1,2,3. LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Η θέση των πρωτεϊνών HT₆-HrpO και HrpO υποδεικνύεται με πράσινο βέλος. Η θέση της HT₁₀-HrpE υποδεικνύεται με μωβ βέλος. MW HT₆-HrpO: 20.48 kDa, MW HrpO: 17.37 kDa, MW HT₁₀-HrpE: 23.82 kDa, MW HrpE: 21.42 kDa

3.3.4.9 Οι περιπτώσεις των αλληλεπιδράσεων HrpP-HrpE & HrpP-HrcQb.

Βάσει των ενδείξεων αλληλεπίδρασης από τις ηλεκτροφορήσεις σε εγγενή πηκτώματα αγαρόζης για τα ζεύγη HrpP-HrpE & HrpP-HrcQb, αποφασίστηκε η κατασκευή των αντίστοιχων δικιστρονικών πλασμιδίων έκφρασης των ανωτέρω πρωτεϊνών. Έτσι, το γονίδιο της HrpP απομονώθηκε με PCR από το γενωμικό DNA της *P.syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 και εντέθηκε με άκρα *Bsp*HI/*Hind*III στις θέσεις *Nco*I/*Hind*III του πρώτου πολυσυνδέτη (MCS1) του φορέα pPROPET. Το πλασμίδιο που προέκυψε αποτέλεσε στη συνέχεια δέκτη για τα γονίδια *hrpE* ή *hrcQb*, τα οποία απομονώθηκαν με διπλή πέψη *Nde*I/*Bam*HI από τα αντίστοιχα πλασμίδια έκφρασης στο φορέα pET16b και εντέθηκαν στις ομώνυμες θέσεις του δεύτερου πολυσυνδέτη του φορέα pPROPET. Τα πλασμίδια αυτά στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε κύτταρα έκφρασης *E.coli* BL21(DE3) και πραγματοποιήθηκε επαγωγή των πρωτεϊνών από καλλιέργεια 100 ml για κάθε πλασμίδιο. Κι ενώ η καλλιέργεια του πλασμιδίου pPROPET/HrpP/HrcQb αυξήθηκε κανονικά και υπεβλήθη σε επαγωγή, η καλλιέργεια του pPROPET/HrpP/HrpE έμεινε στάσιμη και δεν ήταν εφικτή η συνέχιση του πειράματος. Τα κύτταρα επαγωγής της καλλιέργειας pPROPET/HrpP/HrcQb υπεβλήθησαν κατόπιν σε τυπικό καθαρισμό με χρήση διαλύματος λύσης με χρήση 20 ml διαλύματος λύσης σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 5 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.5% Triton X-100 και χρήση 0.5 ml υλικού Ni-NTA agarose. Από τη διαδικασία δεν απομονώθηκε σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών παρά μόνο η πρωτεΐνη φέρουσα την ετικέτα ιστιδινών, HT₆-HrpP (Εικ. 3.22).



Εικ. 3.22. Αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης του σχήματος καθαρισμού από το πλασμίδιο pPROPET/HrpP/HrcQb. Στις εκλούσεις απομονώθηκε μόνο η πρωτεΐνη φέρουσα την ετικέτα ιστιδινών HT₆-HrpP ενώ η HrcQb εντοπίζεται στο κλάσμα έκπλυσης της στήλης (FT). Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται η θέση της HT₆-HrpP, με λευκό της HrcQb. NI: μη επαγμένο δείγμα καλλιέργειας, I: επαγμένο δείγμα καλλιέργειας, SN: υπερκείμενο λύσης, P: αδιάλυτο κλάσμα, FT: κλάσμα έκπλυσης, W1: πρώτο κλάσμα πλύσης, W2: δεύτερο κλάσμα πλύσης, W3: τρίτο κλάσμα πλύσης, E1: πρώτη έκλουση, E2: δεύτερη έκλουση, E3: τρίτη έκλουση. LMW: ο πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. MW HT₆-HrpP: 23.75 kDa, MW HrcQb: 14.06 kDa

3.4 Συζήτηση

Ο δικιστρονικός φορέας έκφρασης pPROPET λειτουργεί ικανοποιητικά.

Ο δικιστρονικός φορέας έκφρασης pPROPET που κατασκευάστηκε στην παρούσα εργασία έτσι όπως σχεδιάστηκε και χρησιμοποιήθηκε, λειτούργησε ικανοποιητικά για την συνέκφραση πρωτεϊνών και την απομόνωση συμπλόκων πρωτεϊνών για τις οποίες είτε είχαν ήδη καταγραφεί στη βιβλιογραφία αλληλεπιδράσεις με τη χρήση του συστήματος δυο υβριδίων στη ζύμη και με άλλες μεθόδους, είτε αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά. Στις τρεις από τις έξι περιπτώσεις (HT₆-HrpG-HrpV, HT₆-HrpG-HrpJ, HT₆-HrpG-HrpV-HrpJ) όπου πρώτο εκφραζόμενο γονίδιο ήταν η HrpG παρουσιάστηκε το φαινόμενο της άνισης υπερέκφρασής της σε σχέση με το δεύτερο ή/και το τρίτο γονίδιο. Στην περίπτωση του τρικιστρονίου pPROPET/HrcN/HrpE/HrpO δεν ήταν ορατή η υπερέκφραση του τρίτου γονιδίου και δεν μπόρεσε να γίνει εντοπισμός της πρωτεΐνης σε κάποιο από τα κλάσματα καθαρισμού. Η κασέτα έκφρασης της HrpO όμως όπως δομήθηκε εντός του τρικιστρονίου ήταν λειτουργική καθώς όταν μεταφέρθηκε από το τρικιστρονικό πλασμίδιο σαν κασέτα HrpE-HrpO και υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pET16b, η πρωτεΐνη HrpO εκφράστηκε επαρκώς και συνεκλούσθηκε σε περιορισμένο βαθμό μαζί με την HT₆-HrpE. Ίσως το τρίτο γονίδιο να μην μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να εκφραστεί ικανοποιητικά, αν και δε συνέβη το ίδιο για το τρικιστρονίο HT₆-HrpG-HrpV-HrpJ όπου η τελευταία εκφράστηκε επαρκώς. Πιθανή εξήγηση είναι ο σχηματισμός απαγορευτικών δευτεροταγών δομών σε κάποια μόρια mRNA που αποκρύπτουν το *rbs* του τρίτου γονιδίου των συντηγμάτων και δεν του επιτρέπουν να αλληλεπιδράσει με το ριβόσωμα.

Σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις συνέκφρασης ζευγών πρωτεϊνών που παρουσιάστηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν εφικτή η απομόνωση των εξεταζόμενων συμπλόκων πρωτεϊνών με εξαίρεση τα ζεύγη HT₆-HrpO-HrpE και HT₆-HrpP-HrcQb. Στην περίπτωση του ζεύγους HT₆-HrpP-HrpE, η παρουσία και μόνο του δικιστρονικού πλασμιδίου χωρίς επαγωγή της έκφρασης του ενθέματος με IPTG ήταν παρεμποδιστική για την ανάπτυξη της καλλιέργειας πάνω από τα αρχικά επίπεδα οπτικής πυκνότητας. Αυτό πιθανόν συνέβη λόγω της διαρροής έκφρασης κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας πριν την επαγωγή, η οποία άσκησε παρεμποδιστική επίδραση στα κύτταρα.

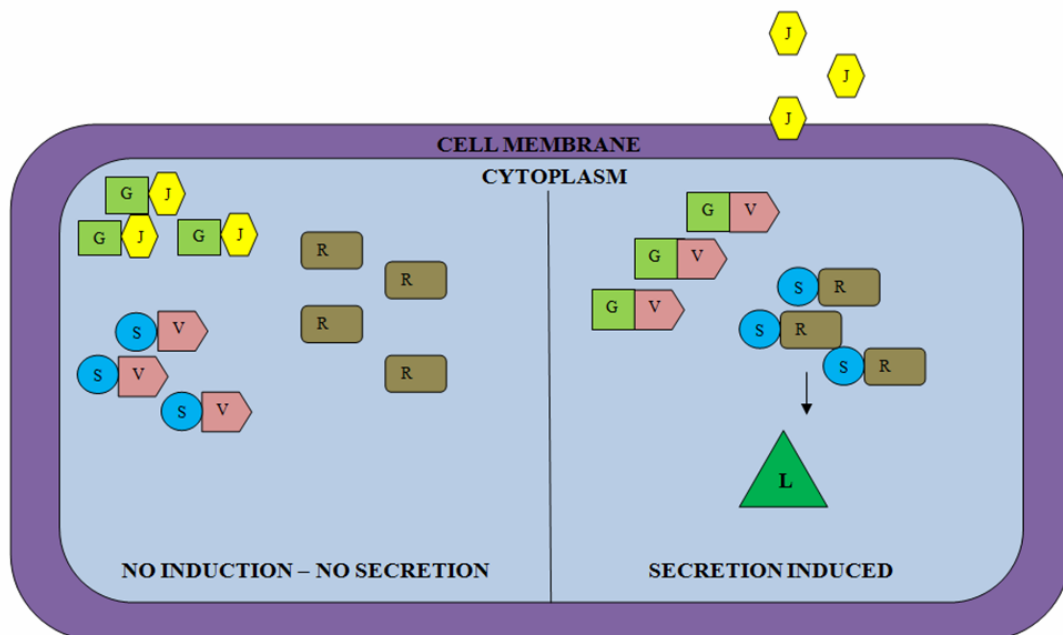
Τα σύμπλοκα HrpG-HrpV, HrpG-HrpJ απομονώνονται in vitro και οι τρεις πρωτεΐνες μπορούν να συνυπάρξουν σε τριπλό σύμπλοκο.

Με δυο ανεξάρτητες μεθοδολογίες, την αναδίπλωση συμπλόκου ξεχωριστά εκφραζόμενων πρωτεϊνών επί στήλης συγγένειας και τη συνέκφραση από δικιστρονικό φορέα έκφρασης, κατεδείχθη ο σχηματισμός ενός συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών HrpG και HrpJ. Η HrpJ, όταν εκφράζεται μόνη της είναι αδιάλυτη και μόνο με συνέκφραση της HrpG παραμένει σε διαλυτή κατάσταση, φαινόμενο που παρατηρείται και στο ομόλογο σύμπλοκο πρωτεϊνών YopN-SycN-YscB (Schubot & Waugh, 2004)

Το σύμπλοκο HrpG-HrpV απομονώθηκε επιτυχώς μετά από συνέκφραση από το πλασμίδιο pPROEX/HrpG/HrpV αλλά η ποσότητα της πρωτεΐνης HT₆-HrpG ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της HrpV. Το σύμπλοκο αυτό υποβλήθηκε για ανάλυση σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες αλλά έδωσε το ίδιο σχήμα με το σχήμα της HrpG, έτσι όπως αυτό περιγράφεται στη διδακτορική διατριβή της Γαζή

Α.Δ 2007. Αντιθέτως, όταν τα γονίδια εκφράστηκαν ως δικιστρόνιο από τον φορέα pET26b, με την πρωτεΐνη HrpV να φέρει την ετικέτα ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο, η ποσότητα της HrpV ήταν διπλάσια από την ποσότητα της HrpG στο εκλουόμενο σύμπλοκο, του οποίου οι υπολογισμένες παράμετροι και το *ab initio* σχήμα από την ανάλυση SAXS παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη HrpV όταν εκφράζεται μόνη της χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά φτωχή διαλυτότητα. Η συνέκφραση των τριών πρωτεϊνών από το τρικιστρονικό πλασμίδιο pPROPET/HrpG/HrpV/HrpJ κατέληξε στην απομόνωση του τριπλού συμπλόκου. Η έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών HrpV και HrpJ στα πειράματά μας, εάν δεν οφείλεται σε κάποιους άδηλους τεχνικούς λόγους, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένδειξη της ύπαρξης δύο επί μέρους αλληλεπιδράσεων στο σύμπλοκο HT₆-HrpG-HrpV-HrpJ: μια μεταξύ των πρωτεϊνών HT₆-HrpG-HrpV και μια άλλη μεταξύ των HT₆-HrpG-HrpJ. Φαίνεται όμως ότι οι πρωτεΐνες HrpV & HrpJ προσδένονται σε αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις επί του μορίου HrpG, καθώς μόνο σε περίπτωση υπεραντιπροσώπευσης της HrpG στο μίγμα είναι δυνατή η απομόνωση του τριπλού συμπλόκου. Όταν για παράδειγμα συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες HT₆-HrpV, HrpG και HrpJ (από τα συμβατά πλασμίδια pET26b/HrpG/HrpV & pAR3/HrpJ), επειδή η ποσότητα της HrpG είναι μειωμένη, η HrpJ εντοπίζεται αδιάλυτη στο μεμβρανικό κλάσμα και δεν συγκαθαρίζεται με τις άλλες δυο πρωτεΐνες (δεν παρουσιάζονται τα δεδομένα).

Το μοντέλο που προτείνεται λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω απεικονίζεται διαγραμματικά στην εικόνα 3.23. Καθώς η HrpJ έχει φανεί ότι λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του συστήματος, η αλληλεπίδραση της με την HrpG πιθανόν τη διατηρεί σε κατάσταση ικανή έκκρισης πριν την ενεργοποίηση του εκκριτικού συστήματος. Όταν η έκκριση ενεργοποιηθεί, η HrpJ απομακρύνεται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα, αυξάνουν τα επίπεδα ελεύθερης HrpG η οποία πλέον μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη HrpV (αρνητικό ρυθμιστή και ανταγωνιστή της HrpJ στην πρόσδεση επί της HrpG) αποκαταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων του T3SS. Η υπόθεση αυτή είναι αρκετά ενδιαφέρουσα και μένει να ελεγχθεί με λειτουργικές αναλύσεις.



Εικ. 3.23. Το προτεινόμενο μοντέλο ρύθμισης σε συνθήκες μη επαγωγής της έκκρισης (αριστερά) και σε συνθήκες επαγωγής (δεξιά).

Η πρωτεΐνη HrpG^{C14} σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με το καρβοξυτελικό άκρο της HrcU αλλά ασταθές, πιθανόν παροδικό σύμπλοκο με την πρωτεΐνη HrpO.

Η πρωτεΐνη HrpG^{C14} συνεκλούσθηκε ως σύμπλοκο με το καρβοξυτελικό διαλυτό άκρο της μεμβρανικής συντηρημένης πρωτεΐνης HrcU (HrcUc) όπως επίσης και με την πρωτεΐνη HrpO. Το πρώτο σύμπλοκο (HrpG^{C14}- HrcUc) παρέμεινε σταθερό σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και αναγωγικού περιβάλλοντος και διατηρήθηκε έστω και με χαμηλότερη ποσοτική απόδοση στις συνεκλούσεις. Στη δεύτερη περίπτωση (HrpG^{C14}- HrpO) το σύμπλοκο αποδείχθηκε ασταθές σε συνθήκες σχετικά υψηλής αλατότητας και μόνο μια μικρή ποσότητα της HrpO παρέμεινε προσδεσμένη με τη HrpG όταν η συγκέντρωση του NaCl αυξήθηκε από τα 50 στα 150 mM. Υποθέσεις για τη φυσιολογική σημασία αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι σε μεγάλο βαθμό επισφαλείς καθώς ο ρόλος των τριών πρωτεϊνών παραμένει άγνωστος. Αν υποθεθεί όμως ότι η HrpG είναι σαπερόνη του T3SS, με υπόστρωμα την HrpJ ή κάποια άλλη πρωτεΐνη, τότε μια αλληλεπίδραση με το κυτταροπλασματικό τμήμα της μηχανής έκκρισης (πχ. την καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrcU) που γειτνιάζει με το C-δακτύλιο θα ήταν λογική, καθώς με την ενεργοποίηση της έκκρισης το σύμπλοκο σαπερόνης-υποστρώματος έκκρισης θα πρέπει να αγκυροβολήσει στο C-δακτύλιο και την ATPάση. Επίσης, ο σχηματισμός παροδικού συμπλόκου της σαπερόνης με την HrpO, πρωτεΐνη της οικογένειας της μαστιγιακής FliJ είναι συνεπής με την παρατήρηση ότι η FliJ συνοδεύει ορφανές σαπερόνες που μόλις έχουν αποδεσμεύσει το υπόστρωμα έκκρισης, σχηματίζοντας μαζί τους παροδικά σύμπλοκα και εν συνεχεία τις παραδίδει στο επόμενο μόριο υποστρώματος (Evans et al., 2006).

Η ATPάση του T3SS της P.syringae HrcN απομονώνεται μαζί με τον πιθανό αρνητικό ρυθμιστή της HrpE αλλά μόνο σε ακραίες αλκαλικές συνθήκες.

Οι προσπάθειες απομόνωσης του συμπλόκου HrcN-HrpE στο pH 8 που τυπικά χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τους καθαρισμούς μοναδιαίων πρωτεϊνών και συμπλόκων τους οδήγησαν στην απομόνωση μόνο της HT₆-HrcN ενώ η HrpE εντοπίστηκε στο αδιάλυτο κλάσμα, παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες λύσης ήταν ιδανικές για τη διαλυτοποίηση της τελευταίας. Η δοκιμή ενός εύρους τιμών pH οδήγησε στην επιλογή της τιμής pH 11 επειδή μόνο σε αυτές τις συνθήκες φάνηκε να επανέρχεται στη διαλυτή κατάσταση η HrpE μαζί με την HrcN. Οι ακόλουθες προσπάθειες συγκαθαρισμού τους σε αυτό το pH απέτυχαν καθώς καμιά από τις δυο πρωτεΐνες δεν μπόρεσε να προσδεθεί στη στήλη συγγένειας και καθώς αποκλείστηκε το ενδεχόμενο το υλικό χρωματογραφίας να μην ανέχεται το ακραία αλκαλικό pH. Ένας πιθανός λόγος είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ τους να αποκρύπτει την ετικέτα ιστιδινών που φέρει η HrcN στο αμινοτελικό της άκρο. Τελικά οι δυο πρωτεΐνες καθαρίστηκαν με χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής και η υποβολή τους σε μοριακή διήθηση (βλέπε παράγραφο 4.3.1.5) οδήγησε στο διαχωρισμό δυο επιμέρους φυσικών πληθυσμών διαφορετικού μοριακού βάρους και διαφορετικής στοιχειομετρίας στο pH 11.

Το αποδεδειγμένο σύμπλοκο των πρωτεϊνών HrpE-HrpO δεν μπορεί να απομονωθεί in vitro με την μέθοδο του συγκαθαρισμού.

Αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HrpE και HrpO της *P.syringae* pv. phaseolicola έχει καταδειχθεί σε πειράματα δυο υβριδίων της ζύμης (Gazi et al., 2008). Στα πλαίσια αυτής τη διατριβής επιχειρήθηκε η απομόνωση του συμπλόκου τους *in vitro* μετά από συνέκφραση των εν λόγω πρωτεϊνών. Παρά τα ικανοποιητικά επίπεδα παραγωγής και των δυο πρωτεϊνών, δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί το σύμπλοκο με συνέκφραση τους στη μορφή HT₆-HrpO+HrpE, ενώ στη μορφή HT₁₀-HrpE+HrpO, ανιχνεύτηκε μια μικρή ποσότητα της HrpO μαζί με την HT₁₀-HrpE στις εκλούσεις. Ίσως το σύμπλοκο αυτό να είναι παροδικό και να μην μπορεί να ανταπεξέλθει στις συνθήκες της *in vitro* απομόνωσης.

Οι ενδείξεις αλληλεπίδρασης από πειράματα εγγενούς ηλεκτροφόρησης ίσως δεν είναι πάντα αξιόπιστες.

Το σύμπλοκο HrpP-HrcQb που είχε φανεί ότι πιθανόν σχηματίζεται μετά από συνεπώαση και εγγενή ηλεκτροφόρηση του μίγματος δεν μπόρεσε να απομονωθεί με την προσέγγιση της συνέκφρασης από δικιστρονικό πλασμίδιο παρά την ικανοποιητική και ισόποση παραγωγή και των δυο πρωτεϊνών. Πιθανές ερμηνείες είναι ι) να μην πρόκειται για πραγματικό ζεύγος αλληλεπιδρώντων μορίων ή ιι) το σύμπλοκο να είναι παροδικό και επομένως ασταθές στις συνθήκες του συγκαθαρισμού από τη στήλη συγγένειας.

Βιβλιογραφία

- Alfano J.R. & Collmer A. 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J Bacteriol.* 179(18), 5655-5662.
- Bernal R.A. & Stock D. 2004. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure* 12, 1789-1798.
- Buchanan S.K. & Walker J.E. 1996. Large-scale chromatographic purification of F₁F₀-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 318, 343-349.
- Buttner D. & Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 193-200
- Cheng L.W., Kay O. & Schneewind O. 2001. Regulated secretion of YopN by the type III machinery of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 183(18), 5293-5301
- Day J.B. & Plano G.V. 1998. A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol* 30(4), 777-788
- Deng W.-L., Preston G., Collmer A., Chang C.-J. & Huang H.-C. 1998. Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars

- syringae, tomato and glycinea and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT* and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. J Bacteriol. 180(17), 4523-4531.
- Fraser G.M., Gonzalez-Pedrayo B., Tame J.R.H. & Macnab R. Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. J Bacteriol. 185(18), 5546-5554
- Fu Z.Q., Guo M. & Alfano J.R. 2006. *Pseudomonas syringae* HrpJ is a type III secreted protein that is required for plant pathogenesis, injection of effectors and secretion of the HrpZ1 harpin. J. Bacteriol. 188(17), 6060-6069
- Gazi A.D., Bastaki M., Charova S.N., Gkoukoulia E.A., Kapelios E.A., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2008. Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. JBC 283(49), 34062-34068.
- Gold L. & Stormo G.D. 2000. High-level translation initiation. Meth. Enzymol. 185, 89-93.
- Hueck C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379-433.
- Hutcheson S.W., Bretz J., Sussan T., Jin S. & Pak K. 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. J. Bacteriol. 183(19), 5589-5598
- Jackson M.W., Day J.B. & Plano G.V. YEAR ?? YscB of *Yersinia pestis* functions as a specific chaperone for YopN. J. Bacteriol. 180(18), 4912-4921.
- Kim R., Yokota H. & Kim S-H. 2000. Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. Anal. Biochem. 282, 147-149.
- Laursen B.S., Sorensen H.P., Mortensen K.K. & Sperling-Petersen H.U. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69(1), 101-123.
- Minamino T. & Macnab R.M. 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. Mol. Microbiol. 37(6), 1494-1503.
- Morello J.E. & Collmer A. 2009. *Pseudomonas syringae* HrpP Is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate-switching protein. J. Bacteriol. 191(9), 3120-31.
- Perez J.P. and Gutierrez J. 1995. An arabinose-inducible expression vector, pAR3, compatible with ColE1-derived plasmids. Gene 158, 141-142.
- Pozidis C. Chalkiadaki A., Gomez-Serrano a., Stahlberg H., Brown I et al. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. J. Biol. Chem. 278, 25816-25824.

Preston G., Deng W.-L., Huang H.-C. & Collmer A. 1998. Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. J. Bacteriol. 180(17), 4532-4537.

Ramos A.R., Morello J.E., Ravindran S. Deng W.-L., Huang H.-C. & Collmer A. 2007. Identification of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. J. Bacteriol. 189(15), 5773-5778.

Ringquist S., Shinedling S., Barrick D., Green L., Binkley J., Stormo G.D. & Gold L. 1992. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. Mol. Microbiol. 6(9), 1219-1229.

Roy S., Purnapatre K., Handa P., Boyanapalli M. & Varshney U. 1998. Use of coupled transcriptional system for consistent overexpression and purification of UDG-Ugi complex and Ugi from *Escherichia coli*. Prot. Expr. Purif. 13, 155-162.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sathasivan K. 2001. Minipreparation of plasmid DNA. Molecular Biology Protocols, protocol 5, 1-5.

Schubot F.D. & Waugh D.S. 2004. A pivotal role for reductive methylation in the *de novo* crystallization of a ternary complex composed of *Yersinia pestis* virulence factors YopN, SycN and YscB. Acta Cryst. D60, 1981-1986.

Schubot F.D., Jackson M.W., Penrose K.J., Cherry S., Tropea J.E., Plano G.V. & Waugh, D.S. 2005. Three-dimensional structure of a macromolecular assembly that regulates type III secretion in *Yersinia pestis*. J. Mol. Biol. 346, 1147-1161.

Tang X., Xiao Y. & Zhou J.-M. 2006. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 19(11), 1159-1166.

Wei C.F., Deng W.L. & Huang H.C. 2005. A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. Mol. Microbiol. 57(2), 520-536.

Xiao Y., Heu S., Yi J., Lu Y. & Hutcheson S.W. 1994. Identification of a putative alternative sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J. Bacteriol. 176(4), 1025-1036.

Γαζή Α.Δ., 2007. Δομικά χαρακτηριστικά υποψηφίων σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III και των συμπλόκων τους. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ταμπακάκη Α. 1999. Μοριακή και βιοχημική μελέτη πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και διερεύνηση του ρόλου τους στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Χαρόβα Σ.Ν., 2004. Καθαρισμός και μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών που δομούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III σε παθογόνα βακτήρια. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Κεφάλαιο 4

Φυσικοχημική ανάλυση επιλεγμένων
διαλυτών πρωτεϊνών του εκκριτικού
συστήματος τύπου III του
φυτοπαθογόνου *Pseudomonas*
syringae pv. *phaseolicola*.

4.1 Εισαγωγή

4.1.2 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες HrpZ, HrpP, HrpB από το φυτοπαθογόνο *P. syringae* pv. *phaseolicola*

4.1.2.1 Η πρωτεΐνη HrpZ

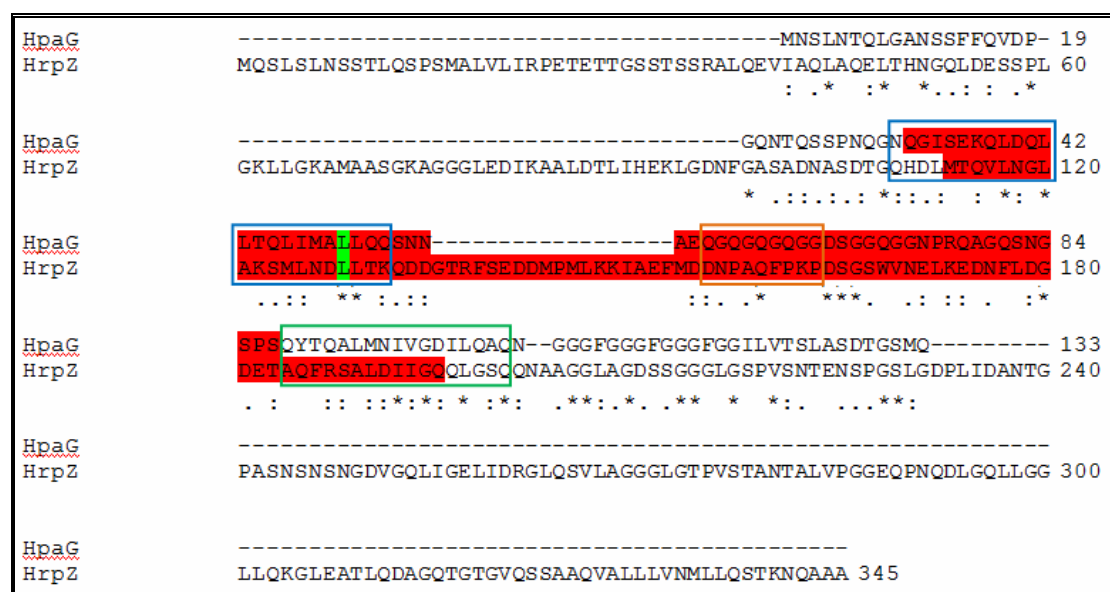
Η πρωτεΐνη HrpZ από την *Pseudomonas syringae* είναι ένα θερμοσταθερό πλούσιο σε κατάλοιπα γλυκίνης μόριο και ανήκει στην κατηγορία των χαρπινών. Αυτό σημαίνει ότι όταν εκκριθεί από το T3SS σε φυτά μη-ξενιστές, εντοπίζεται αποπλαστικά όπου πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) μέσω αλληλεπίδρασης με έναν εξωκυττάριο υποδοχέα (He *et al.* 1993, Tampakaki & Panopoulos 2000). Η αλληλεπίδραση πέραν της HR οδηγεί σε συσσώρευση μεταγράφων πρωτεϊνών PR- (pathogenesis related-) και σε συστηματικά αποκτώμενη ανθεκτικότητα (SAR, systemic acquired resistance) (Lee *et al.*, 2001b). Η πρωτεΐνη έχει φανεί ότι αλληλεπιδρά με τις διλιπιδικές μεμβράνες του ευκαρυώτη όπου μπορεί και διανοίγει πόρους μεταφοράς ιόντων (Lee *et al.*, 2001a). Στην πλασματική μεμβράνη του καπνού έχει εντοπιστεί μια ειδική για την HrpZ θέση πρόσδεσης, μέσω της οποίας πιθανόν γίνεται η επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης PR HIN1 και μάλιστα με την εμπλοκή του μονοπατιού σηματοδότησης των κινασών MAPK (Lee *et al.* 2001b). Η πρωτεΐνη παράγεται από όλα σχεδόν τα στελέχη της *P. syringae* και αυτό υποδεικνύει το σπουδαίο λειτουργικό της ρόλο. Πιθανόν οι πόροι που διανοίγει να χρησιμεύουν στη ροή θρεπτικών προς το φυτοπαθογόνο βακτήριο ή στη μεταφορά μολυσματικών παραγόντων τελεστών (effectors) εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου (Lee *et al.*, 2001a).

Σπουδαία στοιχεία όσον αφορά τη φυσικοχημική λειτουργική μορφή των χαρπινών προέκυψαν πρόσφατα από τη μελέτη της χαρπίνης HraG του φυτοπαθογόνου *Xanthomonas* από την ομάδα του Oh (2007). Η HraG είναι μια μικρή πρωτεΐνη (15.4 kDa) [σχεδόν η μισή από την HrpZ που έχει θεωρητικό μοριακό βάρος ίσο με 35.2 kDa] η οποία προβλέπεται να έχει τρία αναγνωρίσιμα μοτίβα επί της πρωτοταγούς αλληλουχίας της. Το πρώτο εκτείνεται αμινοτελικά στα κατάλοιπα 35-53, η δευτεροταγής δομή του είναι α-ελικοειδής και είναι απαραίτητο για τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης και την πυροδότηση της HR. Είναι πλούσιο σε κατάλοιπα λευκίνης τα οποία όταν υποκατασταθούν το καθένα ξεχωριστά οδηγούν σε μειωμένη HR. Ιδιαίτερη σημασία αποδίδεται στο κατάλοιπο λευκίνης στη θέση 50 που παρουσιάζεται συντηρημένο μεταξύ των ενεργών χαρπινών χωρίς το οποίο δεν πυροδοτείται καθόλου HR. Το τρίτο μοτίβο εκτείνεται καρβοξυτελικά και φαίνεται να τροποποιεί την ικανότητα πολυμερισμού του πρώτου μοτίβου, ίσως μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης μαζί του και δεν φαίνεται να έχει κάποιου είδους δευτεροταγή δομή (Oh *et al.*, 2007). Το δεύτερο μοτίβο αποτελείται από επαναλήψεις καταλοίπων γλουταμίνης και γλυκίνης (QGQGQGQG) στις θέσεις 59-67 και φαίνεται να αποτελεί ευκίνητο αρμό μεταξύ των μοτίβων 1 και 3 (Kim *et al.*, 2004).

Το πρώτο μοτίβο φαίνεται να υπάρχει και στην πρωτεΐνη HrpZ, καθώς από την στοίχισή της με την HraG έχει φανεί ότι τα 15 από τα 23 κατάλοιπά του είναι συντηρημένα, ή συντηρημένες αντικαταστάσεις. Και οι δυο πρωτεΐνες στο μοτίβο αυτό φέρουν έξι κατάλοιπα λευκίνης από τα οποία τα 4 είναι συντηρημένα. Ανάμεσα στα συντηρημένα κατάλοιπα λευκίνης είναι και το κατάλοιπο της θέσης 50 της HraG. Τέλος και για τις δυο πρωτεΐνες η περιοχή αυτή προβλέπεται να είναι α-ελικοειδής

και διαταραγμένη (disordered, αλγόριθμος FoldIndex, βλέπε παράρτημα 3). Το δεύτερο ευκίνητο μοτίβο-αρμός της HpaG δεν φαίνεται να είναι συντηρημένο στην HrpZ, σε αντίθεση με το τρίτο μοτίβο, στο οποίο τα 11 από τα 17 κατάλοιπα της HpaG εμφανίζονται συντηρημένα ή συντηρημένες αντικαταστάσεις στη HrpZ (Εικ. 4.1).

Η πρωτεΐνη HpaG υφίσταται ως τετραμερές με δακτυλιοειδή σφαιρική μορφή σε φρέσκα παρασκευάσματά της, η οποία είναι βιολογικά ενεργή, δηλαδή προκαλεί HR σε φυτά μη ξενιστές. Η εικόνα μεταβάλλεται όταν η καθαρισμένη πρωτεΐνη επωαστεί παρουσία 10 mM NaCl για 8 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου όπου σχηματίζει αμυλοειδείς σχηματισμούς, δηλαδή νηματοειδείς καμπυλόγραμμες δομές, για να φτάσει σε ώριμα νημάτια σε 10 ημέρες επώασης όπου το δείγμα αποκτά τη μορφή καθαρής ζελατίνης. Σε δείγματα πρωτεΐνης επωασμένα σε ελάχιστο μέσο επαγωγής του φυτικού εκκριτικού συστήματος τύπου III η διαδικασία επιταχύνθηκε δραματικά, με τα ώριμα νημάτια να εμφανίζονται στις τρεις ημέρες επώασης. Δείγματα πρωτεΐνης τέλος διαλυμένα σε αποπλαστικό υγρό παρουσίασαν το σχηματισμό αδιάλυτων σωματιδίων μέσα σε μια ημέρα επώασης. Όσον αφορά την μετάφραση του φαινομένου στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης, φρέσκα καθαρισμένα δείγματα της πρωτεΐνης εμφάνισαν καθαρή δευτεροταγή δομή α-ελικοειδούς πρωτεΐνης, ενώ μετά από τρεις ημέρες επώασης σε θερμοκρασία δωματίου η εικόνα αντιστράφηκε και τα δείγματα έδωσαν το χαρακτηριστικό ελάχιστο της β-πτυχής (220 nm). Παρόμοια συμπεριφορά σχηματισμού πρωτονηματίων σε συνθήκες που μιμούνται το αποπλαστικό περιβάλλον έδωσαν και δείγματα απομονωμένης πρωτεΐνης HrpZ (Oh *et al.*, 2007).



Εικ. 4.1. Στοίχιση των αλληλουχιών HpaG της *X. axonopodis* pv. *glycines* (AAP34334) και HrpZ της *P. syringae* pv. *phaseolicola* Psp3121 (AAS20457). Το μοτίβο 1 είναι στο μπλε πλαίσιο, το μοτίβο 2 στο πορτοκαλί και το μοτίβο 3 στο πράσινο. Με ‘*’ σημειώνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα, με ‘·’ οι συντηρημένες αντικαταστάσεις και με ‘.’ οι ημισυντηρημένες αντικαταστάσεις. Με κόκκινη σκίαση σημειώνονται οι διαταραγμένες περιοχές επί της αλληλουχίας των δυο μορίων, βάσει της πρόβλεψης από το FoldIndex. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW2.

4.1.2.2 Η πρωτεΐνη HrpP

Η HrpP είναι μια πρωτεΐνη της *P. syringae* η οποία εκκρίνεται και μεταφέρεται εντός των φυτικών κυττάρων μέσω του T3SS, η λειτουργία της όμως εντός του ευκαρυώτη παραμένει άγνωστη. Η αφαίρεση του γονιδίου της HrpP από το στέλεχος *P. syringae* syringae 61 κατέστειλε πλήρως την επαγωγή της HR σε φυτά *N. tabacum* αλλά επέδειξε μικρή μείωση της HR σε φυτά *N. benthamiana*, κάτι που σημαίνει ότι δεν είναι πλήρως απαραίτητη για την πυροδότηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (Ramos *et al.*, 2007). Η έκφραση *in trans* της πρωτεΐνης HrpP από άλλα στελέχη της *P. syringae* σε μετάλλαγμα *hrpP* της *P. syringae* pv. tomato DC3000 αποκατέστησε την ικανότητα επαγωγής της HR του παθογόνου. Αυτό είναι αξιοσημείωτο καθώς η πρωτεΐνη HrpP ποικίλει στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας από στέλεχος σε στέλεχος. Επίσης, η σύντηξή της με το μόριο της GFP παρεμπόδισε την μεταφορά της μέσα στο φυτικό κύτταρο αλλά δεν εμπόδισε την αποκαταστολή της HR, γεγονός που υποδεικνύει πως για τη δράση της HrpP δεν είναι απαραίτητη η μεταφορά της εντός του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η αφαίρεση των είκοσι καρβοξυτελικών καταλοίπων της πρωτεΐνης οδήγησε σε αποτυχία αποκαταστολής της HR (Morello *et al.*, 2009).

Η πρωτεΐνη HrpP κατατάσσεται βάσει ομοιότητας με τις πρωτεΐνες YscP, InvJ, και SpaN. Οι πρωτεΐνες αυτές από τις οποίες περισσότερο μελετημένη είναι η YscP, αποτελούν το διακόπτη αλλαγής ειδικεύσης υποστρώματος (βλέπε παράγραφο 1.1.6), με την επικράτεια υπεύθυνη για τη λειτουργία αυτή εντοπισμένη στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (επικράτεια 'T3S4'). Η επικράτεια αυτή υπάρχει και στο μόριο της HrpP παρά το γεγονός ότι τόσο η τελευταία όσο και οι ανάλογές της σε άλλα φυτοπαθογόνα είναι αρκετά μικρότερα μόρια σε σχέση με τη YscP (Ramos *et al.*, 2007).

4.1.2.3 Η πρωτεΐνη HrpB

Για την πρωτεΐνη HrpB λίγα είναι γνωστά. Πρόκειται για μια μικρή, διαλυτή πρωτεΐνη του T3SS της *P. syringae* η οποία αρχικά θεωρήθηκε όμοια των πρωτεϊνών YscI από τη *Yersinia* και PrgJ από τη *Salmonella* (Hueck 1998). Η πρωτεΐνη PrgJ όμως φάνηκε ότι αποτελεί δομικό στοιχείο της εσωτερικής ράβδου του βασικού σωματίου του συστήματος (Marlovits *et al.*, 2004, βλέπε παράγραφο 1.1.2) ενώ η πρωτεΐνη HrpB φάνηκε πρόσφατα ότι αποτελεί υπόστρωμα έκκρισης του συστήματος και μάλιστα μεταφέρεται εντός του φυτικού κυττάρου όπου όμως η λειτουργία της παραμένει άγνωστη. Μεταλλάγματα για την πρωτεΐνη HrpB στο παθογόνο *P. syringae* syringae 61 εμπόδισαν πλήρως την ικανότητά του να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας τόσο σε φυτά *N. tabacum* όσο και σε *N. benthamiana* (Ramos *et al.*, 2007).

4.1.3 Η επίδραση του ακραίου αλκαλικού pH στις ιδιότητες των πρωτεϊνών *in vitro*

4.1.3.1 Γενικές αρχές

Η τιμή του pH επηρεάζει τη σταθερότητα μιας πρωτεΐνης. Θεωρείται ότι οι υψηλές απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται από το μεγάλο αριθμό φορτίων σε τιμές $\text{pH} > 11.5$ (σε αλκαλικό pH πραγματοποιείται ο ιονισμός/αποπρωτονίωση των καταλοίπων των οποίων η τιμή pK κυμαίνεται από 10 και πάνω πχ. τυροσίνη, λυσίνη, αργινίνη) οδηγούν στην αποσταθεροποίηση της πρωτεΐνης και εν τέλει στην αποδιάταξή της (Ozog & Bechet 1995, Strucksberg *et al.*, 2007, Palmer *et al.*, 2008).

Η ακριβής συμπεριφορά μιας πρωτεΐνης σε υψηλό pH είναι ένα σύνθετο αποτέλεσμα ποικίλων δυνάμεων. Αρκετές πρωτεΐνες φτάνουν να χάσουν τη δευτεροταγή δομή τους σε τιμές pH άνω του 11 αν και η ενζυμική τους ενεργότητα συνήθως χάνεται σε χαμηλότερες τιμές pH. Σε pH άνω του 11 σε πολλές περιπτώσεις τα φυσικά απαντώμενα ολιγομερή μιας πρωτεΐνης διασπώνται σε μονομερή (Prajapati *et al.*, 1998). Σε άλλες περιπτώσεις πάλι σε υψηλά pH δεν επηρεάζεται ο ολιγομερισμός της πρωτεΐνης αλλά μάλλον η σταθερότητα του ολιγομερούς (Mohan & Hosur 2008). Με την αύξηση του pH έχει φανεί η συσσώρευση ενδιάμεσων μορφών κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν από την ολοκληρωτική αποδιάταξή τους, με τις μορφές αυτές να οφείλονται στις σταδιακές αποπρωτονιώσεις (Weinkam *et al.*, 2008). Οι μορφές αυτές συχνά είναι πιο ευαίσθητες στη θερμική αποδιάταξη σε σχέση με τη φυσική μορφή της πρωτεΐνης (Naseem & Khan 2008).

4.1.3.2 Η επίδραση του αλκαλικού pH σε μια πρωτεΐνη σπειρωμένου σπειράματος

Μέσα σε μια διαμόρφωση σπειρωμένου σπειράματος, φορτισμένα κατάλοιπα υπάρχουν κυρίως στις εσωτερικές θέσεις e, g (και αντίστοιχα e', g') όπως επίσης και στις εξωτερικές θέσεις του σπειράματος b, c, f (όπως και b', c', f'). Έτσι, μπορούν να σχηματιστούν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ α -ελίκων ανάμεσα σε φορτισμένα κατάλοιπα των θέσεων Ig και 2e' και μεταξύ των 2a και 1g'. Επιπλέον, πιθανόν αναπτύσσονται υδρογονικοί δεσμοί ανάμεσα σε κατάλοιπα γλουταμίνης που συχνά απαντώνται στις θέσεις e και g της επτάδας, και αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων. Συμπερασματικά, η σταθεροποίηση ή αποσταθεροποίηση ενός σπειρωμένου σπειράματος στις διάφορες τιμές pH εξαρτάται από το σύνθετο πρότυπο αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται σε κάθε περίπτωση μεταξύ των φορτίων (Ozog & Bechet 1995).

Η μυοσίνη ως τυπικό παράδειγμα πρωτεΐνης σπειρωμένου σπειράματος, λαμβάνει μια αναδίπλωση διπλής σφαιρικής «κεφαλής» συνδεδεμένης ευκίνητα με μια δομή «ουράς» ράβδου. Η ράβδος αποτελείται από δυο α -ελικοειδείς αλυσίδες που τυλίγονται η μία γύρω από την άλλη και δημιουργούν ένα τυπικό αριστερόστροφο σπειρωμένο σπείραμα. Από τρία ανεξάρτητα πειράματα έχει φανεί για την περίπτωση της μυοσίνης ότι η δευτεροταγής αλλά και η τριτοταγής δομή του μορίου δε μεταβάλλεται σημαντικά σε μια κλίμακα τιμών pH 2 - 11 όπως φάνηκε από μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού (Burke *et al.*, 1973, Nakayama *et al.*, 1980, Ozog & Bechet 1995).

4.1.4 Σκοπός των πειραμάτων που παρουσιάζονται σε αυτό το κεφάλαιο

Στο κεφάλαιο αυτό μια σειρά από διαλυτές πρωτεΐνες του T3SS *P. syringae* pv. *phaseolicola* υπεβλήθησαν σε πειράματα μοριακής διήθησης, κυκλικού διχρωισμού και σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες με σκοπό

1. να εξαχθούν συμπεράσματα όσον αφορά το εκλουόμενο μοριακό βάρος τους και άρα να συλλεγεί πληροφορία όσον αφορά την ολιγομερική κατάσταση ή τη διαμόρφωσή τους
2. να συλλεγεί πληροφορία όσον αφορά το περιεχόμενο των πρωτεϊνών αυτών σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής και την ύπαρξη τριτοταγούς διαμόρφωσης στις συνθήκες του πειράματος
3. να μελετηθούν οι παράγοντες σχήματος και διάφορες στερεοχημικές παράμετροι αυτού, όπως επίσης και να παραχθούν τρισδιάστατα μοντέλα σχήματος χαμηλής ανάλυσης από τα δεδομένα σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες.

Οι διαλυτές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν μπορούν να διακριθούν σε δυο κατηγορίες: α) τις κυτταροπλασματικές και β) τα υποστρώματα έκκρισης και μεταφοράς εντός του ευκαρυώτη. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα σύμπλοκα ATPάσης και αρνητικού ρυθμιστή αυτής HrcN-HrpE και των ρυθμιστικών πρωτεϊνών HrpG-HrpV ενώ στη δεύτερη ανήκουν οι HrpP, HrpZ και HrpB. Για όλες τις πρωτεΐνες εκτός του συμπλόκου HrpG - HrpV θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη τους σε δυο τιμές pH, 8 και 11. Στην μεν πρώτη περίπτωση φάνηκε ότι σε pH 11 η συμπεριφορά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που διαμένουν κοντά στην πλασματική μεμβράνη εξομαλύνεται *in vitro*, σε αντίθεση με τιμές $\text{pH} \leq 8$. Ειδικά για το σύμπλοκο HrcN - HrpE, η απομόνωσή του δεν ήταν δυνατή σε οποιαδήποτε άλλη τιμή pH στο εύρος 4 - 11. Η πρωτεΐνη HrpE προβλέπεται να περιέχει επαναλήψεις επτάδας σε υψηλό ποσοστό (51%) και άρα προβλέπεται να περιέχει σε υψηλό ποσοστό σπειρωμένα σπειράματα. Στην παρουσία αυτών σε pH 8 ίσως οφείλεται το γεγονός ότι ήταν αδύνατη η απομόνωση του συμπλόκου της με την HrcN (βλέπε παράγραφο 3.3.4.6). Στη δεύτερη περίπτωση θεωρήθηκε ότι η ήπια αποδιάταξη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε αλκαλικό pH μπορεί να εξομοιώσει τις συνθήκες αποδιάταξης που υφίστανται *in vivo* τα υποστρώματα έκκρισης για να περάσουν από τον αγωγό έκκρισης και έτσι να αποκτηθεί μια εικόνα για την δομή και τις ιδιότητές τους υπό αυτές τις συνθήκες.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Υλικά

Τα υλικά υποκλωνοποίησης και οι χειρισμοί των δειγμάτων DNA και πρωτεϊνών έχουν περιγραφεί στην παράγραφο 3.2.1. Οι φορείς από τους οποίους εκφράστηκαν οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν οι pET16b & pET26b από τη Novagen και ο pPROPET που χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση και καθαρισμό του συμπλόκου HrcN-HrcE (βλέπε παράγραφο 3.3.4.6).

Για τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά: α) Sephacryl S-100 με θεωρητική διαχωριστική ικανότητα 1-100 kDa, β) Sephacryl S-300 με θεωρητική διαχωριστική ικανότητα 10-1000 kDa και γ) Sephacryl S-400 με θεωρητική διαχωριστική ικανότητα 20-8000 kDa. Οι στήλες όπου πακεταρίστηκε το εκάστοτε χρωματογραφικό υλικό ήταν της εταιρίας Pharmacia. Το πακετάρισμα των στηλών πραγματοποιήθηκε από το τεχνικό και ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για την αυτόματη διεκπεραίωση των βημάτων καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα Äkta Purifier της Amersham σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρίας. Οι βαθμονομήσεις των στηλών και οι εξισώσεις που συσχετίζουν τις τιμές K_{av} (βλέπε παράγραφο 2.3.3) των πρωτεϊνών μαρτύρων με το δεκαδικό λογάριθμο του μοριακού τους βάρους όπως και τα διαγράμματα και οι εξισώσεις τους που συσχετίζουν τον όγκο έκλυσης των πρωτεϊνών μαρτύρων με την υδροδυναμική¹⁴ τους ακτίνα παρατίθενται στο Παράρτημα 3. Η απεικόνιση των χρωματογραφημάτων έγινε με χρήση της σουίτας UNICORN 3.00 που συνοδεύει τον εξοπλισμό του Äkta Purifier. Τα δείγματα πρωτεϊνών που υποβλήθηκαν σε μοριακή διήθηση ήταν εκλούσεις πρωτογενούς απομόνωσης με χρωματογραφία συγγένειας (iónτων νικελίου). Η στήλη μοριακής διήθησης πριν τη φόρτωση του δείγματος εξισορροπούνταν με διαλύτη σύστασης 20 mM Tris-Cl pH 8.0 & 50 - 300 mM NaCl για πειράματα σε pH 8.0 ή τυπικά με 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl για πειράματα σε pH 11. Διαφοροποιήσεις από την τυπική σύσταση διαλύτη σημειώνονται σε κάθε περίπτωση όπου συναντώνται.

Η συλλογή δεδομένων σκέδασης σε μικρές γωνίες πραγματοποιήθηκε στην γραμμή ακτινοβολίας X33 του EMBL που στεγάζεται στο δακτύλιο αποθήκευσης DORIS III του σύγχροτου DESY του Αμβούργου, σε δυο ανεξάρτητες επισκέψεις. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο δίσκος ειδώλου MAR345, τοποθετημένος έτσι ώστε το κέντρο της ακτίνας να εντοπίζεται στο πάνω μέρος του δίσκου ειδώλου. Με τον τρόπο αυτό ήταν δυνατή η συλλογή δεδομένων σε μεγάλο εύρος του φορέα σκέδασης s σε μια απόσταση px για τιμές του s από 0.08 nm^{-1} έως 5 nm^{-1} σε μια απόσταση δείγματος/ανιχνευτή περίπου 3 μέτρων (Roessle M.W. *et al.*, 2006). Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ήταν $\lambda = 1.5 \text{ \AA}$. Μεταξύ διαδοχικών ενέσεων του δακτυλίου αποθήκευσης ακτινοβολίας παρεμβάλλεται χρόνος περίπου 8 ωρών, όπου η ένταση της ακτινοβολίας στην αρχή του διαστήματος αυτού κυμαίνεται στα 140 mA και στο τέλος στα 100 mA. Η θερμότητα που διαχέεται στα οπτικά στοιχεία λόγω των αλλαγών στην ένταση του ρεύματος αντιμετωπίστηκε με

¹⁴ Η υδροδυναμική ακτίνα R_h ή αλλιώς η ακτίνα Stokes ορίζεται ως η ακτίνα μιας σκληρής σφαίρας που διαχέεται με τον ίδιο ρυθμό που διαχέεται το υπό εξέταση σωματίδιο. Καθώς τα περισσότερα μόρια δεν είναι πλήρως σφαιρικά, η ακτίνα Stokes συνήθως είναι μικρότερη από τη δραστική ακτίνα του σωματιδίου.

αποτελεσματικό σύστημα ψύξης του συστήματος. Ένας θερμοστάτης Huber 125w επιτρέπει μετρήσεις δειγμάτων σε ένα εύρος θερμοκρασιών από -25°C έως 200°C ενώ στην προκειμένη περίπτωση τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 12°C . Για την αποφυγή της συμβολής του αέρα στη σκέδαση, η κυψελίδα όπου φορτώθηκαν τα τελευταία ήταν υπό κενό και αποτελούνταν από λεπτές διαφανείς στις ακτίνες X πλευρές mica των 20 mm. Η φόρτωση των δειγμάτων όπως και ο καθαρισμός της κυψελίδας πραγματοποιήθηκε με σύριγγα Hamilton. Ο όγκος των δειγμάτων υπό εξέταση τυπικά κυμαινόταν στα 40 – 50 μl (το δείγμα κατά τη φόρτωση εκτοπίζει τον αέρα εντός της κυψελίδας ο οποίος απομακρύνεται μέσω της εξόδου που εδράζεται στην άλλη άκρη της κυψελίδας. Από την ίδια έξοδο απομακρύνονται τα δείγματα μετά τη μέτρηση όπως και τα διαλύματα καθαρισμού της κυψελίδας). Τέλος, μια κάμερα παραλάμβανε μονίμως το είδωλο της κυψελίδας και έστελνε την εικόνα σε μια οθόνη εγκατεστημένη στον εξωτερικό χώρο, ώστε να είναι δυνατή η απρόσκοπτη παρακολούθησή της καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Τα δείγματα πρωτεϊνών που υποβλήθηκαν σε σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες προέκυψαν από διαδοχικό καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας, συγκέντρωση, υποβολή σε μοριακή διήθηση, απομόνωση των κλασμάτων ενδιαφέροντος της πρωτεΐνης με βάση το χρωματογράφημα της μοριακής διήθησης, συγκέντρωσης μέχρι το 0.5 ml περίπου (συγκεντρώσεις από 1 έως 8.5 mg/ml) και αποθήκευση του δείγματος στους -80°C μετά από ακαριαία ψύξη σε υγρό άζωτο. Ο διαλύτης των πρωτεϊνικών δειγμάτων τυπικά ήταν 20 mM Tris-Cl pH 8.0 & 50 – 200 mM NaCl.

Τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο τύπου Jasco, του οποίου τα τεχνικά χαρακτηριστικά και τα υλικά που συνοδεύουν τον ενδεδειγμένο τρόπο χρήσης του έχουν περιγραφεί στην παράγραφο 2.5.3. Για τις μετρήσεις στο άπω υπεριώδες χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία με μήκος βήματος (path length) 1 mm για όγκους δείγματος έως 150 μl ενώ για τις μετρήσεις στο εγγύς υπεριώδες χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία με μήκος βήματος 10 mm για όγκους δείγματος έως 600 μl . Τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε πειράματα κυκλικού διχρωισμού προέκυψαν από καθαρισμό με χρωματογραφία συγγένειας και ακολούθως διαπίδυση έναντι «διαφανούς» διαλύματος δυο διακριτών τιμών pH: α) 10 mM CAPS pH 11, 25 mM KF, β) 10 mM διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH 8.2, 25 mM KF.

4.2.2. Μέθοδοι

4.2.2.1 Μοριακή διήθηση

Δείγματα έκλυσης πρωτεϊνών απομονωμένων με χρωματογραφία συγγένειας συγκεντρώθηκαν μέχρι τα 3 ml και φορτώθηκαν με σύριγγα στην εξισορροπημένη στήλη μοριακής διήθησης, σε λούπα χωρητικότητας 2 ml. Η διαδικασία ρυθμίστηκε ώστε η λούπα να ξεπλυθεί από το δείγμα με έναν καθορισμένο όγκο διαλύτη, τυπικά 5 ml. Η ταχύτητα ροής καθορίστηκε στο 0.8 – 1 ml/min και ο συνολικός όγκος διέλευσης διαλύτη από τη στήλη ορίστηκε τυπικά στον 1.1 όγκο στήλης. Τα κλάσματα διαμοίρασης ορίστηκαν ώστε να περιέχουν τυπικά 2 – 3 ml διερχόμενου διαλύτη - δείγματος. Μετά το πέρας της ανάλυσης έγινε η μελέτη της απεικόνισης του χρωματογραφήματος σε συνδυασμό με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) των κλασμάτων κάθε εμφανιζόμενης κορυφής και η ανάλυση των τιμών των εκλούμενων όγκων των δειγμάτων σε σχέση με το πρότυπο διάγραμμα των

πρωτεϊνών μαρτύρων. Από την εφαρμογή των αντίστοιχων εξισώσεων προέκυψε το μοριακό βάρος των αναλυμένων κορυφών για κάθε δείγμα, όπως επίσης και η υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων. Συμπεράσματα εξήχθησαν ως προς το βαθμό συσσωμάτωσης των παρασκευασμένων δειγμάτων, ως προς το πλήθος των κορυφών και άρα το βαθμό διασποράς των δειγμάτων και ως προς την επίδραση του pH στην σύσταση σε πληθυσμούς και στον ολιγομερισμό της κάθε πρωτεΐνης.

4.2.2.2 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (SAXS)

Στα κατάλληλα παρασκευασμένα δείγματα (βλέπε παραπάνω στην παράγραφο 4.2.1) πριν την υποβολή τους στο πείραμα σκέδασης προστέθηκαν 2 mM DTT για την αποφυγή βλαβών από την επίδραση της ακτινοβολίας. Αρχικά μετρήθηκε το πυκνό δείγμα για κάθε πρωτεΐνη και ακολούθησαν μετρήσεις διαδοχικών αραιώσεών του. Κάθε δείγμα πριν την φόρτωσή του στην κυψελίδα φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε επιτραπέζια φυγόκεντρο *erpedorf* σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν μετρήθηκε η συγκέντρωσή του σε φασματοφωτόμετρο Nanodrop. Πριν και μετά από τη μέτρηση κάθε δείγματος, διαλύτης ίσου όγκου υποβάλλονταν σε μέτρηση. Κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 min. Η γραφική επιφάνεια χρήστη εμφάνισε όλες τις σημαντικές παραμέτρους της γραμμής ακτινοβολίας όπως π.χ. την ένταση της λευκής ακτινοβολίας, την ένταση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας, τη ροή προσπίπτουσας και διερχόμενης ακτινοβολίας, τη θερμοκρασία του μονοχρωματικού κρυστάλλου, του δείγματος και την πίεση στο σωλήνα του ανιχνευτή. Ο χειρισμός του ανιχνευτή MAR345 έγινε απευθείας από το σύστημα της γραφικής επιφάνειας χρήστη. Σχετικές παράμετροι όπως ο χρόνος έκθεσης, μετατροπές ονόματος εικόνων και περιγραφή δειγμάτων ορίστηκαν στην ίδια επιφάνεια χρήστη και μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα MAR της σουίτας προγραμμάτων ATSAS 2.1 το οποίο έλαβε τα δεδομένα. Όλες οι σχετικές παράμετροι αποθηκεύτηκαν σε επικεφαλίδες στα αρχεία MAR και ανασύρθηκαν κατά την ανάλυση των δεδομένων για κανονικοποίηση της έντασης βάσει συγκέντρωσης δείγματος και διερχόμενης ροής από το πρόγραμμα ανάλυσης AUTOMAR. Το πρόγραμμα αυτό υπολογίζει το μέσο όρο των δισδιάστατων αρχείων ως προς το κέντρο της ακτίνας και τα μετατρέπει σε μονοδιάστατα αρχεία της έντασης σκέδασης σε συνάρτηση με το γωνιακό φορέα σκέδασης s . Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν τα πρωτογενή δεδομένα που τέθηκαν στο πρόγραμμα PRIMUS (ATSAS 2.1) (βλέπε παράγραφο 2.6.5) για περαιτέρω επεξεργασία.

Με το πρόγραμμα PRIMUS έγινε αρχικά η αφαίρεση της σκέδασης του διαλύτη από τη σκέδαση του δείγματος. Κατόπιν εφαρμόστηκε η προσέγγιση Guinier στην καμπύλη σκέδασης του αραιότερου διαλύματος για τον υπολογισμό της γυροσκοπικής ακτίνας R_g και της έντασης σε μηδενική γωνία $I_{(0)}$ ώστε συγκρινόμενη με τη σκέδαση σε μηδενική γωνία του μάρτυρα της BSA να υπολογιστεί το μοριακό βάρος του σκεδάζοντος σωματιδίου. Με μια επιλογή της μορφής του Sasplot παρουσιάζεται το διάγραμμα Kratky της καμπύλης σκέδασης και από εκεί προκύπτουν συμπεράσματα για την αναδιπλωμένη (σφαιροειδή) ή αποδιπλωμένη κατάσταση του σκεδάζοντος σωματιδίου (στην περίπτωση του αναδιπλωμένου σωματιδίου εμφανίζεται μια καλά καθορισμένη κορυφή στις μικρές γωνίες). Στη συνέχεια οι καμπύλες σκέδασης της ίδιας πρωτεΐνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις συνδυάστηκαν μεταξύ τους και με τις κατάλληλες προσθαφαιρέσεις στις μεγάλες και τις μικρές γωνίες (αφαιρέθηκαν οι μεγάλες γωνίες των πιο αραιών δειγμάτων για την μετρίαση του θορύβου και οι μικρές γωνίες από τα πιο πυκνά δείγματα για την αποφυγή παραγόντων δομής πχ συσσωμάτωσης) προέκυψε η συνδυαστική τελική

καμπύλη η οποία αποτέλεσε αρχείο εισόδου για το επόμενο πρόγραμμα επεξεργασίας της σουίτας ATLAS 2.1, το πρόγραμμα GNOM.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί στην παράγραφο 2.6.7 το GNOM είναι πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier που υπολογίζει τη συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $\rho(r)$ (η βέλτιστη συνάρτηση κατανομής παρέχεται με τη χρήση κατάλληλων τιμών της παραμέτρου κανονικοποίησης a όπως επίσης και με βάση τις τιμές των αντιληπτικών κριτηρίων που παρέχονται στο πρόγραμμα) ξεκινώντας από την μονοδιάστατη καμπύλη σκέδασης ενώ υπολογίζει εκ νέου τη γυροσκοπική ακτίνα και την ένταση της ακτινοβολίας σε μηδενική γωνία.

Τέλος πραγματοποιήθηκε η μοντελοποίηση ψευδών ατόμων με τη χρήση των προγραμμάτων DAMMIN και GASBOR της σουίτας ATLAS 2.1. Ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στην μοντελοποίηση με το πρόγραμμα DAMMIN. Για κάθε προκύπτον μοντέλο προέκυψε μια τιμή ασυμφωνίας με τα πειραματικά δεδομένα χ . Σε πολλές περιπτώσεις η απόλυτη τιμή του χ δεν είναι ενδεικτική της συμφωνίας των υπολογισμένων μοντέλων από τα πειραματικά δεδομένα, γι' αυτό στο παράρτημα 5 ακολουθεί επιπρόσθετα γραφική παράθεση της προσαρμογής των προκύπτοντων μοντέλων με τα πειραματικά δεδομένα. Για κάθε αρχείο κατανομής αποστάσεων πραγματοποιήθηκαν τυπικά οχτώ εφαρμογές του προγράμματος μοντελοποίησης και τα μοντέλα που προέκυψαν υπερτέθηκαν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους με χρήση των προγραμμάτων της σουίτας DAMAVER (παράγραφος 2.6.10) ώστε να εκτιμηθεί η σταθερότητα της λύσης και να παραχθεί το πιο πιθανό μοντέλο. Το πρόγραμμα SUPCOMB υπολόγισε τελικώς την τιμή της παραμέτρου χωρικής ασυμφωνίας (NSD) η οποία όσο περισσότερο τείνει προς το μηδέν τόσο καλύτερη η υπέρθεση των ομοίων μοντέλων που προκύπτει (βλέπε παράγραφο 2.6.10). Τιμές κάτω του 0.7 τυπικά γίνονται αποδεκτές. Η υδροδυναμική ανάλυση των πιο πιθανών μοντέλων και οι περαιτέρω απεικονίσεις τους έγιναν με χρήση του προγράμματος Pymol.

4.2.2.3 Κυκλικός διχρωϊσμός (CD)

Δείγματα πρωτεΐνης στον κατάλληλο διαλύτη χρησιμοποιήθηκαν για μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού στο άπω υπεριώδες για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής και στο εγγύς υπεριώδες για την εκτίμηση της τριτοταγούς αναδίπλωσης του μορίου. Στο άπω υπεριώδες πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις τόσο των αρχικών διαλυμάτων των πρωτεϊνών όσο και αραιώσεών τους. Επιλεγμένες αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για μελέτες θερμικής αποδιάταξης κατά τις οποίες υπολογίστηκε το σημείο μετάπτωσης της πρωτεΐνης T_M και επίσης εκτιμήθηκε ο αριθμός των μορφών στις οποίες μεταπίπτει μια πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της θερμικής αποδιάταξης. Στο εγγύς υπεριώδες οι μετρήσεις αφορούσαν μόνο το αρχικό πυκνό διάλυμα της κάθε πρωτεΐνης καθώς το σήμα του CD στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους είναι παραπάνω από μια τάξη μεγέθους ασθενέστερο από τα σήματα στην περιοχή του άπω υπεριώδους. Σε όλες τις μετρήσεις, τιμές θορύβου (τάσης HT) πάνω από 600 απορρίπτονταν.

Πριν από την υποβολή των δεδομένων στους υπολογισμούς δευτεροταγούς δομής έγινε η χρήση του μενού του προγράμματος Spectra Manager (Jasco Inc.) όπου πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του σήματος του διαλύτη από την καμπύλη ελλειπτικότητας του δείγματος, η κανονικοποίηση της καμπύλης βάσει του αριθμού καταλοίπων και της συγκέντρωσης του δείγματος και η παραγωγή έτσι της καμπύλης της μοριακής ελλειπτικότητας του δείγματος.

Για τον υπολογισμό των ποσοστών δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα της σουίτας CDPPro, SELCON3, CONTINLL και CDSSTR (βλέπε παράγραφο 2.5.5) από όπου προέκυψαν τα ποσοστά εμφάνισης των διαφορετικών δευτεροταγών δομών στο υπό εξέταση πρωτεϊνικό μόριο μετά από σύγκριση με το σετ αναφοράς SMP56 (Sreerama & Woody, 2004). Και από τα τρία προγράμματα προκύπτει η παράμετρος καλής προσαρμογής (goodness of fit) NRMSD η οποία αποτελεί μέτρο του πόσο καλά ταιριάζει (fit) η υπολογισμένη δευτεροταγής δομή με τα πειραματικά δεδομένα. Η παράμετρος λαμβάνει τιμές από 0 (κανένα fit) έως 1 (τέλειο fit).

Για την εκτίμηση της αναδίπλωσης του υπό εξέταση μορίου με βάση τα δεδομένα ελλειπτικότητας στο εγγύς υπεριώδες έγινε σύγκριση της ελλειπτικότητας του διαλύτη και του δείγματος με υπέρθεση στο πρόγραμμα Spectra Manager και αναζητήθηκαν σήματα από τα αρωματικά κατάλοιπα και τους δισουλφιδικούς δεσμούς στις χαρακτηριστικές περιοχές απορρόφησής τους.

Η θερμική αποδιάταξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασίας από 10 έως 90 °C με βήμα των 10 °C. Η ανάλυση ιδιαιτερώσεων τιμών (SVD, παράγραφοι 2.5.11, 2.5.12) έγινε με τη βοήθεια του πρόσθετου αλγόριθμου Biplot στο πρόγραμμα excel του λειτουργικού συστήματος των windows. Ο υπολογισμός του σημείου μετάπτωσης (T_M) της πρωτεΐνης έγινε με συλλογή των τιμών ελλειπτικότητας στο μήκος κύματος 222 nm για όλες τις θερμοκρασίες από 10 έως 90 °C με βήμα του ενός βαθμού (1 °C). Η καμπύλη της συνολικής ελλειπτικότητας τέθηκε για ανάλυση στο μενού του προγράμματος Spectra Manager όπου υπολογίστηκε η πρώτη παράγωγός της βάσει του αλγόριθμου Savitzky-Golay για 25 σημεία δεδομένων. Στο θερμοκρασιακό σημείο όπου η παράγωγος παρουσιάζει μέγιστο εντοπίζεται η τιμή T_M της πρωτεΐνης.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Μοριακή διήθηση

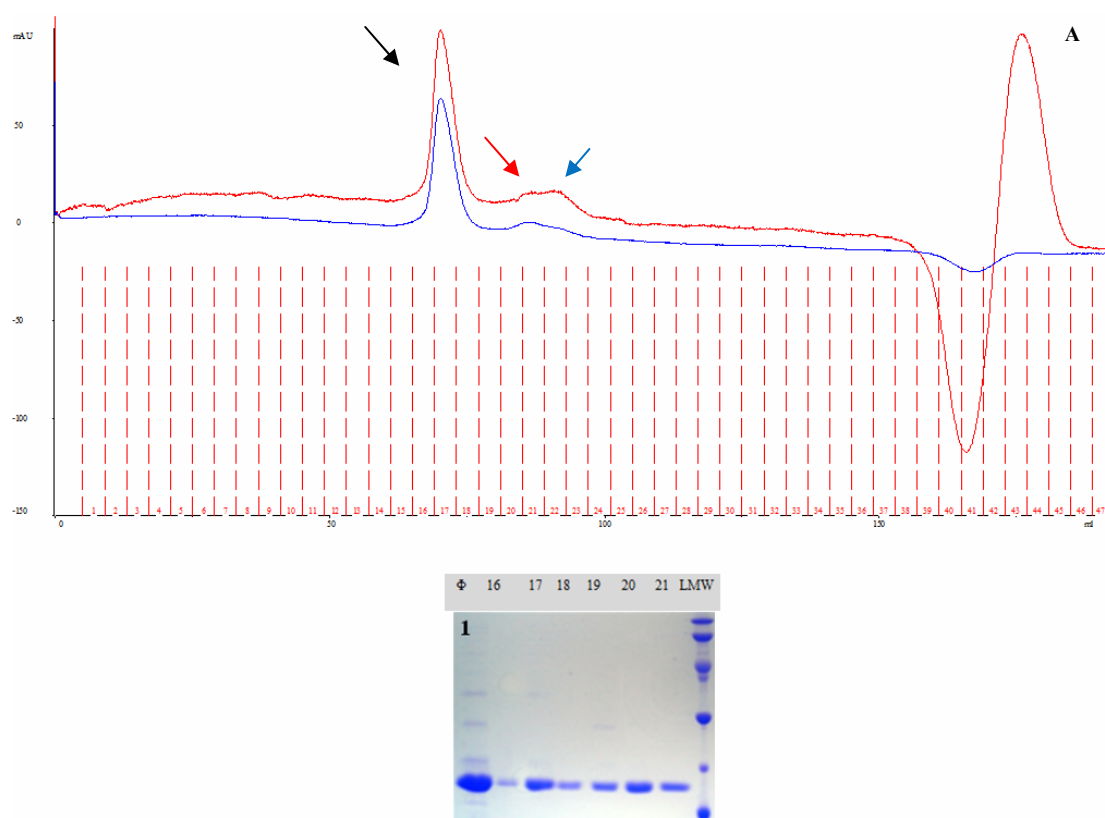
4.3.1.1 Η πρωτεΐνη HrpB

Εκλούσεις της απομονωμένης από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης HrpB-HT σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100¹⁵ εξισορροπημένης με 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl. Ομοίως, εκλούσματα της ίδιας πρωτεΐνης σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο, φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100¹⁶ εξισορροπημένης με 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του μονομερούς της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 13.8 kDa. Στην περίπτωση του pH 8.0 η πρωτεΐνη φάνηκε να εντοπίζεται η περισσότερη στο νεκρό όγκο της στήλης (75 ml) με δυο πολύ μικρές κορυφές να ακολουθούν, από τις οποίες η πρώτη δεν περιλαμβάνεται στην διαχωριστική ικανότητα της στήλης και εκλύεται στα 81.7 ml ενώ η δεύτερη εκλύεται στα 96.4 ml και αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 41.84 kDa (πιθανό τριμερές)

¹⁵ Βαθμονόμηση S-100¹ παραρτήματος 3

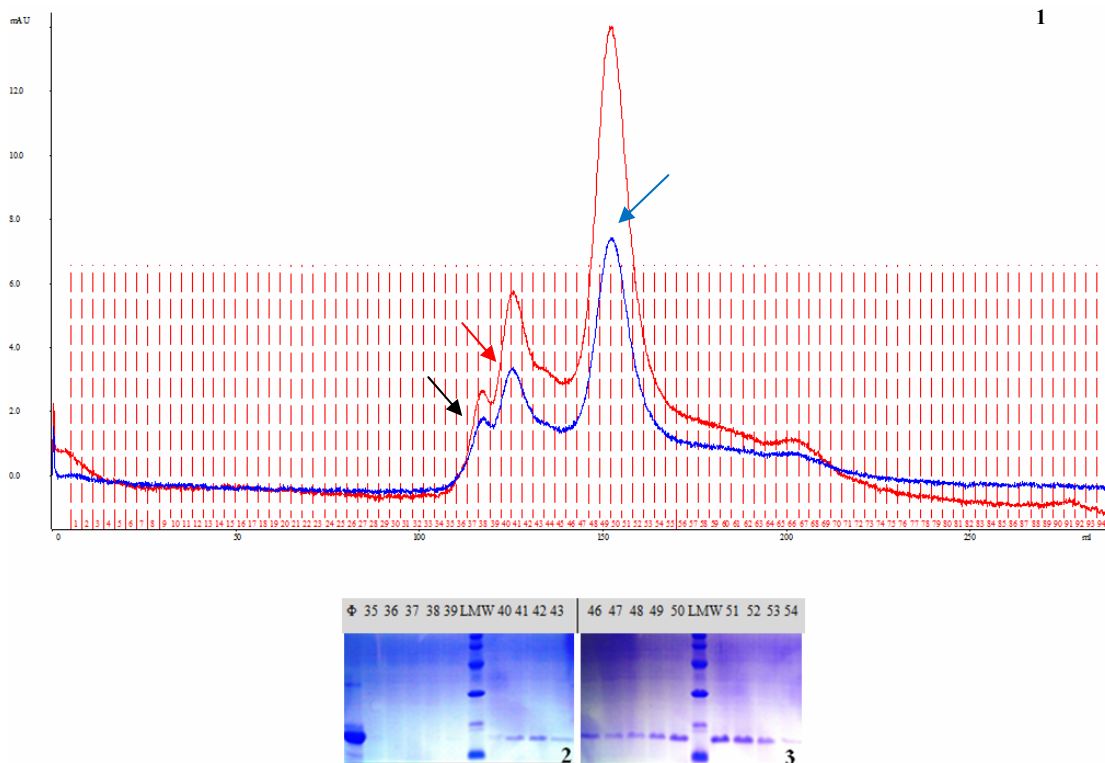
¹⁶ Βαθμονόμηση S-100² παραρτήματος 3

και υδροδυναμική ακτίνα 29.57 Å. Σε pH 11 η πρωτεΐνη εμφανίζει ομοίως πολλαπλές κορυφές όπου όμως το ποσό της πρωτεΐνης που εκλύεται στο νεκρό όγκο της στήλης έχει μειωθεί δραστικά. Συγκεκριμένα, εκτός του νεκρού όγκου της στήλης εμφανίζεται μια μη αναλυόμενη από τη στήλη S100 κορυφή η οποία εκλύεται στα 125.3 ml, έπεται ένας επίσης μη αναλυόμενος ώμος στα 133.5 ml και στη συνέχεια ακολουθεί η κύρια κορυφή σε όγκο έκλυσης 152.3 ml, μοριακό βάρος 47.67 kDa (πιθανό 3μερές) και υδροδυναμική ακτίνα 31.07 Å. Τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν και οι όγκοι έκλυσης με τα αντίστοιχα μοριακά βάρη και τις υδροδυναμικές ακτίνες παρουσιάζονται στις εικόνες 4.2 & 4.3. Είναι φανερό ότι σε pH 11 η πρωτεΐνη αυξάνει τη διαλυτότητά της και αποσυσσωματώνεται σε σχέση με το pH 8.0, ώστε τελικά εμφανίζεται κυρίως με τη μορφή μικρών ολιγομερικών πληθυσμών.



Εικ. 4.2. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HprB-HT σε pH 8 από στήλη S-100 (A) με το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (1). Η περισσότερη πρωτεΐνη εκλύεται στο νεκρό όγκο της στήλης (75 ml, μαύρο βέλος), ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό της εκλύεται σε όγκους 81.7 ml (κόκκινο βέλος) και 96.4 ml (μπλε βέλος), διαδρομές 20,21 πηκτώματος 1. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών (βλέπε παράγραφο 3.2.1). Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης



Εικ. 4.3. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpB-HT σε pH 11 από στήλη S-100 (1) με τα αντίστοιχα αποδιατακτικά πηκτώματα (2,3). Στο ακραίο αλκαλικό pH εμφανίζονται πολλαπλές αναλυμένες κορυφές με τις δυο κύριες να εκλούονται στα 125.3 (μη αναλυόμενη κορυφή, κόκκινο βέλος) και 152.3 ml (47.67 kDa, μπλε βέλος) διαδρομές 41 και 50 πηκτώματος 2 και 3 αντίστοιχα. Εμφανίζεται επίσης μια διαταραχή στο χρωματογράφημα, σε όγκο έκλουσης 133.5 ml. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών (βλέπε παράγραφο 3.2.1). Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

4.3.1.2 Η πρωτεΐνη HrpP

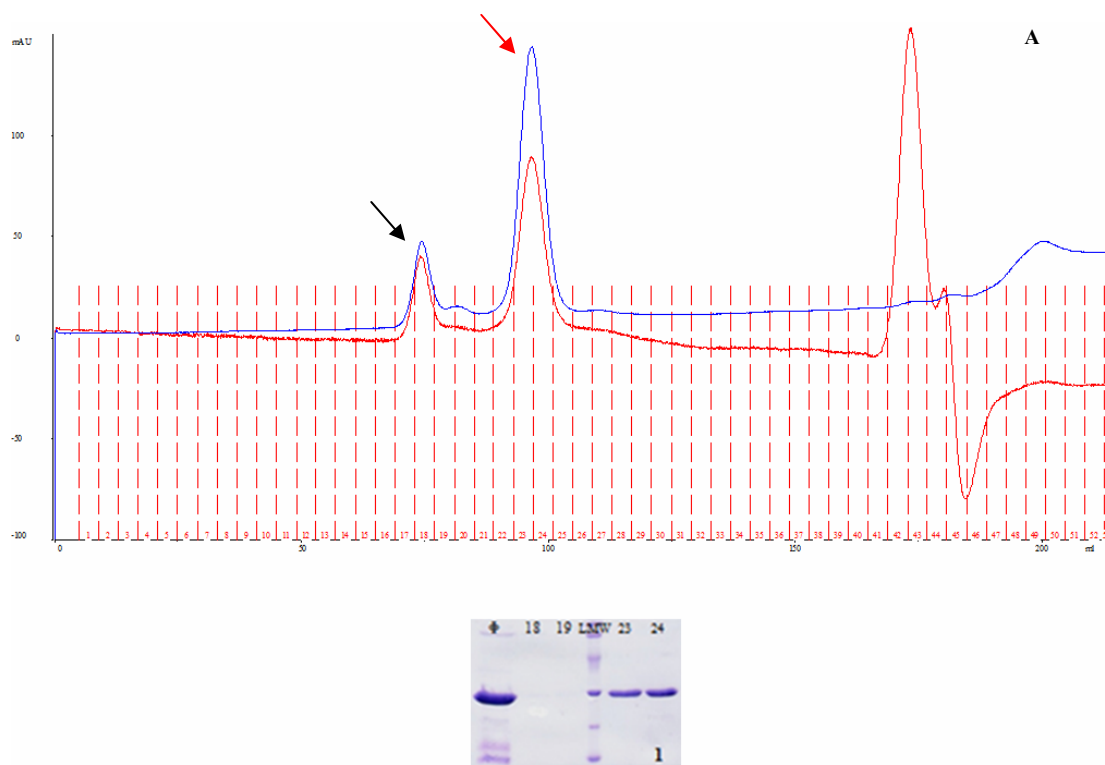
Εκλούσεις της απομονωμένης από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης HT-HrpP¹⁷ σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100¹⁸ εξισορροπημένης με 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl. Εκλούσεις της ίδιας πρωτεΐνης αλλά στη μορφή HrpP-HT και σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο, φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100¹⁹ εξισορροπημένης με 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του μονομερούς της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 23.04 kDa για τη μορφή HT-HrpP και 21.6 kDa για τη μορφή HrpP-HT. Σε pH 8.0 η πρωτεΐνη εμφανίζει μια

¹⁷ Εκφρασμένης από την πλασμιδιακή κατασκευή pET16b/HrpP της Δρ. Α. Ταμπακάκη

¹⁸ Βαθμονόμηση S-100¹ παραρτήματος 3

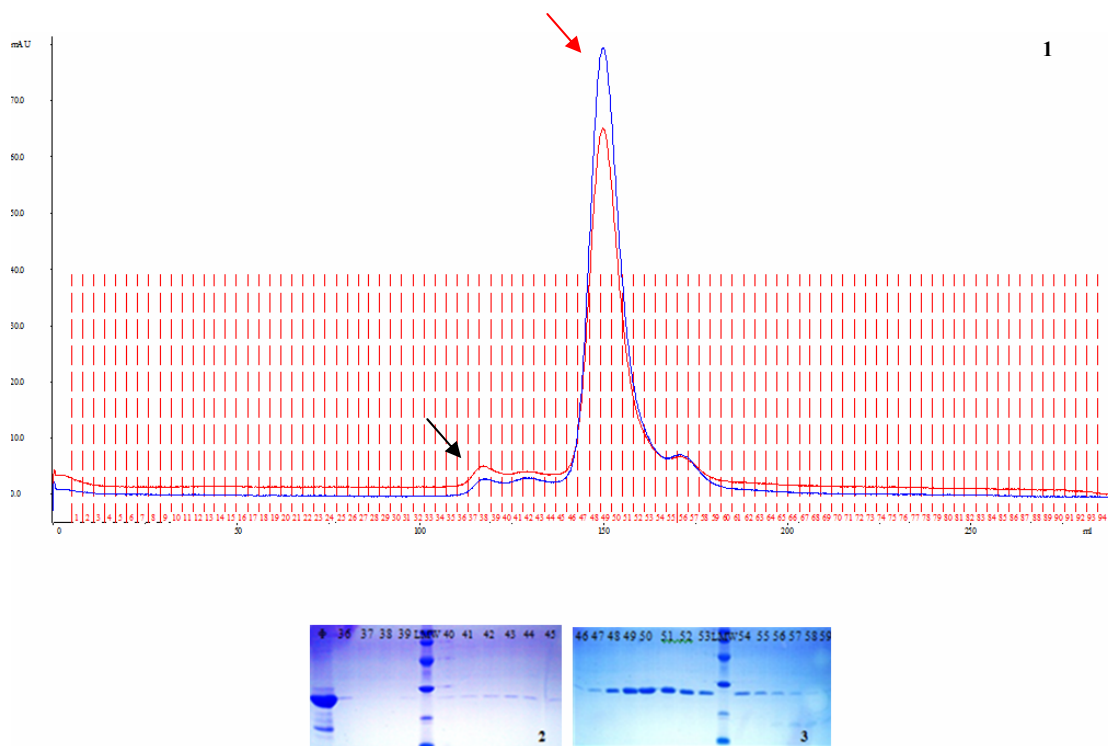
¹⁹ Βαθμονόμηση S-100² παραρτήματος 3

κύρια κορυφή σε όγκο έκλουσης 96.6 ml που αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος 41.96 kDa (πιθανό διμερές) και υδροδυναμική ακτίνα 29.45 Å (Εικ. 4.4). Σε pH 11 παρουσιάζει παρόμοια εικόνα μιας κύριας κορυφής σε εκλουόμενο όγκο 149.8 ml που αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος ίσο με 50.92 kDa (πιθανό διμερές) και υδροδυναμική ακτίνα ίση με 31.91 Å. Και για τα δυο pH πριν από την κύρια κορυφή παρουσιάζεται μια μικρή, μη αναλυόμενη από την στήλη S100, κορυφή/διαταραχή. Το ακραία αλκαλικό pH δε φάνηκε να μεταβάλλει την ολιγομερική συμπεριφορά της πρωτεΐνης HrpP.



Εικ. 4.4. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpP σε pH 8 από στήλη S-100 (A) με το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (1). Η πρωτεΐνη εκλούεται σε μια κεντρική κορυφή στα 96.6 ml (41.96 kDa, κόκκινο βέλος), διαδρομή 24 του πηκτώματος 1. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης



Εικ. 4.5. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpP σε pH 11 από στήλη S-100 (1) με τα αντίστοιχα αποδιατακτικά πηκτώματα (2,3). Η πρωτεΐνη εκλούεται σε μια κεντρική κορυφή στα 149.8 ml (50.92 kDa, κόκκινο βέλος), διαδρομή 49 του πηκτώματος 3. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

4.3.1.3 Η πρωτεΐνη HrpZ

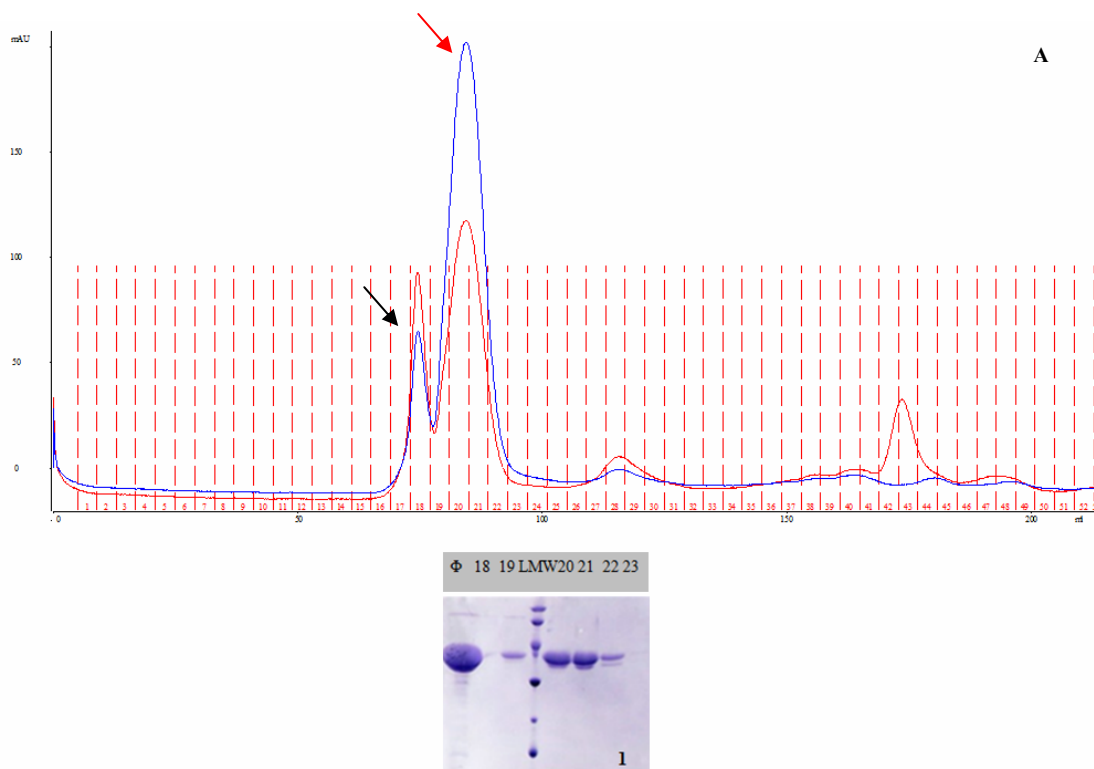
Εκλούσεις της απομονωμένης από στήλη συγγένειας πρωτεΐνης HrpZ-HT²⁰ σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100²¹ εξισορροπημένης με 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl. Ομοίως, εκλούσεις της ίδιας πρωτεΐνης σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο, φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100²² εξισορροπημένης με 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl. Το θεωρητικό μοριακό βάρος του μονομερούς της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 36.2 kDa. Και στις δυο τιμές pH η πρωτεΐνη φαίνεται να υπάρχει ως διμερές, καθώς σε pH 8 εκλούεται σε όγκο 84.5 ml που αντιστοιχεί σε

²⁰ Εκφρασμένη από την πλασμιδιακή κατασκευή pET26b/HrpZ της Δρ. Α. Ταμπακάκη

²¹ Βαθμονόμηση S-100¹ παραρτήματος 3

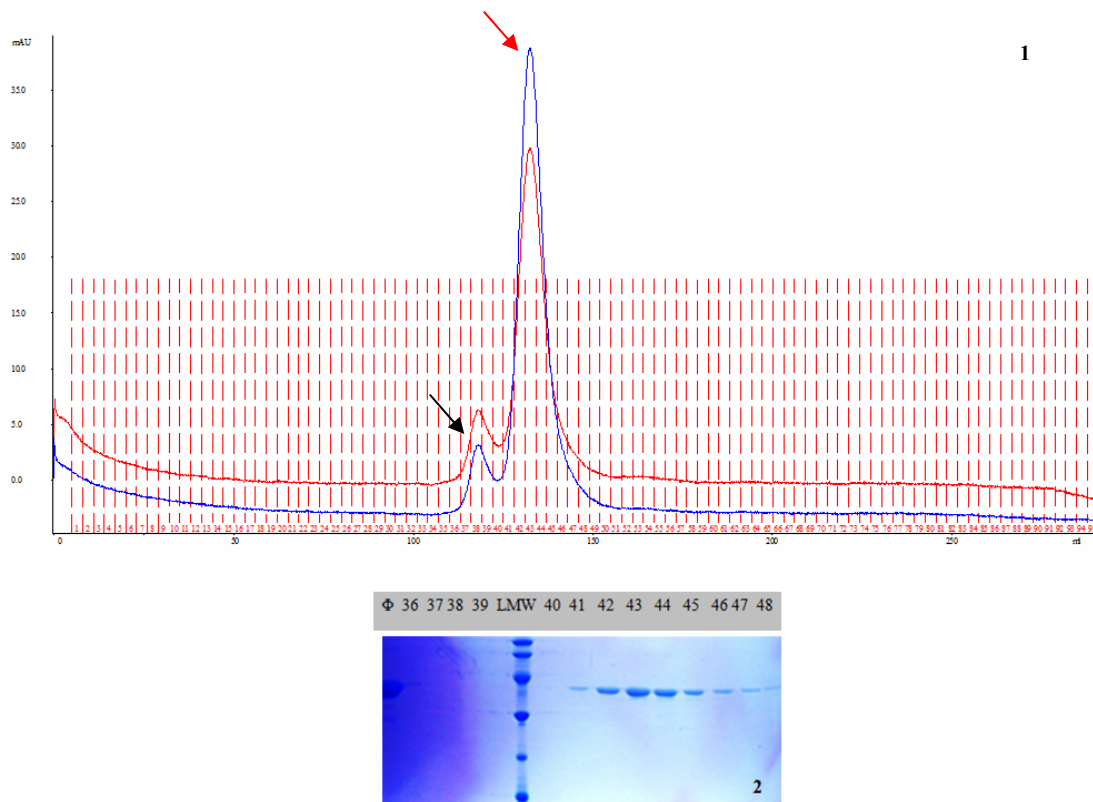
²² Βαθμονόμηση S-100² παραρτήματος 3

μοριακό βάρος 74.57 kDa και υδροδυναμική ακτίνα 36.73 Å (Εικ. 4.6) ενώ σε pH 11 εκλούεται σε όγκο 132.38 ml που αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος 80.56 kDa με υδροδυναμική ακτίνα 37.74 Å. (Εικ. 4.7). Και στην περίπτωση της HrpZ το ακραία αλκαλικό pH δε φάνηκε να μεταβάλλει τη φυσική συμπεριφορά των πληθυσμών της *in vitro*, σε σχέση με το pH 8.



Εικ. 4.6. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpZ-HT σε pH 8 από στήλη S-100 (A) με το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (1). Η πρωτεΐνη εκλούεται σε μια κεντρική κορυφή στα 84.5 ml (κόκκινο βέλος), διαδρομή 20 του πηκτώματος 1. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης



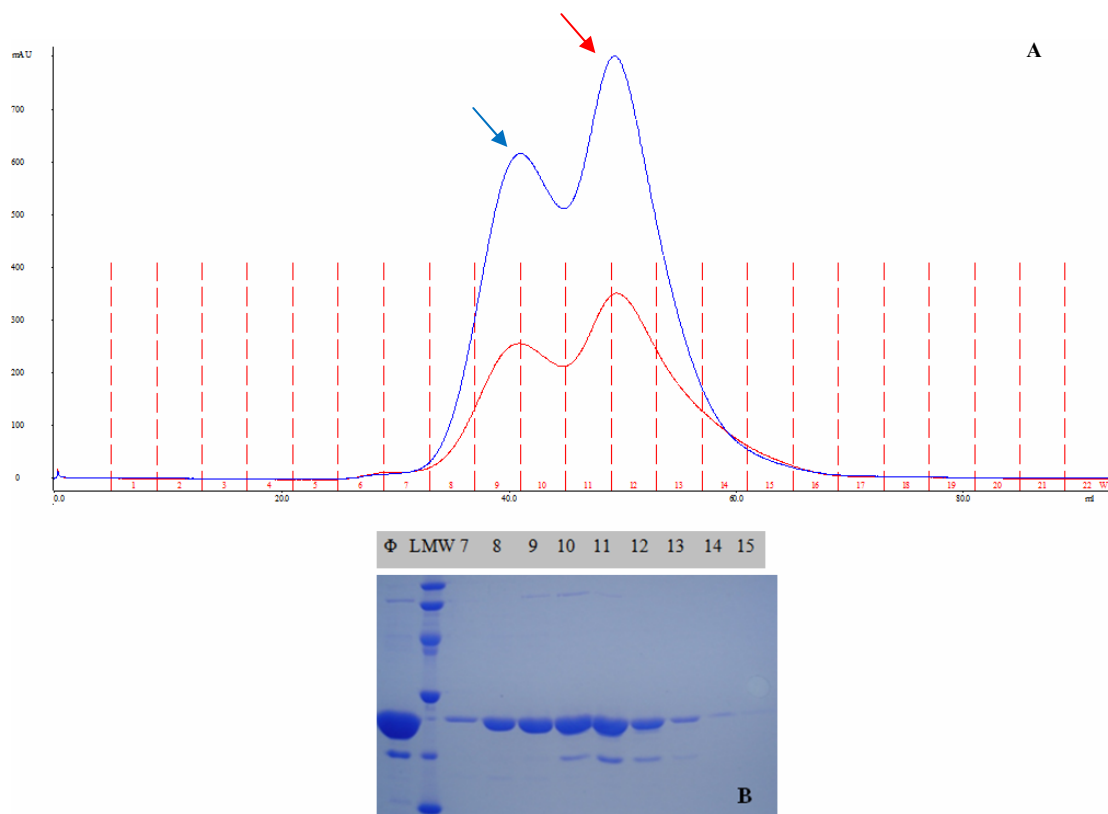
Εικ. 4.7. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpZ-HT σε pH 11 από στήλη S-100 (1) με το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (2). Η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε μια κύρια κορυφή όγκου έκλουσης 132.38 ml (κόκκινο βέλος), διαδρομή 43 του πήκτωματος 2. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

4.3.1.4 Η πρωτεΐνη HrpE

Η πρωτεΐνη HrpE-HT απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας και υποβλήθηκε σε ανάλυση μοριακής διήθησης σε στήλες S-300²³ & S-400 στις δυο διαφορετικές τιμές pH, 8 & 11. Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι 22.5 kDa. Εκλούσεις της πρωτεΐνης σε διαλύτη 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl υποβλήθηκαν σε στήλη S-400 και έδωσαν δυο κορυφές. Η πρώτη κορυφή σε ανάλυση SDS-PAGE περιείχε την πρωτεΐνη καθαρή από τα πρωτεολύματα που την συνοδεύουν μετά από πρωτογενείς απομονώσεις από στήλη συγγένειας ενώ η δεύτερη περιείχε την πρωτεΐνη μαζί με τα πρωτεολύματα (Εικ. 4.8). Λόγω της απουσίας μεγαλομοριακών μαρτύρων για τη βαθμονόμηση της στήλης S-400 δεν ήταν δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός του μοριακού βάρους των δύο κορυφών. Μόνο στοιχείο είναι ο όγκος έκλουσης από τη συγκεκριμένη στήλη της πρωτεΐνης-μάρτυρα θυρογλοβουλίνης (μοριακού βάρους 669 kDa) στα 44.3 ml, με υδροδυναμική ακτίνα στα 85 Å ενώ οι κορυφές της πρωτεΐνης HrpE-HT εντοπίζονται στα 41 και 49.3 ml.

²³ Βλέπε παράρτημα 3 για τη βαθμονόμηση της στήλης

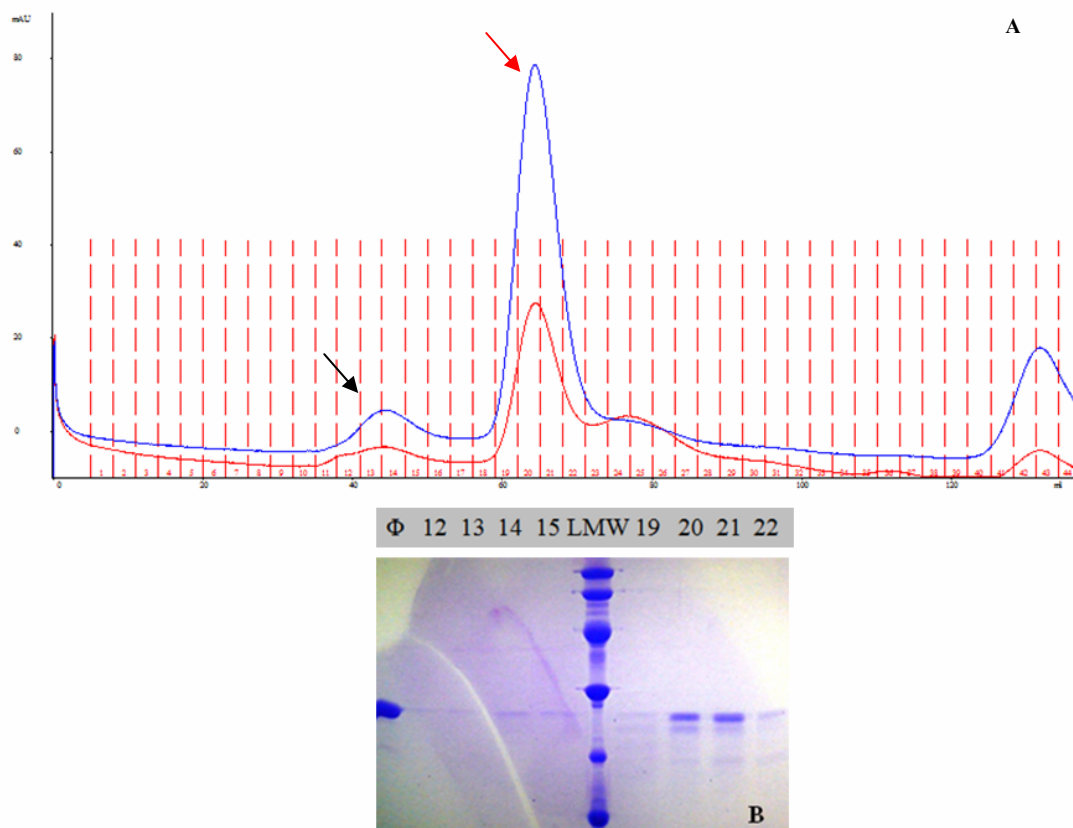


Εικ. 4.8. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpE-HT σε pH 8 από στήλη S-400 (A) και το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (B). Η πρωτεΐνη εκλούεται σε δυο κοντινές μεταξύ τους κορυφές (μπλε και κόκκινο βέλος), οι οποίες όπως φάνηκε στο αποδιατακτικό πήκτωμα διαφέρουν στην ύπαρξη ή όχι πρωτεολυμάτων. Η πρώτη κορυφή περιλαμβάνει τα κλάσματα 7 έως 9 και η δεύτερη τα κλάσματα 10 ως 14. Η στήλη είναι αβαθμονόμητη και δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του μοριακού βάρους των κορυφών έκλουσης. Η θυρογλοβουλίνη (669kDa) εκλούεται στα 44.3 ml. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση μοριακής διήθησης από στήλη S-300 σε pH 11. Απομονωμένη πρωτεΐνη σε διαλύτη 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ φορτώθηκε στη στήλη που προηγουμένως είχε εξισορροπηθεί με τον ίδιο διαλύτη και από την ανάλυση προέκυψαν δυο κορυφές. Η πρώτη αντιστοιχούσε στο νεκρό όγκο της στήλης ενώ η δεύτερη και κυριότερη εκλούστηκε σε όγκο 64.3 ml που αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος 199.86 kDa και υδροδυναμική ακτίνα 39.29 Å (Εικ. 4.9). Οι τιμές του μοριακού βάρους και της υδροδυναμικής ακτίνας σε pH 11 είναι κατά πολύ μικρότερες από τις τιμές που προέκυψαν σε pH 8²⁴ όπου η πρωτεΐνη στη μορφή HT-HrpE εκλούστηκε σε μια κύρια κορυφή των 577 kDa. Φαίνεται ότι σε ακραία αλκαλικό pH η πρωτεΐνη HrpE χαλαρώνει τον ολιγομερισμό της προς χαμηλότερου μοριακού βάρους σωματίδια ή μειώνει το βαθμό της εκτεταμένης διαμόρφωσής της.

²⁴ Αποτελέσματα υπογήφιας Δρ. Μ. Μπαστάκη



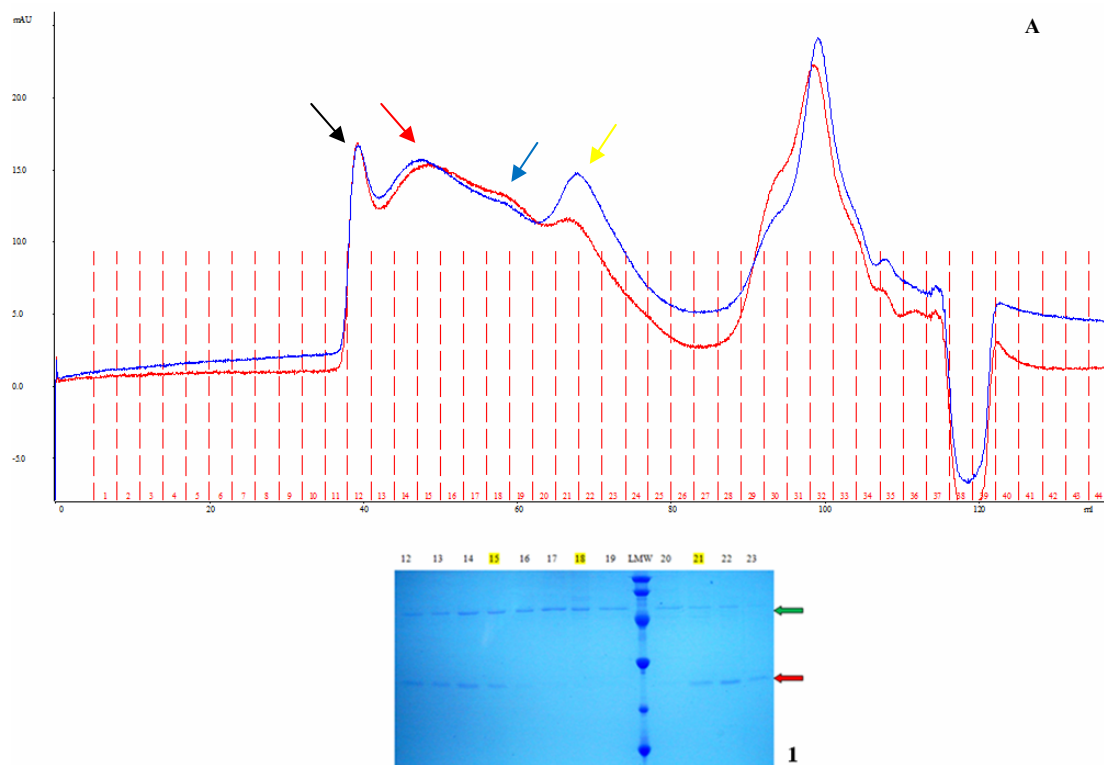
Εικ. 4.9. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HrpE-HT σε pH 11 από στήλη S-300 (A) και το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (B). Μια ποσότητα πρωτεΐνης εκλούεται στο νεκρό όγκο της στήλης (38.2 ml, μαύρο βέλος) αλλά η περισσότερη εντοπίζεται σε μια κύρια κορυφή έκλουσης στα 64.3 ml (199.86 kDa, κόκκινο βέλος), διαδρομή 21 ηχητώματος B. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης.

4.3.1.5 Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT-HrcN + HrpE

Το απομονωμένο από χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής μίγμα πρωτεϊνών HT-HrcN/HrpE (βλέπε παράγραφο 3.3.4.6) υποβλήθηκε σε ανάλυση μοριακής διήθησης σε στήλη S-300. Ο διαλύτης του πρωτεϊνικού δείγματος ήταν 20 mM CAPS pH 11, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ και χρησιμοποιήθηκε και για την εξισορρόπηση της στήλης πριν την έναρξη της ανάλυσης. Τα θεωρητικά μοριακά βάρη των πρωτεϊνών είναι 50.7 kDa για την HT-HrcN και 21.4 kDa για την HrpE. Το χρωματογράφημα της ανάλυσης φανέρωσε τρεις κορυφές. Η πρώτη αντιστοιχεί στο νεκρό όγκο της στήλης. Η δεύτερη περιλαμβάνει και τις δυο πρωτεΐνες σε αναλογία 2:1 HT-HrcN:HrpE, εκλούεται σε όγκο 47.3 ml και αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος 569.48 kDa και υδροδυναμική ακτίνα 76.41 Å. Μετά την κορυφή αυτή ακολουθεί ένας ώμος που αποτελείται μόνο από την πρωτεΐνη HT-HrcN και εκλούεται σε όγκο 58.3 ml, μοριακού βάρους 289.21 kDa (πιθανό δμερές) και με υδροδυναμική ακτίνα 52.39 Å. Τέλος, η τρίτη κορυφή περιλαμβάνει και τις δυο πρωτεΐνες με την παρουσία της HrpE περίπου διπλάσια σε σχέση με την HT-HrcN, σε όγκο έκλουσης 67.8 ml, μοριακό βάρος 161.01 kDa και υδροδυναμική ακτίνα 31.65 Å (Εικ. 4.10). Η

παραπάνω ανάλυση επιβεβαιώνει την ύπαρξη του συμπλόκου HrcN/HrpE *in vitro* σε pH 11 και μαρτυρά ότι υπό αυτές τις συνθήκες το σύμπλοκο υπάρχει σε δυο διαφορετικές μορφές όπως υποδεικνύεται από τις δυο -διαφορετικού μοριακού βάρους και διαφορετικής πρωτεϊνικής αναλογίας- κορυφές έκλουσης από τη στήλη μοριακής διήθησης.

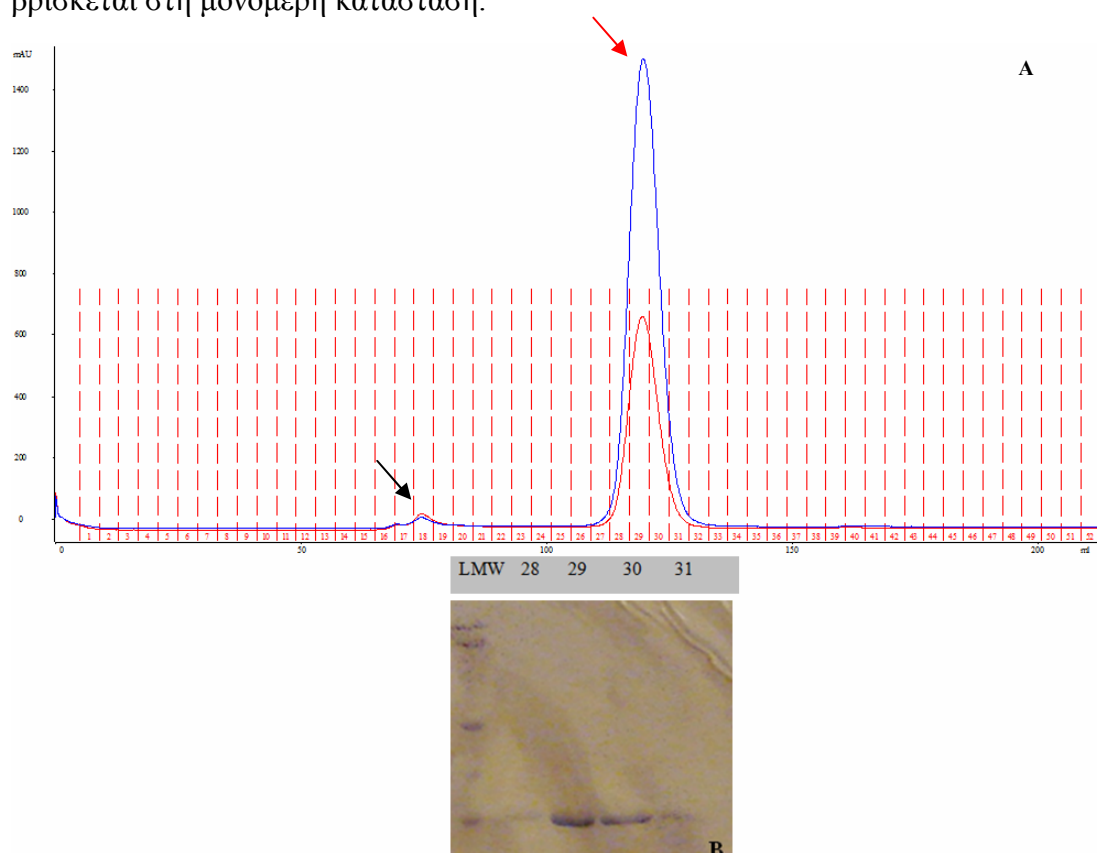


Εικ. 4.10. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου πρωτεϊνών HT-HrcN + HrpE σε pH 11 από στήλη S-300 (A) μαζί με το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (1). Η ανάλυση του συμπλόκου έδωσε εκτός της κορυφής του νεκρού όγκου (38.2 ml, μαύρο βέλος) άλλες δυο κορυφές κι έναν ώμο. Η πρώτη κορυφή εκλούεται στα 47.3 ml (569.48 kDa, κόκκινο βέλος) και περιλαμβάνει και τις δυο πρωτεΐνες, διαδρομή 15 ηχητώματος 1. Μετά την πρώτη κορυφή ακολουθεί ένας ώμος που περιλαμβάνει μόνο τη HT-HrcN, εκλούεται στα 58.3 ml (289.21 kDa, μπλε βέλος), διαδρομή 18 του ηχητώματος 1. Τέλος ακολουθεί η δεύτερη κορυφή η οποία πάλι περιέχει και τις δυο πρωτεΐνες, σε όγκο έκλουσης 67.8 ml (161.01 kDa, κίτρινο βέλος), διαδρομές 21-22 του ηχητώματος 1. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm. Στο αποδιατακτικό πήκτωμα, με πράσινο βέλος σημειώνεται η θέση της πρωτεΐνης HT-HrcN, με κόκκινο της HrpE.

LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

4.3.1.6 Η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrpE (HrpEc)

Εκλούσεις της απομονωμένης από στήλη συγγένειας καρβοξυτελικής επικράτειας της πρωτεΐνης HrpE, HT-HrpEc²⁵ σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο φορτώθηκαν σε στήλη μοριακής διήθησης S-100²⁶ εξισορροπημένης με 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 300 mM NaCl. Από το χρωματογράφημα της ανάλυσης προέκυψε ότι ολόκληρη η ποσότητα της πρωτεΐνης (εκτός από μια μικρή ποσότητα που απομακρύνθηκε στο νεκρό όγκο της στήλης) εκλούστηκε σε μια κορυφή, σε όγκο έκλυσης 119.6 ml που αντιστοιχίζεται σε 14.07 kDa και σε υδροδυναμική ακτίνα ίση με 15.6 Å (Εικ. 4.12). Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 12.5 kDa και η ανάλυση μοριακής διήθησης φανέρωσε ότι βρίσκεται στη μονομερή κατάσταση.



Εικ. 4.12. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης HT-HrpEc σε pH 8 από στήλη S-100 (A) και το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα (B). Η πρωτεΐνη εκλύεται ως μια κύρια κορυφή σε όγκο 118.9 ml (14.5 kDa, κόκκινο βέλος), διαδρομή 29 πηκτώματος B. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

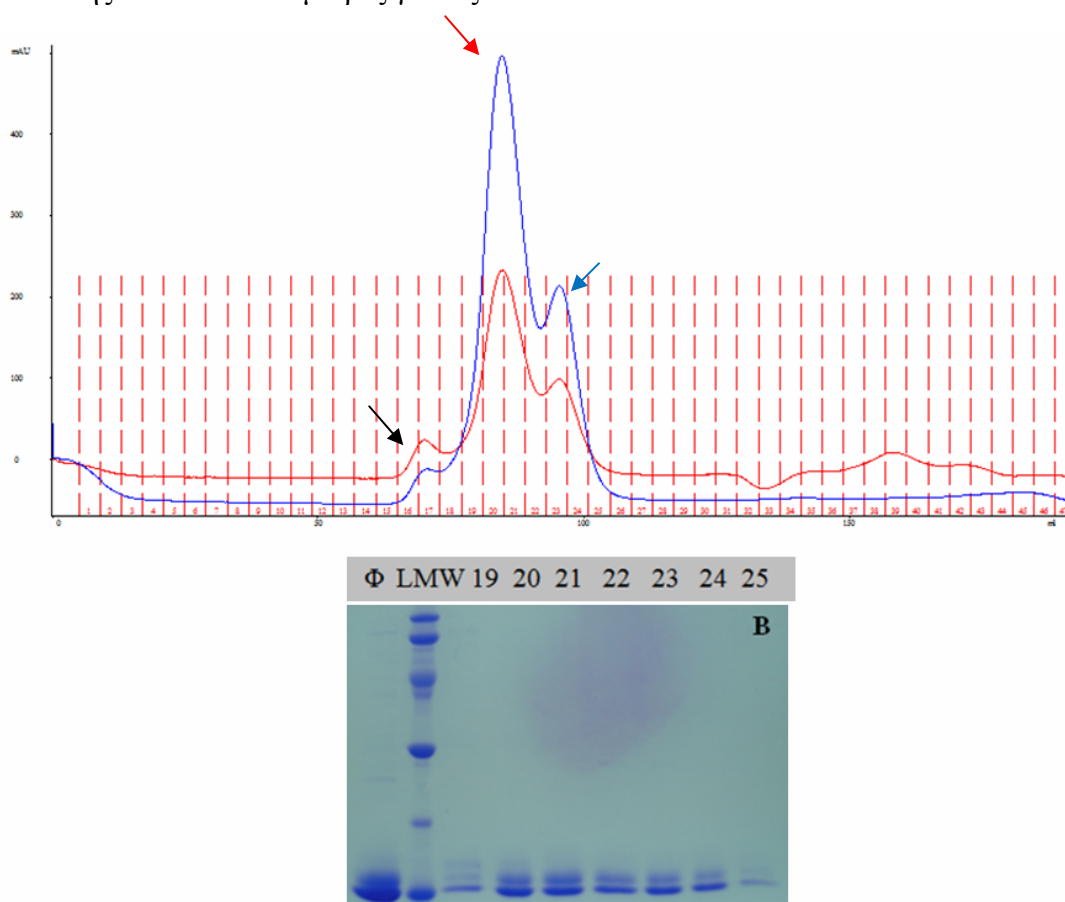
LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης

²⁵ Εκφρασμένη από την πλασμειδιακή κατασκευή pET16b/HrpEc της υποψήφιας Δρ. Μ. Μπαστάκη

²⁶ Βαθμονόμηση S-100¹ παραρτήματος 3

4.3.1.7 Το σύμπλοκο HrpG + HrpV-HT

Το απομονωμένο από χρωματογραφία συγγένειας σύμπλοκο των πρωτεϊνών HrpG + HrpV-HT σε διαλύτη αποτελούμενο από 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 300 mM ιμιδαζόλιο φορτώθηκε σε στήλη μοριακής διήθησης S-100²⁷ εξισορροπημένης με 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl. Από το χρωματογράφημα προέκυψαν δυο κορυφές εκτός της ποσότητας που εκλούσθηκε στο νεκρό όγκο της στήλης, η πρώτη και κύρια στα 84.6 ml η οποία αντιστοιχίζεται περίπου στα 74 kDa ενώ η δεύτερη και μικρότερη εκλούσθηκε σε όγκο 95.6 ml που αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος 43.98 kDa και υδροδυναμική ακτίνα ίση με 30.05 Å (Εικ. 4.13). Το θεωρητικό μοριακό βάρος των πρωτεϊνών είναι 15.8 kDa για την HrpG και 14.4 kDa για την HrpV-HT. Και στις δυο κορυφές η πρωτεΐνη HrpV-HT είναι περισσότερη από την HrpG, σε μια εκτιμώμενη αναλογία 2:1 και 3:1 για την πρώτη και τη δεύτερη κορυφή αντίστοιχα. Η κύρια κορυφή απομονώθηκε και υπεβλήθη σε πειράματα σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες.



Εικ. 4.13. Το χρωματογράφημα μοριακής διήθησης του συμπλόκου πρωτεϊνών HrpG + HrpV-HT σε pH 8 από στήλη S-100 και το αντίστοιχο αποδιατακτικό πήκτωμα. Το σύμπλοκο εκλούεται σε δυο κύριες κορυφές, μια στα 84.6 ml που αποτελεί και την κύρια κορυφή και αντιστοιχίζεται σε μοριακό βάρος περίπου 74 kDa (κόκκινο βέλος), διαδρομή 20 του πηκτώματος B, και μια δεύτερη κορυφή που εκλούεται σε όγκο 95.6 ml (43.98 kDa, μπλε βέλος), διαδρομή 23. Με μαύρο βέλος υποδεικνύεται ο νεκρός όγκος. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση στα 280 nm, με κόκκινη η απορρόφηση στα 254 nm.

Φ: το δείγμα φόρτωσης στη στήλη. LMW: πρωτεϊνικός μάρτυρας μοριακών μεγεθών. Οι αριθμοί αντιστοιχίζονται στα κλάσματα της ανάλυσης.

²⁷ Βαθμονόμηση S-100¹ παραρτήματος 3

4.3.2 Κυκλικός διχρωσμός

4.3.2.2 Η πρωτεΐνη HrpP

Η πρωτεΐνη HrpP-HT υπεβλήθη σε πειράματα κυκλικού διχρωσμού στο άπω υπεριώδες και τα ενδεικτικά ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της έτσι όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL, CDSSTR στις δυο τιμές pH 8 & 11 ακολουθούν παρακάτω στον πίνακα 4.1. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε και για τα δυο pH ήταν το SMP56 (εύρος φάσματος: 190-240 nm, περιέχει 43 διαλυτές και 13 μεμβρανικές πρωτεΐνες και περιλαμβάνει τα στοιχεία: κανονική α-έλικα H(r), διαταραγμένη α-έλικα H(d), κανονικός β- κλώνος S(r), διαταραγμένος β-κλώνος S(d), στροφή T, αδόμητη περιοχή U, Sreerama & Woody 2004). Η πρωτεΐνη και στις δυο τιμές pH επιδεικνύει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα της α-έλικας στα 222 και 208 nm (Εικ. 4.15). Στο pH 11 παρατηρείται πτώση των ποσοστών α-έλικας και αντίστοιχη αύξηση των ποσοστών β-πτυχής. Η παράμετρος καλής προσαρμογής NRMSD για τις αναλύσεις του προγράμματος SELCON3 ήταν μικρότερη του 0.4 (το οποίο γενικά δίνει τις υψηλότερες τιμές NRMSD από τα τρία προγράμματα) ενώ για τα άλλα δυο προγράμματα η τιμή κρατήθηκε κάτω από το όριο του 0.25 που θεωρητικά δεν πρέπει να ξεπερνάται σε μια καλή αναπαράσταση δεδομένων.

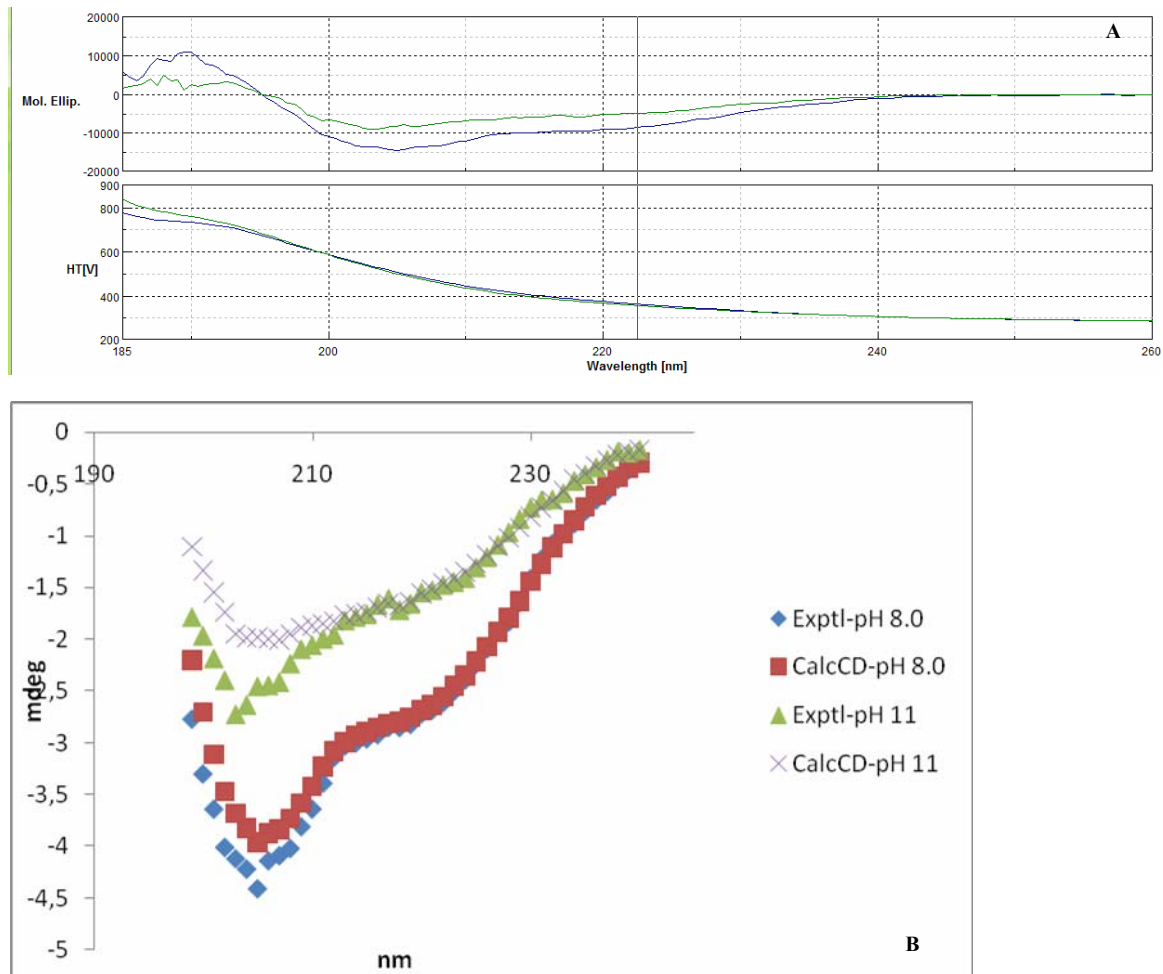
Πίνακας 4.1 Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη HrpP-HT σε pH 8 (**A**) και 11 (**B**) από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL και CDSSTR. Σε pH 8 τα ποσοστά είναι ισομοιρασμένα μεταξύ α-έλικας, β-κλώνου και στροφής. Σε pH 11 η εικόνα μεταβάλλεται και τα ποσοστά α-έλικας υποχωρούν δραστικά υπέρ του β-κλώνου. Οι τιμές των ποσοστών για κάθε pH είναι εν γένει παρόμοιες για τα τρία προγράμματα. Οι τιμές του NRMSD είναι μέσα σε αποδεκτά πλαίσια. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SMP56. H(r): regular helix. H(d): distorted helix. S(r): regular strand. S(d): distorted strand. Trn: turn. Unrd: unordered.

SAMPLE:	: P8-006 DEC2008					
PROGRAM:	: SELCON3					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	: .105	.124	.115	.086	.217	.335
RMSD(Exp-Calc):	1.116					
NRMSD(Exp-Cal):	.403					
SAMPLE:	: P8-006 DEC2008					
PROGRAM:	: CONTINLL					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd
Fractions	: .106	.130	.126	.088	.216	.333
RMSD(Exp-Calc):	.048					
NRMSD(Exp-Cal):	.017					
SAMPLE:	: P8-006 DEC2008					
PROGRAM:	: CDSSTR					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	: .094	.120	.136	.091	.224	.332
RMSD(Exp-Calc):	.230					
NRMSD(Exp-Cal):	.083					

A

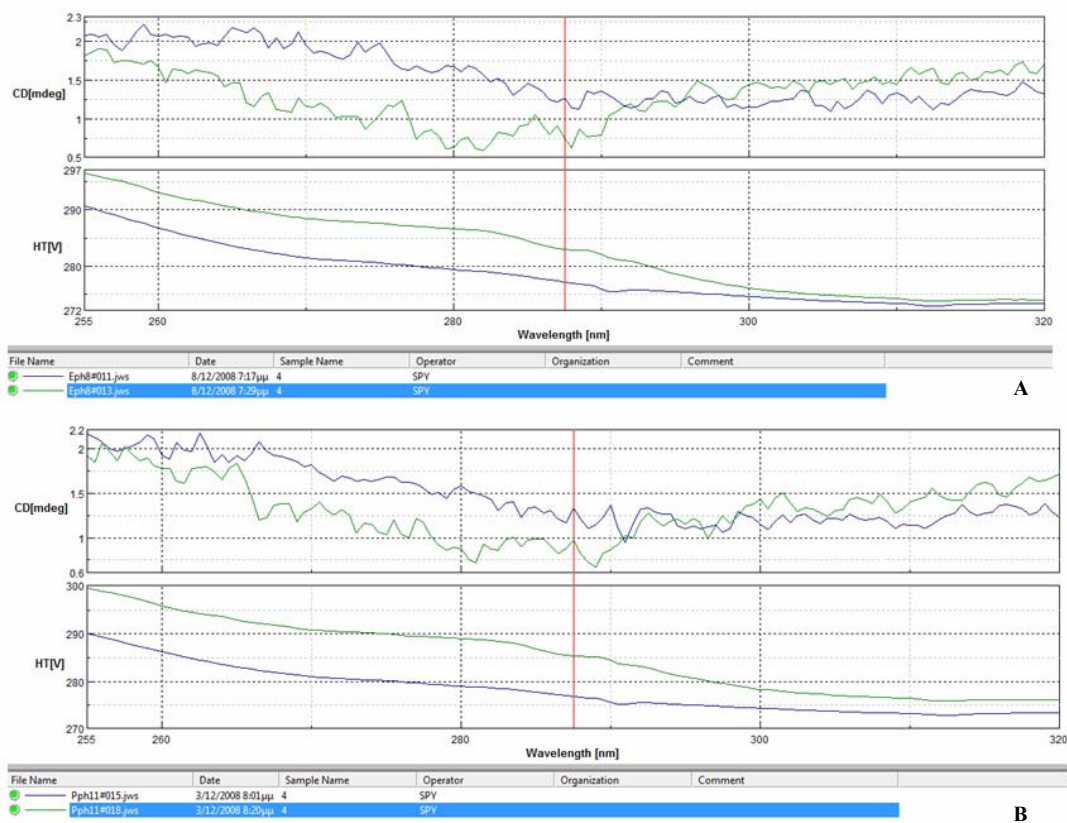
SAMPLE:	: P11-009 DEC2008					
PROGRAM:	: SELCON3					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	: .049	.079	.201	.116	.224	.328
RMSD(Exp-Calc):	.495					
NRMSD(Exp-Cal):	.304					
SAMPLE:	: P11-009 DEC2008					
PROGRAM:	: CONTINLL					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd
Fractions	: .044	.082	.204	.113	.228	.329
RMSD(Exp-Calc):	.057					
NRMSD(Exp-Cal):	.035					
SAMPLE:	: P11-009 DEC2008					
PROGRAM:	: CDSSTR					
Ref. Prot. Set:	SMP56					
Structure	: H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	: .014	.052	.221	.124	.245	.342
RMSD(Exp-Calc):	.292					
NRMSD(Exp-Cal):	.179					

B



Εικ. 4.15. Σύγκριση των κανονικοποιημένων φασμάτων μοριακής ελλειπτικότητας για την πρωτεΐνη HrpP-HT στις δυο τιμές pH (A) και των υπολογισμένων φασμάτων από το πρόγραμμα CDSSTR κατά την ανασύσταση του πειραματικού φάσματος (B). Στο A, με μπλε καμπύλη απεικονίζεται η ελλειπτικότητα σε pH 8, με πράσινη σε pH 11. Σε pH 11 η ελλειπτικότητα έχει υποχωρήσει εμφανώς σε σχέση με το pH 8. Exptl: experimental. Calc: calculated.

Στο εγγύς υπεριώδες, η πρωτεΐνη HrpP έδωσε σήμα και για τις δυο τιμές pH σε όλο το εύρος του φάσματος με χαρακτηριστικό το αρνητικό σήμα στα μήκη κύματος κάτω των 290 nm, σήμα ενδεικτικό ύπαρξης δισουλφιδικού δεσμού (Εικ. 4.16). Η πρωτεΐνη HrpP περιέχει επτά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στο πεδίο 250-270 nm), ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στο πεδίο 280 - 300 nm) και ένα κατάλοιπο κυστεΐνης που πιθανόν συμμετέχει σε σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού (η κυστίνη δίνει σήμα που ξεκινά από τα 320 nm και εμφανίζει μια ή δυο ευρείες κορυφές πάνω από τα 240 nm, οι οποίες συχνά είναι αρνητικές (Martin & Schilstra, 2008) με ένα δεύτερο μόριο πρωτεΐνης.

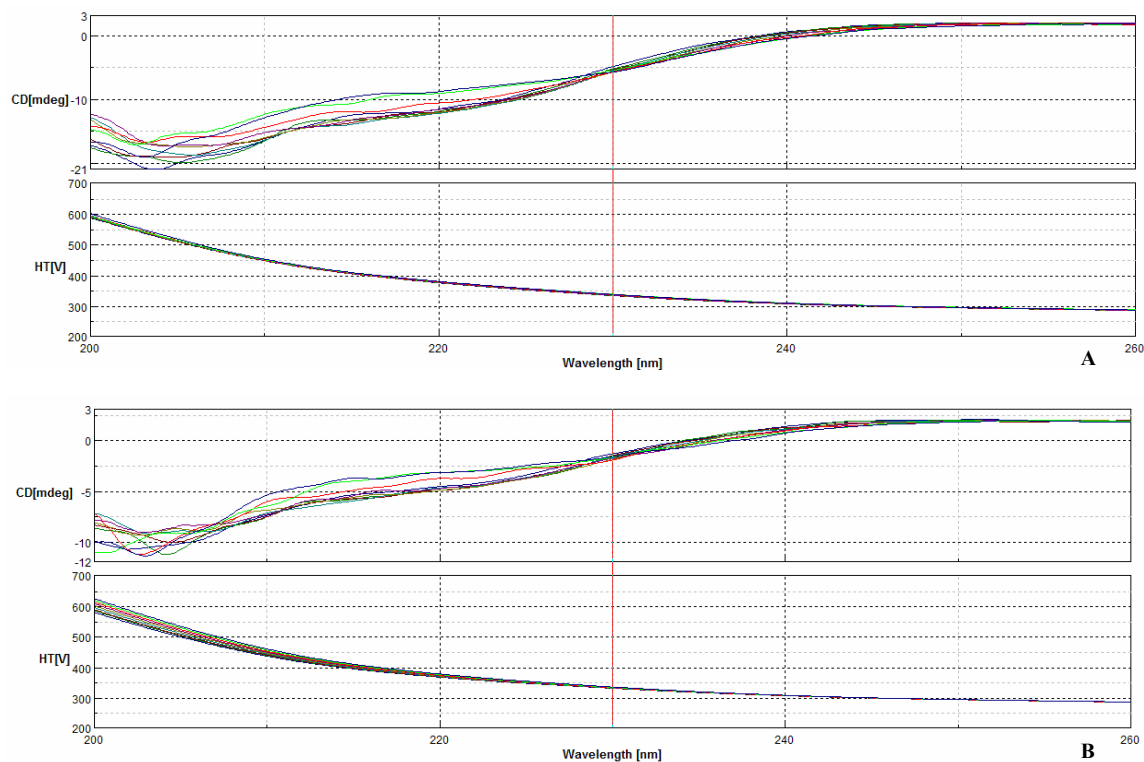


Διαλύτης Δείγμα

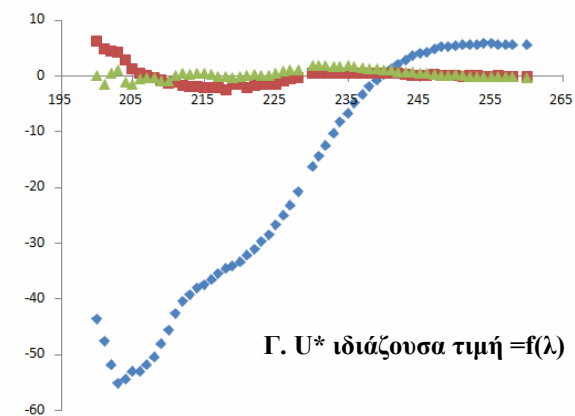
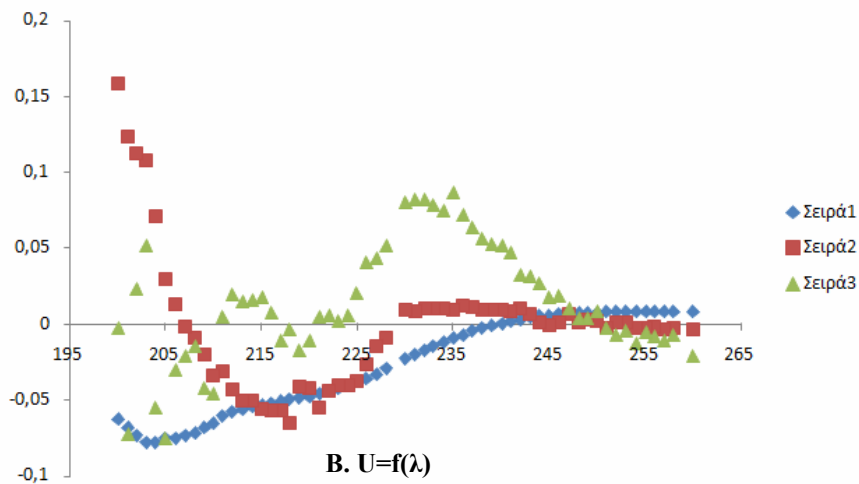
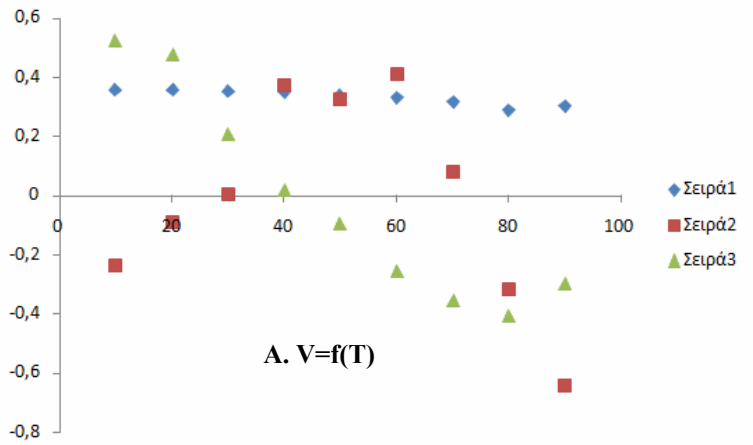
Εικ. 4.16. Τα φάσματα ελλειπτικότητας της πρωτεΐνης HspP-HT συναρτήσεως του μήκους κύματος στο εγγύς υπεριώδες. Το φάσμα **A** αντιστοιχίζεται σε pH 8, το **B** σε pH 11. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση του εκάστοτε διαλύτη, με πράσινη η απορρόφηση του δείγματος. Η πρωτεΐνη HspP-HT περιέχει επτά κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στα 250 – 270 nm), ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στα 280 - 300nm) και ένα κατάλοιπο κυστεΐνης. Η κυστεΐνη δεν απορροφά, αλλά απορροφά η κυστίνη (δισουλφιδικός δεσμός), δίνοντας αρνητικό σήμα σε μεγάλο εύρος του εξεταζόμενου φάσματος. Τα δείγματα που μετρήθηκαν ήταν συγκέντρωσης 0.7 και 0.8 mg/ml για το pH 8 και 11 αντίστοιχα. Το σήμα που λαμβάνεται στο pH 11 είναι κατ'εξασθενημένο σε σχέση με αυτό του pH 8.

Η θερμική αποδιάταξη της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε pH 8 και 11 ανά 10 °C από τους 10 έως τους 90 °C, συνελέγησαν δηλαδή 9 φάσματα και η υπέρθεση των επιμέρους φασμάτων δεν επέδειξε ευκρινώς την ύπαρξη ενός σημείου τομής-ισοδιχρωικού σημείου (Εικ. 4.17). Η απουσία ισοδιχρωικού σημείου μπορεί να σημαίνει α) ότι υπάρχει ισοδιχρωικό σημείο αλλά είναι κρυμμένο, β) εντοπίζεται σε μήκος κύματος μικρότερο των 200 nm ή γ) κατά την αποδιάταξη της πρωτεΐνης μεταβάλλεται η μοριακή ελλειπτικότητα των φασμάτων λόγω μεταβολής του συντελεστή εξάλειψης. Η τελευταία αυτή μεταβολή μπορεί να οφείλεται πχ. στη διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού κατά την πορεία της αντίδρασης. Η πρωτεΐνη φαίνεται να χάνει δραματικά τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής της κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης καθώς αυξάνει η θερμοκρασία. Ουσιαστικά από τους 70 βαθμούς και πάνω αρχίζει να αποδιατάσσεται. Πιθανόν πρόκειται για μια μη συνεργατική αντίδραση, κι αυτό υποδηλώνει ότι εξ αρχής η πρωτεΐνη πιθανόν βρισκόταν σε μια ευκίνητη, μερικώς αποδιπλωμένη κατάσταση. Από την ανάλυση αποσύνθεσης

ιδιαιζουσών τιμών (SVD) επί του αρχικού πίνακα [ο αρχικός πίνακας και για τις δυο τιμές pH αποτελούνταν από 9 στήλες, μια για κάθε θερμοκρασία της θερμικής αποδιάταξης και σειρές όσες και τα εξεταζόμενα μήκη κύματος, από τα 260 έως τα 200 nm με υποδιαίρέσεις του 0,1 nm δηλ συνολικά 601 σειρές] προέκυψε ότι κατά την αποδιάταξη και στις δυο τιμές pH, υπάρχουν δυο μορφές της πρωτεΐνης, η αναδιπλωμένη και η αποδιπλωμένη, χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων καταστάσεων. Ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου της καμπύλης ελλειπτικότητας της αποδιάταξης σε μήκος κύματος 222 nm συναρτήσει της θερμοκρασίας φανέρωσε την τιμή του σημείου T_M της πρωτεΐνης στους 67°C για το pH 8 και στους 71°C για το pH 11 (Εικ. 4.18, 4.19).



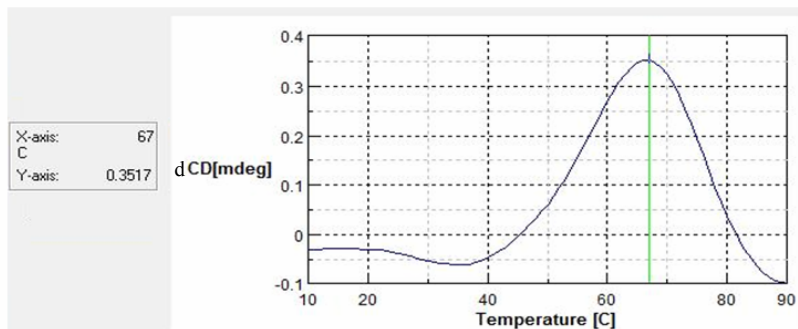
Εικ. 4.17. Η υπέρθεση των φασμάτων της θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης HrpP-HT σε pH 8 (A) και 11(B). Τα εννιά φάσματα από τους 10°C έως τους 90°C και στις δυο τιμές pH δε φαίνεται να τέμνονται σε ένα ισοδιχρωικό σημείο. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής φαίνεται να χάνονται με αργό ρυθμό με την άνοδο της θερμοκρασίας. Από τους 70°C και μετά ουσιαστικά αρχίζει η θερμική αποδιάταξη.

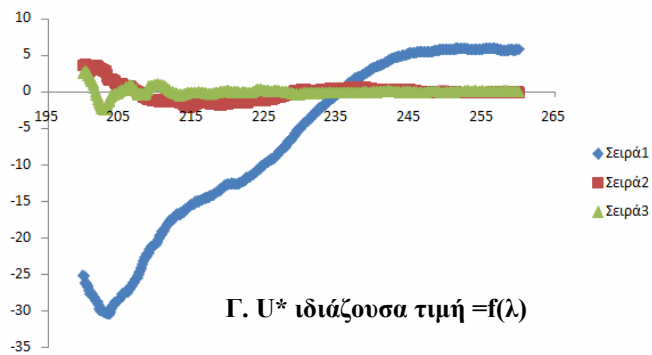
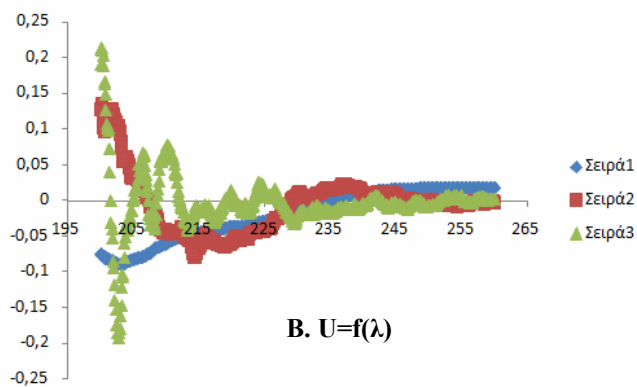
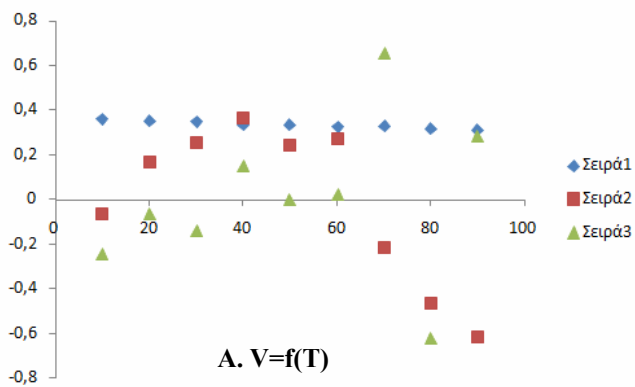


Πίνακας 4.2

Singular and eigenvalues for the SVD (ULAMBDA V')			
	Singular values	Eigen values	Cumulative % of Eigenvalues
	699,9091	489872,8	0,995403
	38,83209	1507,931	0,998467
	21,40158	458,0275	0,999398
	11,48654	131,9407	0,999666
	7,444953	55,42733	0,999778
	6,778392	45,9466	0,999872
	5,11507	26,16394	0,999925
	4,756352	22,62288	0,999971
	3,787269	14,34341	1
	Sum of eigenvalues	492135,2	

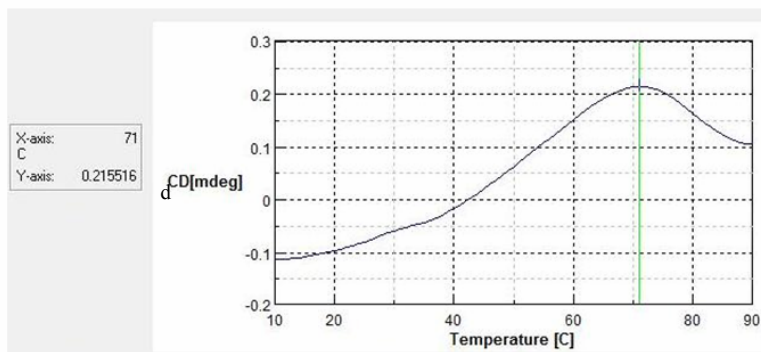
Εικ. 4.18





Πίνακας 4.3

Singular and eigenvalues for the SVD (U LAMBDA V')			
	Singular values	Eigen values	Cumulative % of Eigenvalues
	338,4813	114569,6	0,989451
	28,08888	788,9834	0,996265
	13,1218	172,1816	0,997752
	11,20774	125,6135	0,998837
	7,331212	53,74667	0,999301
	5,44597	29,65859	0,999557
	4,827345	23,30326	0,999759
	4,212831	17,74795	0,999912
	3,195572	10,21168	1
Sum of eigenvalues		115791	



Εκ. 4.19

Εικ. 4.18, 4.19 Η αποσύνθεση ιδιζουσών τιμών και ο υπολογισμός της τιμής T_M για την πρωτεΐνη HrpP-HT σε pH 8 (**Εικ. 4.18**) και 11 (**Εικ. 4.19**). Και στις δυο τιμές η ύπαρξη δυο βασικών ιδιζουσών τιμών που απαιτούνται για την σχεδόν πλήρη ανασύσταση του αρχικού φάσματος (τονισμένα ποσοστά πινάκων 4.2, 4.3) υποδηλώνει την παρουσία δυο καταστάσεων κατά την αποδιάταξη, την αναδιπλωμένη και την αποδιπλωμένη, χωρίς τη συσσώρευση ενδιάμεσης μορφής. Ο αρχικός πίνακας δεδομένων που αναλύθηκε με SVD περιείχε αριθμό σειρών όσες και τα μήκη κύματος που εξετάστηκαν και αριθμό στηλών όσες και οι θερμοκρασίες της θερμικής αποδιάταξης. Ο πίνακας αυτός αναλύθηκε σε τρεις επιμέρους, τον U (οι στήλες του περιέχουν τα φάσματα βάσης του αρχικού πίνακα, αλλιώς τις κύριες συνιστώσες στις οποίες αναλύεται αυτός), τον V (οι στήλες του, που είναι όσες οι στήλες του αρχικού πίνακα καθορίζουν τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του αντίστοιχου φάσματος βάσης του πίνακα U) και τον S . Οι τιμές των στοιχείων της διαγωνίου του πίνακα S (ιδιζουσες τιμές, singular values) υποδεικνύουν τη βαρύτητα των στηλών των πινάκων U & V στην ανασύσταση του αρχικού πίνακα. Οι ιδιζουσες τιμές αποτελούν τη θετική τετραγωνική ρίζα των ιδιοτιμών (eigenvalues). Για υπενθύμιση της επεξήγησης των πινάκων U, V και των ιδιζουσών τιμών βλέπε παράγραφο 2.5.10.). Η ποιοτική απεικόνιση των φασμάτων βάσης και της βαρύτητας της συμβολής τους στην ανασύσταση του αρχικού πίνακα πραγματοποιείται γραφικά μέσω των διαγραμμάτων $V=f(T)$, $U=f(\lambda)$ και $U_x(\text{ιδιζούσα τιμή})=f(\lambda)$. Στο διάγραμμα $V=f(T)$ οι δυο πρώτες στήλες του πίνακα V συναρτήσεως της θερμοκρασίας, για δυο καταστάσεις της πρωτεΐνης δίνουν τακτικές γραμμές/καμπύλες, με την τρίτη στήλη δεδομένων να αποδίδει θόρυβο δηλ. σημεία τυχαία τοποθετημένα γύρω από τον άξονα των θερμοκρασιών. Στο διάγραμμα $U=f(\lambda)$ απεικονίζεται το διάγραμμα των τριών πρώτων στηλών του πίνακα U συναρτήσεως του μήκους κύματος. Για τις πρώτες δυο μορφές έχουν παραχθεί φυσιολογικές καμπύλες, η τρίτη αποτελεί θόρυβο. Στο διάγραμμα $U_x(\text{ιδιζούσα τιμή})=f(\lambda)$ οι τιμές των τριών πρώτων στηλών του πίνακα U έχουν πολλαπλασιαστεί με τις αντίστοιχες ιδιζουσες τιμές και έχουν αναπαρασταθεί γραφικά συναρτήσεως του μήκους κύματος. Καμπύλες φασμάτων που συνεισφέρουν δραστικά στην ανασύσταση του αρχικού φάσματος διαφέρουν από το 0. Καμπύλες-θόρυβος συμπίπτουν με τον άξονα των μηκών κύματος. Στο διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε συνάρτηση της θερμοκρασίας απεικονίζεται η τιμή T_M της πρωτεΐνης ως μέγιστο και είναι ίση με 67°C για το pH 8 (**Εικ. 4.18Δ**) και 71°C για το pH 11 (**Εικ. 4.19Δ**).

4.3.2.3 Η πρωτεΐνη HrpZ

Τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού για την πρωτεΐνη HrpZ-HT στο άπω υπεριώδες μετά από επεξεργασία από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL, CDSSTR στις τιμές pH 8 & 11 φανέρωσαν τα ποσοστά εμφάνισης των διαφόρων στοιχείων δευτεροταγούς δομής που ακολουθούν στον πίνακα 4.4. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε και για τα δυο pH ήταν το SMP56. Η πρωτεΐνη και στις δυο τιμές pH επιδεικνύει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα της α -έλικας στα 222 και 208 nm (**Εικ. 4.20**). Στο pH 11 παρατηρείται πτώση των ποσοστών α -έλικας και αντίστοιχη αύξηση των ποσοστών β -κλώνου. Η παράμετρος καλής προσαρμογής NRMSD για τις αναλύσεις του προγράμματος SELCON3 ήταν μικρότερη του 0.4 ενώ για τα άλλα δυο προγράμματα η τιμή κρατήθηκε κάτω 0.1 που πρακτικά πρέπει να επιδιώκεται στη βέλτιστη αναπαράσταση δεδομένων.

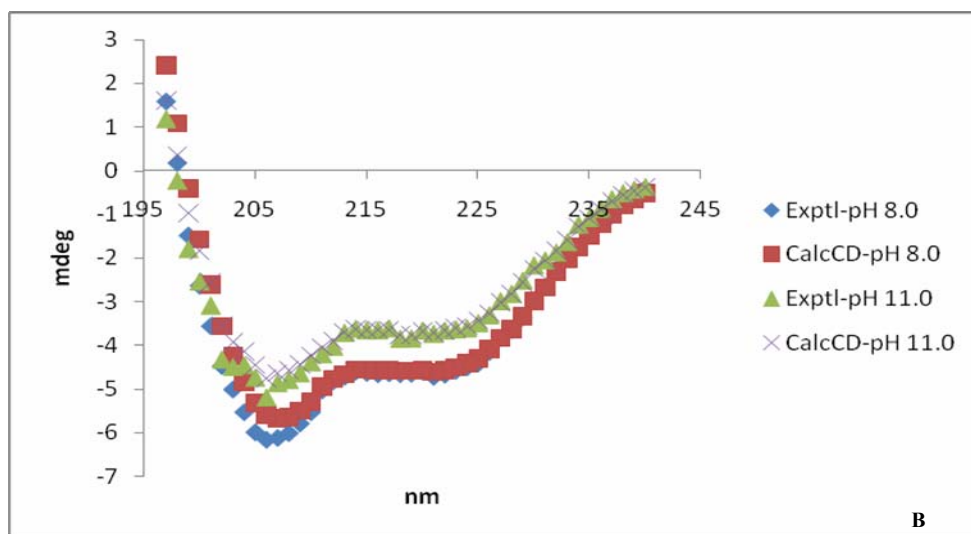
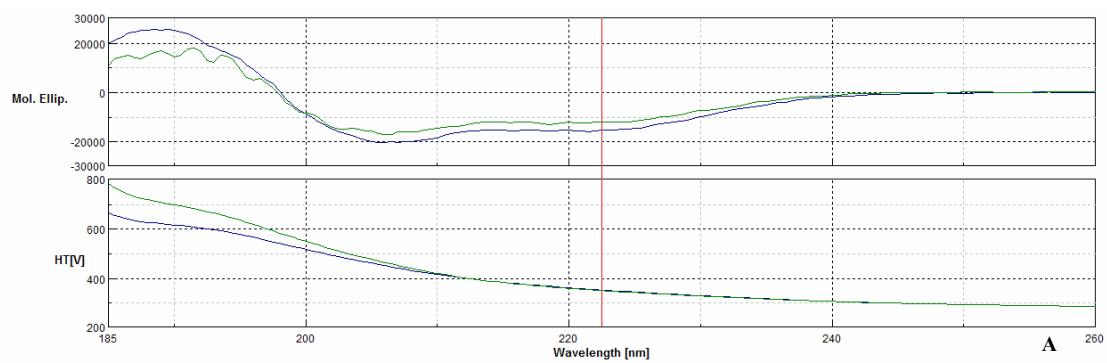
Πίνακας 4.4 Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη HrpZ-HT σε pH 8 (**A**) και 11 (**B**) από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL και CDSSTR. Σε pH 8 η παρουσία της α-έλικας είναι ισχυρή εις βάρος του β-κλώνου που υποαντιπροσωπεύεται. Σε pH 11 η εικόνα μεταβάλλεται και τα ποσοστά α-έλικας υποχωρούν δραστικά υπέρ της β-πτυχής. Οι τιμές στροφής και αδόμητων περιοχών δεν δείχνουν να μεταβάλλονται σε pH 11. Οι τιμές των ποσοστών για τα δυο pH είναι εν γένει παρόμοιες για τα τρία προγράμματα. Οι τιμές του NRMSD είναι μέσα σε αποδεκτά πλαίσια. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SMP56. H(r): regular helix. H(d): distorted helix. S(r): regular strand. S(d): distorted strand. Trn: turn. Unrd: unordered.

SAMPLE:	: Z8-010 DEC2008						
PROGRAM:	: SELCON3						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd	
Fractions	: .253	.195	.011	.053	.188	.319	
RMSD(Exp-Calc):	1.535						
NRMSD(Exp-Cal):	.368						
SAMPLE:	: Z8-010 DEC2008						
PROGRAM:	: CONTINLL						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd	
Fractions	: .247	.210	.001	.045	.179	.318	
RMSD(Exp-Calc):	.079						
NRMSD(Exp-Cal):	.019						
SAMPLE:	: Z8-010 DEC2008						
PROGRAM:	: CDSSTR						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd	
Fractions	: .295	.202	.035	.043	.139	.280	
RMSD(Exp-Calc):	.442						
NRMSD(Exp-Cal):	.106						

A

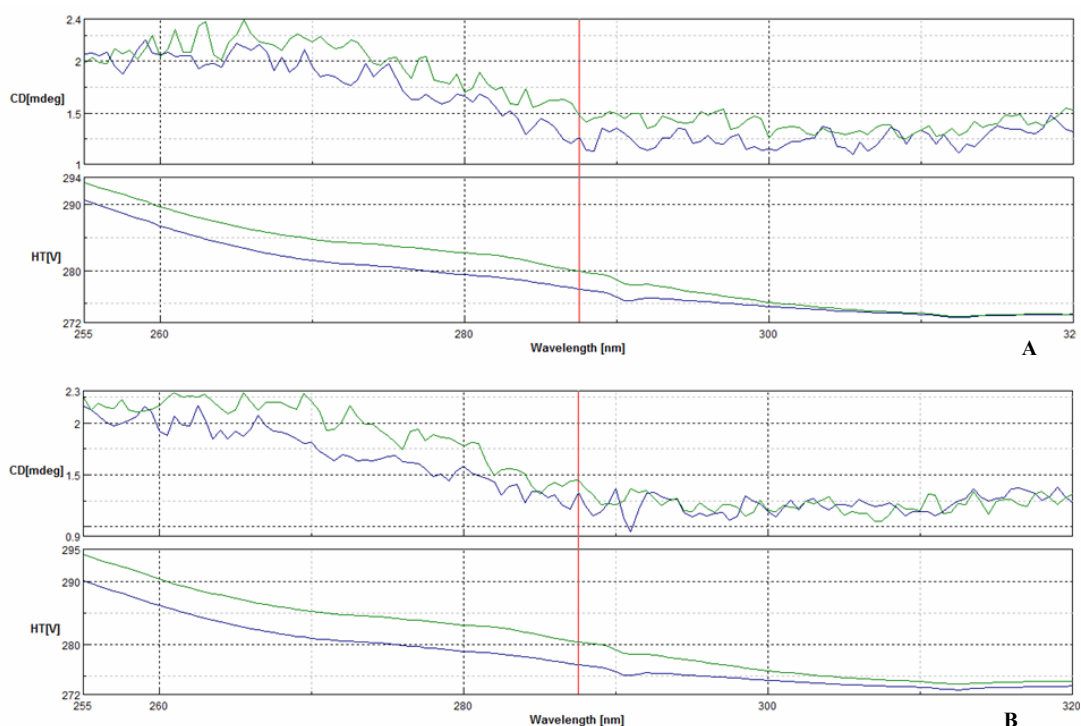
SAMPLE:	: Z11-012 DEC2008						
PROGRAM:	: SELCON3						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd	
Fractions	: .196	.170	.073	.066	.195	.319	
RMSD(Exp-Calc):	1.194						
NRMSD(Exp-Cal):	.362						
SAMPLE:	: Z11-012 DEC2008						
PROGRAM:	: CONTINLL						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd	
Fractions	: .191	.173	.053	.062	.196	.326	
RMSD(Exp-Calc):	.129						
NRMSD(Exp-Cal):	.039						
SAMPLE:	: Z11-012 DEC2008						
PROGRAM:	: CDSSTR						
Ref. Prot. Set:	SMP56						
Structure	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd	
Fractions	: .215	.189	.066	.058	.174	.294	
RMSD(Exp-Calc):	.283						
NRMSD(Exp-Cal):	.086						

B



Εικ. 4.20. Σύγκριση των κανονικοποιημένων φασμάτων μοριακής ελλειπτικότητας για την πρωτεΐνη HprZ-HT στις δυο τιμές pH (**A**) και των υπολογισμένων φασμάτων από το πρόγραμμα CDSSTR κατά την ανασύσταση του πειραματικού φάσματος (**B**). Σε pH 11 η ελλειπτικότητα που εμφανίζεται στο pH 8 έχει υποχωρήσει σε ένα βαθμό. Στο A, με μπλε καμπύλη απεικονίζεται η ελλειπτικότητα σε pH 8, με πράσινη σε pH 11. Exptl: experimental. Calc: calculated.

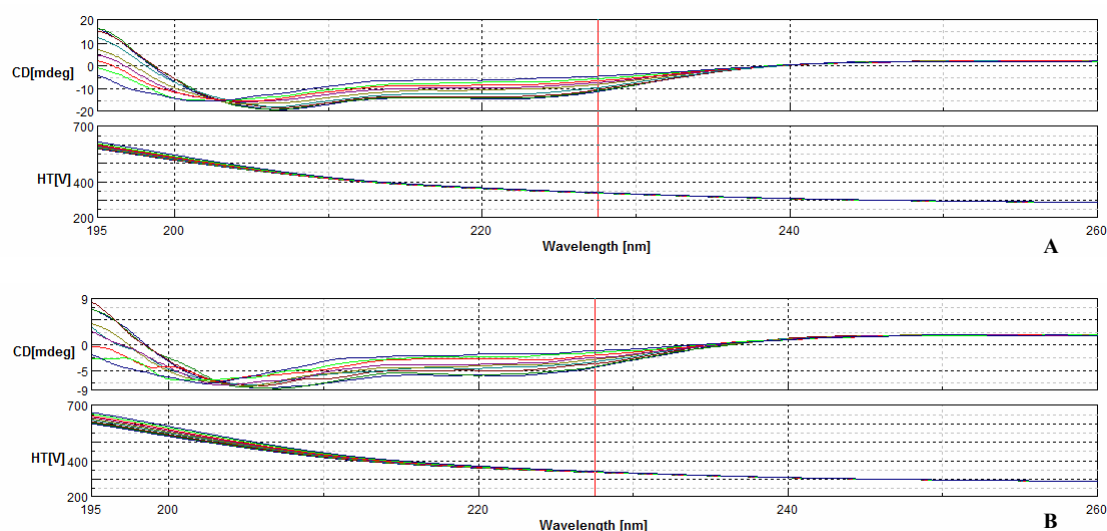
Η πρωτεΐνη HprZ-HT περιέχει έξι κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στο πεδίο 250 - 270 nm) και ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στο πεδίο 280 – 300 nm). Στο εγγύς υπεριώδες, η πρωτεΐνη έδωσε ένα αμυδρό σήμα σε όλο το εύρος του φάσματος και για τις δυο τιμές pH με κάποιες μικρές διαφοροποιήσεις (βλέπε εικόνα 4.21). Αυτό σημαίνει πιθανόν ότι η πρωτεΐνη έχει λάβει μια εκτεταμένη διαμόρφωση και δεν παράγει οργανωμένο περιβάλλον ώστε να διεγερθούν τα χρωμογόνα κατάλοιπα στο εγγύς υπεριώδες.



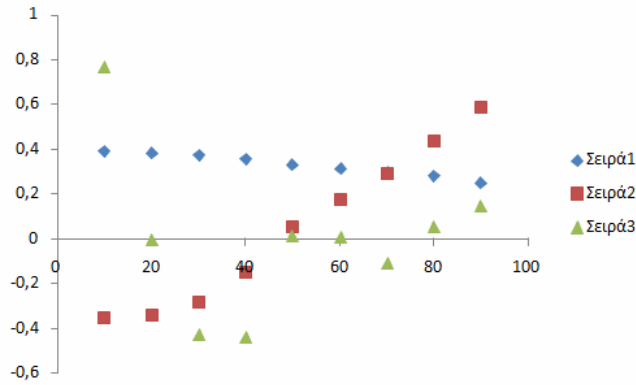
Διαλύτης Δείγμα

Εικ. 4.21. Τα φάσματα ελλειπτικότητας της πρωτεΐνης HprZ-HT συναρτήσει του μήκους κύματος στο εγγύς υπεριώδες. Το φάσμα **A** αντιστοιχίζεται σε pH 8, το **B** σε pH 11. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση του εκάστοτε διαλύτη, με πράσινη η απορρόφηση του δείγματος. Η πρωτεΐνη HprZ-HT περιέχει έξι κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στα 250 – 270 nm) και ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στα 280 – 300 nm). Το σήμα που ελήφθη και για τις δυο τιμές pH είναι αμυδρό. Τα δείγματα που μετρήθηκαν είναι συγκέντρωσης 0.4 και 0.5 mg/ml για το pH 8 και 11 αντίστοιχα.

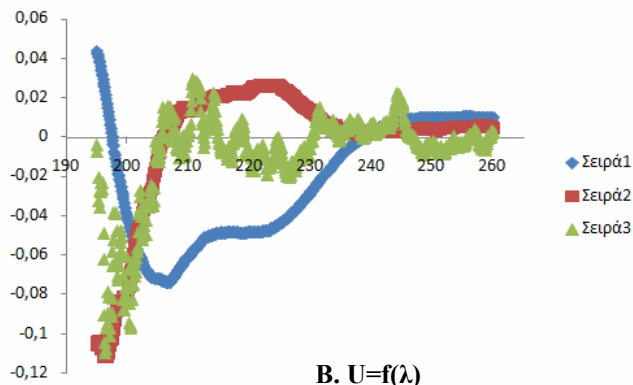
Η θερμική αποδιάταξη της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε pH 8 και 11 ανά 10 °C από τους 10 έως τους 90 °C, συνελέγησαν δηλαδή 9 φάσματα και η υπέρθεση των επιμέρους φασμάτων φανέρωσε την ύπαρξη ενός ισοδιχρωικού σημείου στα 202 nm (Εικ. 4.22). Από την ανάλυση αποσύνθεσης ιδιαζουσών τιμών (SVD) επί του αρχικού πίνακα [ο αρχικός πίνακας και για τις δυο τιμές pH αποτελούνταν από 9 στήλες, μια για κάθε θερμοκρασία της θερμικής αποδιάταξης και σειρές όσες και τα εξεταζόμενα μήκη κύματος, από τα 260 έως τα 195 nm με υποδιαιρέσεις του 0,1 nm δηλ συνολικά 652 σειρές] προέκυψε ότι κατά την αποδιάταξη υπάρχουν δυο μορφές της πρωτεΐνης, η αναδιπλωμένη και η αποδιπλωμένη, χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων καταστάσεων. Ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου της καμπύλης ελλειπτικότητας της αποδιάταξης σε μήκος κύματος 222 nm συναρτήσε της θερμοκρασίας, φανέρωσε δυο τιμές T_M για την πρωτεΐνη, 45 °C & 75 °C για το pH 8 και 36 °C & 72 °C για το pH 11 (Εικ. 4.23, 4.24). Η ύπαρξη δυο τιμών T_M πιθανόν σημαίνει ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από δυο διαφορετικές επικράτειες οι οποίες αποδιατάσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



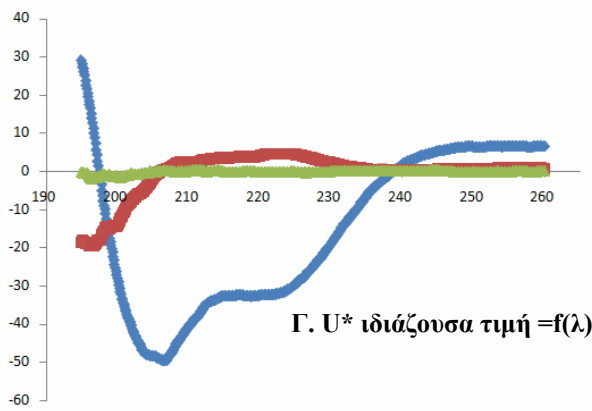
Εικ. 4.22. Η υπέρθεση των φασμάτων της θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης HprZ-HT σε pH 8 (A) και 11 (B). Τα εννιά φάσματα από τους 10 °C έως τους 90 °C και στις δυο τιμές pH τέμνονται σε ένα ισοδιχρωικό σημείο. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν δυο μορφές κατά την αποδιάταξη του μορίου της πρωτεΐνης με την μια να περνάει στην άλλη απευθείας χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσης μορφής. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής χάνονται προοδευτικά με την άνοδο της θερμοκρασίας.



A. $V=f(T)$



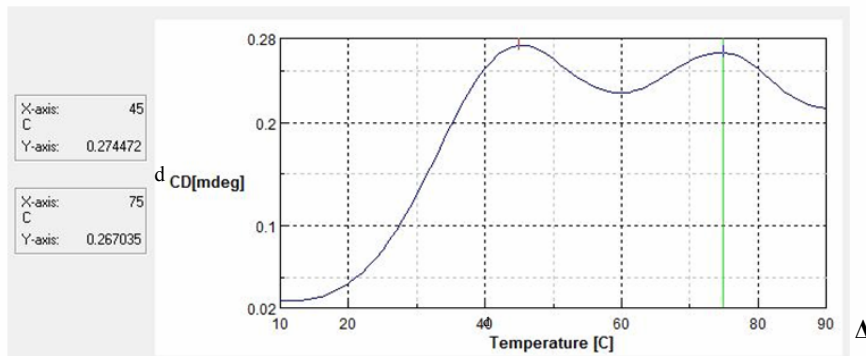
B. $U=f(\lambda)$



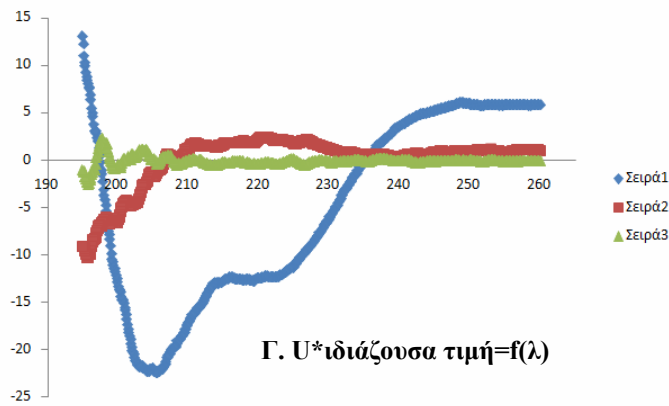
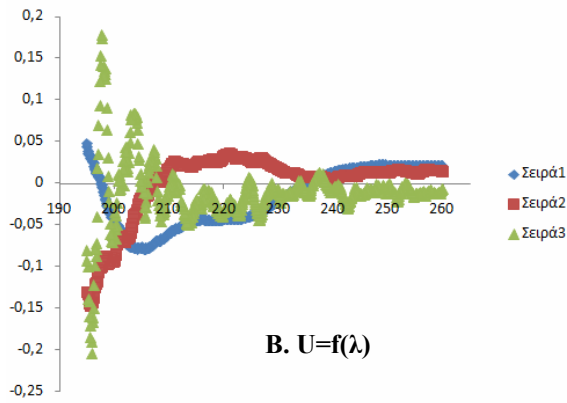
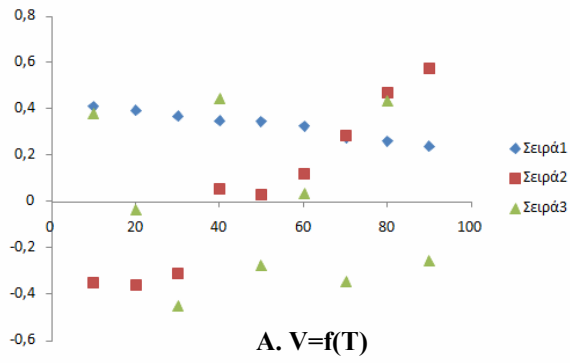
Γ. $U \cdot \text{ιδιόζουσα τιμή} = f(\lambda)$

Πίνακας 4.5

Singular and eigenvalues for the SVD (U LAMBDA V)			
	Singular values	Eigen values	Cumulative % of Eigenvalues
	667,5887	445674,7	0,934748
	174,7391	30533,76	0,998789
	16,59593	275,4248	0,999367
	9,35448	87,50629	0,99955
	8,288279	68,69558	0,999694
	7,354538	54,08923	0,999808
	6,565873	43,11069	0,999898
	5,685695	32,32713	0,999966
	4,036361	16,29221	1
Sum of eigenvalues:		476785,9	

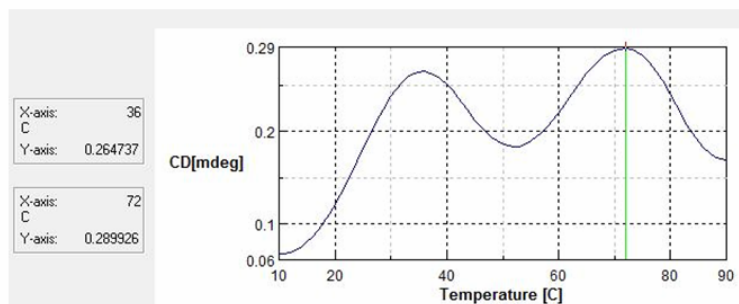


Εικ. 4.23



Πίνακας 4.6

Singular and eigenvalues for the SVD (ULAMBDA V)			
	Singular values	Eigen values	Cumulative % of Eigenvalues
	283,0169	80098,57	0,937481
	69,47128	4826,258	0,993968
	12,88495	166,022	0,995911
	11,75313	138,136	0,997528
	9,116429	83,10928	0,998501
	7,069638	49,97978	0,999086
	5,945863	35,35328	0,999499
	5,202094	27,06178	0,999816
	3,963434	15,70881	1
Sum of eigenvalues		85440,2	



Εικ. 4.24

Εικ. 4.23, 4.24. Η αποσύνθεση ιδιαίτερων τιμών και ο υπολογισμός της τιμής T_M για την πρωτεΐνη HrpZ-HT σε pH 8 (4.23) και 11 (4.24). Και στις δυο τιμές η ύπαρξη δυο βασικών ιδιαίτερων τιμών που απαιτούνται για την ανασύσταση του αρχικού φάσματος (τονισμένα ποσοστά πινάκων 4.5, 4.6) υποδηλώνει την παρουσία δυο καταστάσεων κατά την αποδιάταξη, την αναδιπλωμένη και την αποδιπλωμένη. Το συμπέρασμα απεικονίζεται γραφικά στα διαγράμματα $V=f(T)$, $U=f(\lambda)$ και $U_x(\text{ιδιάζουσα τιμή})=f(\lambda)$. Στο διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε συνάρτηση της θερμοκρασίας απεικονίζονται οι δυο τιμές T_M της πρωτεΐνης ως μέγιστα και είναι ίσες με 45°C και 75°C για το pH 8 (Εικ. 4.23Δ) και 36°C και 72°C για το pH 11 (Εικ. 4.24Δ). Η ύπαρξη δυο τιμών T_M πιθανόν σημαίνει ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από δυο διαφορετικές επικράτειες οι οποίες αποδιάσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

4.3.2.4 Η πρωτεΐνη HrpE

Η πρωτεΐνη HrpE-HT υπεβλήθη σε πειράματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες και τα ενδεικτικά ποσοστά των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της έτσι όπως προέκυψαν μετά από επεξεργασία από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL, CDSSTR στις δυο τιμές pH 8 & 11 ακολουθούν στον πίνακα 4.7. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε και για τα δυο pH ήταν το SMP56. Η πρωτεΐνη και στις δυο τιμές pH επιδεικνύει ισχυρά τα χαρακτηριστικά ελάχιστα της α-έλικας στα 222 και 208 nm (Εικ. 4.25). Στο pH 11 παρατηρείται πτώση των ποσοστών α-έλικας και αύξηση των ποσοστών β-κλώνου και στροφής. Η παράμετρος καλής προσαρμογής NRMSD για τις αναλύσεις του προγράμματος SELCON3 ήταν μικρότερη του 0.3 ενώ για τα άλλα δυο προγράμματα η τιμή κρατήθηκε κάτω από το όριο του 0.1 που πρακτικά πρέπει να επιδιώκεται στη βέλτιστη αναπαράσταση δεδομένων.

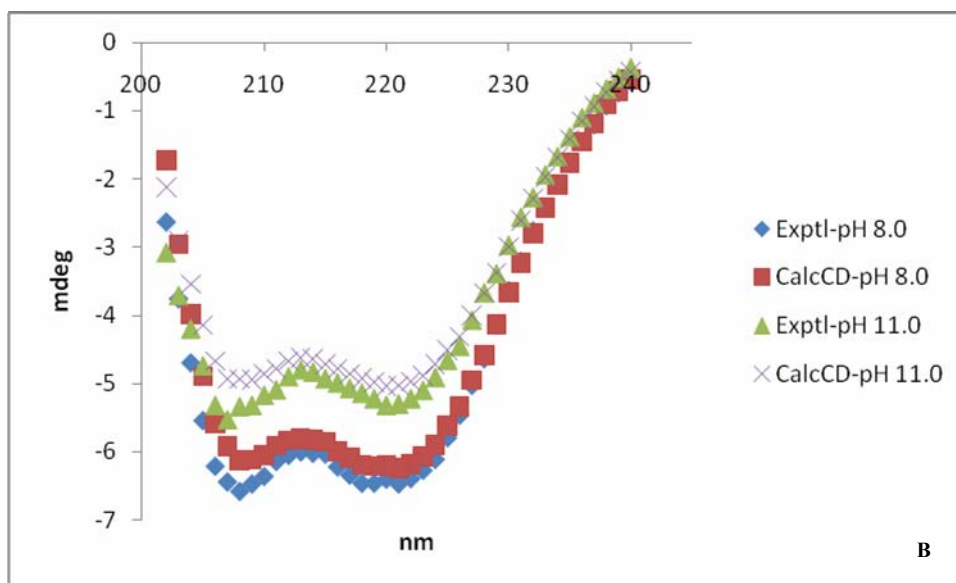
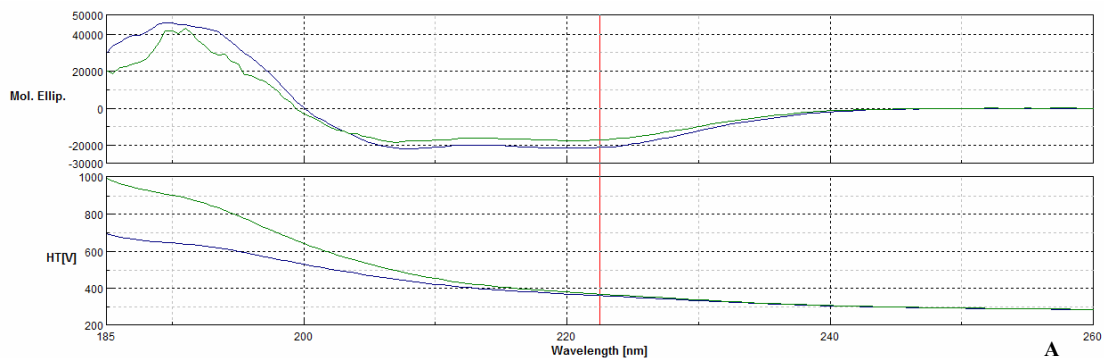
Πίνακας 4.7 Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής για την πρωτεΐνη HrpE-HT σε pH 8 (**A**) και 11 (**B**) από τα προγράμματα SELCON3, CONTINLL και CDSSTR. Σε pH 8 η παρουσία της α-έλικας είναι ισχυρότατη εις βάρος του β-κλώνου. Σε pH 11 η α-έλικα εξακολουθεί να εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά τα οποία όμως παρουσιάζονται σχετικά χαμηλότερα σε σχέση με το pH 8. Οι τιμές των ποσοστών για κάθε pH για τα τρία προγράμματα παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην περίπτωση του pH 8 (το SELCON3 υποτιμά τα ποσοστά α-έλικας και υπερεκτιμά τα ποσοστά στροφής, το αντίθετο συμβαίνει στις εκτιμήσεις του CDSSTR) ενώ για το pH 11 είναι σχετικά επαναλήψιμες. Οι τιμές του NRMSD είναι μέσα σε αποδεκτά πλαίσια. Το σετ αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SMP56. H(r): regular helix. H(d): distorted helix. S(r): regular strand. S(d): distorted strand. Trn: turn. Unrd: unordered.

SAMPLE:	:	E8-003	DEC2008				
PROGRAM:	:	SELCON3					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	:	.273	.159	.049	.049	.215	.296
RMSD(Exp-Calc):	:	1.507					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.290					
SAMPLE:	:	E8-003	DEC2008				
PROGRAM:	:	CONTINLL					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd
Fractions	:	.353	.194	.007	.037	.131	.278
RMSD(Exp-Calc):	:	.081					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.016					
SAMPLE:	:	E8-003	DEC2008				
PROGRAM:	:	CDSSTR					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	:	.397	.205	.054	.039	.094	.206
RMSD(Exp-Calc):	:	.457					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.088					

A

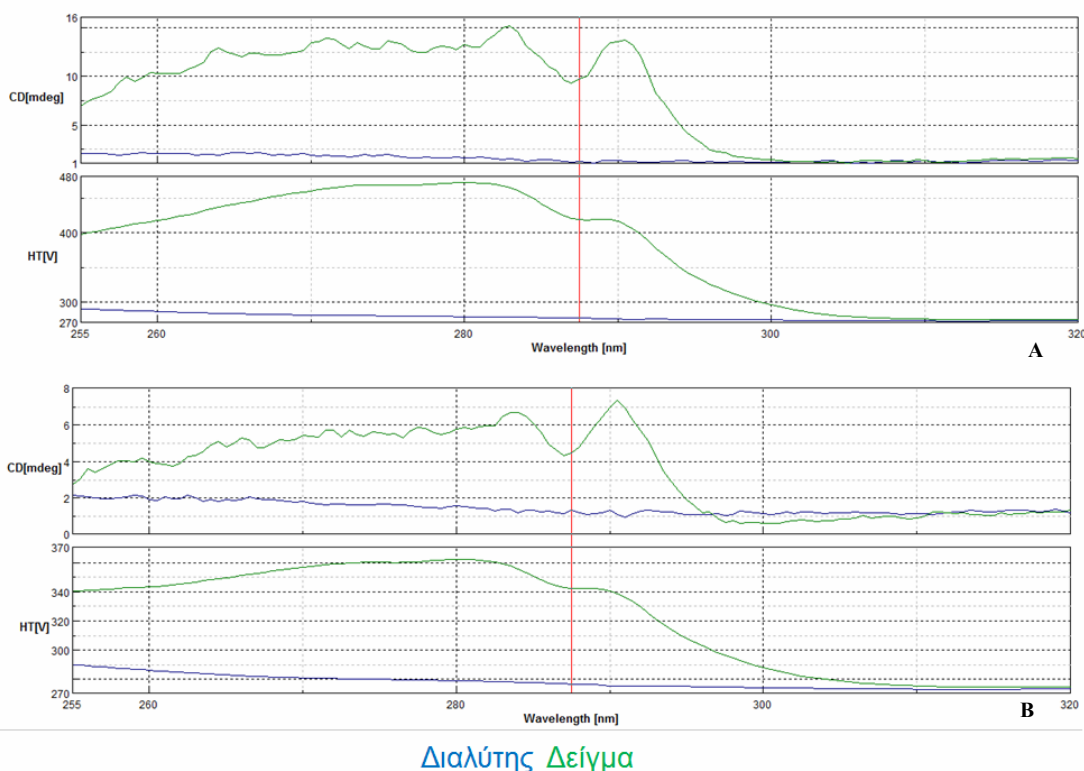
SAMPLE:	:	E11-013	DEC2008				
PROGRAM:	:	SELCON3					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	:	.283	.202	.035	.049	.204	.265
RMSD(Exp-Calc):	:	1.120					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.268					
SAMPLE:	:	E11-013	DEC2008				
PROGRAM:	:	CONTINLL					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Turn	Unrd
Fractions	:	.253	.176	.038	.052	.190	.292
RMSD(Exp-Calc):	:	.068					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.016					
SAMPLE:	:	E11-013	DEC2008				
PROGRAM:	:	CDSSTR					
Ref. Prot. Set:	:	SMP56					
Structure	:	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	Trn	Unrd
Fractions	:	.289	.187	.075	.061	.146	.245
RMSD(Exp-Calc):	:	.335					
NRMSD(Exp-Cal):	:	.080					

B



Εικ. 4.25. Σύγκριση των κανονικοποιημένων φασμάτων μοριακής ελλειπτικότητας για την πρωτεΐνη HrpE-HT στις δυο τιμές pH (**A**) και των υπολογισμένων φασμάτων από το πρόγραμμα CDSSTR κατά την ανασύσταση του πειραματικού φάσματος (**B**). Σε pH 11 στα ανασυσταθέντα φάσματα η ελλειπτικότητα που εμφανίζεται στο pH 8 έχει υποχωρήσει ως ένα βαθμό. Στο A, με μπλε καμπύλη απεικονίζεται η ελλειπτικότητα σε pH 8, με πράσινη σε pH 11. Exptl: experimental. Calc: calculated.

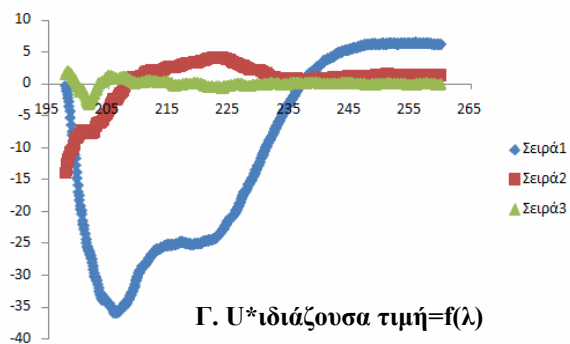
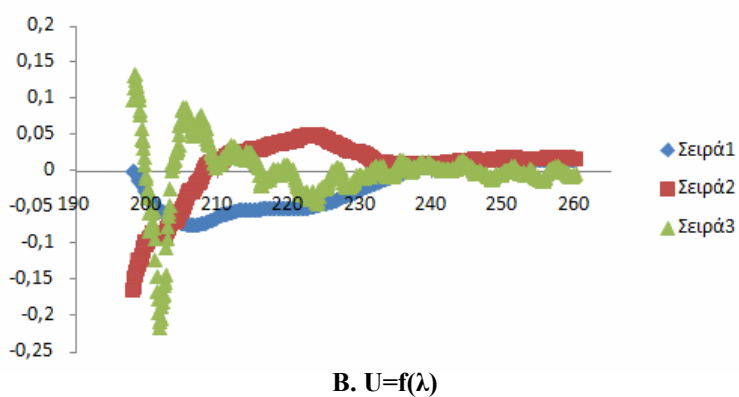
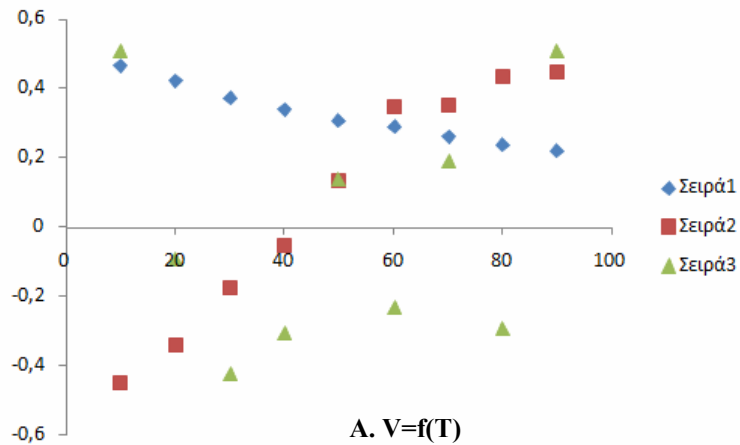
Η πρωτεΐνη HrpE-HT περιέχει τέσσερα κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στο πεδίο 250 – 270 nm), ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στο πεδίο 280 – 300 nm) και ένα κατάλοιπο τυροσίνης (σήμα στο πεδίο 270 – 290 nm). Στο εγγύς υπεριώδες, η πρωτεΐνη έδωσε ένα πολύ ισχυρό σήμα σε όλο το εύρος φάσματος από τα 300 nm και κάτω με την εμφάνιση δυο ευδιάκριτων κορυφών. Το σήμα στο pH 11 είναι συγκρίσιμο με το σήμα στο pH 8 (Εικ. 4.26).



Διαλύτης Δείγμα

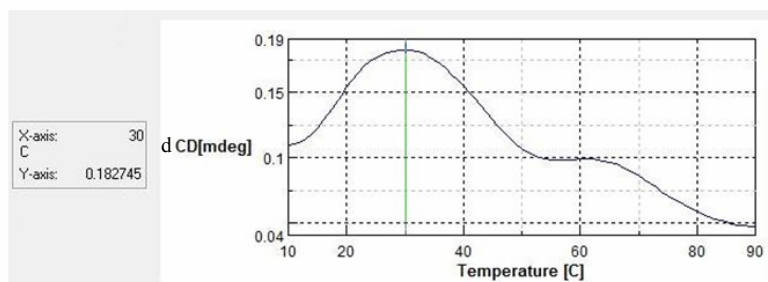
Εικ. 4.26. Τα φάσματα ελλειπτικότητας της πρωτεΐνης HrpE-HT συναρτήσει του μήκους κύματος στο εγγύς υπεριώδες. Το φάσμα **A** αντιστοιχίζεται σε pH 8, το **B** σε pH 11. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση του εκάστοτε διαλύτη, με πράσινη η απορρόφηση του δείγματος. Η πρωτεΐνη HrpZ-HT περιέχει τέσσερα κατάλοιπα φαινυλαλανίνης (σήμα στα 250-270 nm), ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (σήμα στα 280-300 nm) και ένα κατάλοιπο τυροσίνης (σήμα στα 270-290 nm). Και στις δυο τιμές pH το σήμα είναι εξαιρετικά έντονο σε όλο το εύρος φάσματος. Παρουσιάζεται εξασθενημένο στο pH 11 σε σχέση με το pH 8 αλλά αν τεθεί υπόψη ότι η συγκέντρωση του δείγματος του pH 11 ήταν 1.57 mg/ml ενώ του pH 8 ήταν ίση με 3.29 mg/ml, το σήμα εξισορροπείται.

Από την ανάλυση αποσύνθεσης ιδιαζουσών τιμών (SVD) επί του αρχικού πίνακα της θερμικής αποδιάταξης της πρωτεΐνης σε pH 11 [ο αρχικός πίνακας αποτελούνταν από 9 στήλες, μια για κάθε θερμοκρασία της θερμικής αποδιάταξης και σειρές όσες και τα εξεταζόμενα μήκη κύματος, από τα 260 έως τα 198 nm με υποδιαίρεσεις του 0,1 nm δηλ συνολικά 621 σειρές] προέκυψε ότι κατά την αποδιάταξη υπάρχουν δυο μορφές της πρωτεΐνης, η αναδιπλωμένη και η αποδιπλωμένη, χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων καταστάσεων. Ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου της καμπύλης ελλειπτικότητας της αποδιάταξης, φανέρωσε την τιμή T_M των 30 °C (Εικ. 4.27).



Πίνακας 4.8

Singular and eigenvalues for the SVD (U LAMBDA V')			
	Singular values	Eigen values	Cumulative % of Eigenvalues
	470,7013	221559,8	0,966206
	84,63062	7162,342	0,997441
	15,10469	228,1516	0,998436
	11,72172	137,3986	0,999035
	8,949336	80,09061	0,999384
	7,368709	54,29787	0,999621
	6,756859	45,65514	0,99982
	5,167678	26,70489	0,999936
	3,82065	14,59737	1
Sum of eigenvalues		229309	



Εικ. 4.27

Εικ. 4.27. Η αποσύνθεση ιδιάζουσών τιμών και ο υπολογισμός της τιμής T_M για την πρωτεΐνη HrpE-HT σε pH 11. Η ύπαρξη δυο βασικών ιδιάζουσών τιμών που απαιτούνται για την ανασύσταση του αρχικού φάσματος (τονισμένα ποσοστά πίνακα 4.8) υποδηλώνει την παρουσία δυο καταστάσεων κατά την αποδιάταξη, την αναδιπλωμένη και την αποδιπλωμένη. Το συμπέρασμα απεικονίζεται γραφικά στα διαγράμματα $V=f(T)$, $U=f(\lambda)$ και $Ux(\text{ιδιάζουσα τιμή})=f(\lambda)$. Στο διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της ελλειπτικότητας σε συνάρτηση της θερμοκρασίας απεικονίζεται η τιμή T_M της πρωτεΐνης ως μέγιστο και είναι ίση με 30°C (Δ).

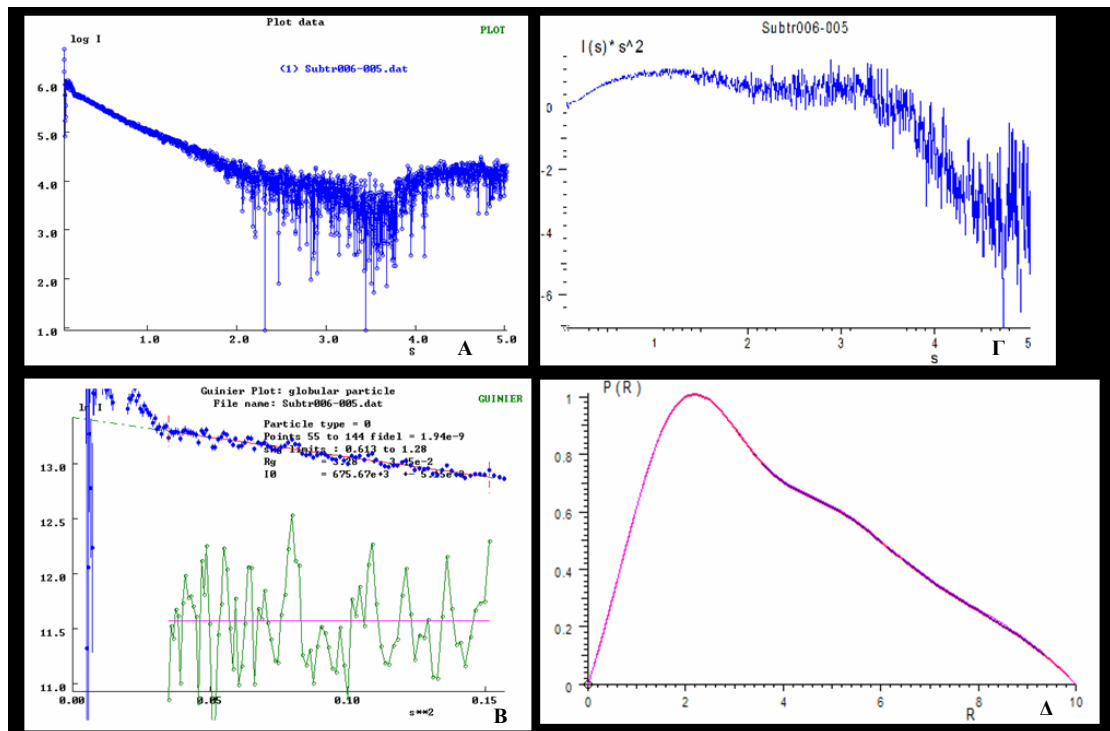
4.3.3 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες (Small-Angle X-ray scattering)

4.3.3.1 Η πρωτεΐνη HrpP

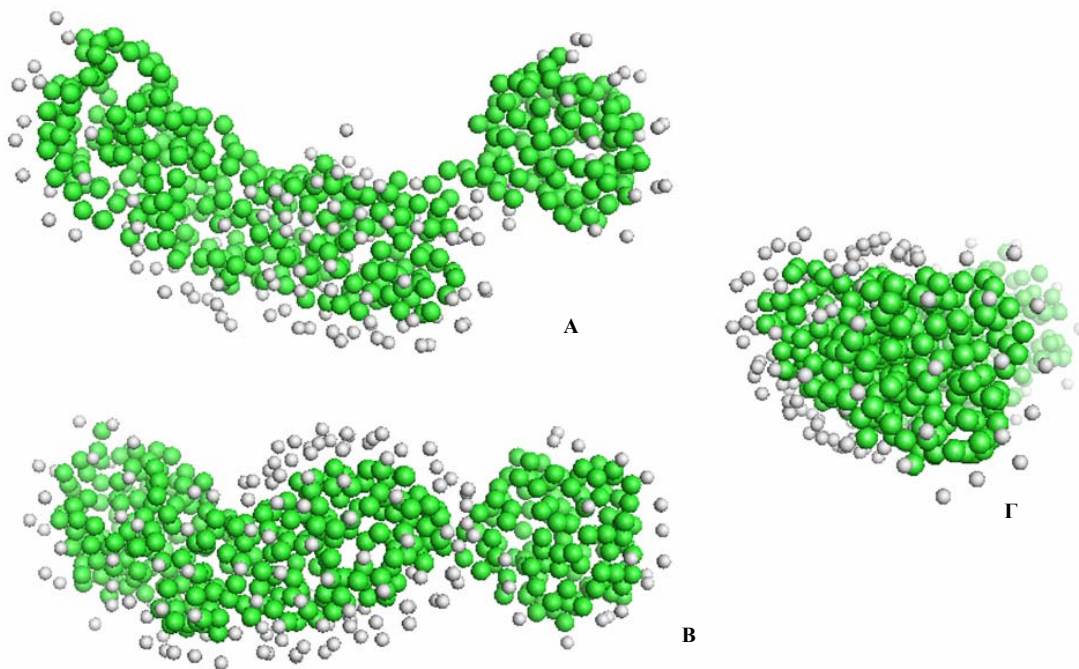
Δείγμα της πρωτεΐνης HT-HrpP²⁸ συγκέντρωσης 1 mg/ml υπεβλήθη σε SAXS και η πρωτογενής καμπύλης σκέδασης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 4.28A). Από την προσέγγιση Guinier προέκυψε η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας $R_g = 3.28$ nm όπως και η τιμή της έντασης της σκέδασης σε μηδενική γωνία $I_{(0)}=675.67 \times 10^3$ με βάση την οποία και σε σύγκριση με την τιμή της $I_{(0)}$ της BSA(=1075 $\times 10^3$) προέκυψε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ίσο με 42 kDa, όσο δηλαδή είχε προκύψει και από την ανάλυση μοριακής διήθησης (Εικ. 4.28B). Το διάγραμμα Kratky ως έκφραση του $I(s) \times s^2$ συναρτήσεως του s , φανέρωσε την ύπαρξη μιας μικρής κορυφής στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιροειδής (Εικ. 4.28Γ). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων που ακολούθησε στη συνέχεια (πρόγραμμα GNOM, ATSAS 2.1) υπολογίστηκε με σταθερή λύση για $D_{\max} = 10$ nm και επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι τιμές των R_g (μέγιστο της συνάρτησης κατανομής) και $I_{(0)}$, οι οποίες ήταν περίπου ίσες με τις τιμές της προσέγγισης Guinier (3.17 nm, 646.6×10^3 αντίστοιχα). Από την ασύμμετρη μορφή της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων (μέγιστο μετατοπισμένο στις μικρές αποστάσεις) προέκυψε ότι πρόκειται για επιμηκυμένο μόριο (Εικ. 4.28Δ). Το αρχείο που προέκυψε από τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε για την μοντελοποίηση *ab initio* του σκεδάζοντος σωματιδίου, με τη χρήση των προγραμμάτων DAMMIN (μοντελοποίηση ψευδών ατόμων) και GASBOR (μοντελοποίηση ψευδών καταλοίπων). Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνδυασμοί σημειακής συμμετρίας – ανισομετρίας σωματιδίου: P1 (καμία σημειακή συμμετρία, Εικ. 4.29, 4.30) P2 prolate (P2P, διπλή σημειακή συμμετρία, επιμήκης ανισομετρία, Εικ. 4.31). Για την παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου το πρόγραμμα DAMMIN στις παραπάνω σημειακές συμμετρίες εφαρμόστηκε σε 8 επαναλήψεις (slow mode), τα μοντέλα υπερτέθηκαν και προέκυψε το πιο πιθανό εξ αυτών με τιμές NSD²⁹ ίσες με 0.65 (P1) και 0.62 (P2P -prolate-).

²⁸ Εκφρασμένης από την πλασμιδιακή κατασκευή pET16b/HrpP της Δρ. Α. Ταμπακάκη και απομονωμένης από την κορυφή έκλουσης 96.6 ml της στήλης S100[^]1 (βλέπε παρ. 4.3.1.2)

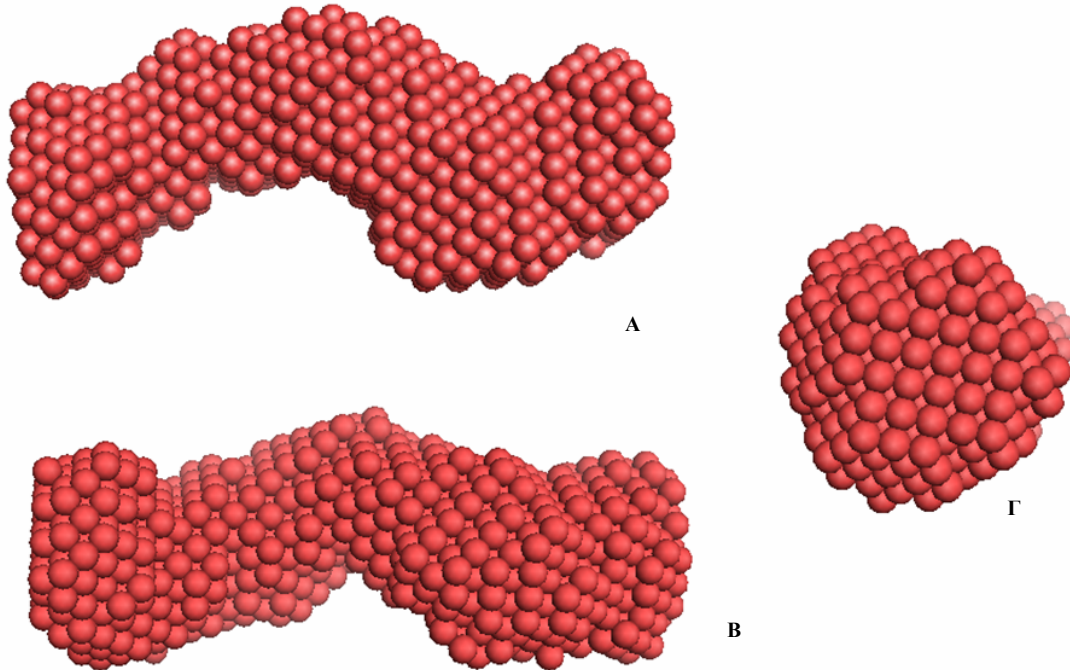
²⁹ Για ιδεατά υπερτιθέμενα αντικείμενα, η τιμή NSD τείνει στο 0. Πρακτικά γίνονται αποδεκτές τιμές κατώτερες του 0.7



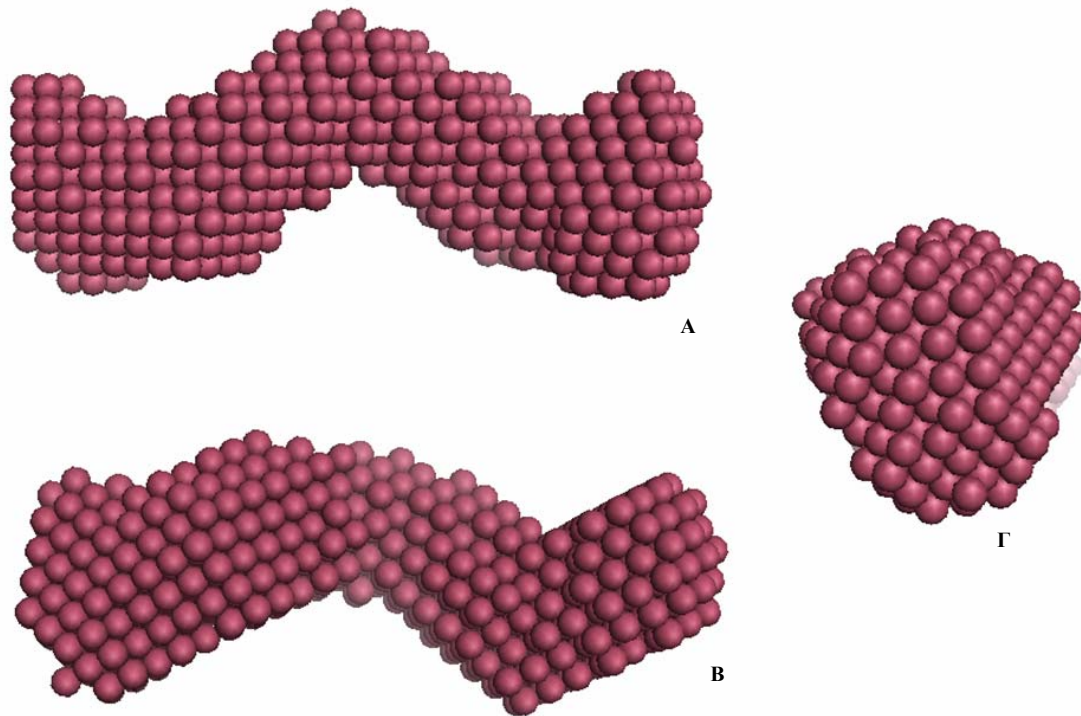
Εικ. 4.28. Α. Η τελική καμπύλη σκέδασης της πρωτεΐνης HT-HgrP, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. Β. Η προσέγγιση Guinier στις μικρές γωνίες της καμπύλης Α. Η κλίση της ευθείας δίνει τη γυροσκοπική ακτίνα R_g του σωματιδίου, 3.28nm, ενώ το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα του $\log I$ δίνει την τιμή της $I_{(0)}=675.67 \times 10^3$. Γ. Το διάγραμμα Kratky $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με μέγιστο στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει αναδιπλωμένο σκεδάζον σωματίδιο. Δ. Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για $D_{max}=10$ nm. Η κατανομή είναι ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εντοπίζεται στις μικρές αποστάσεις r , πράγμα που υποδηλώνει την επιμήκη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.



Εικ. 4.29. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HT-HgpP με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Το πρόγραμμα αυθόρμητα παρήγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **A**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Αποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.93$.



Εικ. 4.30. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HT-HgpP μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Και αυτό το πρόγραμμα αυθόρμητα παρήγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Αποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.71$.



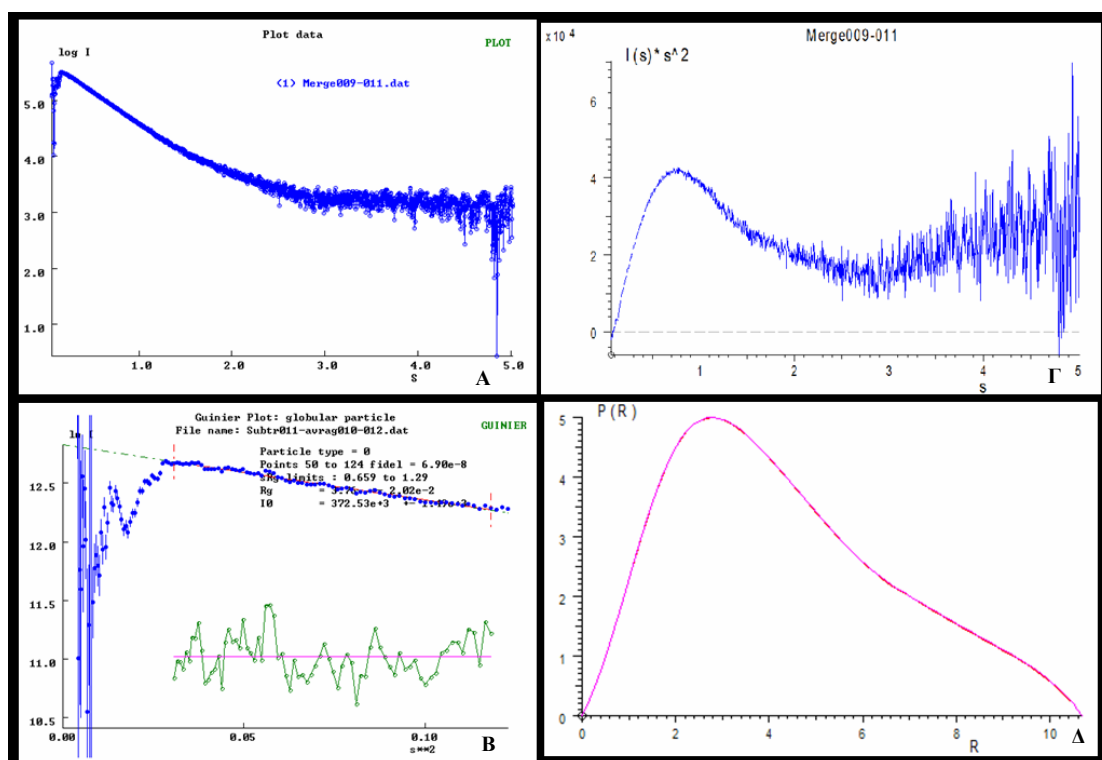
Εικ. 4.31. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HT-HrpP μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Εδώ δόθηκε ο περιορισμός της διπλής σημειακής συμμετρίας (P2) με επιμήκη ανισομετρία (prolate) και διεύθυνση ανισομετρίας κατά πλάτος του σωματιδίου (across). **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**, Αποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.71$.

4.3.3.2 Η πρωτεΐνη HrpZ

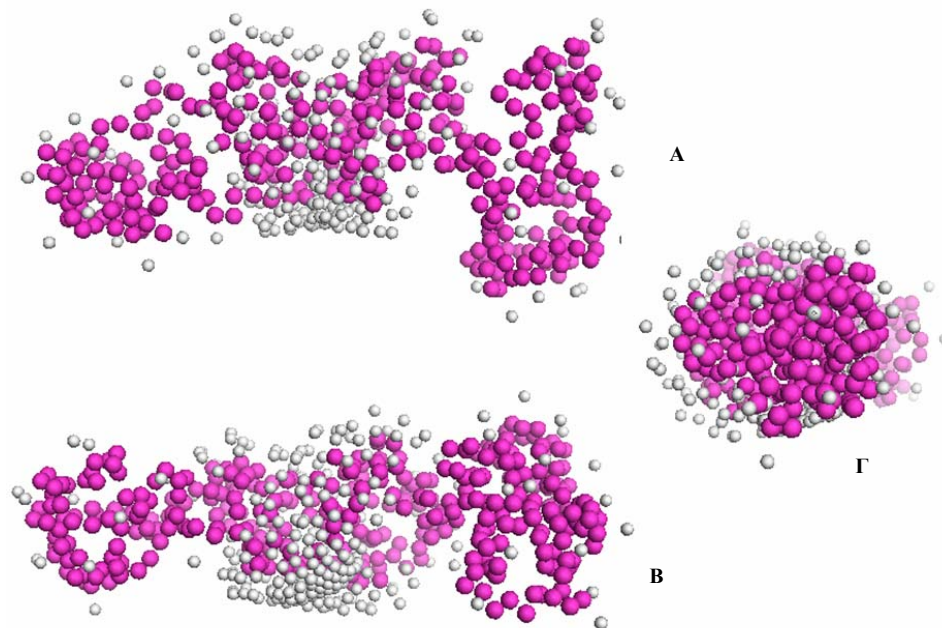
Δείγματα της πρωτεΐνης HrpZ-HT³⁰ σε συγκεντρώσεις 8,4 και 4,2 mg/ml υπεβλήθησαν σε SAXS. Οι καμπύλες σκέδασης συνδυάστηκαν μεταξύ τους και η υβριδική καμπύλη σκέδασης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 4.32A). Από την προσέγγιση Guinier στην οποία υπεβλήθη η καμπύλη των 4.2 mg/ml προέκυψε η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας $R_g = 3.7$ nm όπως και η τιμή της έντασης της σκέδασης σε μηδενική γωνία $I_{(0)} = 372.53 \times 10^3$ με βάση την οποία και σε σύγκριση με την τιμή της $I_{(0)}$ της BSA(= 1075×10^3) προέκυψε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ίσο με 23 kDa (Εικ. 4.32B), αρκετά χαμηλότερο τόσο από το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (36.2 kDa) όσο και από το εκλούμενο από τη στήλη μοριακής διήθησης (74.6 kDa) (η αρτιότητα του δείγματος που υποβλήθηκε σε SAXS ελέγχθηκε και

³⁰ Εκφρασμένης από την πλασμιδιακή κατασκευή pET26b/HrpZ της Δρ. Α. Ταμπακάκη και απομονωμένης από την κορυφή έκλυσης 84.5 ml της στήλης S100^{^1} (βλέπε παρ. 4.3.1.3)

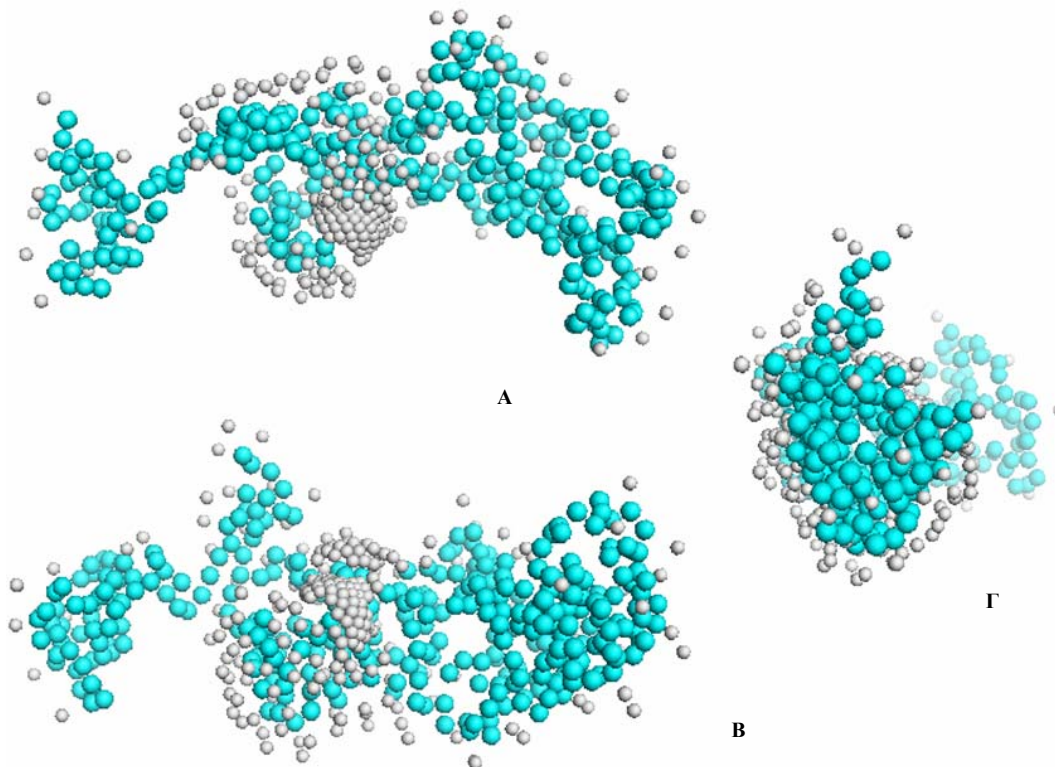
επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα (SDS-PAGE). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε επόμενο ανεξάρτητο πείραμα σκέδασης σε μικρές γωνίες). Το διάγραμμα Kratky ως έκφραση του $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s , φανέρωσε την ύπαρξη μιας κορυφής στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιροειδής (Εικ. 4.32Γ). Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων με σταθερή λύση για $D_{\max}=10.7$ nm και επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι τιμές των R_g (μέγιστο της συνάρτησης κατανομής) και $I(0)$ οι οποίες ήταν περίπου ίσες με τις τιμές της προσέγγισης Guinier (3.44 nm, 343.3×10^3 αντίστοιχα). Από την ασύμμετρη μορφή της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων με μέγιστο μετατοπισμένο προς τις μικρές αποστάσεις προέκυψε ότι πρόκειται για επιμηκυμένο σωματίδιο (Εικ. 4.32Δ). Το αρχείο που προέκυψε από τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε για την μοντελοποίηση *ab initio* του σκεδάζοντος σωματιδίου, με τη χρήση των προγραμμάτων DAMMIN και GASBOR. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνδυασμοί σημειακής συμμετρίας και ανισομετρίας σωματιδίου: P1 (καμία σημειακή συμμετρία, Εικ. 4.33, 4.35) P1P (καμία σημειακή συμμετρία, επιμήκης ανισομετρία, Εικ. 4.34, 4.36) P2 prolate (P2P, διπλή σημειακή συμμετρία, επιμήκης ανισομετρία, Εικ. 4.37). Για την παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου το πρόγραμμα DAMMIN στις παραπάνω σημειακές συμμετρίες εφαρμόστηκε σε 8 επαναλήψεις (slow mode), τα μοντέλα υπερτέθηκαν και προέκυψε το πιο πιθανό εξ αυτών με τιμές NSD ίσες με 0.65 (P1) και 0.62 (P2P).



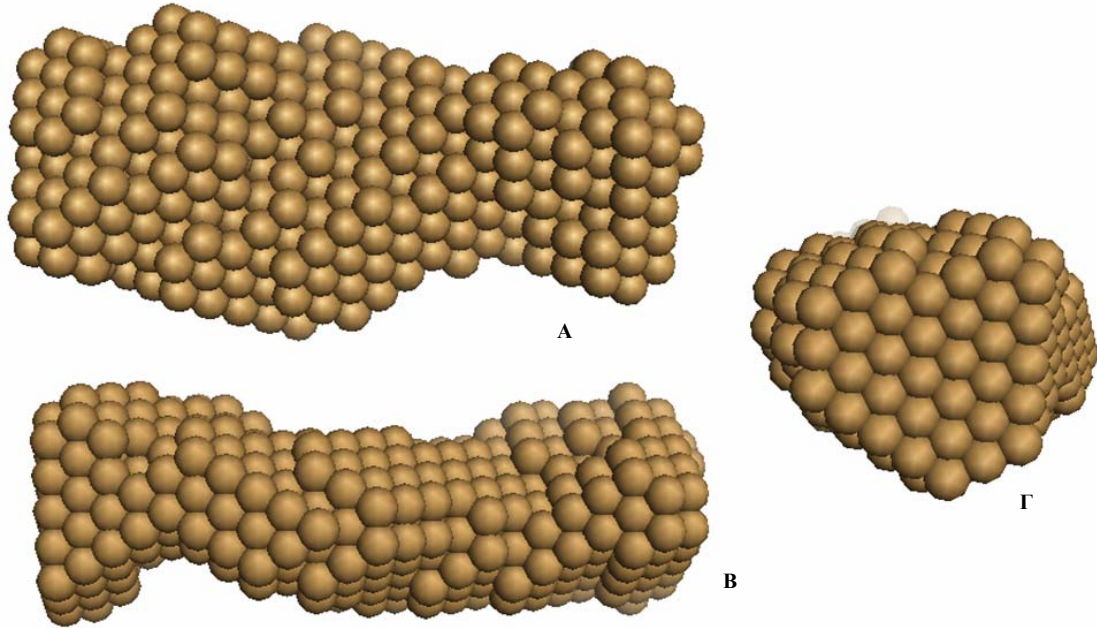
Εικ. 4.32. **A.** Η τελική καμπύλη σκέδασης της πρωτεΐνης HspZ-HT, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. **B.** Η προσέγγιση Guinier στις μικρές γωνίες της καμπύλης A. Η κλίση της ευθείας δίνει τη γυροσκοπική ακτίνα R_g του σωματιδίου, 3.7 nm, ενώ το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα του $\log I$ δίνει την τιμή της $I(0)=372.53 \times 10^3$. **Γ.** Το διάγραμμα Kratky $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με μέγιστο στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει αναδιπλωμένο σκεδάζον σωματίδιο. **Δ.** Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για $D_{\max}=10.7$ nm. Η κατανομή είναι ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εντοπίζεται στις μικρές αποστάσεις r , πράγμα που υποδηλώνει την επιμήκη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.



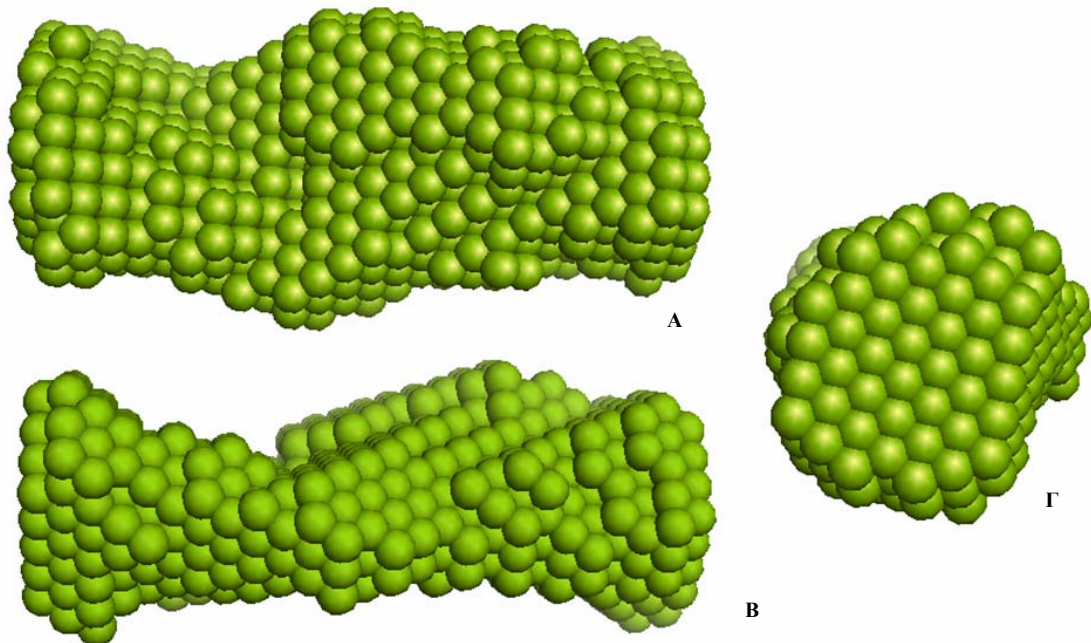
Εικ. 4.33. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HprZ-HT με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.7$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Το πρόγραμμα αυθόρμητα παράγαγε ένα επιμήκες σωματίδιο. **Β**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=2.72$.



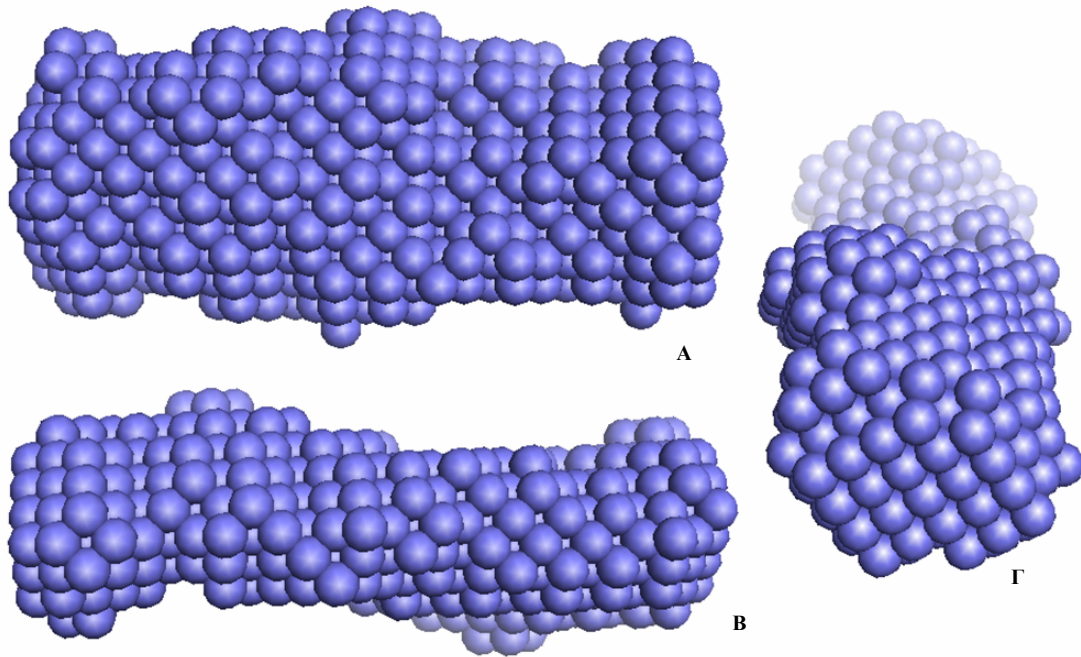
Εικ. 4.34. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HprZ-HT με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.7$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) αλλά δόθηκε ο περιορισμός της επιμήκους ανισομετρίας (prolate). **Β**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=2.55$.



Εικ. 4.35. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HrpZ-HT μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.7$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Και αυτό το πρόγραμμα αυθόρμητα παράγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=2.67$.



Εικ. 4.36. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HrpZ-HT μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.7$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) αλλά δόθηκε ο περιορισμός της επιμήκου ανισομετρίας. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=2.67$.

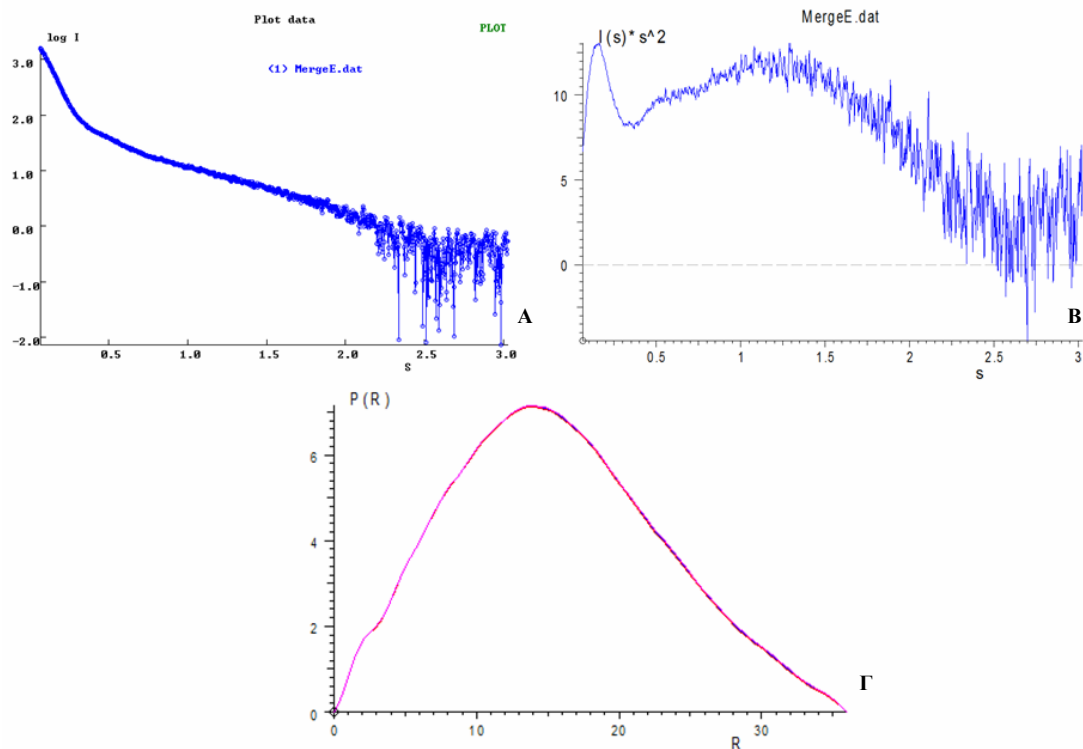


Εικ. 4.37. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HrpZ-HT μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.7$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Εδώ δόθηκε ο περιορισμός της διπλής σημειακής συμμετρίας (P2) με επιμήκη ανισομετρία (prolate) και διεύθυνση ανισομετρίας κατά πλάτος του σωματιδίου (across). **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**, Αποψη βάσης με προοπτική από πάνω. Η τιμή ασυμφωνίας των υπολογισμένων μοντέλων από τα πειραματικά δεδομένα χ κυμάνθηκε από 2.67 έως 2.7.

4.3.3.3 Η πρωτεΐνη HrpE

Δείγμα της πρωτεΐνης HrpE-HT³¹ σε συγκέντρωση 3.5 mg/ml υπεβλήθη σε SAXS. Η πρωτογενής καμπύλη σκέδασης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 4.38Α). Προσέγγιση Guinier δεν ήταν δυνατό να γίνει λόγω του μεγάλου μεγέθους του σκεδάζοντος σωματιδίου. Το διάγραμμα Kratky ως έκφραση του $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s , φάνερωσε την ύπαρξη μιας καλά ορισμένης κορυφής στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιροειδής (Εικ. 4.38Β). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων που ακολούθησε στη συνέχεια υπολογίστηκε με σταθερή λύση για $D_{max}=36$ nm. Από το ασύμμετρο, μετατοπισμένο προς τις μικρές αποστάσεις, πεπλατυσμένο μέγιστο της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων προέκυψε ότι πρόκειται για μεγάλο, πεπλατυσμένο σωματίδιο (Εικ. 4.38Γ). Λόγω της αδυναμίας εξαγωγής συμπεράσματος για την ύπαρξη μονοδιάσπαρτου δείγματος, άποψη που υποστηρίζεται και από την αδυναμία πειραμάτων αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης να καταλήξουν σε σταθερούς πληθυσμούς του μορίου, δεν επιχειρήθηκε μοντελοποίηση *ab initio* του σκεδάζοντος σωματιδίου. Από πειράματα δυναμικής σκέδασης λευκού φωτός (DLS) η πρωτεΐνη δε φάνηκε να περιέχει συσσωματώματα (aggregates) (μη παρουσιαζόμενα δεδομένα).

³¹ Απομονωμένης από την κορυφή έκλουσης 41 ml της στήλης S400 (βλέπε παρ. 4.3.1.4)



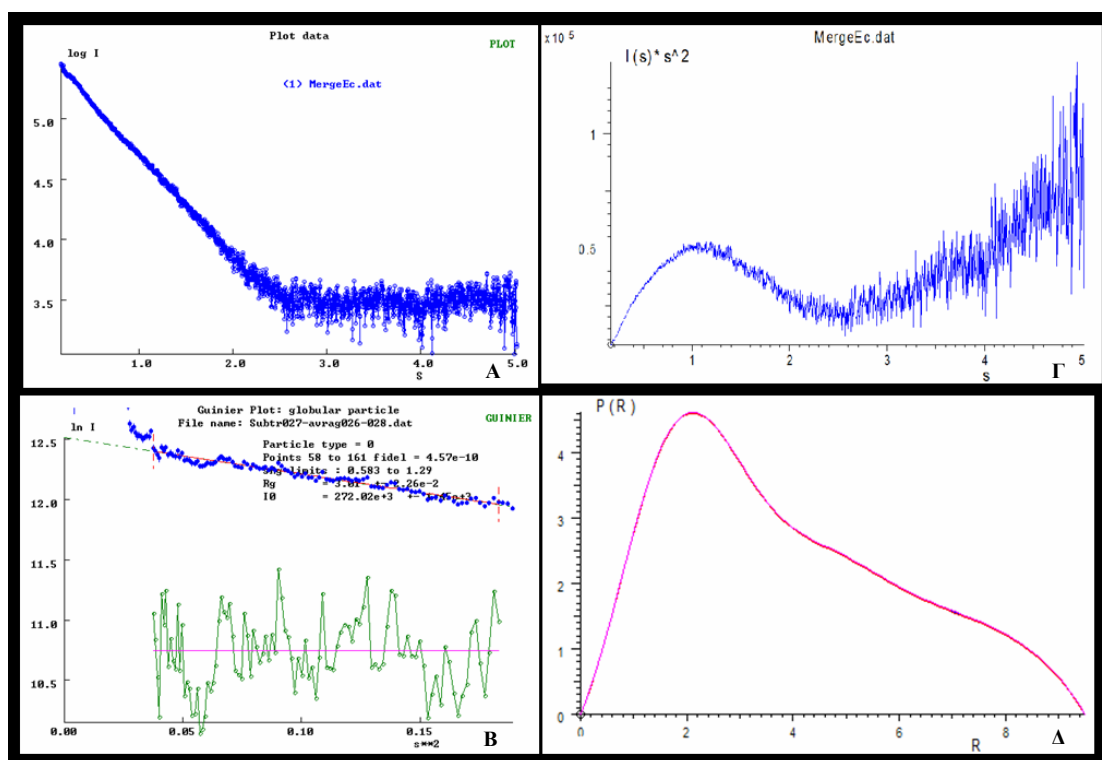
Εικ. 4.38. **A.** Η πρωτογενής καμπύλη σκέδασης της πρωτεΐνης HrpE-HT, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. **B.** Το διάγραμμα Kratky $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με μέγιστο στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει αναδιπλωμένο σκεδάζον σωματίδιο. **Γ.** Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για $D_{max}=36$ nm. Η κατανομή είναι ελαφρώς ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εμφανίζεται πεπλατυσμένο, πράγμα που υποδηλώνει την πεπλατυσμένη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.

4.3.3.4 Η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrpE (HrpEc)

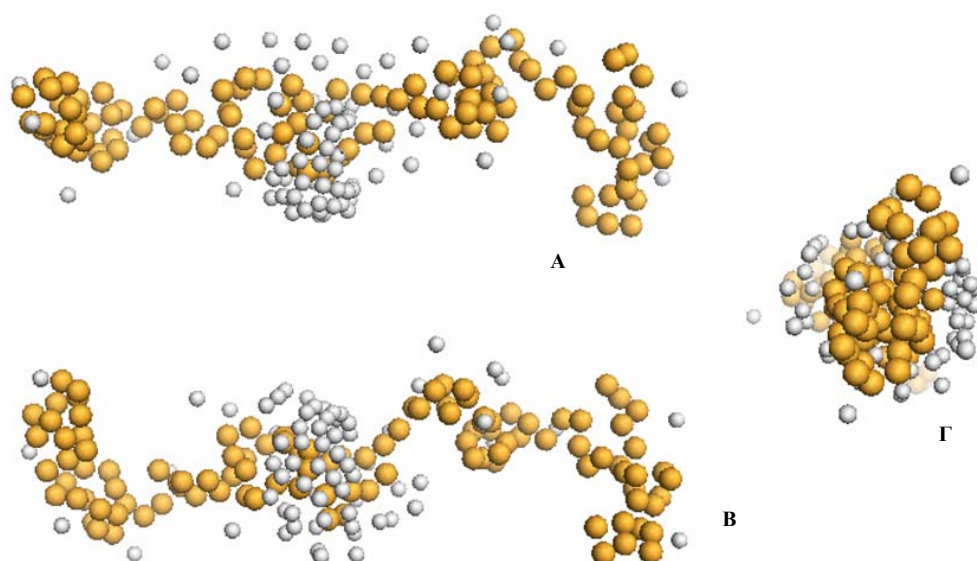
Δείγματα της πρωτεΐνης HT-HrpEc³² σε συγκεντρώσεις 5.2 και 2.6 mg/ml υπεβλήθησαν σε SAXS. Οι καμπύλες σκέδασης συνδυάστηκαν μεταξύ τους και η υβριδική καμπύλη σκέδασης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 4.39A). Από την προσέγγιση Guinier στην οποία υπεβλήθη η καμπύλη των 2,6 mg/ml προέκυψε η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας $R_g = 3$ nm όπως και η τιμή της έντασης της σκέδασης σε μηδενική γωνία $I_{(0)}=272.02 \times 10^3$ με βάση την οποία και σε σύγκριση με την τιμή της $I_{(0)}$ της BSA ($=1075 \times 10^3$) προέκυψε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης ίσο με 17 kDa, αρκετά όμοιο με το υπολογισμένο μοριακό βάρος έκλυσης από τη στήλη μοριακής διήθησης (15.4 kDa, μονομερές) (Εικ. 4.39B). Το διάγραμμα Kratky ως έκφραση του $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s , φανέρωσε την ύπαρξη μιας κορυφής στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιροειδής (Εικ. 4.39Γ). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων που ακολούθησε στη συνέχεια υπολογίστηκε με σταθερή λύση για $D_{max}=9.5$ nm και επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι τιμές των R_g (μέγιστο

³² Εκφρασμένης από την πλασμιδιακή κατασκευή pET16b/HrpE της υποψήφιας Δρ. Μ.Μπαστάκη και απομονωμένης από την κορυφή έκλυσης 119.6 ml της στήλης S100^{^1} (βλέπε παρ. 4.3.1.6)

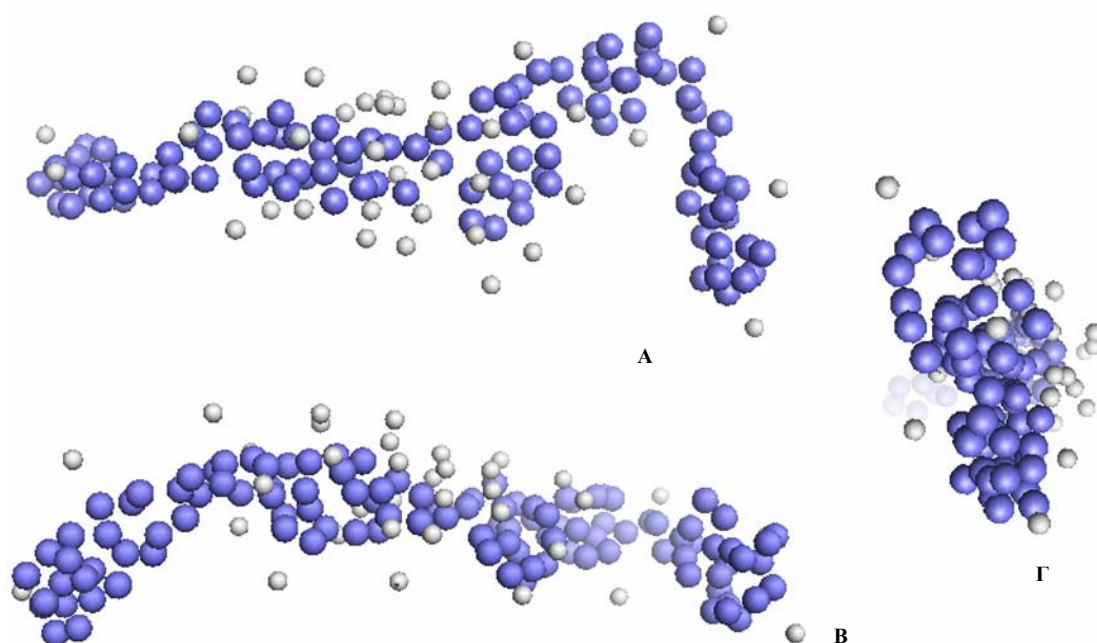
της συνάρτησης κατανομής) και $I_{(0)}$ οι οποίες ήταν περίπου ίσες με τις τιμές της προσέγγισης Guinier ($3,1 \text{ nm}$, 274×10^3 αντίστοιχα). Από την ασύμμετρη μορφή της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων προέκυψε ότι πρόκειται για επιμηκυσμένο μόριο (Εικ. 4.39Δ). Το αρχείο που προέκυψε από τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε για την μοντελοποίηση *ab initio* του σκεδάζοντος σωματιδίου, με τη χρήση των προγραμμάτων DAMMIN και GASBOR. Καθώς το σωματίδιο εμφανίζεται ως μονομερές δεν τέθηκε κάποια σημειακή συμμετρία κατά τη μοντελοποίηση *ab initio* παρά μόνο ο περιορισμός της ανισομετρίας. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικές ανασυστάσεις σχήματος, όπου στην πρώτη δεν ετέθη ούτε σημειακή συμμετρία ούτε ανισομετρία (P1, Εικ. 4.40, 4.42) ενώ στη δεύτερη ετέθη η επιμήκης ανισομετρία (P1 prolate, P1P, Εικ. 4.41, 4.43). Για την παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου το πρόγραμμα DAMMIN στις παραπάνω δυο συνθήκες εφαρμόστηκε σε 8 επαναλήψεις (slow mode), τα μοντέλα υπερτέθηκαν και προέκυψε το πιο πιθανό εξ αυτών με τιμές NSD ίσες με 0.53 (P1) και 0.54 (P1P). Το μοντέλο που προέκυψε από την μοντελοποίηση *ab initio* του προγράμματος GASBOR χωρίς καμία σημειακή συμμετρία και με επιμήκη ανισομετρία παρατίθεται στην Εικ. 4.44 μαζί με τα προβλεπόμενα μοντέλα από τον αλγόριθμο HMMSTR/Rosetta. Όπως φαίνεται, τα προβλεπόμενα μοντέλα μοιάζουν αρκετά με το μοντέλο της επεξεργασίας από τη σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες.



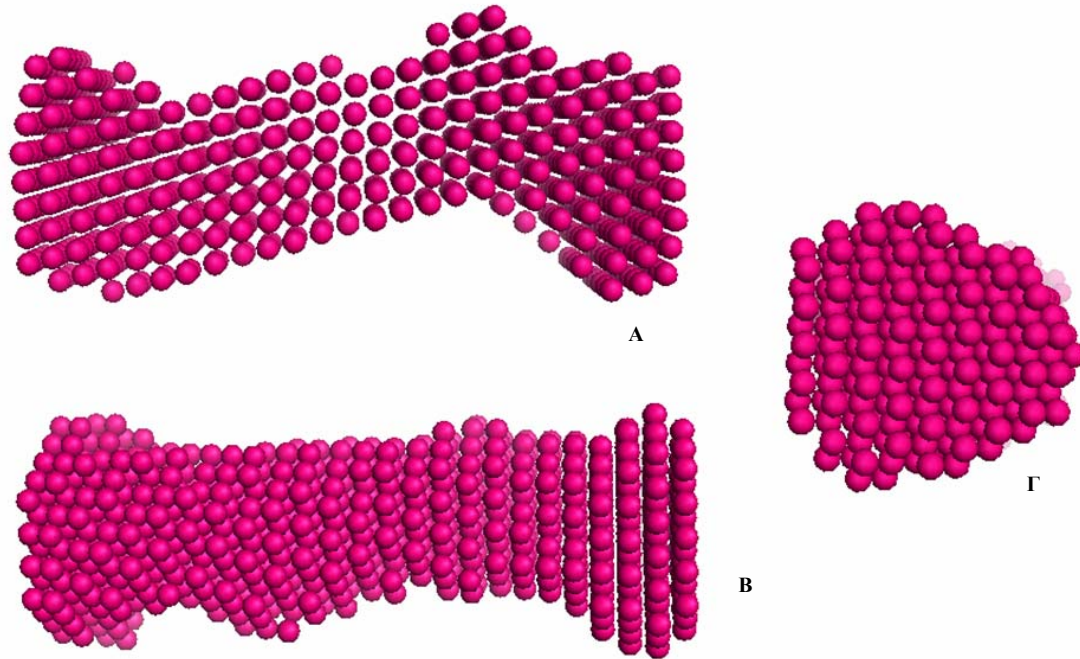
Εικ. 4.39. **A.** Η τελική καμπύλη σκέδαση της πρωτεΐνης HT-HrpEc, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. **B.** Η προσέγγιση Guinier στις μικρές γωνίες της καμπύλης A. Η κλίση της ευθείας δίνει τη γυροσκοπική ακτίνα R_g του σωματιδίου, 3 nm, ενώ το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα του $\log I$ δίνει την τιμή της $I_{(0)}=272.02 \times 10^3$. **Γ.** Το διάγραμμα Kratky $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με μέγιστο στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει αναδιπλωμένο σκεδάζον σωματίδιο. **Δ.** Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για $D_{\max}=9.5 \text{ nm}$. Η κατανομή είναι ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εμφανίζεται μετατοπισμένο στις μικρές αποστάσεις r , πράγμα που υποδηλώνει την επιμήκη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.



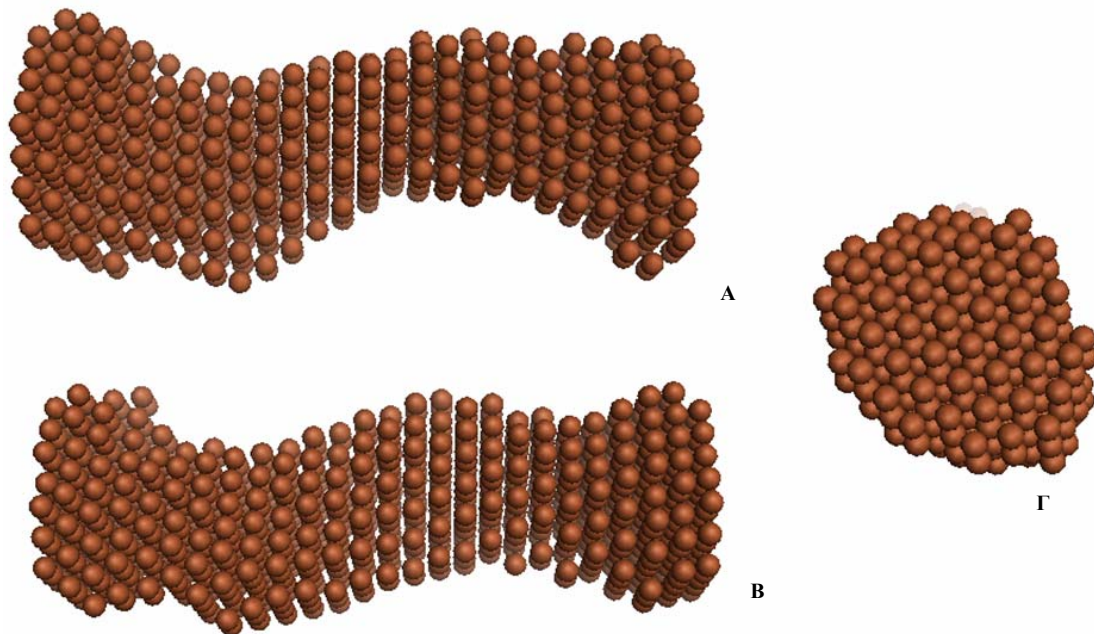
Εικ. 4.40. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HT-HrpEc με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=9.5$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Το πρόγραμμα αυθόρμητα παρήγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.79$.



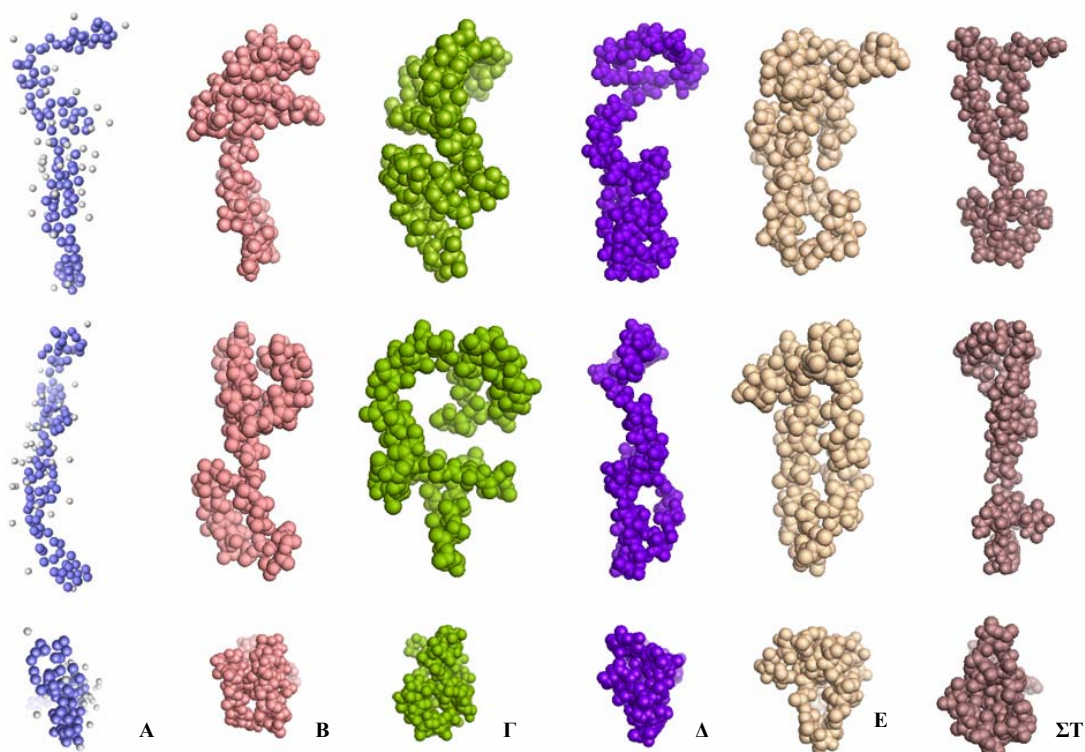
Εικ. 4.41. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HT-HrpEc με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=9.5$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) αλλά δόθηκε ο περιορισμός της επιμήκουσ ανισομετρίας (prolate). **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.95$.



Εικ. 4.42. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HT-HgrEc μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=9.5$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. Και αυτό το πρόγραμμα αυθόρμητα παρήγαγε ένα επίμηκες σωματίδιο. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**, Αποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.84$.



Εικ. 4.43. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων της πρωτεΐνης HT-HgrEc μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=9.5$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) αλλά δόθηκε ο περιορισμός της επιμήκου ανισομετρίας. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**, Αποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.84$.

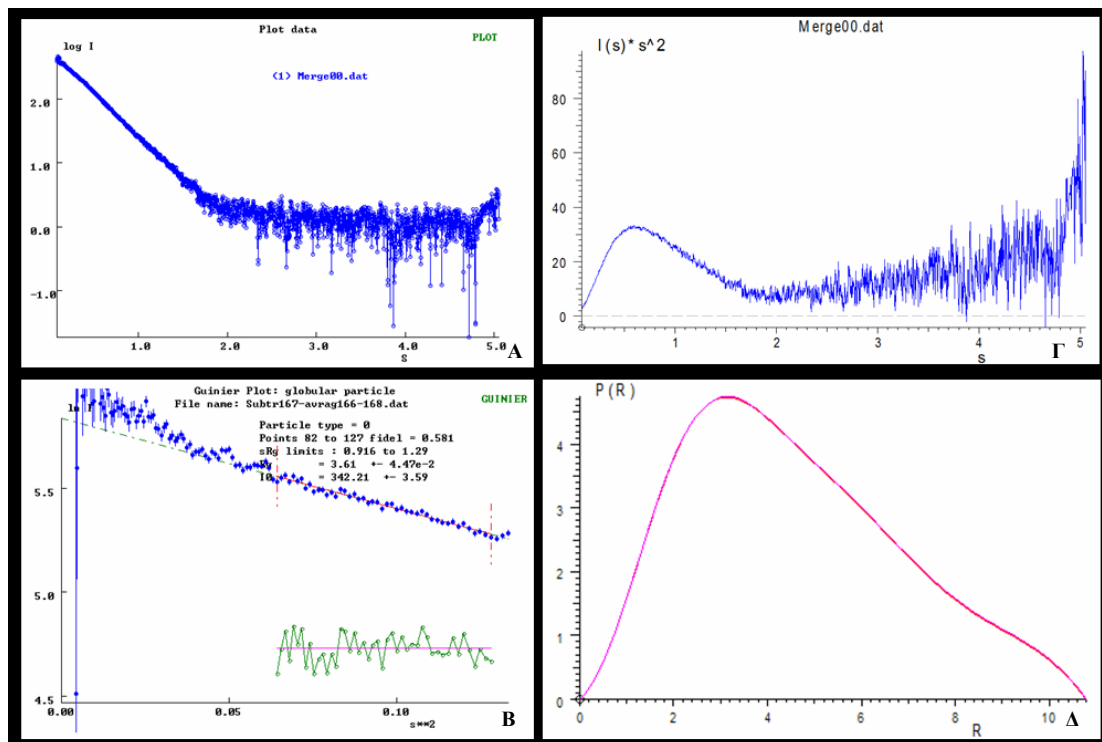


Εικ. 4.44. Σύγκριση του μοντέλου ψευδών καταλοίπων της πρωτεΐνης HT-HrpEc όπως προέκυψε από το πρόγραμμα GASBOR με καμία σημειακή συμμετρία και επιμήκη ανισομετρία (P1 prolate) (A) με τα πέντε πιο πιθανά προβλεπόμενα μοντέλα βάσει πρωτοταγούς αλληλουχίας από τον αλγόριθμο HMMSTR-ROSETTA. Τα προβλεπόμενα μοντέλα παρατίθενται με σειρά καλύτερης πρόβλεψης (από το B έως το ΣΤ). Οι μεσαίες απεικονίσεις αποτελούν κάθετη περιστροφή κατά 90° των άνω απεικονίσεων. Οι κάτω απεικονίσεις αποτελούν άποψη βάσης των μοντέλων.

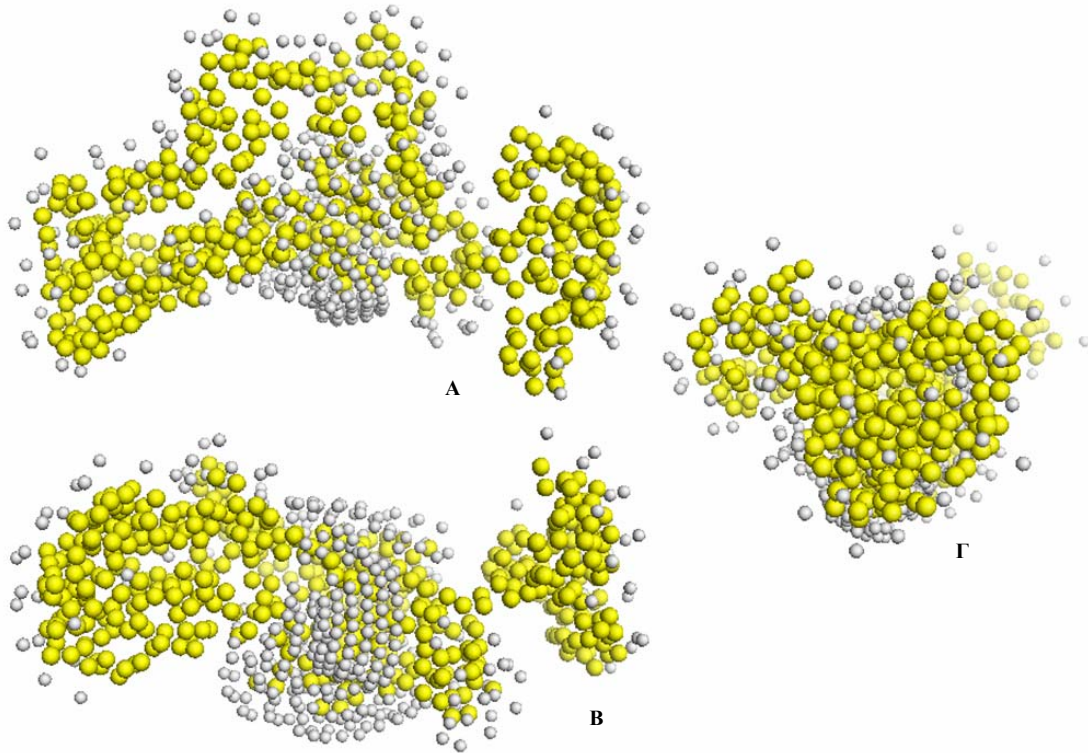
4.3.3.5 Το σύμπλοκο HrpG-HrpV

Δείγματα του συμπλόκου HrpG+HrpV-HT από την κύρια κορυφή έκλυσης (όγκος έκλυσης 84.6 ml της στήλης S100¹, βλέπε παρ. 4.3.1.7), υπεβλήθησαν σε SAXS σε συγκεντρώσεις 2 και 1 mg/ml. Οι καμπύλες σκέδασης συνδυάστηκαν μεταξύ τους και η υβριδική καμπύλη σκέδασης παρατίθεται παρακάτω (Εικ. 4.45Α). Από την προσέγγιση Guinier στην οποία υπεβλήθη η καμπύλη του 1 mg/ml προέκυψε η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας $R_g = 3.6$ nm όπως και η τιμή της έντασης της σκέδασης σε μηδενική γωνία $I_{(0)}=342.21$ με βάση την οποία και σε σύγκριση με την τιμή της $I_{(0)}$ της BSA (=345.44) προέκυψε το μοριακό βάρος του συμπλόκου ίσο με 66.4 kDa, ενώ το υπολογισμένο μοριακό βάρος έκλυσης της πρώτης κορυφής από τη στήλη μοριακής διήθησης ήταν στα 74.2 kDa (Εικ. 4.45B). Το διάγραμμα Kratky ως έκφραση του $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s , φανέρωσε την ύπαρξη μιας κορυφής στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει ότι το σκεδάζον σωματίδιο είναι σφαιροειδές (Εικ. 4.45Γ). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων που ακολούθησε στη συνέχεια υπολογίστηκε με σταθερή λύση για $D_{max}=10.8$ nm και επίσης επαναπροσδιορίστηκαν οι τιμές των R_g (μέγιστο της συνάρτησης κατανομής) και $I_{(0)}$ οι οποίες ήταν περίπου ίσες με τις τιμές της προσέγγισης Guinier (3.58 nm, 336.4 αντίστοιχα). Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων είναι ελαφρώς ασύμμετρη κι αυτό μαρτυρά ελαφρώς επιμηκυσμένο σκεδάζον σωματίδιο (Εικ. 4.45Δ). Το αρχείο που προέκυψε από τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων χρησιμοποιήθηκε για την μοντελοποίηση *ab initio* του σκεδάζοντος σωματιδίου, με τη χρήση των

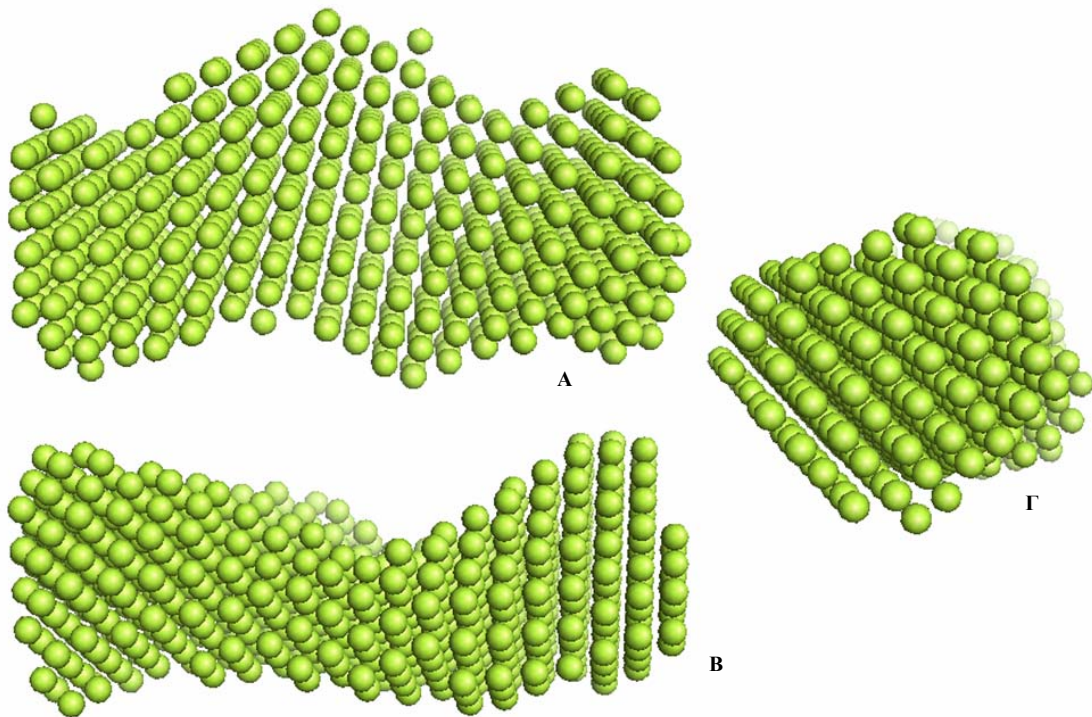
προγραμμάτων DAMMIN και GASBOR. Και για τα δυο προγράμματα δεν χρησιμοποιήθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1), Εικ. 4.46, 4.47). Για την παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου το πρόγραμμα DAMMIN εφαρμόστηκε σε 8 επαναλήψεις (slow mode), τα μοντέλα υπερτέθηκαν και προέκυψε το πιο πιθανό εξ αυτών με τιμή NSD ίση με 0.67.



Εικ. 4.45. **Α.** Η τελική καμπύλη σκέδαση του συμπλόκου πρωτεϊνών HrpG+HrpV-HT, παραγόμενη από το πρόγραμμα PRIMUS. **Β.** Η προσέγγιση Guinier στις μικρές γωνίες της καμπύλης Α. Η κλίση της ευθείας δίνει τη γυροσκοπική ακτίνα R_g του σωματιδίου, 3.61 nm, ενώ το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα του $\log I$ δίνει την τιμή της $I_{(0)}=342.21 \times 10^3$. **Γ.** Το διάγραμμα Kratky $I(s) \times s^2$ συναρτήσει του s παράγει μια καμπύλη με μέγιστο στις μικρές γωνίες, κάτι που υποδηλώνει αναδιπλωμένο σκεδάζον σωματίδιο. **Δ.** Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier του προγράμματος GNOM για τιμή $D_{max}=10.8$ nm. Η κατανομή είναι ασύμμετρη, με το μέγιστό της να εμφανίζεται μετατοπισμένο στις μικρές αποστάσεις r , πράγμα που υποδηλώνει την επιμήκη ανισομετρία του σκεδάζοντος σωματιδίου.



Εικ. 4.46. Μοντέλο ψευδών καταλοίπων του συμπλόκου πρωτεϊνών HrpG+HrpV-HT με τη χρήση του προγράμματος GASBOR. Το πρόγραμμα έχει προσθέσει ψευδή κατάλοιπα νερού. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.8$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης του μοντέλου. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας υπολογισμένου μοντέλου από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.89$.



Εικ. 4.47. Το πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων του συμπλόκου πρωτεϊνών HrpG+HrpV-HT μετά από υπέρθεση μέσω DAMAVER οχτώ υπολογισμένων από το πρόγραμμα DAMMIN μοντέλων. Στον υπολογισμό του προγράμματος δόθηκε η τιμή $D_{max}=10.8$ nm ως η διάμετρος του σφαιρικού χώρου ανάπτυξης των μοντέλων. Δε δόθηκε καμία σημειακή συμμετρία (P1) και καμία ανισομετρία. **B**, μοντέλο περιστραμμένο κάθετα κατά 90° . **Γ**. Άποψη βάσης. Τιμή ασυμφωνίας όλων των υπολογισμένων μοντέλων από πειραματικά δεδομένα $\chi=1.96$.

4.4 Συζήτηση

Η πρωτεΐνη HrpP

Η πρωτεΐνη HrpP σε pH 11 φαίνεται να παραμένει διμερές όπως παρουσιάζεται στο pH 8 αλλά μάλλον παίρνει μια κάπως πιο εκτενή διαμόρφωση καθώς εκλύεται στα 50 kDa σε pH 11 έναντι των 42 kDa στο pH 8. Επίσης, σε αλκαλικό pH φαίνεται να μειώνεται ο βαθμός συσσωμάτωσης μεταφρασμένος ως το ποσό της πρωτεΐνης που λαμβάνεται στο νεκρό όγκο της στήλης μοριακής διήθησης. Αυτό είναι φυσικό καθώς το αλκαλικό pH ανάλογα με την τιμή του και τη φύση της πρωτεΐνης αποτελεί σε μικρό ή μεγαλύτερο βαθμό αποδιατακτικό μέσο (Prajapati *et al.*, 1998, Strucksberg *et al.*, 2007).

Από τα δεδομένα δευτεροταγούς δομής προκύπτει ότι ενώ σε pH 8 το ποσοστό δευτεροταγούς δομής είναι ισομοιρασμένο μεταξύ α -έλικας, β -κλώνου, στροφής και αδόμετων περιοχών, σε pH 11 η α -έλικα υποχωρεί δραστικά προς όφελος του β -κλώνου. Παρ' όλα αυτά εξακολουθούν και υπάρχουν έντονα τα στοιχεία οργανωμένης δευτεροταγούς δομής σε pH 11, ενώ τα ποσοστά του τυχαίου σπειράματος παραμένουν σταθερά και καταλαμβάνουν το 1/3 περίπου της πρωτεΐνης. Αυτό το 1/3 της πρωτεΐνης που προβλέπεται να μην έχει δομή, βάσει της πρόβλεψης από τον αλγόριθμο PsiPred φαίνεται να εντοπίζεται κυρίως στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης το οποίο φαίνεται να είναι και εξαιρετικά διαταραγμένο (όπως προκύπτει από τις προβλέψεις του αλγόριθμου Foldindex). Η τιμή του pH 11 δεν φαίνεται να αποτελεί δραστικό αποδιατακτικό παράγοντα για την πρωτεΐνη HrpP.

Στο διμερές της πρωτεΐνης υπάρχει η ένδειξη ότι αναπτύσσεται ένας δυσουλφιδικός δεσμός (αρνητικό σήμα στο εγγύς υπερίωδες) και για τις δυο τιμές pH. Ο δεσμός αυτός αυξάνει κατά πολύ τη θερμοσταθερότητα του μορίου (Guzzi *et al.*, 2008) το οποίο δε φαίνεται να αποδιπλώνεται παρά μόνο άνω των 70 °C και στις δυο τιμές pH. Το pH 11 δε φαίνεται να προωθεί την εμφάνιση ενδιάμεσων καταστάσεων κατά τη μετάβαση από την αναδιπλωμένη στην αποδιπλωμένη κατάσταση. Τα σημεία μετάπτωσης της πρωτεΐνης σε pH 8 & 11 μοιάζουν πολύ, 67 °C και 71 °C αντίστοιχα, ενώ θα μπορούσε να ευσταθεί ο ισχυρισμός ότι η σταθερότητα της πρωτεΐνης σε pH 11 αυξάνει.

Από την ανάλυση των δεδομένων σκέδασης στις μικρές γωνίες επιβεβαιώθηκε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης όπως επίσης ότι σε pH 8 είναι σφαιροειδής (καλά καθορισμένη κορυφή διαγράμματος Kratky). Η μέγιστη διάστασή της ορίστηκε στα 10 nm και από τη συνάρτηση κατανομής αποστάσεων φάνηκε ότι πρόκειται για επίμηκες σωματίδιο με γυροσκοπική ακτίνα 3.2 nm. Τα μοντέλα που παρήχθησαν ήταν πιστά με τα πειραματικά δεδομένα και αναπαρήγαγαν ένα συμπαγές επίμηκες μόριο με την υποβολή ή όχι διπλού άξονα συμμετρίας. Η αναπαράσταση της πρωτεΐνης ως ένα επίμηκες μόριο το οποίο υπό συνθήκες εξομοίωσης της αποδιάταξής του (με την υποβολή του σε ακραία αλκαλικό pH) γίνεται περισσότερο εκτεταμένο συνάδει με την ανάγκη διάσχισης του αγωγού Hrp κατά την έκκρισή της από τη συσκευή του T3SS.

Η πρωτεΐνη HrpZ

Σε pH 11 η HrpZ φαίνεται να παραμένει στη διμερή της μορφή αλλά πιθανόν παίρνει και αυτή όπως και η HrpP μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση (από τα 74 kDa περίπου για το pH 8, εκλύεται στα 80.5 kDa σε pH 11). Επίσης και εδώ φαίνεται το

pH 11 να μειώνει το βαθμό συσσωμάτωσής της όπως μεταφράζεται στη μείωση της πρωτεϊνικής κορυφής του νεκρού όγκου στη στήλη μοριακής διήθησης.

Από τα δεδομένα δευτεροταγούς δομής προκύπτει ότι τα ποσοστά α-έλικας τα οποία σε pH 8 είναι έντονα, σε pH 11 υποχωρούν προς όφελος των β-κλώνων ενώ τα ποσοστά των αδόμετων περιοχών παραμένουν σταθερά. Και στο αλκαλικό pH όμως η πρωτεΐνη παραμένει έντονα α-ελικοειδής. Το 1/3 της πρωτεΐνης προβλέπεται να είναι αδόμετο. Στην προκειμένη περίπτωση το τμήμα αυτό κατά πάσα πιθανότητα είναι το κεντρικό κομμάτι της HrpZ το οποίο πιθανόν περιέχει το μοτίβο 2 που πρωτοπεριγράφηκε για την χαρπίνη HraG (Oh et al., 2007) και αποτελεί τον ευκίνητο αρμό μεταξύ του αμινοτελικού (μοτίβο1) και του καρβοξυτελικού τμήματος (μοτίβο3) της πρωτεΐνης.

Η πρωτεΐνη φαίνεται να είναι σε εκτεταμένη τριτοταγή διαμόρφωση καθώς δε δίνει ιδιαίτερο σήμα στο εγγύς υπεριώδες και για τις δυο τιμές pH. Ο υπολογισμός της θερμοκρασίας μετάπτωσης (T_M) φανέρωσε δυο τιμές και για τα δυο pH, 45 °C και 75 °C για το pH 8, 36 °C και 72 °C για το pH 11. Η ύπαρξη δυο τιμών T_M πιθανόν αντικατοπτρίζει ότι τα δυο υποθετικά μοτίβα της πρωτεΐνης (στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης) αποδιατάσσονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η πτώση των τιμών T_M σε pH 11 πιθανόν αντικατοπτρίζει τη μείωση της θερμοσταθερότητας της πρωτεΐνης (Guzzi et al., 2008). Κατά τη θερμική αποδιάταξη της πρωτεΐνης υπάρχουν δυο βασικές καταστάσεις που περιγράφουν τη μετάβαση, η αναδιπλωμένη και η αποδιπλωμένη και για τις δυο τιμές pH.

Η ανάλυση σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες για τιμή pH ίση με 8 έδωσε ένα ανεξήγητα μικρό μοριακό βάρος για την πρωτεΐνη που δεν επιβεβαίωσε τις τιμές έκλυσης από την στήλη μοριακής διήθησης. Η ακεραιότητα της πρωτεΐνης ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε και η παρατήρηση επαναλήφθηκε σε ανεξάρτητη επανάληψη του πειράματος. Η HrpZ φάνηκε να είναι σφαιροειδής στο δείγμα που υποβλήθηκε σε SAXS από το διάγραμμα Kratky και τις αποδόθηκαν από τα προγράμματα επεξεργασίας οι ίδιες τιμές μέγιστης διαμέτρου και γυροσκοπικής ακτίνας όπως και στην περίπτωση της πρωτεΐνης HrpP. Το τελευταίο δεν είναι εντυπωσιακό καθώς και οι δυο πρωτεΐνες είναι υποστρώματα έκκρισης από τον ίδιο μηχανισμό με λογικά όμοιες στερεοχημικές παραμέτρους. Τα μοντέλα που παρήχθησαν ήταν πιστά με τα πειραματικά δεδομένα και αναπαρήγαγαν συμπαγείς, επιμήκεις αναπαραστάσεις του μορίου, με την επιβολή ή όχι διπλού άξονα συμμετρίας.

Η πρωτεΐνη HrpB

Από την περιορισμένη μελέτη της πρωτεΐνης αυτής φάνηκε ότι ενώ σε pH 8 το μεγαλύτερο ποσοστό της ήταν συσσωματωμένο, σε pH 11 φάνηκε να διαλυτοποιείται και να αποσυσσωματώνεται, δίνοντας γένεση σε κορυφές ολιγομερών με κύρια αναλυόμενο πληθυσμό αυτόν του τριμερούς. Πειράματα κυκλικού διχρωισμού σε pH 8 & 11 όπως και σκέδασης ακτίνων X σε pH 8 επιχειρήθηκαν για δείγματα της πρωτεΐνης αυτής, αλλά στην πρώτη περίπτωση δεν ήταν δυνατός ο καθορισμός των ποσοστών δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης διότι ήταν αδύνατη η παραγωγή φασμάτων μοριακής ελλειπτικότητας (δεν ήταν δυνατή η μέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης καθώς δεν περιέχει κατάλοιπα τρυπτοφάνης, τυροσίνης ή κυστεΐνης). Λήψη φάσματος στο εγγύς υπεριώδες φανέρωσε την σχεδόν πλήρη απουσία σήματος κι αυτό σημαίνει ότι το μοναδικό

κατάλοιπο φαινυλαλανίνης της HrpB δεν επαρκεί για να δώσει μετρήσιμο σήμα ή ότι η πρωτεΐνη είναι αποδιπλωμένη και δεν παράγει ασύμμετρο περιβάλλον για το κατάλοιπο φαινυλαλανίνης. Στην περίπτωση της σκέδασης ακτίνων X, έγινε η απομόνωση του μικρού κλάσματος που περιείχε την κύρια κορυφή έκλουσης ενός υποθετικού δμερούς της πρωτεΐνης σε pH 8 αλλά το δείγμα συσσωματώθηκε γρήγορα σε μεγαλύτερου μοριακού βάρους σωματίδια, όπως αποδείχτηκε από τις καμπύλες σκέδασης και την υποβολή του σε δυναμική σκέδαση λευκού φωτός (DLS). Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη HrpB *in vitro* παράγει ολιγομερή τα οποία επωαζόμενα δίνουν γένεση σε μεγαλύτερα συσσωματώματα συνάδει με την αρχική πρόβλεψη αναλογίας της με την πρωτεΐνη PrgJ (Hueck 1998) που δομεί την εσωτερική ράβδο της δομής βελόνας στη *Salmonella*. Αν στην *Pseudomonas syringae* η πρωτεΐνη HrpB παίζει έναν παρόμοιο δομικό ρόλο είναι φυσιολογικό να πολυμερίζεται σε φυσιολογικό pH. Η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη αυτή εκκρίνεται και μεταφέρεται στο φυτικό κύτταρο (Ramos et al., 2007) μπορεί να υποδεικνύει την ύπαρξη μιας ρυθμιστικής λειτουργίας του βακτηρίου με την απομάκρυνση της HrpB από το προκαρυωτικό περιβάλλον, με τον εντοπισμό της στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα να είναι παράπλευρος και όχι κύριας λειτουργικής σημασίας.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HrpG-HrpV

Το σύμπλοκο των HrpG-HrpV-HT αναλύθηκε σε δυο κορυφές από τη στήλη μοριακής διήθησης με την πρώτη να αντιστοιχίζεται στα 74 kDa και τη δεύτερη στα 44 kDa. Η πρώτη αφορούσε τη στοιχειομετρία 2HrpV:1HrpG και η δεύτερη τη στοιχειομετρία 3HrpV:1HrpG. Μόνο η πρώτη κορυφή όμως υπεβλήθη σε σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες καθώς η δεύτερη φάνηκε μετά από υποβολή της σε DLS ότι ήταν εξαιρετικά συσσωματωμένη. Τα δεδομένα σκέδασης έδειξαν ότι το σύμπλοκο έχει μοριακό βάρος 66.4 kDa, κατάτι μικρότερο δηλαδή από την τιμή της μοριακής διήθησης. Από το διάγραμμα Kratky το σύμπλοκο φάνηκε να είναι αναδιπλωμένο ενώ οι τιμές που αποδόθηκαν για τη μέγιστη διάμετρο και τη γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου ήταν 10.8 nm και 3.6 nm αντίστοιχα. Από τη μοντελοποίηση *ab initio* παρήχθησαν συμπαγή, ελαφρώς επιμηκυσμένα μοντέλα χωρίς την επιβολή συμμετρίας ή ανισομετρίας.

Η πρωτεΐνη HrpE, η καρβοξυτελική επικράτεια της HrpE (HrpEc) και το σύμπλοκο HrpE-HrcN

Η πρωτεΐνη HrpE εμφανίζει μια ιδιότυπη συμπεριφορά όταν αναλύεται από στήλες μοριακής διήθησης. Εκκλύεται σε πολύ μεγάλα μοριακά βάρη, παρατήρηση που πιθανότατα δεν αποκρίνεται στον εκτενή ολιγομερισμό της. Παρόμοια συμπεριφορά επιδεικνύει και η ομόλογή της στο μαστιγιακό σύστημα FliH (Minamino *et al.*, 2002). Η τελευταία εκκλύεται στα 232 kDa αλλά στην πραγματικότητα είναι στη διμερή της μορφή με πραγματικό μοριακό βάρος στα 52 kDa, δηλαδή το υποθετικό μονομερές των 23 kDa θα εκλουόταν στα 116 kDa. Η ομάδα του Minamino έδειξε ότι για την συμπεριφορά αυτή της πρωτεΐνης ευθύνεται το αμινοτελικό της τμήμα που φαίνεται να είναι εξαιρετικά εκτενές και ευθύνεται για τον διμερισμό της πρωτεΐνης, ενώ το καρβοξυτελικό μοιάζει να είναι πιο σφαιρικό (περισσότερες λεπτομέρειες και εκτενής μελέτη της πρωτεΐνης HrpE και των

ελλειμματικών μορφών της παρουσιάζονται στην εργασία της υποψήφιας Δρ. Μ. Μπαστάκη). Η πρωτεΐνη HrpE σε pH 8 έχει φανεί ότι εκλύεται στα 577 kDa ενώ από την παρούσα εργασία σε pH 11 φάνηκε να εκλύεται κατά κύριο λόγο στα 200 kDa. Βάσει αναλογίας με τις παρατηρήσεις για τη FliH, πιθανόν η HrpE να εμφανίζεται ως τετραμερές σε pH 8 και ως διμερές σε pH 11. Σε αντίθεση με την ολόκληρη HrpE, το καρβοξυτελικό της τμήμα HrcE, που αποτελείται από τα τελευταία 93 κατάλοιπα της πρωτεΐνης εκλύεται κανονικά ως μονομερές από τη στήλη μοριακής διήθησης στα 14 kDa.

Το σύμπλοκο πρωτεϊνών HT-HrcN-HrpE δεν μπόρεσε να διαλυτοποιηθεί και να μελετηθεί σε pH 8.0. Ενώ η πρωτεΐνη HrcN ελήφθη κανονικά στις εκλούσεις, η HrpE εντοπίστηκε εξολοκλήρου στο αδιάλυτο κλάσμα. Μόνο υπό αλκαλικές συνθήκες και μόνο από στήλη ανιοντοανταλλαγής μπόρεσε το σύμπλοκο να απομονωθεί και να μελετηθεί περαιτέρω. Η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας δεν κατάφερε να συγκρατήσει την ετικέτα ιστιδινών της HT-HrcN και της αλληλεπιδρώσας με αυτήν HrpE, πιθανότατα διότι η αλληλεπίδραση με την τελευταία συμβαίνει με το αμινοτελικό άκρο της HrcN, κάτι που ίσως εμποδίζει την ετικέτα ιστιδινών να αλληλεπιδράσει με το υλικό χρωματογραφίας. Το σύμπλοκο εκλούστηκε από τη στήλη μοριακής διήθησης σε δυο κορυφές διαφορετικής αναλογίας πρωτεϊνών και διαφορετικού φαινομενικού μοριακού βάρους. Η πρώτη αφορά μια αναλογία 2HrcN:1HrpE και αντιστοιχίζεται σε φαινομενικό μοριακό βάρος 570 kDa και η δεύτερη την αντίστροφη αναλογία 2HrpE:1HrcN σε φαινομενικό μοριακό βάρος 161 kDa. Καθώς η πρωτεΐνη HrpE εκλύεται ανώμαλα από τη στήλη μοριακής διήθησης δεν είναι ασφαλής η εξαγωγή συμπερασμάτων όσον αφορά την ολιγομερική κατάσταση των υπομονάδων στο σύμπλοκο. Παρ' όλα αυτά, μια υπόθεση θα μπορούσε να δεχτεί α) για την πρώτη κορυφή έκλυσης, τη συμμετοχή έξι μορίων HT-HrcN και τριών μορίων HrpE ($6 \times 50,7 + 3 \times 100$ -αν κατ' αναλογία με την FliH δεχτούμε ότι το υποθετικό μονομερές εκλύεται κοντά στα 100 kDa- ≈ 600 kDa) και β) για τη δεύτερη κορυφή έκλυσης η αναλογία 2HrpE:1HrcN επιτυγχάνεται μόνον εάν δεχτούμε ότι η πρωτεΐνη HrpE ανακτά τη σφαιρικότητά της όπως υποστηρίζουν και οι Minamino & Macnab (2000) και το σύμπλοκο υφίσταται με τη μορφή 2xHrpE:1HrcN ($4 \times 21,4 + 2 \times 50,7 = 187$ kDa). Από την ανάλυση του συμπλόκου παρουσιάζεται και μια κορυφή που περιέχει μόνο την HrcN στην εξαμερή της μορφή, παρατήρηση όμοια με την ανάλυση μοριακής διήθησης του συμπλόκου των FliI-FliH, όπου ένα ποσοστό της FliI αποδεσμεύτηκε από το σύμπλοκο (Minamino & Macnab 2000). Το ακραίο αλκαλικό pH εν γένει δεν φάνηκε να διέσπασε το σύμπλοκο.

Η μελέτη κυκλικού διχρωισμού για την πρωτεΐνη HrpE φανέρωσε ένα υψηλότατο περιεχόμενο σε α-έλικα και για τις δυο τιμές pH (η πρωτεΐνη HrpE προβλέπεται να περιέχει υψηλά ποσοστά, κατά 51% επαναλήψεις επτάδας άρα προβλέπεται να σχηματίζει σπειρωμένο σπείραμα). Σε pH 11 πάλι φαίνεται μια μικρή υποχώρηση των ποσοστών της προς εύνοια του β-κλώνου και της στροφής, αλλά και πάλι η παρουσία των α-ελίκων είναι ισχυρή. Ίσως η μείωση των ποσοστών α-έλικας στην πρωτεΐνη HrpE να αντικατοπτρίζει την κατάρρευση ενός σπειρωμένου σπειράματος που κρατάει μαζί το διμερές διμερών. Στο εγγύς υπερίωδες ελήφθη πολύ δυνατό σήμα και στις δυο τιμές pH κι αυτό υποδηλώνει ότι το ακραίο αλκαλικό pH δεν είχε καμία αποδιατακτική επίδραση στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης. Οι παρατηρήσεις ότι το ακραίο αλκαλικό pH δεν επηρεάζει ουσιαστικά την δευτεροταγή αλλά ούτε και την τριτοταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης HrpE, συμφωνεί με τις αντίστοιχες παρατηρήσεις για την μυοσίνη, μια ακόμα περίπτωση πρωτεΐνης

σπειρωμένου σπειράματος. Θερμική αποδιάταξη και υπολογισμός του σημείου μετάπτωσης της HrpE πραγματοποιήθηκε στην εργασία αυτή μόνο για την τιμή του ακραίου αλκαλικού pH καθώς τις μελέτες της πρωτεΐνης σε pH 8 έχει αναλάβει η συνεργάτιδα Μ. Μπαστάκη. Τα πειράματα φανέρωσαν την ύπαρξη δυο καταστάσεων κατά τη διαδικασία της θερμικής αποδίπλωσης της πρωτεΐνης, της αναδιπλωμένης και της αποδίπλωμένης χωρίς την παρεμβολή ενδιάμεσων καταστάσεων ενώ το σημείο T_M υπολογίστηκε στους 30 °C, αρκετά χαμηλότερο από την τιμή στο pH 8. Το γεγονός αυτό μαρτυρά ότι η πρωτεΐνη υπέστη μείωση της θερμοσταθερότητάς της στο αλκαλικό περιβάλλον (Guzzi *et al.*, 2008).

Η ανάλυση των δεδομένων σκέδασης σε μικρές γωνίες επιβεβαίωσε την παρουσία ενός μεγάλου, εκτεταμένου μορίου έτσι όπως εκλούεται από τις στήλες μοριακής διήθησης σε pH 8. Από το διάγραμμα Kratky φάνηκε να είναι σφαιροειδής ενώ η μέγιστη διάστασή της ορίστηκε στα 36 nm. Ενδιαφέρουσα ήταν η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων που προέκυψε, η οποία παρουσίασε πλατύ μέγιστο, ενδεικτικό της πεπλατυσμένης μορφής του σωματιδίου. Η μοντελοποίηση της πρωτεΐνης βάσει των επεξεργασμένων δεδομένων δεν θεωρήθηκε σκόπιμη καθώς λόγω μεγάλου μεγέθους του σωματιδίου δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μονοδιάσπαρτου δείγματος. Το καρβοξυτελικό τμήμα της HrpE, HrpEc, έδωσε ξεκάθαρα και αναμενόμενα αποτελέσματα από την επεξεργασία των δεδομένων σκέδασης σε μικρές γωνίες. Το μοριακό της βάρος επιβεβαιώθηκε ως εκείνο του μονομερούς (17 kDa) όπως είχε εκλουσθεί και από τη στήλη μοριακής διήθησης (14 kDa) και οι τιμές της μέγιστης διαμέτρου και της γυροσκοπικής ακτίνας του σωματιδίου που αποδόθηκαν από τα προγράμματα επεξεργασίας ήταν 9.5 nm και 3 nm αντίστοιχα. Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων έδωσε μια εξαιρετικά ασύμμετρη κορυφή, μετατοπισμένη στις μικρές γωνίες, ενδεικτικό της επιμηκυσμένης μορφής του σωματιδίου. Η μοντελοποίηση του σωματιδίου *ab initio* με τη βοήθεια των προγραμμάτων ψευδών ατόμων και ψευδών καταλοίπων, έδωσε σε κάθε περίπτωση, χωρίς την επιβολή συμμετρίας και με ή χωρίς την επιβολή επιμηκυσμένης ανισομετρίας ένα συμπαγές επίμηκες σωματίδιο. Τα μοντέλα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μοντελοποίησης *ab initio* βάσει των δεδομένων SAXS μοιάζουν αρκετά με τα μοντέλα που προβλέφθηκαν από τον αλγόριθμο HMMSTR/Rosetta.

Η επίδραση του pH 11 στις πρωτεΐνες του T3SS που μελετήθηκαν

Το ακραία αλκαλικό pH έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι αποτελεί εναλλακτικό αποδιατακτικό μέσο για τις μελέτες της διαδικασίας πρωτεϊνικής αποδιάταξης και των παραμέτρων της. Μάλιστα προτιμάται ως μέθοδος αποδιάταξης καθώς δεν οδηγεί στη συσσωμάτωση των υπό αποδιάταξη μορίων και η διαδικασία της αλκαλικής αποδιάταξης σε αντίθεση με τη θερμική είναι αντιστρεπτή (Strucksberg *et al.*, 2007).

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά την επίδραση του pH 11 στη φυσικοχημική συμπεριφορά των μορίων.

- Προώθησε την αποσυσσωμάτωση των μορίων όπως αυτή προκύπτει από το ποσοστό της πρωτεΐνης που λαμβάνεται στο νεκρό όγκο από τις στήλες της μοριακής διήθησης, με καλύτερο και πιο παραστατικό παράδειγμα την περίπτωση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης HrpB.

- Οδήγησε στην εκτεταμένη διαμόρφωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών HrpZ, HrpP αφήνοντας άθικτο το διμερές τους, πιθανώς προσομοιάζοντας τις συνθήκες της αποδιάταξής τους λίγο πριν την έκκριση από τον αγωγό Hrp. Η πρωτεΐνη HrpE αφετέρου φάνηκε να εγκαταλείπει την τετραμερή κατάσταση και να υφίσταται πλέον ως διμερές.
- Σε όλες τις περιπτώσεις οδήγησε σε μείωση των ποσοστών της α -έλικας προς όφελος των ποσοστών του β -κλώνου (και της στροφής στην περίπτωση της HrpE). Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι α -έλικες σταθεροποιούνται σε όξινο pH (Matsumura *et al.*, 2008). Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος όμως εξακολούθησαν να είναι α -ελικοειδείς και σε καμία περίπτωση το pH 11 δεν οδήγησε σε κατάρρευση της δευτεροταγούς δομής κάποιας πρωτεΐνης. Η μείωση των ποσοστών α -έλικας στην πρωτεΐνη HrpE πιθανόν αντικατοπτρίζει την κατάρρευση του σπειρωμένου σπειράματος που κρατάει μαζί το διμερές διμερών (βλέπε παραπάνω).
- Είχε μικρή ή καμία επίδραση στην τριτοταγή διαμόρφωση των υπό εξέταση μορίων
- Οδήγησε σε μείωση της θερμοσταθερότητας των μορίων όπως αυτή αντικατοπτρίζεται από την τιμή T_M εκτός από την περίπτωση της HrpP (όπου η τιμή T_M αυξήθηκε κατά 4 °C)
- Για καμία από τις πρωτεΐνες που μελετήθηκαν δεν προώθησε την εμφάνιση ενδιάμεσων καταστάσεων κατά τη μετάβασή τους από την αναδιπλωμένη στην αποδιπλωμένη μορφή.
- Δεν διέσπασε το σύμπλοκο HrcN (ATPάσης) – HrpE (αρνητικού ρυθμιστή) του συστήματος.

Βιβλιογραφία

Burke M., Himmelfarb S. & Harrington W.F. 1973. Studies of the “hinge” region of myosin. *Biochemistry*, 12(4), 701-710.

Evans L.D.B, Stafford G.P., Ahmed S., Fraser G.M. & Hughes C. 2006. An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *PNAS*, 103(46), 17474-17479.

Guzzi R., Sportelli L., Sato K., Cannistraro S. & Dennison C. 2008. Thermal unfolding of a phytocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1997-2003

He, S. Y., Huang H.-C. & Collmer A. 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255–1266.

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

- Kim J.-G., Jeon E., Oh J., Moon J.-S. & Hwang I. 2004. Mutational analysis of *Xanthomonas* harpin HpaG identifies a key functional region that elicits the hypersensitive response in nonhost plants. *J. Bacteriol.* 186(18), 6239-6247
- Lee J., Klessig D.F. & Nurnberger T. A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant Cell*, 13. 1079-1093.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C. et al. 2001. HrpZ_{PspH} from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *PNAS*, 98(1), 289-294.
- Marlovits T.C., Kubori T., Sukhan A., Thomas D.R., Galan J.E. & Unger V.M. 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 306, 1040-1042.
- Martin S.R. and Schilstra M.J. 2008. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Meth Cell Biol.* 84, Ch.10, 263-293
- Matsumura Y., Li J., Ikeguchi M, & Kihara H. 2008. Helix-rich transient and equilibrium intermediates of equine β -lactoglobulin in alkaline buffer. *Biophys. Chem.* 134, 84-92.
- Minamino T. & Macnab R.M. 2000. FliH, a soluble component of the type III flagellar export apparatus of *Salmonella*, forms a complex with FliI and inhibits its ATPase activity. *Mol Microbiol.* 37(6), 1494-1503
- Minamino T., Gonzalez-Pedrajo B., Oosawa K., Namba K. & Macnab R.M. 2002. Structural properties of FliH, an ATPase regulatory component of the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J. Mol. Biol.* 322, 281-290
- Mohan P.M. & Hosur R.V. 2008. pH dependent unfolding characteristics of DLC8 dimer: residue level details from NMR. *Biochim Biophys Acta.* 1784(11), 1795-1803.
- Morello J.E. & Collmer A. 2009. *Pseudomonas syringae* HrpP Is a type III secretion substrate specificity switch domain protein that is translocated into plant cells but functions atypically for a substrate-switching protein. *J. Bacteriol.* 191(9), 3120-31.
- Nakayama A.D., Suzuki Y., Niwa F. & Hamada I. 1980. Conformational change of chymotryptic myosin rod. *Agric. Biol. Chem.* 44, 2363-2369.
- Naseem F. & Khan R.H. 2008. Pea lectin in alkaline conditions: formation of molten globule-like intermediate and its structural and thermal studies under the influence of hexafluoroisopropanol. *Protein & Peptide Letters*, 15(6), 606-611.
- Oh J., Kim J.-G., Jeon E., Yoo C.-H., Moon J.S., Rhee S. & Hwang I. 2007. Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *JBC*, 282(18), 13601-13609

- Ozog A. & Bechet J.-J. The effect of pH on the folding and stability of the myosin rod. *Eur. J. Biochem.* 234, 501-505.
- Palmer B., Angus K., Taylor L., Warwicker J. & Derrick J.P. 2008. Design of stability at extreme alkaline pH in streptococcal protein G. *J. Biotechnol.* 134(3-4), 222-230.
- Pozidis C. Chalkiadaki A., Gomez-Serrano a., Stahlberg H., Brown I et al. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278, 25816–25824.
- Prajapati S., Bhakuni V., Babu K.R. & Jain S.K. 1998. Alkaline unfolding and salt-induced folding of bovine liver catalase at high pH. *Eur. J. Biochem.* 255, 178-184.
- Ramos A.R., Morello J.E., Ravindran S. Deng W.-L., Huang H.-C. & Collmer A. 2007. Identification of *Pseudomonas syringae* pv *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* 189(15), 5773-5778
- Roessle M.W., Klaering R., Ristau U., Robrahn B. et al., 2007. Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Cryst.* 40, s190-s194
- Sreerama N. and Woody R.W. 2004. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci.* 13, 100-112
- Strucksberg K.H., Rosenkratz T. & Fitter J. 2007. Reversible and irreversible unfolding of multi-domain proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 1591-1603.
- Tampakaki A.P. & Panopoulos N.J. 2000. Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{PspH} produced in planta. *MPMI*, 13(12) 1366-1374.
- Weinkam P., Zimmermann J., Sagle L.B., Matsuda S., Dawson P.E., Wolynes P.G. & Romesberg F.E. 2008. Characterization of alkaline transitions in ferricytochrome *c* using carbon-deuterium infrared probes. *Biochemistry*, 47(51), 13470-13480

Συζήτηση – Μελλοντικές προοπτικές

Στην παρούσα διατριβή αναδείχθηκαν προηγούμενα άγνωστες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πολυπαραγοντική ρύθμιση της μεταγραφής και λειτουργικής ενεργοποίησης του T3SS του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *P. syringae* pv. *phaseolicola* και επιβεβαιώθηκαν ορισμένες άλλες αλληλεπιδράσεις για τις οποίες υπήρχαν αδημοσίευτες ενδείξεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι σε συμφωνία με δημοσιευμένα ευρήματα που αφορούν σε άλλα, μαστιγιακά και μη μαστιγιακά συστήματα τύπου III, τεκμηριώνουν το δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του συστήματος στο εν λόγω βακτήριο και αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την διεξοδικότερη ανάλυση της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *hrp/hrc*, της συναρμολόγησης και της εκκριτικής ενεργοποίησης του εννοσώματος που αυτά κωδικοποιούν. Ειδικότερα, τα ευρήματα που προέκυψαν προσθέτουν έναν ακόμα αγνοούμενο κρίκο στο δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που αποτυπώνονται στο μέχρι τώρα ισχύον μοντέλο ρύθμισης του TTSS σε φυτοπαθογόνα μέλη του γένους *P. syringae*. Στο προτεινόμενο μοντέλο, η πρωτεΐνη HrpG, στην οποία δεν είχε προηγουμένως αποδοθεί συγκεκριμένος ρόλος, είναι μια σαπερόνη του T3SS του φυτοπαθογόνου *P. syringae* pv. *phaseolicola* με υπόστρωμα αλληλεπίδρασης τον αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος HrpJ, τον οποίο και διατηρεί ενδοκυττάρια σε σύμπλοκο μαζί της πριν την επαγωγή της έκκρισης. Όταν ενεργοποιηθεί η έκκριση, το σύμπλοκο HrpG-HrpJ αγκυροβολεί στο C- δακτύλιο του εννοσώματος μέσω αλληλεπίδρασης με το κυτταροπλασματικό τμήμα της μεμβρανικής πρωτεΐνης HrcU, η HrpJ εκκρίνεται και η HrpG ανακυκλώνεται μέσω αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη “φρουρό”, HrpO. Με την αποδέσμευση της πρωτεΐνης HrpJ και την έκκρισή της εξωκυττάρια μέσω του ίδιου του εννοσώματος, η σαπερόνη HrpG ασκεί δευτερευόντως ένα ρυθμιστικό ρόλο, αυτόν του αντι-αντι-καταστολέα: η ελεύθερη πλέον HrpG προσδένει τον άλλο αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος, HrpV και με τον τρόπο αυτό απελευθερώνει τον μεταγραφικό ενεργοποιητή HrpS από την κατασταλτική αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη HrpV. Η ελεύθερη πλέον πρωτεΐνη HrpS μπορεί να σχηματίσει το μεταγραφικά ενεργό ετεροδιμερές σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα HrpR και να επάγει τη μεταγραφή του εναλλακτικού παράγοντα σ του συστήματος, HrpL, ο οποίος διαμεσολαβεί στη συνέχεια στη ενεργοποίηση της μεταγραφής όλων των οπερονίων της νησίδας *hrp/hrc* και της πλειάδας των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις δια του TTSS-μεταφερόμενες πρωτεΐνες τελεστές (effectors) στα φυτικά κύτταρα.

Επιλεγμένες πρωτεΐνες του συστήματος και σύμπλοκά τους απομονώθηκαν σε διαλυτή κατάσταση μετά από συνέκφρασή τους και μελετήθηκαν δομικά με μεθόδους μοριακής διήθησης, κυκλικού διχρωισμού και σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες. Από την ανάλυση προέκυψαν πρωτογενή στοιχεία για τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά τους τόσο σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις φυσιολογικές όσο και σε συνθήκες αποδίπλωσης που πιθανώς προσομοιάζουν την κατάσταση έκκρισης. Δύο εκκρινόμενες μέσω του TTSS πρωτεΐνες (HrpP, HrpZ) φάνηκε ότι είναι επιμήκεις και ελικοειδείς, με υπολογιζόμενες υδροδυναμικές και γυροσκοπικές ακτίνες συμβατές με την εσωτερική διάμετρο του καναλιού έκκρισης, με τον ελικοειδή χαρακτήρα τους να υποχωρεί σε συνθήκες που υποβοηθούν την αποδίπλωσή τους. Προέκυψαν πρωτογενείς ενδείξεις ότι η πρωτεΐνη HrpB αποτελεί την πρωτεΐνη δόμησης κάποιου εξωκυττάριου συστατικού του συστήματος, πιθανόν μιας δομής που μοιάζει με την εσωτερική ράβδο του βασικού σωματίου των ζωοπαθογόνων. Όσον αφορά στην μελέτη των κυτταροπλασματικών ρυθμιστικών

πρωτεϊνών του συστήματος, ειδική μνεία γίνεται για τον αρνητικό ρυθμιστή της ΑΤΡάσης, HrpE. Οι μελέτες από την παρούσα εργασία υποδηλώνουν ότι πρόκειται για ένα μεγάλο, πεπλατυσμένο σωματίδιο το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με την ΑΤΡάση σε δυο διαφορετικές ολιγομερικές μορφές. Η συστηματικά μετρούμενη πολύ υψηλή φαινομενική μοριακή μάζα της HrpE πιθανόν να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό περιεχομένου της σε σπειρωμένα σπειράματα, ένα χαρακτηριστικό που παρουσιάζεται συστηματικά σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε πολυπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και με πολύπλοκο ρυθμιστικό ρόλο.

Ένας μελλοντικός πειραματικός σχεδιασμός για τη συμπλήρωση και ολοκλήρωση των παρατηρήσεων που προέκυψαν στην παρούσα εργασία θα μπορούσε να διαρθρωθεί σε διακριτές ενότητες, που συνοψίζονται παρακάτω

Στην πρώτη ενότητα περιλαμβάνονται πειράματα επιβεβαίωσης των αναδεδειγμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με επιπρόσθετες μεθόδους, όπως πχ. με το σύστημα των δυο υβριδίων της ζύμης ή με κάποιο βακτηριακό σύστημα δύο υβριδίων. Συμπληρωματικά, θα ήταν χρήσιμος ο εντοπισμός των μικρο-επικρατειών που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ των μορίων με την συστηματική εισαγωγή μεταλλαγών ένθεσης ή αφαίρεσης μικρού μήκους πεπτιδίων (π.χ. 4-πεπτιδίων) και/ή επιλεγμένων σημειακών μεταλλαγών, διατηρώντας την δευτεροταγή και τριτοταγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Αναγκαία κρίνεται η διευκρίνιση του προβληματικά μεγάλου μοριακού βάρους της πρωτεΐνης HrpE πχ. μέσω πολυγωνικής σκέδασης φωτός (multi-angle light scattering) για τον καθορισμό του ακριβούς αριθμού υπομονάδων στους χρωματογραφικά διακριτούς πληθυσμούς του μορίου, τόσο σε pH 8 όσο και σε pH 11.

Η δεύτερη ενότητα περιλαμβάνει πειράματα λειτουργικής ανάλυσης που να αναδεικνύουν την επίδραση *in vivo* της υπερέκφρασης ή απουσίας του ενός μέλους του συμπλόκου στην έκφραση, τον εντοπισμό και τη λειτουργία του άλλου αλλά και στη ρύθμιση και τη λειτουργική ενεργοποίηση του T3SS. Κάνοντας ειδική μνεία στο σύμπλοκο HrpG-HrpJ, θα πρέπει να σχεδιαστεί σειρά πειραματικών προσεγγίσεων που να αποδεικνύει ότι η HrpG αποτελεί όντως σαπερόνη της HrpJ. Παραδείγματα τέτοιων πειραμάτων θα μπορούσε να είναι α) η μελέτη της ικανότητας του βακτηρίου *P. syringae* να εκκρίνει την HrpJ απουσία της HrpG και β) η ικανότητα ή μη αλληλεπίδρασης της HrpJ με την HrpG μετά από αφαίρεση από τη HrpJ της υποθετικής επικράτειας αλληλεπίδρασής της με την HrpG (CBD). Ομοίως χρήσιμη θεωρείται και η κατασκευή στοχευμένων μεταλλαγών της HrpG που επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή της με τις πρωτεΐνες HrcO, HrcU και η επίπτωσή τους στη λειτουργικότητα του T3SS *in vivo*.

Ένα δεύτερο πακέτο εργασίας αφορά σε πειράματα σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες για τις πρωτεΐνες μετά από απομόνωση σε pH 11 και η σύγκριση των παραμέτρων σχήματος με τις αντίστοιχες που προέκυψαν στο pH 8 και παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε επίσης και η συλλογή δεδομένων σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες για τα δυο διαφορετικά σύμπλοκα των πρωτεϊνών HrcN-HrpE που απομονώθηκαν σε pH 11.

Τέλος, κρίνεται αναγκαία η εφαρμογή άλλων μεθόδων δομικής πρωτεϊνικής ανάλυσης για τη μελέτη των πρωτεϊνικών συμπλόκων που αναδείχθηκαν στην παρούσα διατριβή, συμπεριλαμβανομένης της ελεγχόμενης πρωτεόλυσης και υποβολή των προϊόντων σε κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Παραρτήματα

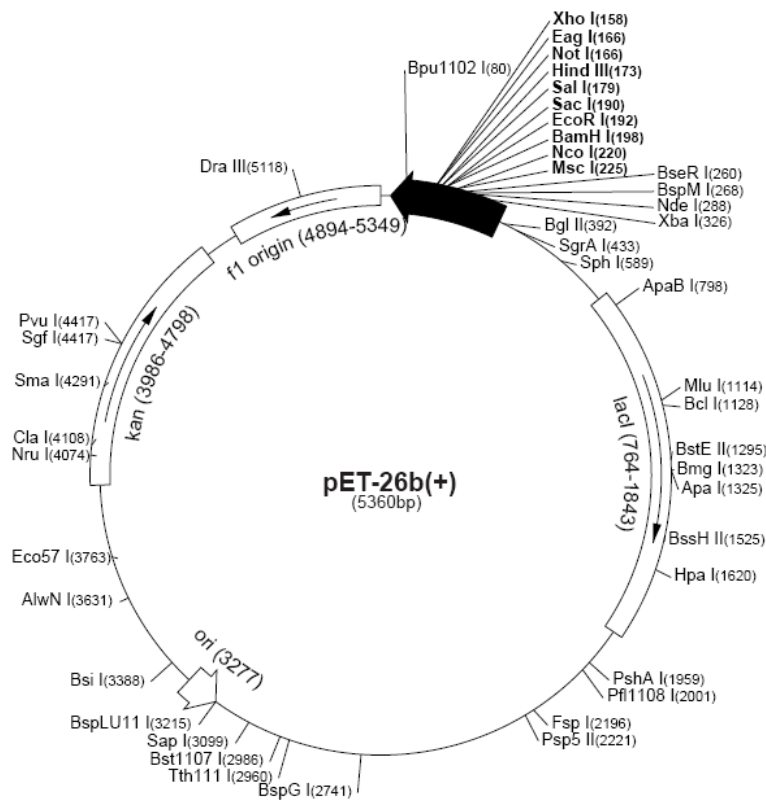
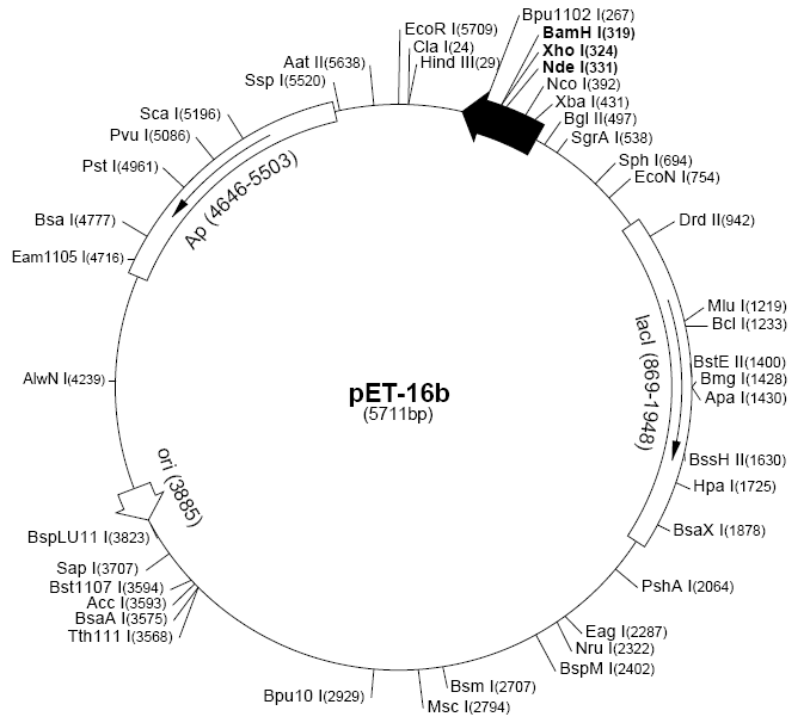
Παράρτημα 1

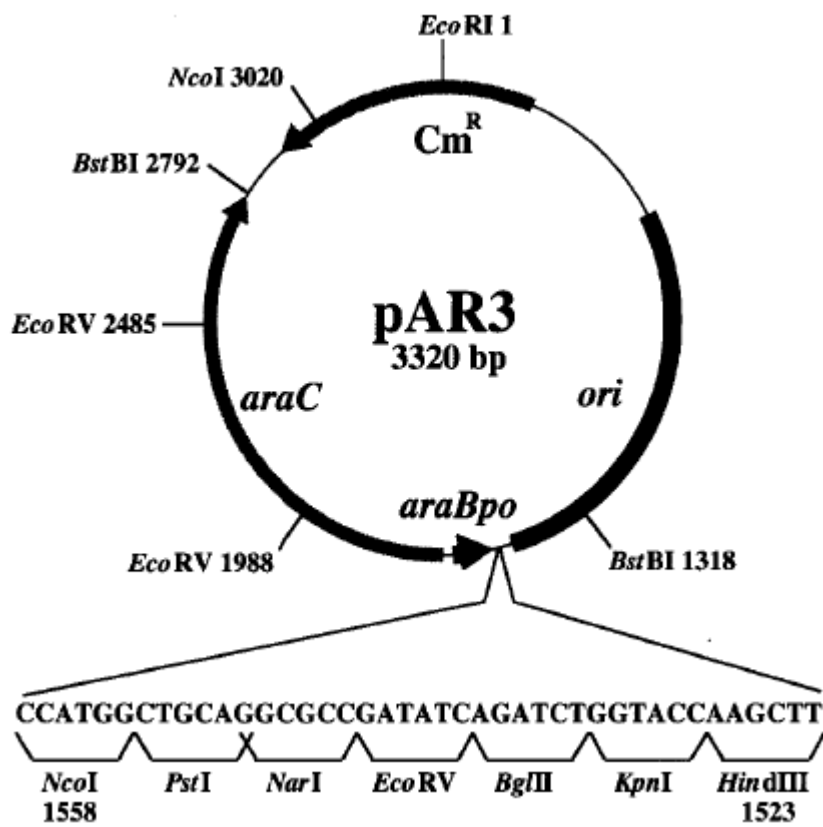
Αλληλουχίες εκκινητών, μήτρες προέλευσης των ενθεμάτων και πλασμίδια αποδέκτες τους.

Ένθεμα	Άνω εκκινητής	Κάτω εκκινητής	Μήτρα DNA	Πλασμίδιο αποδέκτης
HrpV	5'- AGGATTAGTCATGATTG AGGTAAAG-3'	5'- CGTCTAGAAGCTTGCGTCC- 3'	pET16b/HrpV	pPROEX/HrpG, pPROPET MCS1
HrpGV	5'- CAGGGCCATATGAGCTC GATG- 3'	5'- GACAGAATCTCGAGAGCCAG G- 3'	pPROEX/HrpG/ HrpV	pET26b
pPROEX- HTa MCS	5' GCGCTTAAGAATTTCAC AAAGGAGACAG-3'	5'-CGCCTTAAGAGCCAAGCTT- 3'	pPROEX-HTa	pET26b (modified) to generate pPROPET
HrpG	5'- GACCAATCATGAGCTCG ATGGATTTC-3'	5'- TTAGCAGCCGGATCCACATCA AG-3'	pPROEX/HrpG	pPROPET MCS1
HrpGV	5'- GACCAATCATGAGCTCG ATGGATTTC-3'	5'- CGTCTAGAAGCTTGCGTCC- 3'	pPROEX/HrpG/ HrpV	pPROPET MCS1
HrpJ	5'- GCTCAGAACC <u>GT</u> CATAT GAAAATCG-3'	5'- CGACAGGGCA <u>AGCT</u> TGTTTCAG AAAG-3'	pPROEX/HrpJ	pPROPET/HrpG pPROPET/HrpG /HrpV, pPROPET/HrpV (MCS2)
HrpP	5' – GCCATATCGAAGGTCGT CATATG-3'	5' – GCAGACGCAGCGCTCGAGTGC T-3'	pET16b/HrpP	pET26b
HrpE	5' – GCCATATCGAAGGTCGT CATATG-3'	5' – GGATCCTCTCGAGGGCAGACG AGTCACG-3'	pET16b/HrpE	pET26b
HrpS	5'- CTCGGGGGTCATCATAT GGATCTTGAT-3'	5'- ATCGGTACCAGCCGTCTGCAA AAAATCAG-3'	Psp3121 (race1) genomic DNA	pPROPET/HrpV
HrcN	5'- GAAGGTCGTCTCATGAA TGCTGCACTG-3'	5'- CCCAGTGAAGCTTCCATCGTT AC-3'	pET16b/HrcN	pPROPET MCS1
HrpE	5'- CGAAGGTCGTATATGC TCG – 3'	5'- GTTAGCAGCCGGATCCTCCTT CAG-3'	pET16b/HrpE	pPROPET/HrcN (MCS2)
HrpO	5'- CTGTATTTTCAGGGATC CATGGAAGAC-3'	5'- CCGTGCGGTCATGAGCTCTTA ACCTTC-3'	pPROEX/HrpO	pPROPET/HrcN /HrpE (downstream of HrpE)
HrpP	5'- GAAGGTTTCATGACGAT GACCGCACCG-3'	5'- GGGCATCAAGCTTGCGCAGAC -3'	Psp3121 (race1)genomic DNA	pPROPET MCS1
HrpJ	5'- GTCATATGACTGCAGTC GCCCCG-3'	5'- CGACAGGGCA <u>AGCT</u> TGTTTCAG AAAG-3'	pET16b/HrpJ	pAR3

Παράρτημα 2.

Οι χάρτες των εμπορικών φορέων έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.





Πηγή χαρτών pET16b & pET26b: www.novagen.com

Πηγή χάρτη pAR3: Perez-Perez J. & Gutierrez J. 1995.

Παράρτημα 3.

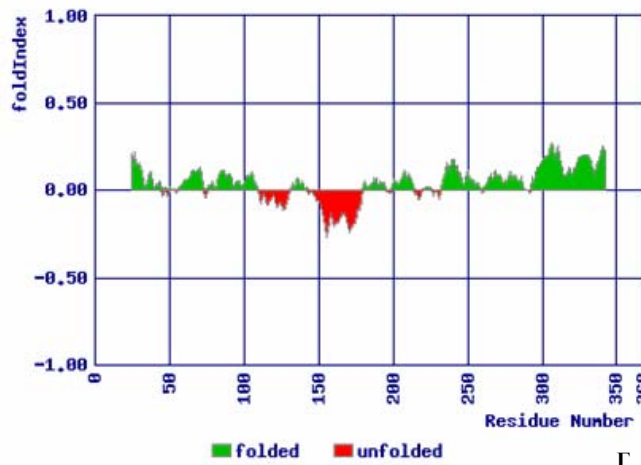
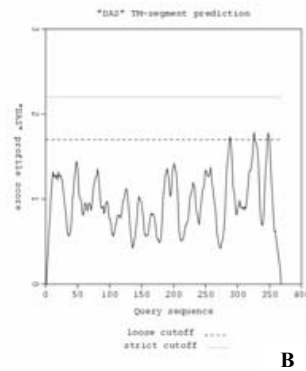
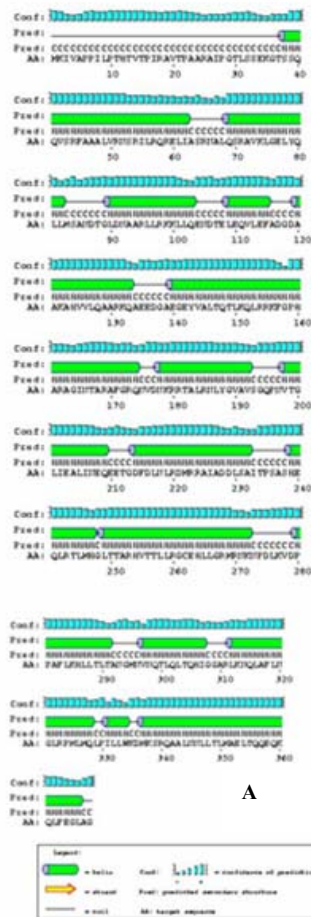
Βιοϋπολογιστική ανάλυση των αλληλουχιών των πρωτεϊνών *P. syringae* pv. phaseolicola race1 (Psp3121) που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία με τα προγράμματα DNAMAN, ProtParam, FoldIndex, Psipred, MATCHER, Scan Prosite (λειτουργικό Windows). Οι αλληλουχίες ανασύρθηκαν από τη βάση δεδομένων NCBI.

1. HrpJ (AAS20436)

- Protein Length=368
- MW=40585
- Predicted pI=10.53
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.245

```

MKIVAPPILPHTHTVTPIRAVTPAARAIPGTLSSSEKGTSSQQVSR
FAAALVNRNRIILRQRELIASRNALQSRVAVKLGELYQLLMSANDTGLDNAARLLRKKLL
QENDTELEQVLEFADGDAAKAHVVLQAARKQAEEDGAEGEYVALTQTLKQLRRKFGPH
ARAGINTARAFGRQNVNDNKRRTALRNLYGVAVSGQPNTGLIEALINEQEETGDFDLN
LRDMRRAIADDSAITPSASHEQLRTLHGLTTARHVTTLLRGCEHLLGRMRNKNPDL
KVDPPAFKHLTLTANGMNVNQTLQLTQHIGGARLKNQLAFLNGLRPMLMQLPILLW
KDMKSRQAALNNLLTLMAELTQEQKQLFEGLAG
    
```



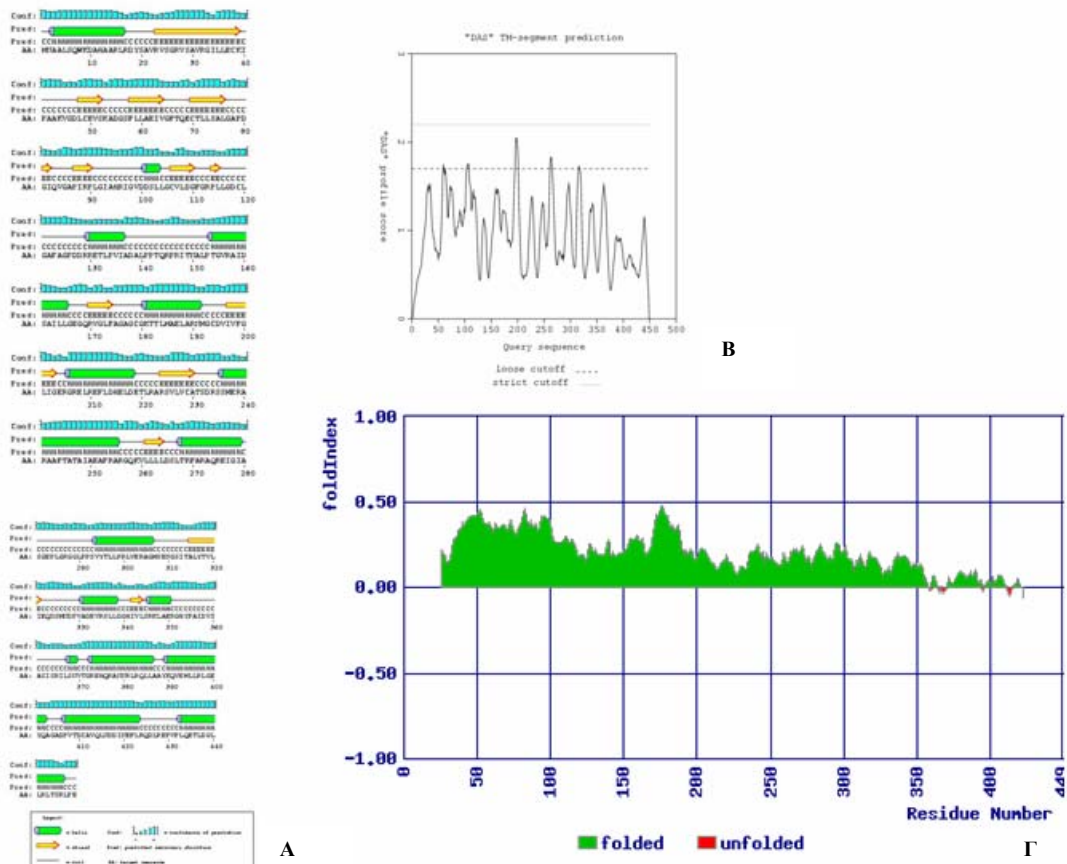
Εικ. 3Π.1. **A.** Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpJ από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Η πρωτεΐνη HrpJ προβλέπεται να είναι όλη α-ελικοειδής. **B.** Πρόβλεψη μεμβρικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλιού. Η πρωτεΐνη HrpJ προβλέπεται να είναι διαλυτή. Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι η HrpJ ανακτά τη διαλυτότητά της μόνο παρουσία της αλλη

λεπιδρώσας HrpG. **Γ.** Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές, με πράσινο οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες.

2. HrcN (AAS20439)

- Protein Length=449
- MW=48325
- Predicted pI=5.75
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.309 assuming ALL Cys residues appear as half cystines OR 0.298, assuming NO Cys residues appear as half cystines

MNAALSQWKDAHAARLRDYSAVRVSGRVSAVRGILLECKIPAAK
 VGDLCVSKADGSFLLAEIVGFTQECTLLSALGAPDGIQVGAPIRPLGIAHRIGVDDS
 LLGCVLDGFGFRPLLGDCLGAFAGPDDRRRTLPIADALPPTQRPRITNALPTGVRAID
 SAILLGEGRVGLFAGAGCGKTTLMAELARNMGCDVIVFGLIGERGLREFLDHELD
 ETLRARSVLVCATSDRSMERARAAFTATAIAEAFRARGQKVLLLDLSLRFARAQRE
 IGIASGEPLGRGGLPPSVYTLLPRLVERAGMSENGSITALYTVLIEQDSMNDPVADEV
 RSLLDGHI VLSRKLAEARGHYPAIDVSASISRILSNVTGREHQRANNRLRQLLAAYKQV
 EMLLRLEGEYQAGADPVTDCAVQLNDDINEFLRQDLREPVLQETLDGLLRLTSRLPE



ATPASE_ALPHA_BETA *ATP synthase alpha and beta subunits signature:*

————— ■ (449 aa)

355 - 364:

PAIDVSASIS

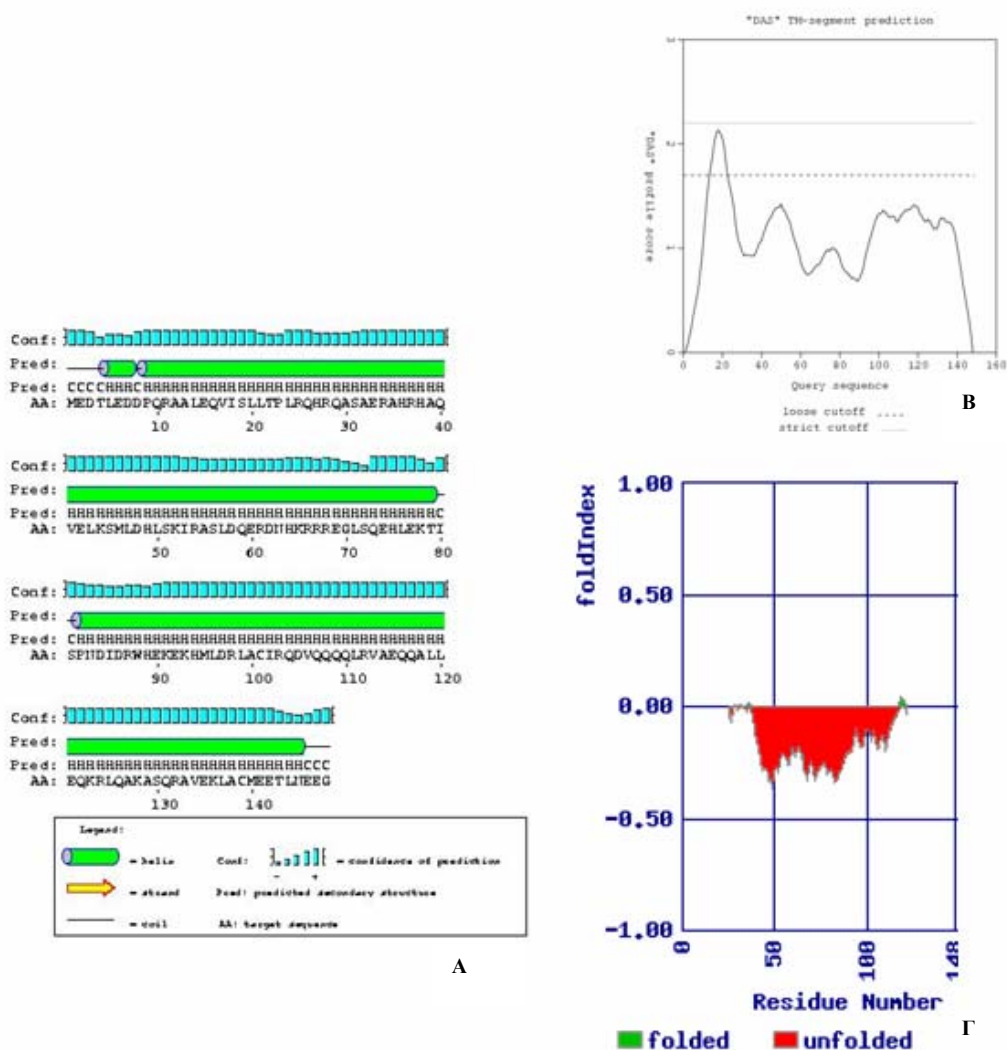
Δ

Εικ. 3Π.2. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrcN από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλιού. Η πρωτεΐνη HrcN προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Pozidis et al 2003, παρούσα εργασία) Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές. Η πρωτεΐνη HrcN προβλέπεται να είναι όλη αναδιπλωμένη. Δ. Ο αλγόριθμος ScanProsite αναγνώρισε ένα μοτίβο επί της αλληλουχίας της HrcN, την υπογραφή των α- και β- υπομονάδων της ATPάσης, στα κατάλοιπα 355-364 της πρωτεΐνης. Όντως, πρόκειται για την ATPάση του T3SS της *P.syringae* pv. *phaseolicola* (Pozidis et al 2003).

3. HrpO (AAS20440)

- Protein Length=148
- MW=17374
- Predicted pI=6.26
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.323 assuming ALL Cys residues appear as half cystines OR 0.316, assuming NO Cys residues appear as half cystines

MEDTLEDDPQRAALEQVILLSLTPLRQHRQASAERAHRHAQVELK
 SMLDHLISKIRASLDQERDNHKKRRREGLSQEHLEKTI SPNDIDRWHEKEKHMLDRLACI
 RQDVQQQLRVAEQQALLEQKRLQAKASQRAVEKLACMEETLNEEG

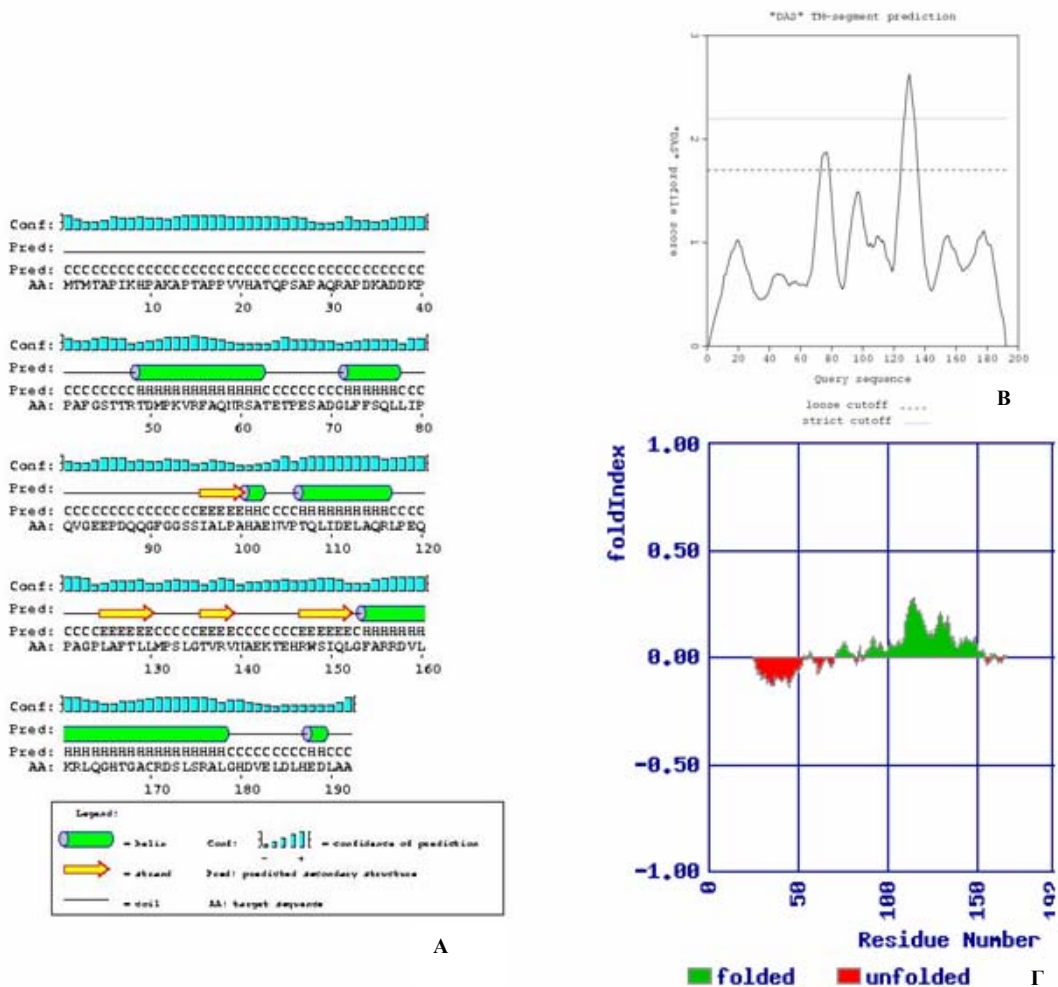


Εικ. 3P.3. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpO από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Η πρωτεΐνη HrpO προβλέπεται να είναι όλη α-ελικοειδής. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλιού. Η πρωτεΐνη HrpO προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Gazi et al 2008, παρούσα εργασία) Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές. Η πρωτεΐνη HrpO προβλέπεται να είναι όλη αποδιπλωμένη. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Gazi et al 2008)

4. HrpP (AAS20441)

- Protein Length=192
- MW=20637
- Predicted pI=5.96
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.266

MTMTAPIKHPAKAPTAPPVVHATQPSAPAPQAPDKADDKPPAFG
 STTRTDMPKVRFAQNRSATETPESADGLFFSQQLLIPQVGEPPDQQGFGSSIALPAHA
 ENVPTQLIDELAQRLEPQAGPLAFTLLMPSLGTVRVNAEKTEHRWSIQLGFARRDVL
 KRLQGHTGACRDSLSRALGHDVVELDLHEDLAA

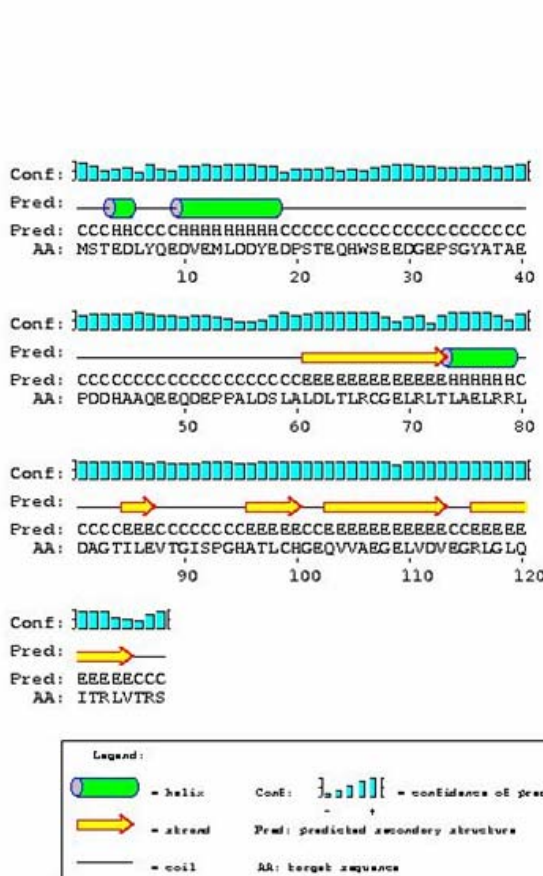


Εικ. 3Π.4. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpP από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Σε φυσιολογικό pH στην παρούσα εργασία αποδείχτηκε ότι στην πρωτεΐνη HrpP τα ποσοστά μεταξύ α-έλικας και β-πτυχής είναι ισομοιρασμένα (παράγραφος 4.3.2.2). Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλιού. Η πρωτεΐνη HrpP προβλέπεται να έχει μια διαμεμβρανική περιοχή αλλά τα πειράματα έδειξαν ότι συμβαίνει το αντίθετο καθώς πρόκειται για διαλυτή πρωτεΐνη (παρούσα εργασία). Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές.

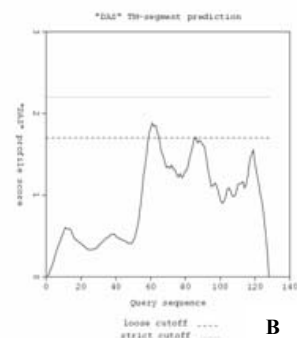
5. HrcQb (AAS20443)

- Protein Length=128
- MW=14062
- Predicted pI=3.80
- Ext. coefficient for HrcQbc (fragment 50-128aa)(Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.015 assuming ALL Cys residues appear as half cystines OR 0.000, assuming NO Cys residues appear as half cystines

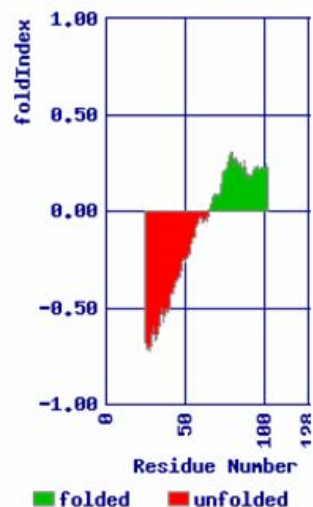
MSTEDLYQEDVEMLDDYEDPSTEQHWSEEDGEPSPGYATAEPDDH
AAQEEQDEPPALDSIALDLTLRCGELRLTLAELRRLDAGTILEVTGISPGHATLCHGE
QVVAEGELVDVEGRGLQITRLVTRS



A



B



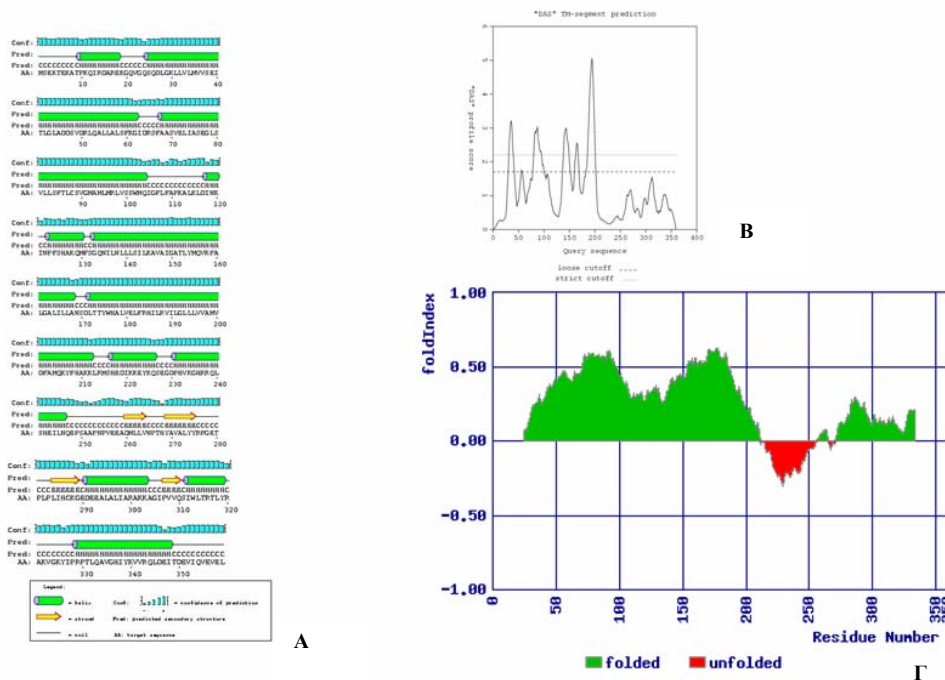
Gamma

Εικ. 3Π.5. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrcQb από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. **Β.** Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακομαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατώφλιου. Η πρωτεΐνη HrcQb προβλέπεται να είναι διαλυτή. Πειραματικά έχει επιβεβαιωθεί (Fadouloglou et al 2004, παρούσα εργασία) **Γ.** Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές. Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης προβλέπεται να είναι εξαιρετικά αποδιπλωμένο, το καρβοξυτελικό προβλέπεται να είναι αναδιπλωμένο. Όπως, μόνο μετά την αφαίρεση του αμινοτελικού άκρου μπόρεσε το υπόλοιπο μόριο να κρυσταλλώσει (Fadouloglou et al 2004).

6. HrcU (AAS20447)

- Protein Length=359
- MW=39946
- Predicted pI=9.08
- Ext. coefficient for HrcUc (fragment 199-359aa) (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.945

MSEKTEKATPKQIRDAREKGQVGSQDLGKLLVLMVSEITLGL
 ADDSVDRLQALLALSFKGI DRSF AASVELIASEGLSVLLSFTLCSVGMAMLMRLVSSW
 MQIGFLFAPKALKLDINKINPF SHAKQMFSGQNI LNL LLSILKAVAIGATLYMQVKPA
 LGALILLANSDLT'TYWHALVELFRHILRVILG LLLVAMVDFAMQKYFHAKKL RMSHE
 DIKKEYKQSEGDPHVKGHRRLSHEILNQEPSAAPNPVEADMLLVNPTHYAVALYR
 PGETPLPLIHKCGEDEEALAL IARAKKAGIPVVQSIWLTRTLYRAKVGK YIPRPTLQA
 VGHYKVVRLDEITDEVIQVEVEL



ABC_TRANSPORTER_1 *ABC transporters family signature:*
 (359 aa)

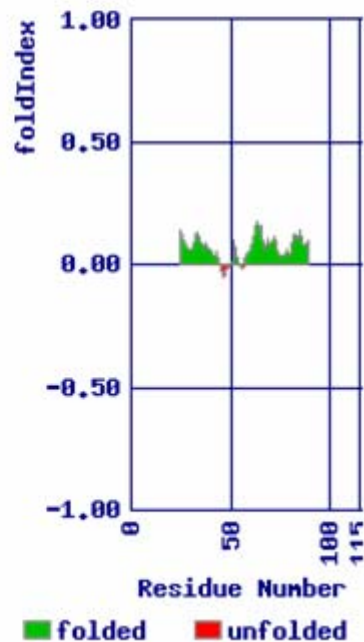
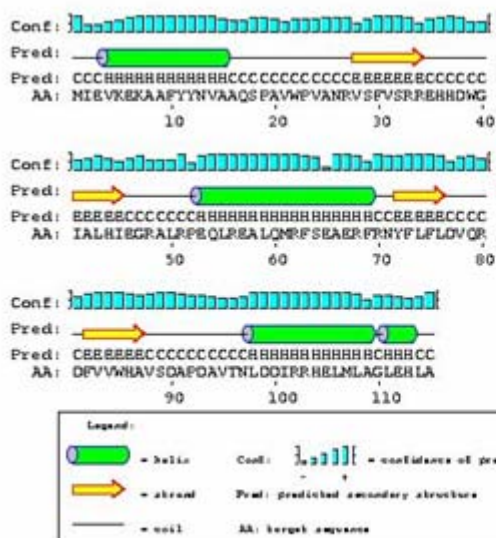
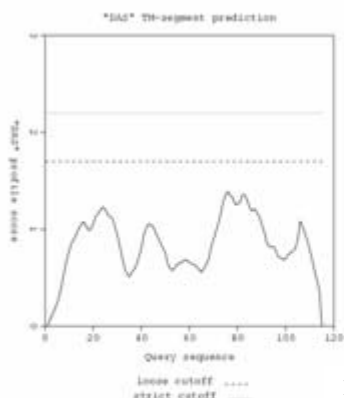
88 - 102: CSVGMAMLMRLVSSW Δ

Εικ. 3Π.6. **A.** Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrcU από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. **B.** Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατώφλιου. Η πρωτεΐνη HrcU προβλέπεται να έχει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές και ένα διαλυτό καρβοξυτελικό άκρο. Οι προβλέψεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί πειραματικά (Χαρόβα, Μεταπτυχιακή Διατριβή, 2004). **Γ.** Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές. **Δ.** Ο αλγόριθμος ScanProsite αναγνώρισε ένα μοτίβο επί της αλληλουχίας της HrcU, την υπογραφή των μεταφορέων ABC, στα κατάλοιπα 88-102 της πρωτεΐνης.

7. HrpV (AAS20448)

- Protein Length=115
- MW=13444
- Predicted pI=6.06
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 1.558

MI EVKEKAAFYYNVAAQSPAVWPVANRVSFVSRREHHDWGIALH
IEGRALRPEQLREALQMRFS EAERFRNYFLFLDVQRDFVWHAVSDAPDAVTNLDDIR
RHEMLLAGLEHLA

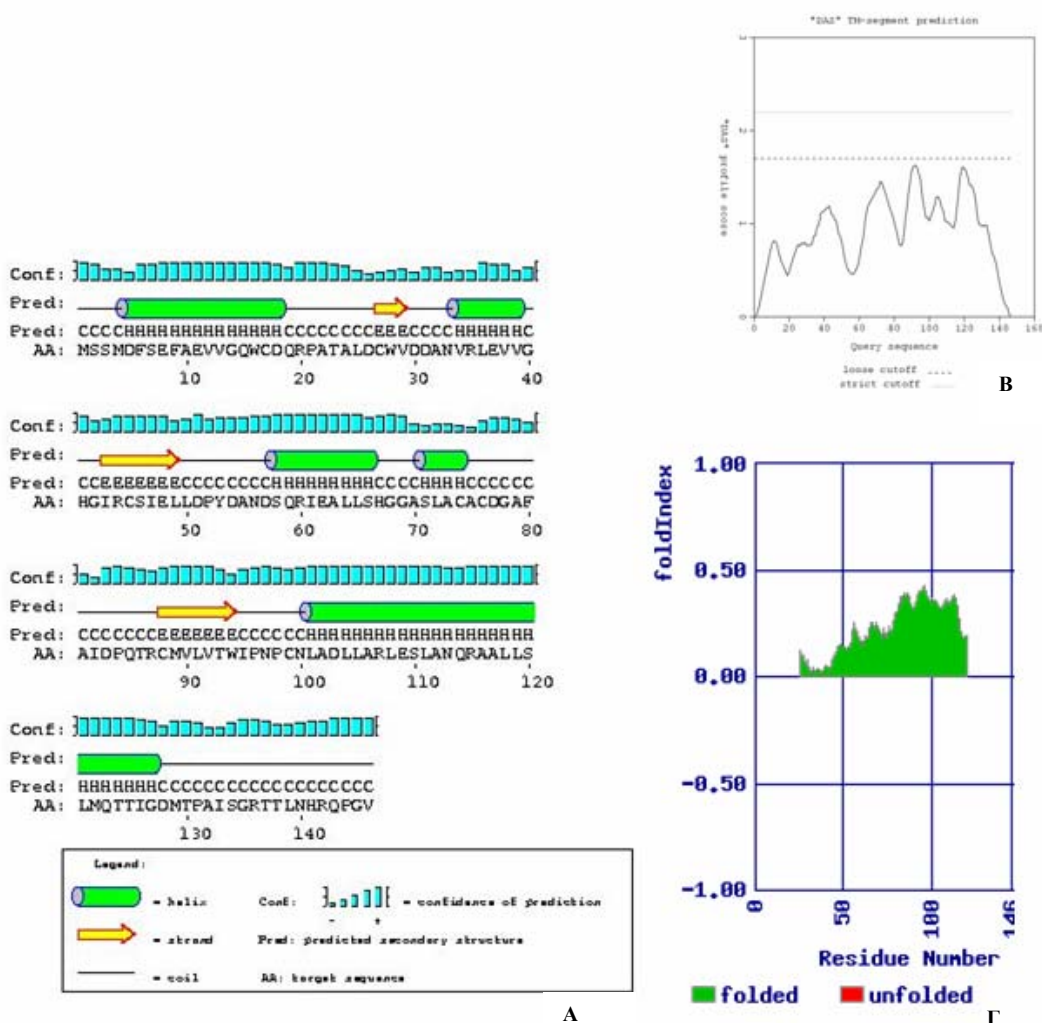


Εικ. 3Π.7. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpV από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. **Β.** Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλίου. Η πρωτεΐνη HrpV προβλέπεται να είναι διαλυτή. Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι η HrpV ανακτά τη διαλυτότητά της μόνο παρουσία της αλληλεπιδρώσας HrpG. **Γ.** Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές.

8. HrpG (AAS20451)

- Protein Length=146
- MW=15785
- Predicted pI=4.29
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 1.162 assuming ALL Cys residues appear as half cystines OR 1.138, assuming NO Cys residues appear as half cystines

MSSMDFSEFAEVVGQWCDQRPATALDCWVDDANVRLEVVGHGIR
 CSIELLDPYDANDSQRIEALLSHGGASLACACDGAFIDPQTRCMVLTWIPNPNLA
 DLLARLES LANQRAALLSLMQTTIGDMTPAISGR TTLNHRQPGV

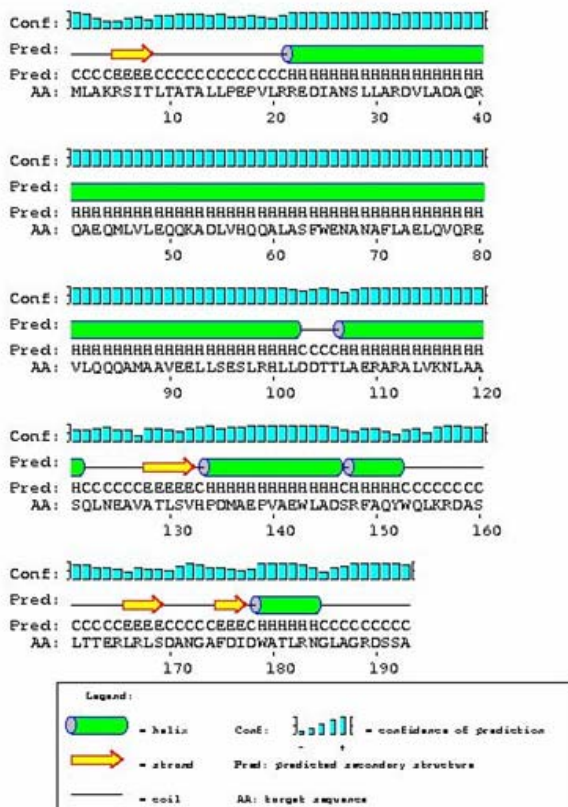


Εικ. 3Π.7. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpG από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατώφλιού. Η πρωτεΐνη HrpG προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Γαζή, Διδακτορική Διατριβή 2007, παρούσα εργασία). Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές. Όλοκληρη η πρωτεΐνη προβλέπεται να είναι αναδιπλωμένη.

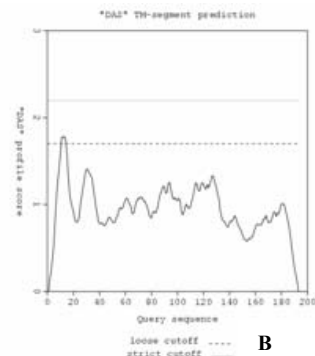
9. HrpE (AAS20453)

- Protein Length=193
- MW=21418
- Predicted pI=4.65
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 1.096

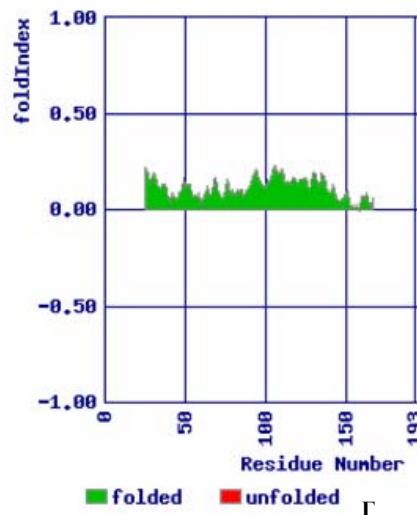
MLAKRSITLTATALLPEPVLRRDIANSLLARDVLADARQAEQ
 MLVLEQQKADLVHQALASFWENANAFLELQVQREVLLQQQAMA AVEELLSSESLRHLL
 DDTTLAERARALVKNLAA SQLNEAVATLSVHPDMAEPVAEWLADSRFAQYWQLKRDAS
 LTTTERLRLSDANGAFDIDWATLRNGLAGRDSSA



A



B



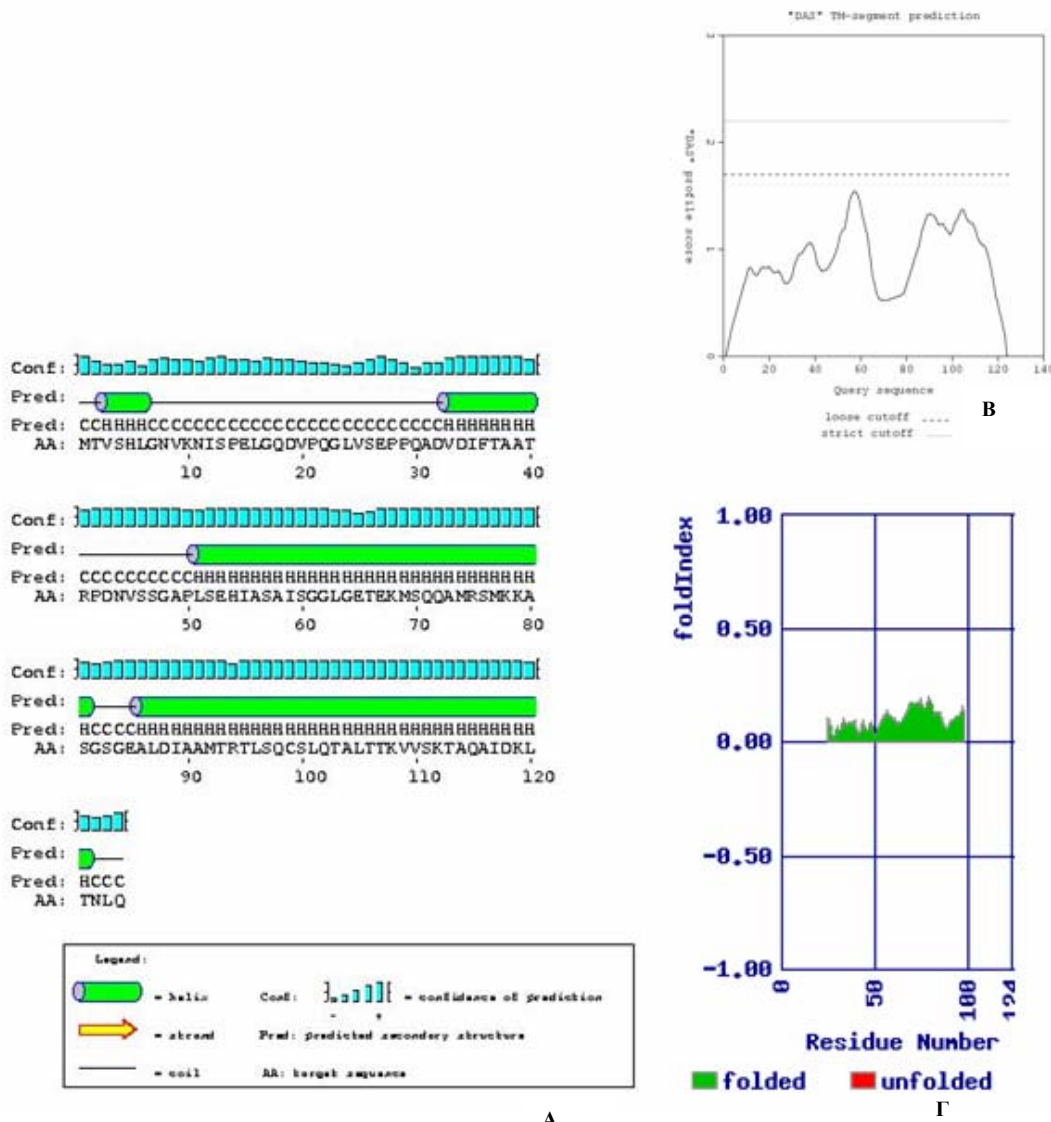
Γ

Εικ. 3Π.9. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpE από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Από την παρούσα εργασία προέκυψε ότι σε πολύ μεγάλο βαθμό η πρωτεΐνη HrpE αποτελείται από α-έλικες. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατώφλιου. Η πρωτεΐνη HrpE προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Gazi et al 2008, παρούσα εργασία). Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές. Ολόκληρη η πρωτεΐνη προβλέπεται να είναι αναδιπλωμένη.

10. HrpB (AAS20456)

- Protein Length=124
- MW=12851
- Predicted pI=5.49
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.000

MTVSHLGNVKNISPELQDVPQGLVSEPPQADVDFIATAATRPDN
VSSGAPLSEHIASAISSGLGETEKMSQQAMRSMKKASGSGEALDIAAMTRTLSQC SLQ
TALTTKVSKTAQAIDKLTNLQ

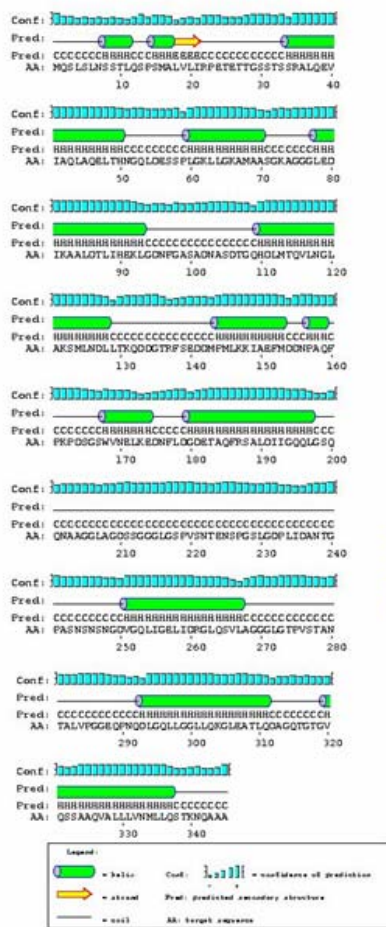


Εικ. 3Π.10. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpB από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Ολόκληρη η πρωτεΐνη προβλέπεται να είναι α-ελικοειδής. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατωφλιού. Η πρωτεΐνη HrpB προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη επιβεβαιώθηκε από τα πειράματα της παρούσας εργασίας. Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιάπλωτες περιοχές. Ολόκληρη η πρωτεΐνη προβλέπεται να είναι αναδιπλωμένη.

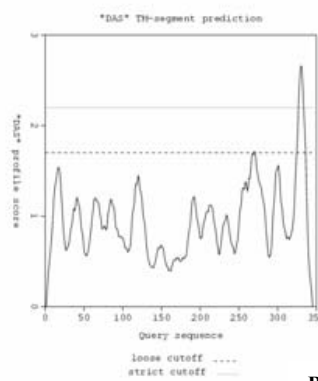
11. HrpZ (AAS20457)

- Protein Length=345
- MW=35211
- Predicted pI=4.00
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.156

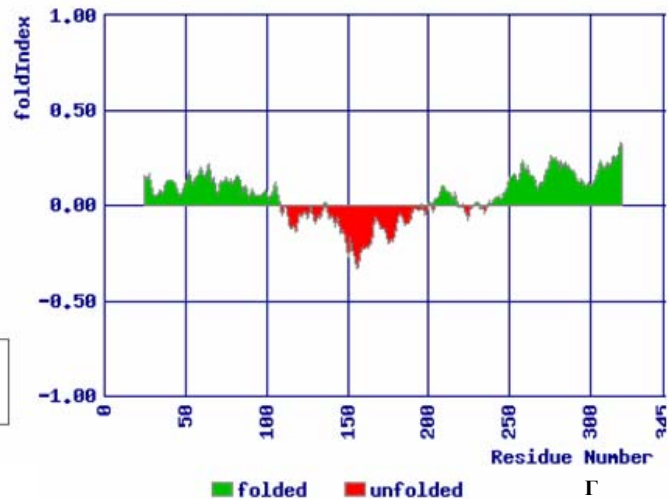
MQSLSLNSSTLQSPSMALVLRPETETTTGSSTSSRALQEVIAQL
 AQELTHNGQLDESSPLGKLLGKAMAASGKAGGLEDIKAAALDTLIHEKLGDNFGASAD
 NASDTGQHDLMTQVLNGLAKSMLNDLLTKQDDGTRFSEDDMPMLKKAIEFMDNPAQF
 PKPDSGSWVNELKEDNFLDGDETAQFRSALDIIGQQLGSQQNAAGGLAGDSSGGGLGS
 PVSNTENSPGLSDPLIDANTGPASNSNSNGDVGQLIGELIDRGLQSVLAGGGLGTPV
 STANTALVPGGEQPNQDLGQLLGLLQKGLEATLQDAGQTGTGVQSSAAQVALLLVNM
 LLQSTKNQAAA



A



B



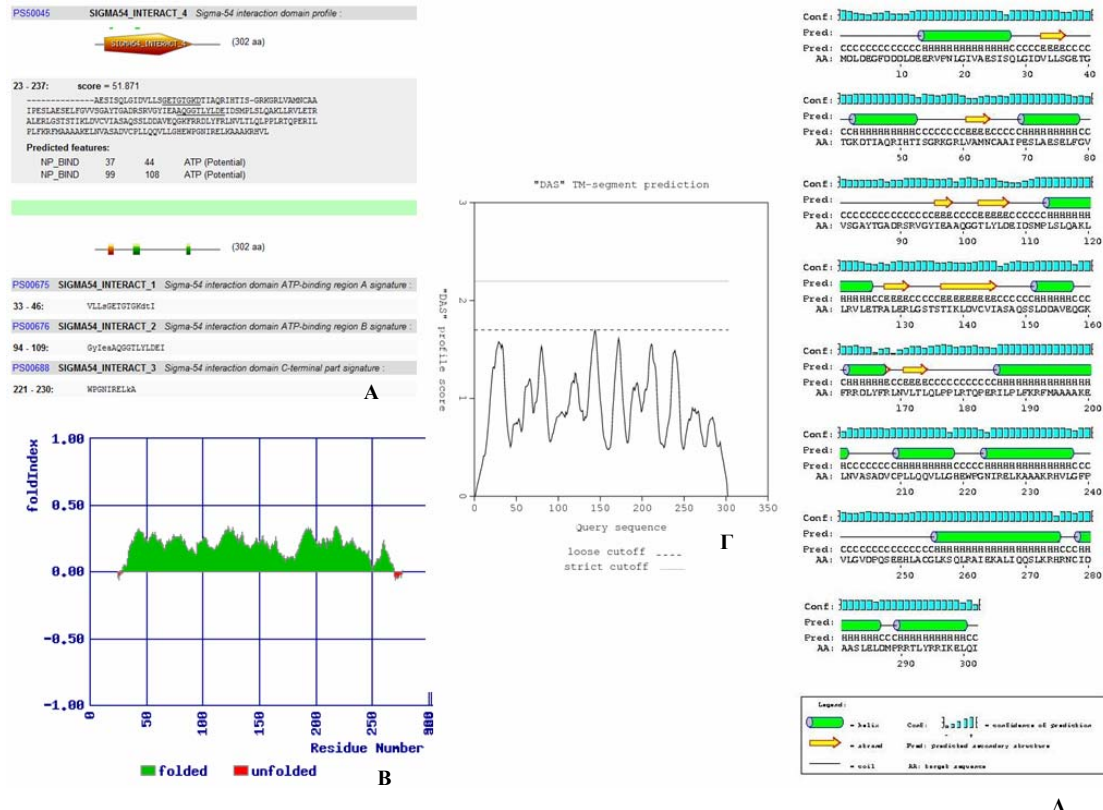
Gamma

Εικ. 3Π.11. Α. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpZ από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης. Ολόκληρη η πρωτεΐνη σχεδόν προβλέπεται να είναι α-ελικοειδής. Στην παρούσα εργασία προέκυψε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης είναι α-ελικοειδής. Β. Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατάφωλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατάφωλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού καταφωλιού. Η πρωτεΐνη HrpZ προβλέπεται να έχει μια καρβοξυτελική διαμεμβρανική περιοχή αλλά τα πειράματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι πρόκειται πραγματικά για διαλυτή πρωτεΐνη. Γ. Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αδιπλωτες περιοχές.

12. HrpS (CAA54728)

- Protein Length=302
- MW=33243.4
- Predicted pI=6.07
- Ext. coefficient (Abs 0.1% (=1 g/l)) = 0.483 assuming ALL Cys residues appear as half cystines OR 0.475, assuming NO Cys residues appear as half cystines

MDLDEGFDDDLDEERVNPLGIVAESISQLGIDVLLSGETGTGKD
 TIAQRHTISGRKGRVAMNCAAIPESLAESELFVVGAYTGADRSRVGYIEAAQGG
 TLYLDEIDSMPLSLQAKLRVLETRALERLGGSTSTIKLDVCVIASAQSSLDVAEQGK
 FRDLYFRNLNVLTLQLPPLRTQPERILPLFKRFMAAAAKELNVAADVCPLLQVLLG
 HEWPGNIRELKAALKRHLVGFVPLGVDPQSEHLACGLKSQLRAIEKALIQQSLKRHR
 NCIDAASLELDMRRTLYRRIKELQI



Εικ. 3Π.12. **A.** Ο αλγόριθμος ScanProsite αναγνώρισε μια μεγάλη επικράτεια αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα σ54 και τα επιμέρους μοτίβα της στην αμινοξική περιοχή 23-237 (Hutcheson et al., 2001). **B.** Πρόβλεψη αναδιπλωμένων επικρατειών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι προβλεπόμενες αναδιπλωμένες περιοχές, με κόκκινο οι αποδιπλωμένες. Σχεδόν όλη η πρωτεΐνη προβλέπεται να είναι αναδιπλωμένη. **Γ.** Πρόβλεψη μεμβρανικών επικρατειών. Καταδεικνύονται δυο κατώφλια, το χαλαρό (διακεκομμένη γραμμή) και το αυστηρό (συνεχής γραμμή). Περιοχές όπου η καμπύλη διακυμαίνεται από το αυστηρό κατώφλι και κάτω προβλέπονται ως μη μεμβρανικές. Το αντίθετο όπου η καμπύλη κυμαίνεται άνω του αυστηρού κατώφλιου. Η πρωτεΐνη HrpS προβλέπεται να είναι διαλυτή. Η πρόβλεψη έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά (Hutcheson et al. 2001, παρούσα εργασία). **Δ.** Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης HrpS από το πρόγραμμα Psi-Pred. Με πράσινο κύλινδρο απεικονίζονται οι προβλεπόμενες α-έλικες, με κίτρινα βέλη οι προβλεπόμενες β-πτυχές. Η γαλάζια μπάρα επιδεικνύει την εμπιστοσύνη πρόβλεψης.

Πίνακας 3Π.1. Πρόβλεψη επαναλήψεων επτάδας (επί τοις εκατό του μήκους της πρωτεΐνης σε κατάλοιπα) για τις υπό εξέταση σε αυτήν την εργασία πρωτεΐνες της *P.syringae* pv. *phaseolicola* race1 (Psp3121) με τη βοήθεια του αλγορίθμου MATCHER.

Psp3121 pathogenicity island open reading frames	% PREDICTED COILED-COILS (MATCHER)
HrpJ	44%
HrcN	24%
HrpO	77%
HrpP	0%
HrcQb	31%
HrcU	10%
HrpV	0%
HrpG	16%
HrpE	51%
HrpB	0%
HrpZ	14%
HrpS	10%

Βιβλιογραφία

Fadoulglou, V.E., Tampakaki, A.P., Glykos, N.M., Bastaki, M.N., Hadden, J.M., Phillips, S.E., *et al.* 2004. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *PNAs*, **101**: 70–75.

Fadoulglou V.E., Bastaki M.N., Ashcroft A.E., Phillips S.E., Panopoulos N.J., Glykos N.M., Kokkinidis M. 2009. On the quaternary association of the type III secretion system HrcQB-C protein: experimental evidence differentiates among the various oligomerization models. *J Struct Biol.* 166(2):214-25.

Gazi A.D., Bastaki M., Charova S.N., Gkougkoulia E.A., Kapelios E.A., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M. 2008. Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems. *JBC*, 283(49), 34062-34068.

Hutcheson S.W., Bretz J., Sussan T., Jin S. & Pak K. 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol.* 183(19), 5589-5598

Pozidis C. Chalkiadaki A., Gomez-Serrano a., Stahlberg H., Brown I et al. 2003. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J. Biol. Chem.* 278, 25816–25824.

Γαζή Α.Δ., 2007. Δομικά χαρακτηριστικά υποψήφιων σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III και των συμπλόκων τους. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

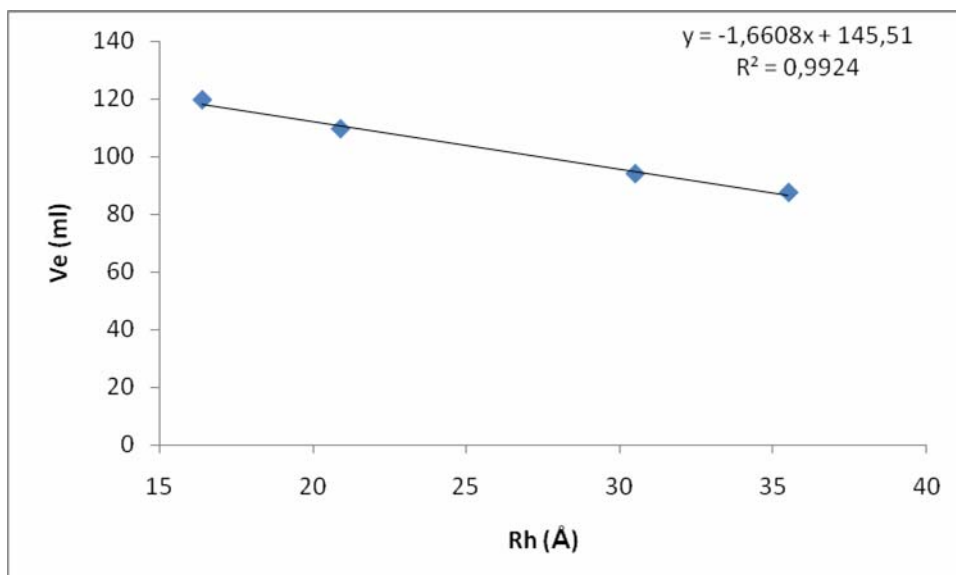
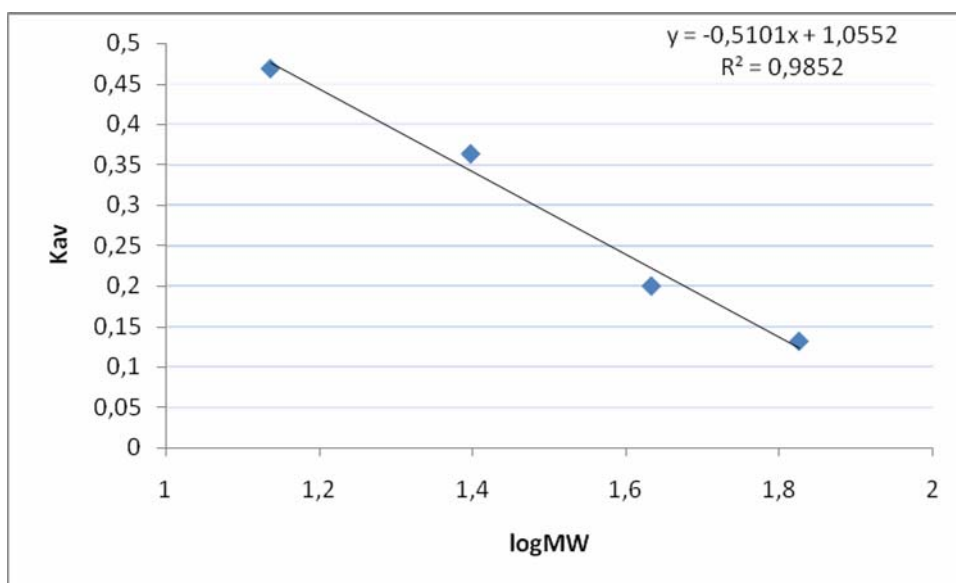
Χαρόβα Σ.Ν., 2004. Καθαρισμός και μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών που δομούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III σε παθογόνα βακτήρια. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Παράρτημα 4.

Βαθμονομήσεις των στηλών μοριακής διήθησης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και τα γραφήματα ανεύρεσης μοριακού βάρους και υδροδυναμικής ακτίνας

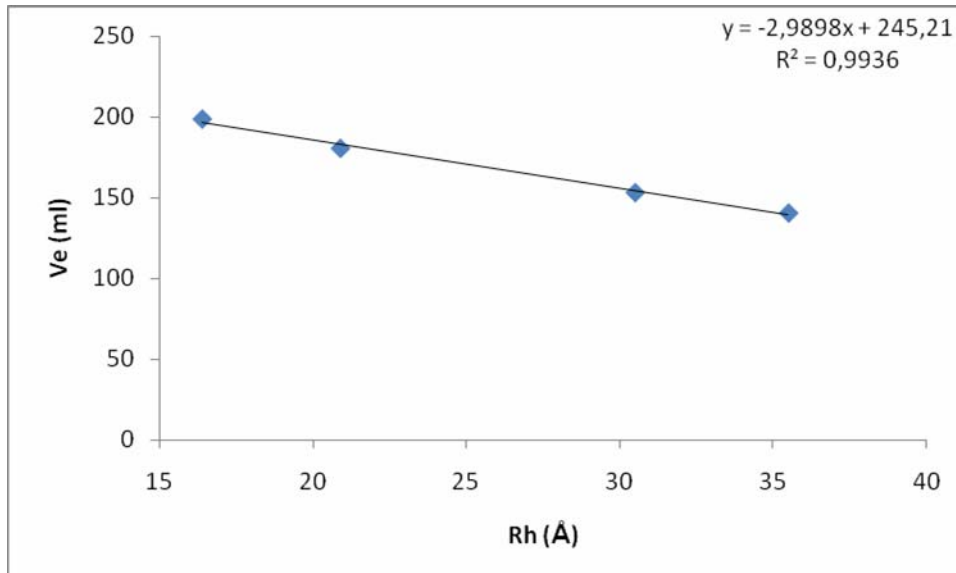
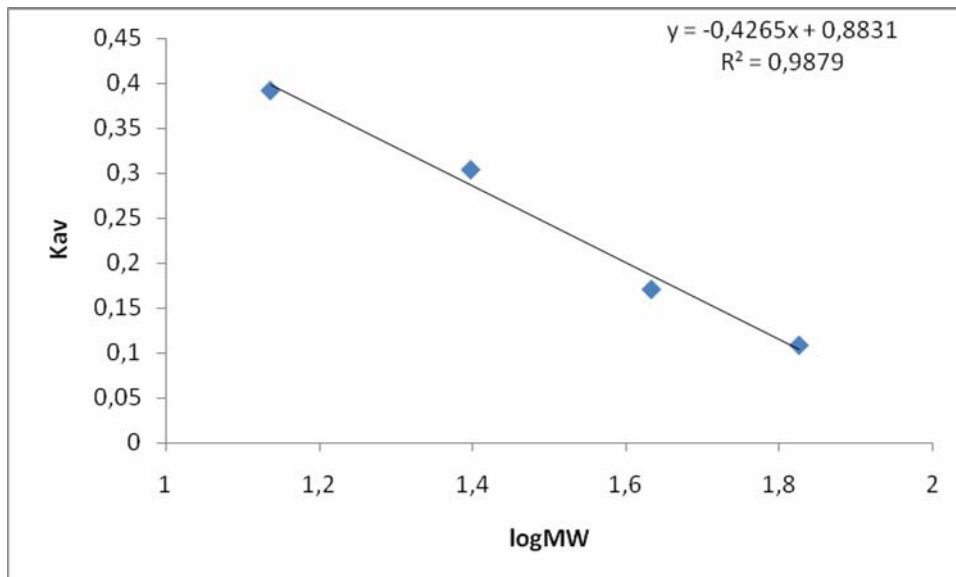
1. S100¹ ($V_t=170\text{ml}$, $V_0=75\text{ml}$)

PROTEIN	MW(kDa)	LogMW	V_E (ml)	K_{av}	R_h (Å)
Ribonuclease A	13,7	1,1367	119,5	0,4684	16,4
Chymothrypsinogen A	25	1,3979	109,5	0,3632	20,9
Ovalbumine	43	1,6334	94	0,2	30,5
Albumin (BSA)	67	1,8260	87,5	0,1316	35,5



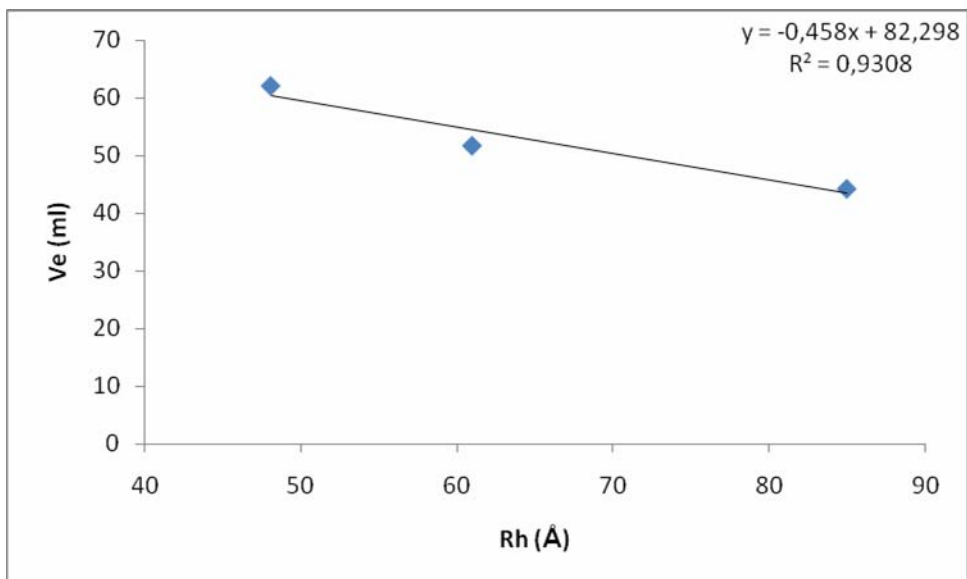
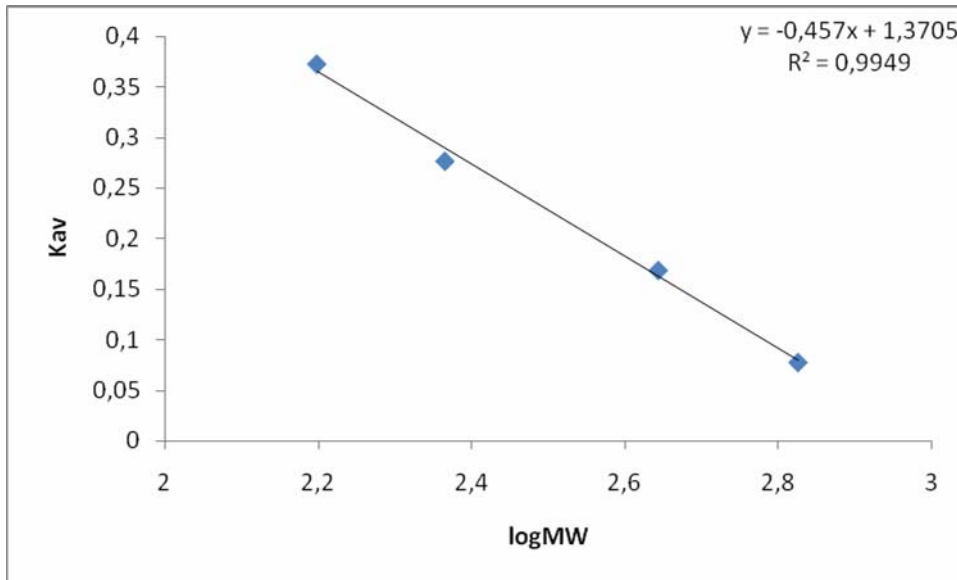
2. S100² ($V_t=323\text{ml}$, $V_0=118\text{ml}$)

PROTEIN	MW(kDa)	LogMW	V_E (ml)	K_{av}	R_h (Å)
Ribonuclease A	13,7	1,1367	198,3	0,392	16,4
Chymothrypsinogen A	25	1,3979	180,3	0,304	20,9
Ovalbumine	43	1,6334	153	0,171	30,5
Albumin (BSA)	67	1,8260	140,4	0,109	35,5



3. S300 ($V_t=120\text{ml}$, $V_0=38.2\text{ml}$)

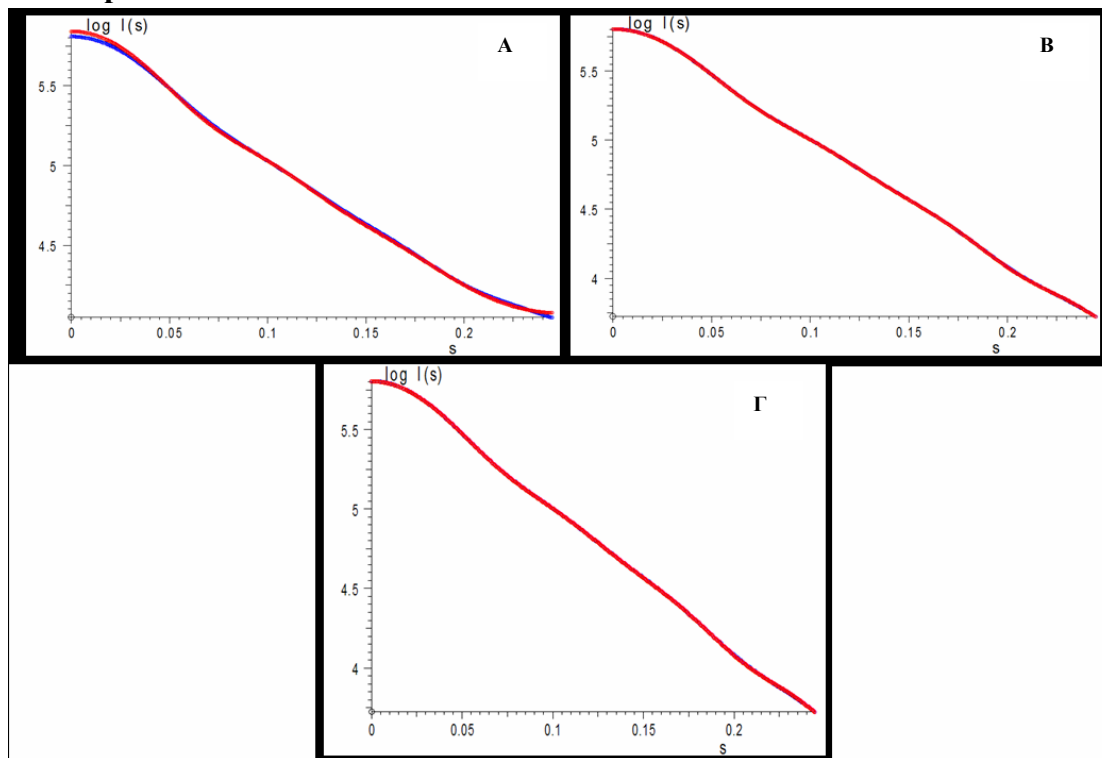
PROTEIN	MW(kDa)	LogMW	V_E (ml)	K_{av}	R_h (Å)
Thyroglobulin	669	2,8254	44,3	0,078	85
Ferritin	440	2,6434	51,7	0,169	61
Catalase	232	2,3655	60,5	0,277	
Aldolase	158	2,1986	62	0,373	48,1



Παράρτημα 5.

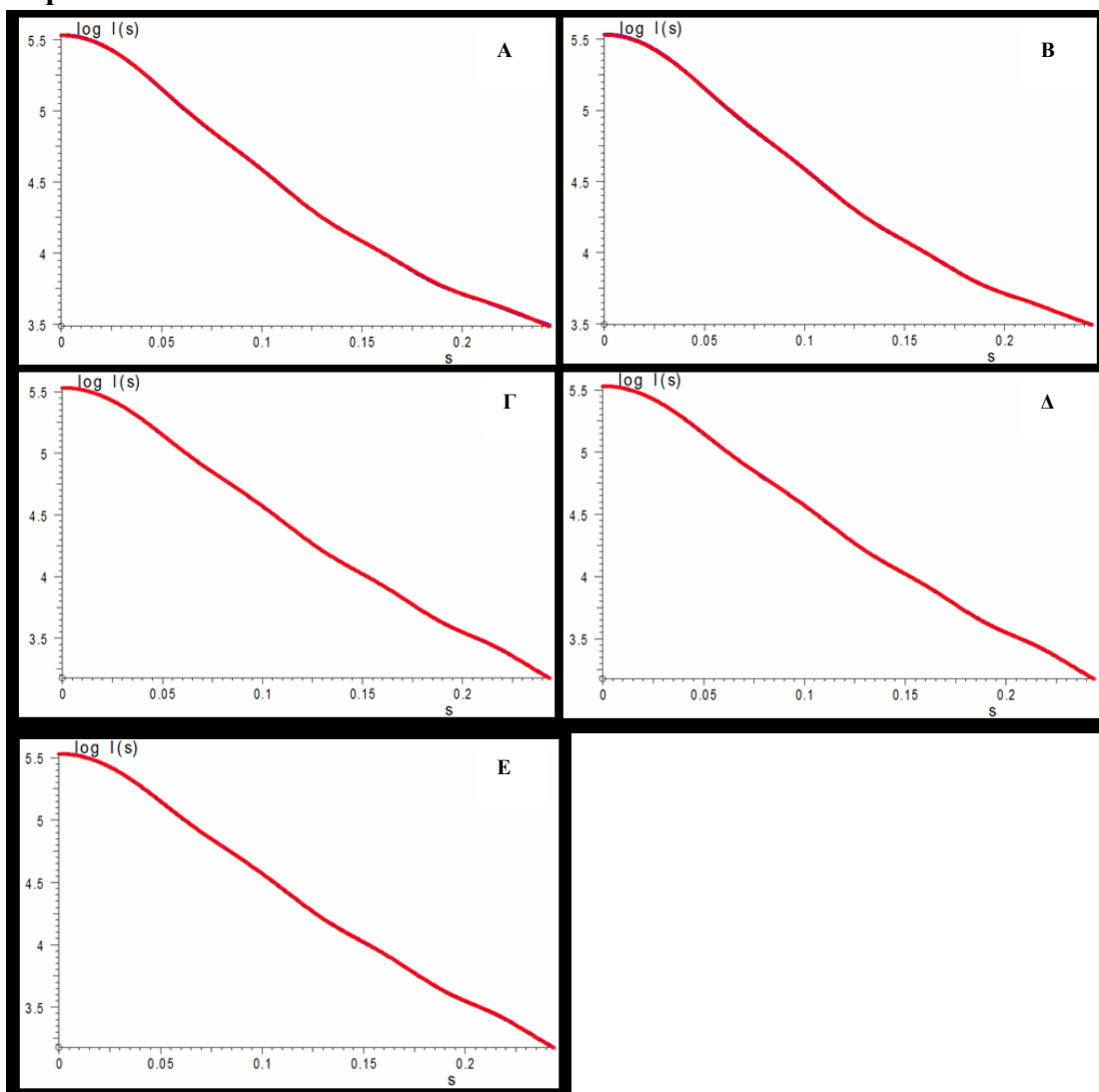
Γραφική απεικόνιση προσαρμογής των *ab initio* υπολογισμένων μοντέλων από τα προγράμματα DAMMIN και GASBOR στα πειραματικά δεδομένα.

A. HT-HrpP



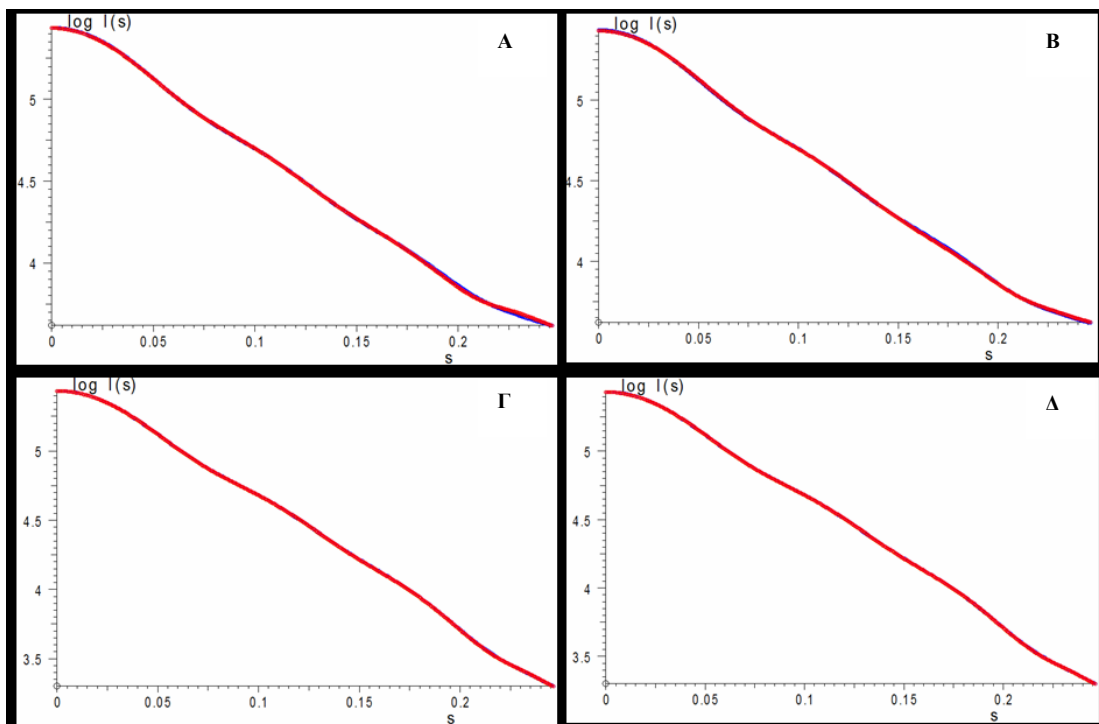
Εικ. Π5.1. Προσαρμογή υπολογισμένων μοντέλων της πρωτεΐνης HT-HrpP στα πειραματικά δεδομένα. **A.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1, $\chi=1,93$. **B.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1 (καμία συμμετρία). Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=1.71$. **Γ.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P2P (διπλός άξονας συμμετρίας με επιμήκη (prolate) ανισομετρία). Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=1.71$. Η κόκκινη καμπύλη αποτελεί την αναπαράσταση των δεδομένων από το υπολογισμένο μοντέλο και η μπλε τα πειραματικά δεδομένα. Όσο καλύτερη η συμφωνία μεταξύ τους τόσο πιστότερο το υπολογισμένο μοντέλο.

B. HrpZ-HT



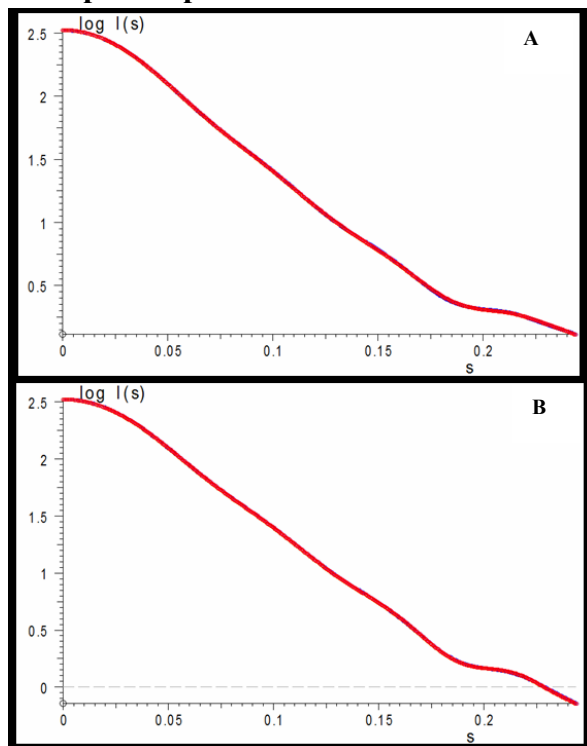
Εικ. Π5.2. Προσαρμογή υπολογισμένων μοντέλων της πρωτεΐνης HrpZ-HT στα πειραματικά δεδομένα. **A.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1 (καμία σημειακή συμμετρία), $\chi=2,72$. **B.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1P (καμία σημειακή συμμετρία με επιμήκη (prolate) ανισομετρία), $\chi=2,55$. **Γ.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1. Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=2,67$. **Δ.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1P. Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=2,67$. **E.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P2P (διπλός άξονας συμμετρίας με επιμήκη (prolate) ανισομετρία). Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=2,7$. Η κόκκινη καμπύλη αποτελεί την αναπαράσταση των δεδομένων από το υπολογισμένο μοντέλο και η μπλε τα πειραματικά δεδομένα.

Γ. HT-HrpEc



Εικ. Π5.4. Προσαρμογή υπολογισμένων μοντέλων της πρωτεΐνης HT-HrpEc στα πειραματικά δεδομένα. **A.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1, τιμή $\chi=1,79$. **B.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1P, $\chi=1,95$. **Γ.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1. Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=1,84$. **Δ.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1P. Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi=1,84$. Η κόκκινη καμπύλη αποτελεί την αναπαράσταση των δεδομένων από το υπολογισμένο μοντέλο και η μπλε τα πειραματικά δεδομένα. Όσο καλύτερη η συμφωνία μεταξύ τους τόσο πιστότερο το υπολογισμένο μοντέλο.

Δ. HrpG+HrpV-HT



Εικ. Π5.5. Προσαρμογή υπολογισμένων μοντέλων του συμπλόκου πρωτεϊνών HrpG+HrpV-HT στα πειραματικά δεδομένα. **A.** Πρόγραμμα GASBOR, σημειακή συμμετρία P1, $\chi^2=1,89$. **B.** Πρόγραμμα DAMMIN, σημειακή συμμετρία P1. Οκτώ διαφορετικά μοντέλα υπολογίστηκαν και όλα έδωσαν τιμή $\chi^2=1,96$. Η κόκκινη καμπύλη αποτελεί την αναπαράσταση των δεδομένων από το υπολογισμένο μοντέλο και η μπλε τα πειραματικά δεδομένα. Όσο καλύτερη η συμφωνία μεταξύ τους τόσο πιστότερο το υπολογισμένο μοντέλο.

