

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών & Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας Φυτών

Διδακτορική διατριβή

« Δομικά χαρακτηριστικά υποψήφιων
σαπερονών του εγκριτικού συστήματος τύπου
III και των συμπλόκων τους ».

Αναστασία Δ. Γαζή

Ηράκλειο, 2007.

Επιβλέποντες: Καθ. Ν.Ι. Πανόπουλος & Καθ. Μ. Κοικινίδης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή: Καθ. Ν.Ι. Πανόπουλος, Καθ. Μ. Κοικινίδης,
Καθ. Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή: Καθ. Ν.Ι. Πανόπουλος, Καθ. Μ. Κοικινίδης, Καθ.
Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, Αναπλ. Καθ. Κ. Κοτσαμπάσης, Αναπλ. Καθ. Α.
Οικονόμου, Επιμ. Καθ. Ε. Τσαγρή, Λεκτ. Ν.Μ. Γλυκός

Πρόλογος

Η παρούσα θέση παρουσιάζει τον βιοχημικό και βιοφυσικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών που «εργάζονται» στην τύπου III έκκριση των Gram αρνητικών βακτηρίων και πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Βιοτεχνολογίας Φυτών και Κρυσταλλογραφίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης & του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας. Οι μοριακές εργασίες κλωνοποίησης των γονιδίων σε κατάλληλους φορείς ετερόλογης έκφρασης έγιναν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, ενώ η βιοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών, τα πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης, η ανάλυση δεδομένων σκέδασης ακτίνων-X και τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας. Ως εκ τούτου θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα τους επικεφαλής των δύο εργαστηρίων και άμεσους επιβλέποντες της παρούσας θέσης, καθηγητές Ν.Ι. Πανόπουλο και Μ. Κοκκινίδη για την εξαιρετική τους υπομονή, σύνεση και ευρηματικότητα, για την πλούσια παροχή υλικοτεχνικού εξοπλισμού, και κυρίως για την μύηση στα μυστικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III που αποτελεί το βιολογικό πεδίο της θέσης αλλά και στον αντίστροφο κόσμο της σκέδασης που αποτέλεσε το κύριο εργαλείο μελέτης της δομής των πρωτεϊνών.

Τα πειράματα συλλογής δεδομένων σκέδασης ακτίνων-X πραγματοποιήθηκαν στο σύγχροτο του Αμβούργου (DESY). Ειδικά για τα πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες από διάλυμα (SAXS) θέλω να ευχαριστήσω θερμότατα τον επικεφαλής της ομάδας SAXS του εξωτερικού σταθμού του Αμβούργου του ευρωπαϊκού εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL) και υπεύθυνο της γραμμής ακτινοβολήσης X33, Dr Dimitri Svergun, που μας εμπιστεύτηκε ανεπίσημα και πέραν του τυπικού προγράμματος την γραμμή ακτινοβολήσης για 5 ολόκληρες νύχτες. Λαμβάνοντας υπόψη τις δυσκολίες που παρουσιάζει ο πειραματικός κλωβός των γραμμών ακτινοβολήσης, την ανάγκη για συνεχή εναλλαγή των δειγμάτων στην περίπτωση της συγκεκριμένης γραμμής - απαιτείται η είσοδος και η έξοδος από τον πειραματικό κλωβό ανά πέντε λεπτά - και ο συνδυασμός των παραπάνω δυσκολιών με την νυχτερινή βάρδια ήταν δυνατό να οδηγηθούμε στην σχεδόν αναπόφευκτη ενεργοποίηση του συστήματος ασφαλείας που θα στερούσε την ροή ηλεκτρονίων σε ολόκληρο τον αποθηρευτικό δακτύλιο DORIS III.

Καθώς η διδακτορική μου φοίτηση έγινε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω γι' αυτό θερμά την υπεύθυνη του προγράμματος αλλά και τρίτο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής καθηγήτρια Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη.

Στην διάρκεια των τελευταίων πειραματικών ετών της διδακτορικής θέσης, από το 2004 και ύστερα συνεργάστηκα στενά με την Σπυριδούλα Χαρόβα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών. Η Σπυριδούλα αποτελεί έναν πραγματικό μαχητή του πάγκου και την ευχαριστώ θερμότατα που ασχολήθηκε, μερίμνησε, υποστήριξε και εν συνεχεία εμπλούτισε τα "σχέδια" για τις σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, τόσο. Ευχαριστώ επίσης την δρ. Βασιλική Φαδούλογλου για την αμέριστη συμπαράσταση της αλλά και για την παραδειγματική δουλειά της που εμπνέει μεταπτυχιακούς φοιτητές σε κατάσταση κρίσης. Ευχαριστώ επίσης την μελλοντική -λίαν συντόμως- δόκτορα Μπασιτάκη Μαρίνα για τις συζητήσεις περί του εκκριτικού συστήματος τύπου III αλλά και τον συναδελφικό της πόνο μπροστά στις διαδικαστικές διεργασίες του διδακτορικού μου. Κουράγιο, έφτασε η ώρα. Στα σημεία συμπαράστασης χρωστώ εξαιρετική ευγνωμοσύνη και στην αγαπημένη μου φίλη Ιωάννα Πλατή.

Ευχαριστώ τους δύο καταπληκτικούς "περιστρεφόμενους" φοιτητές Ευθύμιο Καπέλλιο και Δημήτρη Στεφανάκη για την προσήλωση και αγάπη που έδειξαν στην HrpO, είτε παράγοντας την ίδια την πρωτεΐνη είτε την πρωτεάση rTEV, είτε εκτελώντας πειράματα κρυστάλλωσης, είτε μελετώντας την θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της πρωτεΐνης στα διαφορετικά pH μέσω κυκλικού διχρωισμού.

Ευχαριστώ επίσης την προπτυχιακό τότε και μεταπτυχιακό τώρα Αλεξάνδρα Τσαλαφούτα για την παραγωγή και τον καθαρισμό της καρβοξυτελικής επικράτειας της πρωτεΐνης HrcU (βλ. εδάφιο 5.3.14). Ευχαριστώ τους προπτυχιακούς φοιτητές Ν. Μαθουδάκη και Ι. Ελευθεριάδου, για την βιοπληροφορική ανάλυση της γενωμικής περιοχής P_SPPH_2515 ως P_SPPH_2539 της *P. syringae* pv *phaseolicola* 1448A. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην παντός καιρού τεχνικό Α. Κοτσιφάκη για την παραγωγή της rTEV, τον έλεγχο υπερέκφρασης μέρους των κλώνων της HrpO, συμμετοχή στις κρυσταλλώσεις και στα αρχικά πειράματα μοριακής διήθησης στο παλιό FPLC για το σύμπλοκο AnrPphF ORF1/ORF2. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα παιδιά και των δύο εργαστηρίων που συνεχίζουν να εργάζονται πιστά στο εκκριτικό σύστημα τύπου III και δεν μνημονεύτηκαν παραπάνω.

Τέλος ευχαριστώ θερμά την επταμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας θέσης για την συνεργασία, την υπομονή που επέδειξαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Περίληψη

Τα εικριτικά συστήματα τύπου III (T3SSs) αποτελούν εξειδικευμένα όργανα αλληλεπίδρασης πολλών Gram-αρνητικών βακτηρίων με τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το μονοπάτι έκκρισης κωδικοποιείται από τα γονίδια *hrp* (HR και pathogenicity) και *hrc* (HR και conserved). Οι πρωτεΐνες Hrc κατευθύνουν την έκκριση των υποστρωμάτων διαμέσου του βακτηριακού φακέλου, ενώ ένα υποσύνολο των πρωτεϊνών Hrp, με μερικές προς το παρόν μόνο προσδιορισμένες λειτουργίες, εκκρίνονται από το σύστημα και/ή βοηθούν στην έκκριση των υποστρωμάτων.

Η πρωτεΐνη HrpG είναι μία υποθετική τάξης I σαπερόνη του T3SS, όπως προβλέπεται από αλγορίθμους αναγνώρισης αναδίπλωσης και από τον τρόπο οργάνωσης της νησίδας παθογένειας της *Pseudomonas syringae*. Πειράματα σκέδασης ακτίνων-X (SAXS) σε μικρές γωνίες και κυκλικού διχρωισμού χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της υπόθεσης αυτής. Σε αντιδιαστολή με την τάξη των ομοδιμερών τάξης I σαπερονών, η HrpG σχηματίζει τετραμερές σε διάλυμα. Παρόλα αυτά το τετραμερές πρωτεϊνικό σωματίδιο δεν φαίνεται να διαθέτει την αντίστοιχη συμμετρία ενός κλειστού συμπλόκου. Η απαλοιφή των 14 καρβοξυτελικών αμινοξέων της πρωτεΐνης οδηγούν στον σχηματισμό σταθερού διμερούς στο διάλυμα με την απαραίτητη δομική συμμετρία. Το διμερές σωματίδιο προσεγγίζει το γενικό σχήμα των τάξης I σαπερονών αλλά η κατάταξή της πρωτεΐνης στην οικογένεια των τάξης I σαπερονών είναι αμφίβολη λόγω της μεγαλύτερης διαμέτρου του σωματιδίου και των υψηλών ποσοστών α -ελίκων που φαίνεται να διαθέτει. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε μέσω εγγενούς ηλεκτροφόρησης η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης HrpG με την καρβοξυτελική επικράτεια της HrcU και την πρωτεΐνη HrpO.

Η πρωτεΐνη HrpO είναι μία διαλυτή πρωτεΐνη του T3SS της *P. syringae* pv phaseolicola. Το χρωματογραφικό πρότυπο της στην στήλη μοριακής διήθησης προσεγγίζει το αντίστοιχο της μαστιγιακής πρωτεΐνης FljJ. Η πρωτεΐνη βρέθηκε να έχει μία εκτεταμένη δομή στο διάλυμα μέσω πειραμάτων SAXS, ενώ συγχρόνως παρουσιάζει χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης, όπως αυτή καταγράφηκε μέσω κυκλικού διχρωισμού. Κατά την μετάπτωση αυτή δεν παρατηρήθηκε συσώρευση ενδιάμεσου πληθυσμού. Τα υψηλά ποσοστά δευτεροταγούς δομής όμως αποκλείουν την ταξινόμηση της πρωτεΐνης στην οικογένεια των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών.

Οι τάξης I σαπερόνες του T3SS δεσμεύουν το αμινοτελικό τμήμα των δραστηκών πρωτεϊνών και παραδίδουν τις πρωτεΐνες αυτές στην ATPάση του συστήματος. Το οπερόνιο *avrPphF* της *P. syringae* pv phaseolicola διαθέτει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, μία τάξης I σαπερόνη (ORF1) και την συγγενική σε αυτήν δραστική πρωτεΐνη (ORF2). Παρόλο που και οι δύο πρωτεΐνες κρυσταλλώνουν αρκετά εύκολα, το σύμπλοκο τους δεν ήταν δυνατό να κρυσταλλώσει. Εδώ παρουσιάζεται η προκαταρκτική ανάλυση των κρυστάλλων της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 και η δομή του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 στο διάλυμα βασισμένη σε πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.

Abstract

Type III secretion systems (T3SSs) are essential mediators of the interaction of many Gram-negative bacteria with plant or animal eukaryotic cells. The T3SS pathway of plant pathogens is encoded by *hrp* (HR and pathogenicity) and *hrc* (HR and conserved) genes. The Hrc proteins direct secretion of T3SS substrates across the bacterial envelope, whereas a subset of the Hrp proteins, whose function is only partially defined, are themselves secreted by the T3SS and direct the translocation of effectors through host cell barriers.

HrpG is a hypothetical class I T3SS chaperone as predicted by fold recognition algorithms and *Pseudomonas syringae* T3SS genes organization. Small angle X-ray scattering and circular dichroism experiments were used for evaluation of this hypothesis. In contradistinction to the homodimeric class I T3SS chaperones, HrpG forms a tetramer in solution. However the protein particle does not possess the symmetry of a closed tetrameric complex. Deletion of the 14 carboxyterminal residues led to the formation of a stable dimer in solution with the appropriate symmetry. Although the dimeric particle possesses the overall shape of class I T3SS chaperones, we could not conclusively propose that HrpG belongs to this class of chaperones because of its longer diameter and the higher content of α -helix. Moreover, HrpG was found to interact with HrpO and the carboxyterminal domain of HrcU through native electrophoresis.

HrpO is a highly soluble protein of the T3SS of *P. syringae* pv phaseolicola. Size exclusion chromatography profiles resemble those obtained by FliJ (Fraser *et al.* 2003). Thus, an aberrant elution profile was also demonstrated for HrpO in the present work. HrpO was found to have an extended shape in solution by SAXS with low melting temperature by CD experiments. During the thermal unfolding experiments no intermediate population of the protein is observed. The high content of secondary structure however, discourages the classification of HrpO with intrinsically unfolded proteins (IUp).

Class I T3SS chaperones bind to the N-terminal part of effectors and deliver them to the T3SS ATPase for translocation. The *avrPphF* operon of *P. syringae* pv phaseolicola possesses two open reading frames, a class I T3SS chaperone (ORF1) and its cognate virulence effector (ORF2). Although each of the proteins crystallizes quite easily, the complex was recalcitrant to crystallization. Here we present the preliminary crystallographic analysis of the AvrPphF ORF1 crystals as well as the solution structure of the AvrPphF ORF1/ORF2 complex based on small angle X-ray scattering data.

Συντμήσεις

3D-EM	Protein Structure Databank for Cryo-Electron Microscopy
APS	Ammonium PerSulfate
ATP	Adenosine TriPhosphate
ATPάση	Adenosine TriPhosphatase
ATSAS	All That Small Angle Scattering (suite of programs)
Avr	Avirulence
AU	Arbitrary Units
Bis-Tris-Pro	1,3-bis-[(1,3-dihydroxy-2-hydroxymethyl)isopropylaminopropane]
BSA	Bovine Serum Albumin
CASP	Critical Assessment of Structure Prediction
CATH	Class, Architecture, Topology, Homologous hierarchical classification
CBD	Chaperone Binding Domain
CCD	Charged Coupled Device
CCP	Collaborative Computational Program
CD	Circular Dichroism
CNS	Crystallography & NMR System
DAS	Dense Alignment Surface
DESY	Deutches Elektronen-Synchrotron
DMAB	DiMethylAmine – Borane complex
DMSO	DiMethylSulfOxide
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
DSSP	Dictionary of Secondary Structures of Proteins
DTT	DiThioThreitol
ECF	Extracytoplasmic function
EDTA	Ethlen-Diamine-Tetra-Acetic acid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbend Assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
E-value	Expectation value
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FFT	Fast Fourier Transform
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	4-(2-HydroxylEthyl)-1-PiperazinEthaneSulsonic acid
HMM	Hidden Markov Models
Hop	Hrp-dependent outer proteins
HR	Hypersensitive Response
HRC	Hypersensitive Response and Conserved
HRP	Hypersensitive Response and Pathogenesis
HT	His-Tag
IPTG	IsoPropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
IUps	Intrinsically Unstructured proteins
kb	kilobase pairs
kD	kiloDalton
LB	Luria Bertani medium
LB	Luria Broth
LCR	Low Calcium Response
MAD	Multiwavelength Anomalous Diffraction
Mb	Megabase pairs
MG	Molten Globule
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
MLD	Membrane Localization Domain
MNSD	Mean Normalized Spatial Discrepancy
MPD	2-Methyl 2,4-PentaneDiol

MR	Molecular Replacement
MW	Molecular Weight
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NF-T3SS	Non Flagellar - Type III Secretion System
NiNTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Nops	Nodulation Outer Proteins
NRDB	Non Redundant Data Base
NUC	Natively Unfolded Coils
NUP	Natively Unfolded Pre-molten globules
OD	Optical Density
ORD	Optical Rotatory Dispersion
ORF	Open Reading Frame
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank / Protein Structure Databank
PEG	PolyEthylene Glycol
PHYRE	Protein Homology/analogY Recognition Engine
pI	Isoelectric point
PMG	Pre-Molten Globule
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PSC	Pseudomonas SeCretion
PSI-BLAST	Position Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool
PSSM	Position Specific Scoring Matrix
PTTG1	Pituitary Tumor Transforming Gene 1
P-value	Probability value
R _h	Hydrodynamic radius
R _g	Radius of gyration
RMSD	Root Mean Square Deviation
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SCOP	Structural Classification of Proteins database
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
Shc	Specific Hop Chaperone
SPDBV	Swiss-Protein Data Bank Viewer
SVD	Singular Value Decomposition
Syc	Specific Yop Chaperone
TEMED	N,N-TEtra Methyl Ethylene Diamine
TPR	Tetratricopeptide Repeats
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
WAXS	Wide Angles X-ray Scattering
Yops	Yersinia Outer Proteins
YSC	Yersinia SeCretion

1 Εισαγωγή στο εκκριτικό σύστημα τύπου III των Gram αρνητικών βακτηρίων

Θεωρητικό υπόβαθρο και σκοπός της εργασίας.....	1
1.1 Η αρχιτεκτονική της μηχανής έκκρισης τύπου III - μεταφοράς.....	2
1.2 Νησίδες παθογένειας-Γονιδιακή Οργάνωση.....	4
1.3 Υποστρώματα έκκρισης και σινιάλα.....	5
1.3.1. Υποστρώματα μεταφοράς – Δραστικές πρωτεΐνες.....	5
1.3.2. Υποστρώματα έκκρισης – Δραστικές πρωτεΐνες – Πρωτεΐνες διάνοιξης / μεταφοράς.....	6
1.3.3. Υποστρώματα έκκρισης – Δομικές πρωτεΐνες του εξωκυττάριου τμήματος της συσκευής.....	7
1.3.4 Σινιάλα έκκρισης του εκκριτικού συστήματος τύπου III.....	8
1.4 Οι σαπερόνες του εκκριτικού μηχανισμού τυπου III.....	8
1.4.1 Τάξης I (IA και IB) Σαπερόνες.....	9
1.4.1.1 Βιολογικός ρόλος.....	9
1.4.1.2 Ιστορική αναδρομή του προσδιορισμού των δομών των τάξης I σαπερονών.....	11
1.4.2 Τάξης II Σαπερόνες.....	13
1.4.3 Τάξης III Σαπερόνες.....	14
1.4.4 Σαπερόνες Γενικής Χρήσεως.....	15
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	16
1.6 Δομή της διατριβής.....	16
1.7 Αναφορές.....	17

2 Σύνοψη κύριων μεθοδολογιών και επεξεργασία δεδομένων..... 21

2.1 Ανάλυση πρωτεϊνικής αλληλουχίας με βιοϋπολογιστικές μεθόδους.....	22
2.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών.....	24
2.3 Χρωματογραφία.....	25
2.3.1 Χρωματογραφία Συγγενείας.....	25
2.3.2 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης.....	26
2.4 Υδροδυναμική ανάλυση.....	26
2.5 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών & πειράματα σάρωσης συνθηκών.....	28
2.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών.....	28
2.5.1.1 Ιοντική ισχύς.....	28
2.5.1.2 pH.....	28
2.5.1.3 Θερμοκρασία.....	29
2.5.1.4 Οργανικοί διαλύτες.....	29
2.5.2 Η κρυσταλλογένεση και η ενέργεια ενεργοποίησης.....	29
2.5.3 Μέθοδοι έρευνας συνθηκών κρυστάλλωσης.....	29
2.5.4 Μέθοδοι κρυστάλλωσης.....	30

2.5.4.1 Μέθοδος διάχυσης ατμών.....	31
2.5.5 Βασικό πρωτόκολλο σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης.....	32
2.6 Αλληλεπίδραση ακτίνων-X με την ύλη.....	33
2.6.1 Σκέδαση Thomson.....	33
2.6.2 Σκέδαση Compton.....	33
2.6.3 Ατομικός παράγοντας σκέδασης.....	33
2.6.4 Σκέδαση από ένα πολυατομικό μόριο.....	34
2.7 Σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.....	34
2.7.1 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα.....	34
2.7.2 Η προσέγγιση Guinier και η εξίσωση Debye.....	35
2.7.3 Ο Νόμος του Porod.....	36
2.7.4 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων – Μετασχηματισμός Fourier.....	36
2.7.5 Ab initio καθορισμός του σχήματος.....	37
2.7.6 Σύγκριση μοντέλων σε ατομική διακριτικότητα με δεδομένα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.....	38
2.7.7 Σύγκριση μοντέλων σε ατομική διακριτικότητα με μοντέλα ψευδών ατόμων ή καταλοίπων.....	38
2.7.8 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων Σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.....	39
2.8 Κρυσταλλογραφία Βιολογικών Μακρομορίων.....	41
2.8.1 Η αναγκαιότητα της κρυστάλλωσης.....	41
2.8.2 Σκέδαση ακτίνων-X από κρύσταλλο – Παράγοντας δομής.....	41
2.8.3 Επεξεργασία αρχικών δεδομένων.....	42
2.8.4 Στατιστική ανάλυση Wilson.....	43
2.8.5 Μετασχηματισμός Fourier – Εξίσωση Ηλεκτρονικής Πυκνότητας.....	43
2.8.6 Μοριακή Αντικατάσταση.....	44
2.8.6.1 Συνάρτηση Patterson.....	44
2.8.6.2 Συνάρτηση αυτό-περιστροφής.....	45
2.8.7 Σύνθεση διαφορών Fourier.....	45
2.8.8 Βελτιστοποίηση του μοντέλου.....	45
2.8.9 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων Κρυσταλλογραφίας.....	46
2.9 Κυκλικός διχρωσμός.....	47
2.9.1 Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωσμού.....	47
2.9.2 Επεξεργασία δεδομένων κυκλικού διχρωσμού.....	48
2.9.2.1 Εκτίμηση ποσοστών δευτεροταγούς δομής.....	48
2.9.2.2 Θερμοδυναμικός καθορισμός της αποδιάταξης.....	50
2.9.2.3 Επεξεργασία φασμάτων στο άπω υπεριώδες κατά την διάρκεια θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης.....	50
2.9.2.3.1 Ισοδιχρωικό σημείο.....	50
2.9.2.3.2 Ανάλυση ιδιάζουσών τιμών / SVD.....	50
2.10 Αναφορές.....	52

3 Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών του συμπλόκου σαπερόνης – δραστηνής πρωτεΐνης AnrPphF ORF1/ORF2..... 55

3.1 Εισαγωγή.....	55
3.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	57

3.2.1	Επαγωγή της έκφρασης του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.....	57
3.2.2	Απομόνωση του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.....	57
3.2.2.1	Στάδιο χαμηλού καθαρισμού.....	58
3.2.2.2	Στάδιο υψηλού καθαρισμού.....	58
3.2.3	Προστασία των αμινοομάδων της λυσίνης με χημική τροποποίηση.....	60
3.2.4	Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες.....	61
3.2.5	Πειράματα Κρυστάλλωσης.....	61
3.3	Αποτελέσματα.....	61
3.3.1	Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης-Σχηματισμός συμπλόκου 2:1.....	61
3.3.2	Πειράματα κρυστάλλωσης.....	62
3.3.3	Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες για το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2	64
3.3.4	Έλεγχος της ολιγομερικής κατάστασης του συμπλόκου στο διάλυμα.....	66
3.3.5	Ab initio καθορισμός του σχήματος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.....	67
3.3.6	Εγγενής ηλεκτροφόρηση του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.....	69
3.4	Συμπεράσματα.....	70
3.4.1	Το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ ORF2 δεν είναι μονοδιάσπαρτο σε διάλυμα..	70
3.4.2	Το γενικό σχήμα και μέγεθος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 προσεγγίζει αυτό των άλλων συμπλόκων σαπερονών – δραστικών πρωτεϊνών.....	71
3.4.3	Η δραστική πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 φαίνεται να αλλάζει την στερεοδιάταξη της κατά την δέσμευση στη σαπερόνη AvrPphF ORF1.....	72
3.5	Αναφορές.....	72

4 Κρυστάλλωση, προκαταρτική ανάλυση δεδομένων περιθλασης και πειράματα σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα της AvrPphF ORF1, μίας τυπικής σαπερόνης τάξης IA..... 75

4.1	Εισαγωγή.....	75
4.2	Υλικά και Μέθοδοι.....	76
4.2.1	Επαγωγή της έκφρασης της AvrPphF ORF1.....	76
4.2.2	Απομόνωση της AvrPphF ORF1.....	76
4.2.3	Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα στις μικρές γωνίες.....	77
4.2.4	Κρυστάλλωση της AvrPphF ORF1.....	77
4.2.5	Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περιθλασης από κρυστάλλους.....	78
4.3	Αποτελέσματα.....	80
4.3.1	Ανάλυση δεδομένων περιθλασης.....	80
4.3.2	Χρήση του ατομικού μοντέλου 1s28.pdb για την ερμηνεία των δεδομένων περίθλασης.....	88
4.3.3	Η δομή της AvrPphF ORF1 στο διάλυμα.....	90
4.3.4	Σύγκριση του κρυσταλλογραφικού μοντέλου της AvrPphF ORF1 και του μοντέλου σκέδασης από διάλυμα.....	91
4.4	Συμπεράσματα.....	92
4.4.1	Η AvrPphF ORF1 είναι διμερής στο διάλυμα.....	92
4.4.2	Η δομή της ORF1 στο διάλυμα είναι ελαφρώς διαφορετική από ότι η κρυσταλλική της δομή.....	93
4.4.3	Η AvrPphF ORF1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον χαρακτηρισμό άλλων σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III.....	93
4.5	Αναφορές.....	93

5 Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HrpG.....	95
5.1 Εισαγωγή.....	96
5.1.1 Το καρβοξυτελικό άκρο των τάξης I σαπερονών.....	96
5.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	97
5.2.1 Βιοϋπολογιστικές Μέθοδοι.....	97
5.2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>hrpG</i> σε φορέα έκφρασης και παρασκευή του μεταλλάγματος έλλειψης <i>hrpG</i> Δ133-146.....	97
5.2.3 Επαγωγή της έκφρασης της HrpG και της HrpGΔ133-146.....	98
5.2.4 Απομόνωση της πρωτεΐνης HrpG & του μεταλλάγματος HrpGΔ133-146.....	98
5.2.4.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού.....	98
5.2.4.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού.....	98
5.2.5 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα στις μικρές γωνίες.....	100
5.2.6 Κυκλικός Διχρωσμός.....	101
5.2.7 Προστασία των σουλφυδρυλομάδων με χημική τροποποίηση.....	101
5.2.8 Πειράματα Κρυστάλλωσης.....	101
5.2.9 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III μέσω εγγενούς ηλεκτροφόρησης.....	102
5.3 Αποτελέσματα.....	102
5.3.1 Βιοϋπολογιστική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της HrpG.....	102
5.3.2 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης.....	105
5.3.3 Υδροδυναμική ανάλυση της πρωτεΐνης HrpG και της ελλειμματικής μορφής της HrpGΔ133-146.....	107
5.3.4 Σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες για την HrpGΔ133-146.....	109
5.3.5 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες για την HrpG.....	110
5.3.6 Σύγκριση των πειραματικών καμπύλων σκέδασης σε μικρές γωνίες από διάλυμα της πρωτεΐνης HrpG με τις θεωρητικές καμπύλες των τάξης I σαπερονών.....	111
5.3.7 <i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος της HrpGΔ133-146.....	115
5.3.8 Σύγκριση των <i>ab initio</i> ανασυστάσεων της πρωτεΐνης HrpGΔ133-146 με την κρυσταλλογραφική δομή της τάξης I σαπερόνης SicP.....	118
5.3.9 <i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος της HrpG.....	119
5.3.10 Εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής της HrpGΔ133-146.....	123
5.3.11 Φάσματα κυκλικού Διχρωσμού στο Εγγύς Υπεριώδες.....	123
5.3.12 Θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpGΔ133-146.....	124
5.3.13 Προσπάθειες αποτροπής σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεΐνη HrpGΔ133-146.....	125
5.3.14 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και επώσεις της HrpG με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III.....	126
5.4 Συμπεράσματα.....	127
5.4.1 Η HrpG αποτελεί ένα διαλυτό συστατικό του εκκριτικού συστήματος τύπου III.....	127
5.4.2 Η HrpG βρίσκεται σε τετραμερή μορφή στο διάλυμα. Υπεύθυνο για τον διμερισμό των διμερών της είναι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ το τετραμερές σωματίδιο φαίνεται να έχει μικρότερη συμμετρία από την αναμενόμενη.	128
5.4.3 Η HrpGΔ133-146 προσεγγίζει το γενικό σχήμα μιας σαπερόνης τάξης I αλλά διαθέτει κατά 20 Å μακρύτερη την μεγαλύτερη διάμετρο της.....	130
5.4.4 Η HrpGΔ133-146 διαθέτει υψηλότερα ποσοστά α-έλικας σε σύγκριση με τις σαπερόνες τάξης I.....	130

5.4.5 Ενδείξεις αλληλεπίδρασης της HrpG με την HrpO και το καρβοξυτελικό τμήμα της HrcU.....	132
5.5 Αναφορές.....	132

6 Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HrpO.....135

6.1 Εισαγωγή.....	135
6.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	136
6.2.1 Βιοϋπολογιστικές Μέθοδοι.....	136
6.2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου <i>hrpO</i> σε φορέα έκφρασης.....	137
6.2.3 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης HrpO.....	137
6.2.4 Απομόνωση της πρωτεΐνης HrpO.....	137
6.2.4.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού.....	137
6.2.4.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού.....	137
6.2.5 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες.....	139
6.2.6 Κυκλικός Διχρωσμός.....	139
6.2.7 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης.....	140
6.3 Αποτελέσματα.....	140
6.3.1 Ανάλυση αλληλουχίας.....	140
6.3.2 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης.....	142
6.3.3 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης.....	143
6.3.4 Παράμετροι σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες.....	144
6.3.5 Διάγραμμα Kratky.....	146
6.3.6 <i>Ab initio</i> καθορισμός του σχήματος της HrpO στους 13°C.....	147
6.3.7 Εκτίμηση ποσοτών δευτεροταγούς δομής.....	149
6.3.8 Φάσματα κυκλικού διχρωσμού της HrpO στο Εγγύς Υπεριώδες.....	150
6.3.9 Θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpO.....	151
6.4 Συμπεράσματα.....	155
6.4.1 Η HrpO παρουσιάζει αναλογίες με τις πρωτεΐνες YscO και FliJ.....	155
6.4.2 Η HrpO βρίσκεται σε μερικώς διπλωμένη μορφή υπό φυσιολογικές συνθήκες..	156
6.4.3 Η χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης της HrpO εμπλέκεται στα πειράματα σκέδασης και εμποδίζει την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης.....	159
6.4.4 Η HrpO αλληλεπιδρά με την HrpG 160	
6.5 Αναφορές.....	160

7 Συζήτηση & Προοπτικές.....163

7.1 Αναφορές.....	169
-------------------	-----

8 Παραρτήματα.....171

8.1 Παλαιότερες κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	171
---	-----

8.2 Πειράματα ηλεκτροφόρησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών που δεν εμφανίστηκαν στο κυρίως κείμενο.....	171
8.2.1 Πρωτεολυτικά πρότυπα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 κατά την περιορισμένη πρωτεόλυση.....	172
8.2.2 Πρωτεολυτικά πρότυπα της πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 στην σύμπλοκη και στην μεμονωμένη μορφή της κατά την παραμονή των δειγμάτων στους 4°C.....	173
8.2.3 Εγγενής ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών.....	173
8.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών άνευ αναγωγικού.....	174
8.2.5 Γρήγορος προκαταρκτικός έλεγχος της δημιουργίας συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών HrpG και HrpO μέσω ψεύδο-εγγενούς ηλεκτροφόρησης.....	174
8.3 Αποτελέσματα PSI-BLAST για την περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG.....	175
8.4 Επιπρόσθετες συνθήκες σάρωσης πειραμάτων κρυστάλλωσης.....	178
8.5 Φαινόμενα που παρουσιάστηκαν στις σταγόνες κρυστάλλωσης.....	188
8.5.1 AvrPphF ORF1: Κρύσταλλοι.....	188
8.5.2 AvrPphF ORF2 : Κρύσταλλοι.....	189
8.5.3 HrpO : Σταγόνες ελαίου και διάφοροι τύποι διαχωρισμού φάσεως.....	189
8.5.4 HrpG : Διάφορα είδη ιζήματος.....	190
8.6 Αρχείο συλλογής δεδομένων σκέδασης σε μικρές γωνίες.....	190
8.7 Χαρακτηριστικά των γραμμών ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν.....	192
8.8 Δικτυακοί τόποι και προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	193
8.8.1 <i>On-line</i> προγράμματα ανάλυσης αμινοξικής αλληλουχίας.....	193
8.8.2 <i>On-line</i> προγράμματα υπολογισμού συνθηκών κρυστάλλωσης.....	194
8.8.3 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων SAXS.....	194
8.8.4 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.....	195
8.8.5 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων κυκλικού διχρωισμού.....	196
8.8.6 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αρχείων pdb.....	196
8.9 Στατιστική ανάλυση Wilson.....	197
8.10 Λεξικό αγγλικών όρων.....	197
8.11 Αναφορές.....	200

Εισαγωγή στο εκκριτικό σύστημα τύπου III των Gram αρνητικών βακτηρίων Θεωρητικό υπόβαθρο και σκοπός της εργασίας

*“...most scientific problems are far
better understood by studying their
history than their logic”*

Ernst Mayr

Η ύπαρξη μιας σειράς φυσικών εμποδίων διαχωρίζει το κυτταρόπλασμα ενός κατά Gram αρνητικού βακτηρίου από τον εξωκυττάριο χώρο. Τα εμπόδια αυτά είναι η εσωτερική μεμβράνη, ο περιπλασμικός χώρος, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και τελικώς η εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου. Για την υπερσκέλιση των εμποδίων αυτών και την επικοινωνία με τον εξωκυττάριο χώρο και το περιβάλλον τους τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν ποικίλους μηχανισμούς με σκοπό την έκκριση πρωτεϊνών στο εξωτερικό περιβάλλον (Pugsley, 1993, Ecomonou *et al.*, 2006). Στον μηχανισμό τύπου I η έκκριση είναι διαδικασία ενός σταδίου διέλευσης διαμέσου και των δύο μεμβρανών του βακτηρίου ενώ τα υποστρώματα διαθέτουν ένα μη αποκοπτόμενο πεπτιδικό σινιάλο στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Στον μηχανισμό τύπου II χρησιμοποιείται το Sec-εξαρτώμενο μονοπάτι για την διέλευση πρωτεϊνών διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης σε συνεργασία με ένα δεύτερο εκκριτικό σύστημα στην εξωτερική μεμβράνη. Τα υποστρώματα εδώ διαθέτουν ένα αποκοπτόμενο πεπτιδικό σινιάλο στο αμινοτελικό τους άκρο.

Στενά συνδεδεμένα με την βακτηριακή παθογένεια είναι το εκκριτικό σύστημα τύπου IV (T4SS), το οποίο μεταφέρει ειδικές πρωτεΐνες ή/και DNA στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου (ξενιστή) μεταβάλλοντας τις κυτταρικές του διεργασίες. Εξελικτικά αυτά τα συστήματα φαίνεται να σχετίζονται με τις μηχανές βακτηριακής σύζευξης (Ding *et al.*, 2003).

Η ανακάλυψη ομόλογων αλληλουχιών μεταξύ πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην έκκριση δραστικών πρωτεϊνών σε ποικίλα βακτηριακά παθογόνα και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην εξαγωγή συστατικών του μαστιγίου προτάσσει την ύπαρξη του τρίτου κοινού μονοπατιού έκκρισης που ονομάζεται τύπου III (Michiels *et al.*, 1991, Lindgren *et al.*, 1986) (T3SS). Το εκκριτικό σύστημα πρωτεϊνών τύπου III, χρησιμοποιείται για να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα απευθείας στο κυτταρόπλασμα του

ξενιστή, όπως αποδείχτηκε αργότερα και για το εκκριτικό σύστημα τύπου IV. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III είναι κοινό στα παθογόνα βακτήρια των φυτικών και ζωικών οργανισμών, ενώ βρέθηκε αργότερα και σε συμβιωτικούς οργανισμούς. Απαρτιζόμενο από περισσότερες από 20 πρωτεΐνες το τύπου III σύστημα μοιάζει να είναι ένα από τα πιο περίπλοκα συστήματα στα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν τρία χαρακτηριστικά: i) οι προς εξαγωγή πρωτεΐνες δεν διαθέτουν αποκοπτόμενο σιγάλο ii) απαιτούνται προσαρμοσμένες βοηθητικές πρωτεΐνες (σαπερόνες) για πολλές από τις προς εξαγωγή πρωτεΐνες – υποστρώματα έκκρισης και iii) απαιτείται επαφή με το κύτταρο ξενιστή για πλήρη ενεργοποίηση του μονοπατιού έκκρισης – μεταφοράς (Thomas & Finlay, 2003).

Για έκκριση μέσω αυτού του συστήματος απαιτείται ένας πρωτεϊνικός δακτύλιος στην εσωτερική μεμβράνη που δρα ως αγκυροβόλιο των υποστρωμάτων έκκρισης. Πάνω από τον εσωτερικό δακτύλιο βρίσκεται ένα κανάλι που διαπερνά την εσωτερική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο και την εξωτερική μεμβράνη. Στην εξωτερική επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου βρίσκεται είτε μια βελονοειδής δομή ή το νήμα του μαστιγίου. Η εκκριτική συσκευή που είναι υπεύθυνη για την καθοδήγηση της έκκρισης συνδέεται με την κυτταροπλασματική επιφάνεια του εσωτερικού δακτυλίου (Ανασκόπηση Cornelis, 2000).

Τα Gram αρνητικά παθογόνα βακτήρια φαίνεται να αποκτούν το σύστημα μεταφοράς τύπου III μέσω μηχανισμού οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στην παρατήρηση ότι τα συστήματα τύπου III συχνά κωδικοποιούνται από επιπρόσθετα χρωμοσωμικά στοιχεία (πλασμίδια) ή από νησίδες παθογένειας (pathogenicity islands) που εδράζουν στο κύριο βακτηριακό χρωμόσωμα. Οι νησίδες αυτές είναι τμήματα χρωμοσωμικού DNA που απουσιάζουν από τα συγγενικά μη παθογόνα βακτήρια (Groisman & Ochman, 1996), έχουν δε, συχνά περιεχόμενο σε GC που αποκλίνει από αυτό του κύριου χρωμοσώματος του οργανισμού ξενιστή, και συνήθως οριοθετούνται από υπολείμματα αλληλουχιών ένθεσης, γονίδια βακτηριοφάγων ή μεταθετά στοιχεία.

1.1 Η αρχιτεκτονική της μηχανής έκκρισης τύπου III - μεταφοράς

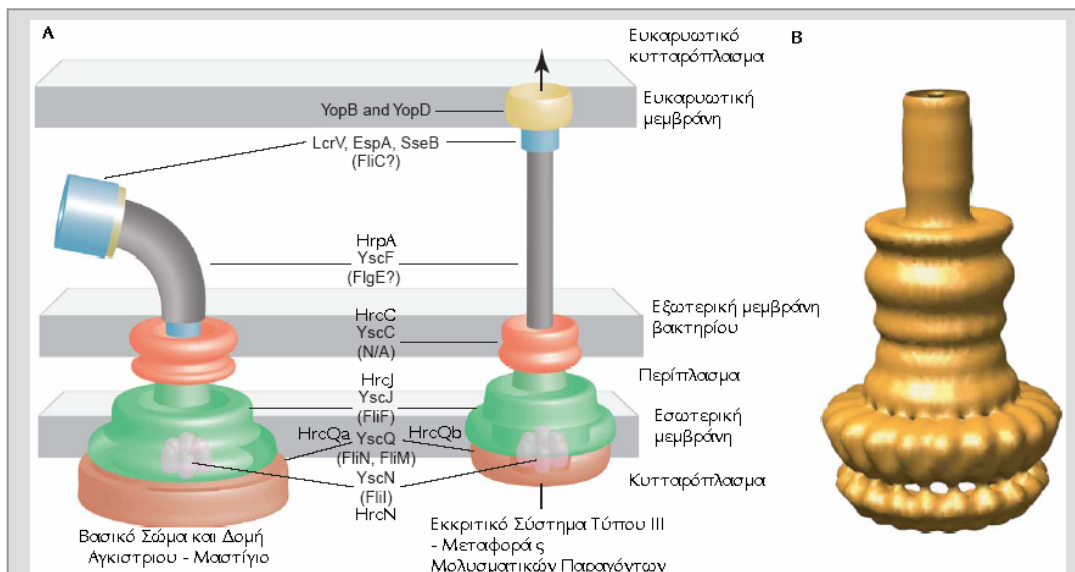
Όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών, φυτικών παθογόνων καθώς και των συμβιωτικών βακτηρίων έχουν από κοινού έναν αριθμό κύριων δομικών συστατικών υψηλά συντηρημένων (Hueck, 1998). Αυτά τα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κύριες ομάδες.

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης στην μεμβράνη που παρουσιάζουν ομοιότητες με τη συσκευή εξαγωγής του μαστιγίου. Δομούν τον εσωτερικό – κυτταροπλασματικό δακτύλιο, τον δακτύλιο της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και το τμήμα της εκκριτικής συσκευής που βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο.

Στην δεύτερη ομάδα ανήκουν οι πρωτεΐνες που απαρτίζουν τον δακτύλιο της εξωτερικής μεμβράνης και τα εξωκυττάρια εξαρτήματα της συσκευής. Αυτό το τμήμα της συσκευής δεν φέρει πρωτεΐνες με ομοιότητες μεταξύ των δύο συστημάτων (μολυσματικού και μαστιγιακού) αφού έχει επιστρατευθεί για διαφορετική χρήση. Τα εξωκυττάρια εξαρτήματα της συσκευής διαφέρουν για τον ίδιο λόγο και μεταξύ ζωοπαθογόνων και φυτοπαθογόνων βακτηρίων έχοντας προσαρμοστεί ώστε να αντιμετωπίζουν τις διαφορετικές προκλήσεις των δύο τύπων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η εξωκυττάρια νηματοειδής κατασκευή των ζωοπαθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων ονομάζεται βελονοειδής δομή (needle), ενώ των φυτοπαθογόνων ινίδιο

(pilus). Το ινίδιο είναι λεπτότερης διαμέτρου και εξαιρετικά μακρύτερο από την βελονοειδή δομή, φθάνοντας σε μήκος της τάξεως των μικρομέτρων. Κατ' αυτόν τον τρόπο εξυπηρετείται η μεταφορά δραστικών παραγόντων/πρωτεϊνών σε μεγάλες αποστάσεις με κύριο σκοπό την διάτρηση και διέλευση διαμέσου ενός σημαντικού επιπρόσθετου εμποδίου: του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος (Buttner & Bonas, 2006). Οι δομικές διαφορές που υπάρχουν στα εξωκυττάρια τμήματα των εκκριτικών συστημάτων τύπου III μεταξύ των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων αντανακλά την διαφορετική κυτταρική οργάνωση των ζωικών και φυτικών οργανισμών στους οποίους παρασιτούν. Σε αντίθεση, η *Pseudomonas aeruginosa* στέλεχος PA14 είναι ένα ανθρώπινο ευκαιριακό παθογόνο, ικανή να προκαλέσει ασθένεια και σε φυτά *Arabidopsis* (Plotnikova *et al.*, 2000). Αυτό το παθογόνο έχει την ικανότητα να αποικεί επιφάνειες και ζωικών και φυτικών κυττάρων και να αποφεύγει τα διαφορετικά συστήματα ανοπτείας και άμυνας των τόσο εξελικτικά απομακρυσμένων ξενιστών του.

Η υπερμοριακή δομή που συνδέεται με το τύπου III σύστημα μεταφοράς της *Salmonella typhimurium* απομονώθηκε και απεικονίστηκε με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (Kubori *et al.*, 1998, Marlovits *et al.*, 2004, 2006). Στην βάση δεδομένων 3D-EM έχουν καταταθεί οι χάρτες πυκνότητας από κρουσηλεκτρονική μικροσκοπία των βάσεων του εκκριτικού συστήματος τύπου III από την *S. typhimurium* (κωδικός πρόσβασης 1224) αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες PrgK, PrgH και InvG καθώς και σύμπλοκο της βάσης με την βελονοειδή δομή (Εικόνα 1.1). Η PrgK είναι η ομόλογη πρωτεΐνη της HrcJ κατά Hueck, (1998) στο σύστημα της *P. syringae*, η InvG είναι η ομόλογη της HrcC που πιθανόν σχηματίζει τον δακτύλιο της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ η PrgH δεν έχει ομόλογο στην *P. syringae*, αλλά ούτε και στην *Yersinia*. Στο σύμπλοκο της βελονοειδούς δομής που



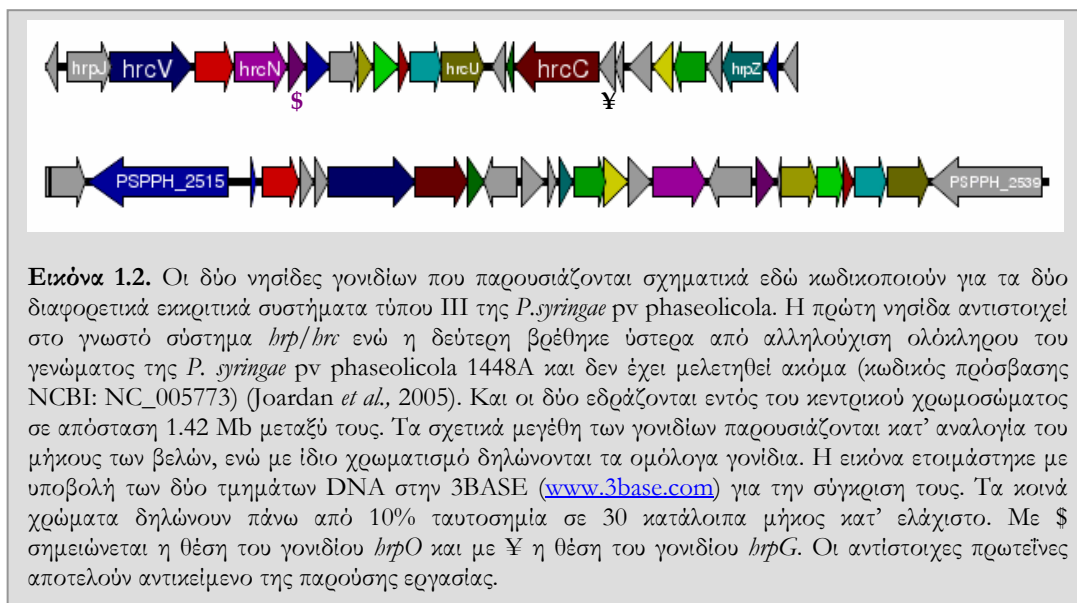
Εικόνα 1.1. Αρχιτεκτονική των εκκριτικών συστημάτων τύπου III. Α) Η συσκευή του βασικού σώματος του μαστιγίου και του εκκριτικού συστήματος τύπου III εξιδικευμένου στην μεταφορά δραστικών παραγόντων/πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Η μορφολογία τους παρουσιάζει ομοιότητες. Αποτελούνται από τους δακτύλιους της εσωτερικής (πράσινο) και εξωτερικής (κόκκινο) μεμβράνης, τον κυτταροπλασματικό δακτύλιο (καφέ), διαθέτουν ΑΤΡάση και ελικοειδή εξωτερικά εξαρτήματα (γκρι). Αναφέρονται οι αντίστοιχες Hrp και Hrc πρωτεΐνες από το φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola καθώς και οι αντίστοιχες από το Ysc εκκριτικό σύστημα της *Yersinia*. Σε παρένθεση αναφέρονται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες από το μαστίγιο. Β) Χάρτης πυκνότητας κρουσηλεκτρονικής μικροσκοπίας του εκκριτικού συστήματος τύπου III από την *S. typhimurium* (3D-EM Βάση Δεδομένων, Κωδικός πρόσβασης: emd1100). Αναπαριστά τον πυρήνα του εκκριτικού συστήματος τύπου III (πρωτεΐνες: PrgH, PrgK, InvG, PrgJ, PrgI). Λείπουν συστατικά του κυτταροπλασματικού δακτυλίου και η ΑΤΡάση. Τροποποιημένη εικόνα από το άρθρο των Yip & Strynadka, 2006.

προσδιόρισαν ο Marlovits και οι συνεργάτες του συμμετέχουν επίσης οι πρωτεΐνες PrgJ και PrgI, ομόλογες των HrpB και YscF¹ κατά Hueck (1998) από την *P. syringae*.

Εικτενή άρθρα ανασκόπησης για την αρχιτεκτονική των εκκριτικών συστημάτων τύπου III είναι τα Tampakaki *et al.*, (2004), Pallen *et al.*, (2005), He *et al.*, (2004), Cornelis (2000).

1.2 Νησίδες παθογένειας-Γονιδιακή Οργάνωση

Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια η κύρια γενετική θέση στην οποία εδράζουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της εκκριτικής συσκευής τύπου III ονομάζεται *hrp/hrc* (Alfano & Collmer, 1997). Η θέση αυτή αποτελείται από μία δεσμίδα γονιδίων στενά συνδεδεμένων που οργανώνονται σε 4 – 6 γειτονικά οπερόνια ενώ το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του ενός γονιδίου ενίοτε υπεισέρχεται εντός του γειτονικού του (π.χ. επικάλυψη του τερματικού κωδικονίου του ενός πλαισίου ανάγνωσης με το εναρτητήριο κωδικόνιο του επόμενου). Μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια επηρεάζουν όχι μόνο την βακτηριακή παθογένεια αλλά και την επαγωγή της τοπικής αντίστασης των φυτών γνωστή ως «Αντίδραση Υπερευαισθησίας», (HR, Hypersensitive Response). Ένας αριθμός αυτών των γονιδίων είναι υψηλά συντηρημένος όχι μόνο μεταξύ των φυτοπαθογόνων, αλλά και μεταξύ των ζωικών παθογόνων βακτηρίων που φέρουν εκκριτικό σύστημα τύπου III, όπως στα γένη *Yersinia*, *Salmonella* και *Shigella*. Αυτά χαρακτηρίζονται σαν γονίδια *hrc* (HR conserved). Τα περισσότερα από τα γονίδια *hrc* φέρουν δε και ομολογίες με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του βακτηριακού μαστιγίου. Γενικά αυτές οι νησίδες γονιδίων εντοπίζονται χρωμοσωμικά στα φυτικά παθογόνα, αλλά στη *Ralstonia solanacearum* εντοπίζονται σε ένα γιγάντιο πλασμίδιο 2100 kb (Boucher *et al.*, 1986), ενώ στην *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* εντοπίζονται σε ένα πλασμίδιο 150 kb ονομαζόμενο pPATH (Nizan *et al.*, 1997).



Πρόσφατα τέτοιες νησίδες γονιδίων έχουν βρεθεί και σε συμβιωτικά μη-παθογόνα βακτήρια των γενών *Rhizobium*, *Bradyrhizobium japonicum* και *Mesorhizobium loti* (Marie *et al.*, 2001) ενώ συγκεκριμένα η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* φαίνεται να φέρει ένα δεύτερο τέτοιο εκκριτικό σύστημα εντός του γενώματός της, εκτός από την γνωστή νησίδα παθογένειας *hrp/hrc*. Το δεύτερο αυτό εκκριτικό σύστημα φαίνεται να παρουσιάζει υψηλότερη ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με τα αντίστοιχα συστήματα των συμβιωτικών κατά Gram αρνητικών βακτηρίων (Joardan *et al.*, 2005) (Εικόνα 1.2). Στα είδη του *Rhizobium* NGR234 η επαγωγή του σχηματισμού των ροζιδίων (nodules) συν-ρυθμίζεται με την επαγωγή γονιδίων του

¹ Η YscF είναι η υπομονάδα δόμησης της βελονοειδούς δομής στην *Yersinia*.

εκκριτικού συστήματος III. Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του T3SS με την ονομασία εξωτερικές πρωτεΐνες ροζιδίωσης (modulation outer proteins, Nops) φαίνεται ότι συμβάλλουν στην συμβίωση. Στην περίπτωση της παθογένειας το εκκριτικό σύστημα τύπου III φαίνεται να εμπλέκεται στον καθορισμό του εύρους ξενιστών των βακτηρίων, η ιδιότητα αυτή διατηρείται κατ' αναλογία και στην περίπτωση της συμβίωσης, (Marie *et al.*, 2001).

Οι *hrp/hrc* νησίδες παθογένειας των φυτικών παθογόνων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, με βάση την συντήρηση των αλληλουχιών: στην ομάδα I ανήκουν οι νησίδες παθογένειας από τις *Erwinia amylovora* (Bogdanove *et al.*, 1996), *Erwinia chrysanthemi* (Kim *et al.*, 1998) και *P. syringae* και στην ομάδα II από τις *Ralstonia solanacearum* και *Xanthomonas campestris*. Η ρύθμιση της έκφρασης των *hrp/hrc* γονιδίων διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων. Στην ομάδα I η έκφραση ελέγχεται από την πρωτεΐνη HrpL, ένα μέλος της υποοικογένειας ECF (extracytoplasmic function) των παραγόντων σίγμα (sigma factors), (Wei & Beer, 1995). Αντίθετα, στην ομάδα II οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, HrpX και HrpG στην *X. campestris* και η HrpB στην *R. Solanacearum*, φαίνεται να δρουν σαν ανιχνευτές (sensors) και πρωτεΐνες ρύθμισης αντίδρασης (response regulators), αντίστοιχα, για ένα ρυθμιστικό σύστημα ανίχνευσης δύο συστατικών (two-component regulatory system) τύπου AraC (Wangelnik & Bonas, 1996). Σημειώτέον ότι μεταξύ των δύο συστημάτων υπάρχουν γονίδια που τους έχει δώσει το ίδιο όνομα αλλά δεν εκτελούν καμία ανάλογη λειτουργία και συχνά κωδικοποιούν για τελείως διαφορετικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη HrpG της *X. campestris* δεν έχει καμία λειτουργική συνάφεια, ομολογία ή ανάλογη γονιδιακή θέση με την HrpG από την *P. syringae* η οποία μελετάται στην παρούσα διατριβή. Παρόλη την σύγχυση που προκαλεί εκ πρώτης όψεως η ονοματολογία αυτή έχει επικρατήσει για ιστορικούς κυρίως λόγους. Εκτεταμένη ανασκόπηση παρουσιάζεται στο άρθρο του Hueck, (1998).

1.3 Υποστρώματα έκκρισης και σινιάλα

Τα υποστρώματα που προορίζονται για έκκριση από το εκκριτικό σύστημα τύπου III ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα i) τον βιολογικό τους ρόλο, ii) την χρονολογική σειρά /στάδιο έκκρισης και iii) την χρήση διαφορετικών τάξεων σαπερονών.

1.3.1. Υποστρώματα μεταφοράς – Δραστικές πρωτεΐνες

Τα συστήματα έκκρισης τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων προσαρμόστηκαν για να παραδίδουν στο κύτταρο του ξενιστή μια σειρά δραστικών πρωτεϊνών (Type III Secretion System Effectors) με την ικανότητα να παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό του ξενιστή χρησιμοποιώντας τον προς όφελος των βακτηρίων. Τις δραστικές αυτές πρωτεΐνες έχουν «μάθει» να ανιχνεύουν τα ευκαρυωτικά κύτταρα στην διάρκεια της συν-εξελικτικής τους πορείας και σχέσης με τα παθογόνα τους. Η ανίχνευση τους στη συνέχεια οδηγεί στην επαγωγή των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή. Η θεώρηση αυτή έχει δεσπόζουσα θέση στο ερευνητικό πεδίο που μελετά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ παθογόνου και ξενιστή. Ιδιαίτερα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια παρουσιάζουν υψηλό βαθμό «εξειδίκευσης» ως προς τον ξενιστή τους (race cultivar specificity).

Οι δραστικές πρωτεΐνες στα φυτικά παθογόνα βακτήρια κωδικοποιούνται από γονίδια που πρόσφατα ονομάστηκαν *hop* (hrp-dependent outer proteins) και παλαιότερα *avr* (avirulence). Τα γονίδια ονομάστηκαν αρχικά *avr* γιατί ανακαλύφθηκαν χάρη στην ιδιότητα τους να μετατρέπουν μια συμβατή σχέση παθογόνου-ξενιστή (compatible interaction) σε ασύμβατη (incompatible interaction). Οι ασύμβατες σχέσεις χαρακτηρίζουν 'ανθεκτικές' στο παθογόνο ποικιλίες του φυτού και αποδίδονται στην ικανότητα του φυτού να αναγνωρίζει τα προϊόντα των γονιδίων *avr* και να επάγει τους μηχανισμούς άμυνας. Σε τέτοιες ποικιλίες οι δραστικές πρωτεΐνες του βακτηρίου που μεταφέρονται μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III προκαλούν μια ταχεία τοπική νέκρωση γνωστή ως αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR), η οποία χαρακτηρίζεται από επαγωγή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου στα φυτικά κύτταρα που είναι σε άμεση επαφή με το παθογόνο (Alfano & Collmer, 1996). Σε αντίθεση, σε μη ανθεκτικούς ξενιστές τα ίδια παθογόνα δεν προκαλούν

HR και συνεχίζουν να αυξάνονται και να διαδίδονται στον διακυττάριο χώρο του μολυσμένου οργάνου για αρκετές μέρες πριν την παραγωγή ορατών συμπτωμάτων της ασθένειας. Με αυτόν τον τρόπο τα Gram αρνητικά βακτήρια των γενών *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, και *Ralstonia* δημιουργούν νεκρωτικές κηλίδες, μαρμασμό και νέκρωση σε διάφορα καλλιεργούμενα φυτά (ξενιστές). Πίσω από αυτές τις διαφορετικές ασθένειες βρίσκεται η ικανότητα του συστήματος μεταφοράς τύπου III να μεταφέρει δραστικές πρωτεΐνες μέσα στα φυτικά κύτταρα (Alfano & Collmer, 1996).

Τα φυτοπαθογόνα σε σχέση με τα ζωοπαθογόνα βακτήρια διαθέτουν ένα αρκετά μεγάλο οπλοστάσιο δραστικών πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η *P. syringae* pv *phaseolicola* διαθέτει 19 γνωστές δραστικές πρωτεΐνες, ενώ η *P. syringae* pv *tomato* DC3000 φθάνει τον αριθμό των 29 δραστικών πρωτεϊνών (Chang *et al.*, 2005) σε αντίθεση με τις 6 της *Yersinia*. Ο συνεργιστικός τρόπος δράσης των φυτοπαθογόνων δραστικών πρωτεϊνών καθιστά δύσκολη την εξακρίβωση της λειτουργίας τους εντός του φυτικού κυττάρου αφού η μεμονωμένη δράση τους (όταν αναστέλλεται μέσω μεταλλαξιγένεσης) δεν επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην παθογένεια. Σε αντίθεση οι κύριες δραστικές πρωτεΐνες των ζωοπαθογόνων βακτηρίων είναι πιο καλά μελετημένες. Η διαφορά στο πλήθος των δραστικών πρωτεϊνών/γονιδίων που παρουσιάζεται μεταξύ φύτο- και ζώο-παθογόνων φαίνεται να αντανακλά τα διαφορετικά επίπεδα άμυνας των δύο τύπων ευκαρυωτικών κυττάρων. Στην περίπτωση των θηλαστικών τα βακτήρια ανιχνεύονται και εξουδετερώνονται σε κυτταρικό επίπεδο από το ανοσοποιητικό σύστημα με τελική κατάληξη την φαγοκυττώση τους από τα μακροφάγα. Τα είδη του γένους της *Yersinia* διαθέτουν ειδικές δραστικές πρωτεΐνες που στοχεύουν στον κυτταροσκελετό των μακροφάγων και τον επηρεάζουν έτσι ώστε το μακροφάγο να μην είναι σε θέση να δημιουργήσει ψευδοπόδια και να ολοκληρώσει την φαγοκυττώση. Αντίθετα, τα φυτικά κύτταρα φαίνεται να αμύνονται σε γενετικό επίπεδο καθώς παρουσιάζουν συνεχώς νέα κατάλληλα λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια/πρωτεΐνες που είναι σε θέση να ανιχνεύσουν τις εισερχόμενες δραστικές πρωτεΐνες (gene for gene hypothesis) και να πυροδοτήσουν την αμυντική σηματοδότηση.

Ωστόσο πρόσφατη μελέτη των Tobe και συνεργατών (2006) αποκάλυψε την απρόσμενη παρουσία 39 «εν δυνάμει» δραστικών πρωτεϊνών στην εντεροαιμοραγική *E. coli* (EHEC) O157:H7 στέλεχος Sakai. Οι δραστικές αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με βιοϋπολογιστικές μεθόδους και ακολούθως ελέγχθηκαν πειραματικά. Φαίνεται να ανήκουν σε περισσότερες από 20 οικογένειες δραστικών πρωτεϊνών, ενώ υπήρχαν μερικές που είχαν αμινοξικές ομοιότητες και «εν δυνάμει» λειτουργικές ομολογίες με γνωστές πρωτεΐνες (υποστρώματα έγκρισης) του εκκριτικού συστήματος τύπου III από φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως οι πρωτεΐνες HrpPtoH, HrpW και AvrA.

Οι δραστικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια διάσπαρτα σε διάφορα σημεία του κύριου χρωμοσώματος του βακτηρίου, ενώ αρκετές κωδικοποιούνται και από πλασμίδια. Συχνά τα γονίδια αυτά γειτονεύουν με μεταθετά στοιχεία γεγονός που υποδηλώνει επίσης την υψηλή «ινητικότητα» (οριζόντια μεταφορά) τους μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Για παράδειγμα στην πλειοψηφία τους τα γονίδια που κωδικοποιούν δραστικές πρωτεΐνες στην *E. coli* (EHEC) O157:H7 στέλεχος Sakai βρέθηκαν εντός λαμδοειδών προσφάγων σε περισσότερους από 20 γενετικούς τόπους στο γένωμα της EHEC. Η ικανότητα των Hrp πρωτεϊνών να μεταφέρονται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III των βακτηρίων άλλων γενών ίσως είναι υπό το πρίσμα αυτό βιολογικά σημαντική (Collmer, 1998, Kim *et al.*, 1998). Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως στην εντεροπαθόγνο *E. coli*, το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον κυριότερο δραστικό της παράγοντα, Ttr, καθώς και το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αντίστοιχη σαπερόνη τάξης I, βρίσκονται εντός της νησίδας παθογένειας του εκκριτικού συστήματος της. Εκτενές άρθρο ανασκόπησης για τις δραστικές πρωτεΐνες είναι των Alfano & Collmer, 2004.

1.3.2. Υποστρώματα έγκρισης – Δραστικές πρωτεΐνες – Πρωτεΐνες διάνοιξης / μεταφοράς

Εκτός από τις δραστικές πρωτεΐνες που δρουν εντός του κυτταροπλάσματος του ξενιστή, ορισμένες δρουν εξωκυττάρια ή ενσωματώνονται στην μεμβράνη του. Για παράδειγμα στην *P. syringae* pv *phaseolicola*, η πρωτεΐνη HrpZ, που κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζει

εσωτερικά της νησίδας παθογένειας του εκκριτικού συστήματος τύπου III, μπορεί να προκαλέσει αντίδραση υπερευαισθησίας αν προστεθεί εξωγενώς. Η HrpZ φαίνεται να δημιουργεί οπές σε λιπιδιές διπλοστοιβάδες *in vitro* (Lee *et al.*, 2001). Η HrpW επίσης από την *E. amylovora* περιλαμβάνει μια καρβοξυτελική περιοχή που παρουσιάζει ομολογία με μια τάξη λυασών του πολυγαλακτουρονικού οξέος, (Gaudriault *et al.*, 1998). Έχει προταθεί ότι οι καρβοξυτελικές περιοχές των πρωτεϊνών αυτών ίσως εμπλέκονται στη στόχευση τους στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα.

Εκτός από τις δραστικές πρωτεΐνες, από το εκκριτικό σύστημα τύπου III εκκρίνονται και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δόμηση του πόρου στη μεμβράνη του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες διάνοιξης – μεταφοράς (translocators) αναφέρονται σε αυτήν την παράγραφο καθώς έχουν στενή σχέση με την μολυσματική ιδιότητα. Ως πρωτεΐνες διάνοιξης – μεταφοράς χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα να δομούν τον πόρο στην μεμβράνη του ξενιστή και στη συνέχεια να δεσμεύονται με το υπόλοιπο εξωκυττάριο τμήμα της εκκριτικής συσκευής, οδηγώντας έτσι απευθείας τις δραστικές πρωτεΐνες στο εσωτερικό του ξενιστή. Οι πρωτεΐνες διάνοιξης – μεταφοράς στα ζωοπαθογόνα έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς και φαίνεται ότι διεισδύουν πλήρως στην μεμβράνη του ξενιστή. Συνήθως κάθε εκκριτικό σύστημα τύπου III των ζωοπαθογόνων φέρει δύο τέτοιες πρωτεΐνες (π.χ. YopD και YopB στην *Yersinia*) οι οποίες συνιστούν τον πόρο στην μεμβράνη του ξενιστή. Τοποθετούνται στην ευκαρυωτική μεμβράνη συνήθως με την βοήθεια της πρωτεΐνης του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής (LcrV στην περίπτωση της *Yersinia*). Στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, πριν την έκκριση τους, οι πρωτεΐνες διάνοιξης-μεταφοράς βρίσκονται δεσμευμένες στις αντίστοιχες σαπερόνες τάξης II. Η δέσμευση αυτή πιθανόν αποτρέπει την πρόωγη αλληλεπίδραση τους που θα προκαλούσε κυτοτοξικότητα στο βακτήριο (Neyt & Cornelis, 1999).

1.3.3. Υποστρώματα έκκρισης – Δομικές πρωτεΐνες του εξωκυττάριου τμήματος της συσκευής

Η πρωτεΐνη PscF της *P. aeruginosa* αποτελεί το κύριο συστατικό δόμησης της εξωκυττάριας βελονοειδούς δομής (needle) του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Όταν η πρωτεΐνη απομονώθηκε έπειτα από ετερόλογη υπερέκφραση της σε *E. coli* βρέθηκε να πολυμερίζεται παράγοντας ίνες πλάτους 80 Å και μήκους μεγαλύτερου του 1 μm, (Quinaud *et al.*, 2005).

Οι Deane *et al.*, (2006) παρουσίασαν την ατομική δομή της υπομονάδας της βελονοειδούς δομής από την *Shigella flexneri*, MxiH, και στην συνέχεια χρησιμοποίησαν την τρισδιάστατη επανασύσταση της βελονοειδούς δομής από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο για να ‘ελλιμενίσουν’ (docking) την πρωτεΐνη και να παράγουν ένα πλήρες ατομικό μοντέλο της βελονοειδούς δομής. Χαρακτηριστικά κατέδειξαν ότι το μεγαλύτερο μέγεθος της υπομονάδας που δομεί το μαστίγιο σε σχέση με την υπομονάδα της βελονοειδούς δομής, λαμβάνοντας υπόψη την κοινή τους αρχιτεκτονική, έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση στην εξωτερική διάμετρο του εξωκυττάριου τμήματος του T3SS και όχι στην εσωτερική διάμετρο. Οι ερευνητές θεωρούν αυτό το χαρακτηριστικό ως μία κατάλληλη εξελικτική προσαρμογή σε δύο διαφορετικές καταστάσεις με κοινή βάση την έκκριση. Στην *P. syringae* το ινίδιο (pilus) αποτελείται κατά κύριο λόγο από την πρωτεΐνη HrpA. Η πρωτεΐνη HrpA δεν φαίνεται να διαθέτει ειδικό ζευγάρι σαπερόνων για την παρεμπόδιση του πρώιμου πολυμερισμού της εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Σύμφωνα με τους Hienonen *et al.*, (2006) τα μετάγραφα του γονιδίου *hrpA* φαίνεται να διαθέτουν εξαιρετική σταθερότητα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι κάτι τέτοιο μπορεί να συσχετίζεται άμεσα είτε με την υψηλή απαίτηση του βακτηρίου για την κύρια υπομονάδα που δομεί το ινίδιο, είτε με την λειτουργία του mRNA ως εκκριτικού σιγάλου. Η τελευταία θεώρηση συναντά αριετούς υποστηρικτές επίσης (άρθρο ανασκόπησης, Aldridge & Hughes, 2001), ενώ η σύζευξη του μηχανισμού μετάφρασης και σύγχρονης έκκρισης θα δικαιολογούσε την απουσία σαπερόνων τάξης III από την νησίδα παθογένειας του *hrp/hrx* εκκριτικού συστήματος.

Στις δομικές εξωκυττάριας πρωτεΐνες ανήκουν και οι πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτεΐνες του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής (needle-tip proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέουν την βελονοειδή δομή με τις πρωτεΐνες διάνοιξης-μεταφοράς της μεμβράνης του

ξενιστή εξασφαλίζοντας την συνέχεια του αγωγού έκκρισης με τον πόρο μεταφοράς του εκκριτικού συστήματος τύπου III στην ευκαρυωτική μεμβράνη. Επίσης οι πρωτεΐνες αυτές είναι υπεύθυνες για την ορθή τοποθέτηση, ενσωμάτωση και ολιγομερισμό των πρωτεϊνών διάνοιξης-μεταφοράς κατά την δόμηση του πόρου. Στην περίπτωση του Ysc εκκριτικού συστήματος (*Yersinia*) η πρωτεΐνη LcrV παρουσιάζει τις παραπάνω ιδιότητες. Η πρωτεΐνη έχει την επιπλέον ικανότητα να ανοίγει πόρους σε μεμβράνες (Derewenda *et al.*, 2004). Η δομή της πρωτεΐνης έχει προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X ενώ κρυσταλλικές δομές διατίθενται και για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από την *S. flexneri* IpaD και την BipD της *Burkholderia pseudomallei* (Johnson *et al.*, 2006). Και οι τρεις πρωτεΐνες διαθέτουν μία κεντρική περιοχή σπειραμμένου σπειράματος² (coiled coil) που αποτελείται από δύο α-έλικες μήκους περίπου 50 καταλοίπων.

1.3.4 Σινιάλα έκκρισης του εκκριτικού συστήματος τύπου III

Τα υποστρώματα έκκρισης φέρουν σινιάλα για την παράδοση τους στο εκκριτικό σύστημα τύπου III και τον περαιτέρω χειρισμό τους. Το κύριο σινιάλο έκκρισης από το τύπου III σύστημα φαίνεται να εδράζει στα 15 με 20 αμινοτελικά αμινοξέα των υποστρωμάτων έκκρισης και παρόλο που δεν γίνεται αντιληπτή η ύπαρξη ενός εμφανούς μοτίβου, το κύριο αυτό σινιάλο είναι κοινό μεταξύ των εκκριτικών συστημάτων τύπου III, μαστιγιακών και μη, (Lee & Galan, 2004). Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο παραπάνω συστημάτων υπεισέρχεται στη χρήση ενός δεύτερου σινιάλου που χρησιμοποιούν τα μη μαστιγιακά εκκριτικά συστήματα τύπου III. Το δεύτερο αυτό σινιάλο απαιτεί την συνεργασία μίας βοηθητικής πρωτεΐνης (σαπερόνη τάξης I, βλέπε επόμενο εδάφιο 1.4.1) που δεσμεύεται στα κατάλοιπα 30 – 80 της δραστηκής πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, δεν έχουν βρεθεί σαπερόνες που εξυπηρετούν όλο το εύρος των δραστηκών πρωτεϊνών. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι σαπερόνες τάξης I φαίνεται να παραδίδουν τα υποστρώματα στην ΑΤΡάση του εκκριτικού συστήματος (Gauthier & Finlay, 2003). Ειδικότερα πιστεύεται ότι οι σαπερόνες αυτές κρατούν το αμινοτελικό άκρο των δραστηκών πρωτεϊνών σε μία εκτεταμένη διαμόρφωση χρησιμεύοντας πιθανώς σαν εκκινητές (primers) της διαδικασίας αποδίπλωσης της δραστηκής πρωτεΐνης για την ενεργητική της μεταφορά μέσω του στενού διαύλου/αγωγού του εκκριτικού συστήματος τύπου III (εσωτερική διάμετρος $\approx 20 \text{ \AA}$).

Η χρήση πολλών σινιάλων από το εκκριτικό σύστημα τύπου III ίσως παρέχει την μοριακή βάση για ιεραρχία στην έκκριση των πρωτεϊνών ενώ οι Lee και Galan (2004) έδειξαν ότι η χρήση του δεύτερου σινιάλου εξυπηρετεί την στόχευση για έκκριση από το μη μαστιγιακό εκκριτικό σύστημα τύπου III (βλ. εδάφιο 1.4.1).

1.4 Οι σαπερόνες του εκκριτικού μηχανισμού τυπου III

Μία νέα οικογένεια πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III που ανακαλύφθηκε και μελετήθηκε αρχικά στα ζωπαθόγωνα βακτήρια είναι η οικογένεια των σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Ο λειτουργικός τους ρόλος συσχετίστηκε με την αλληλεπίδραση τους με τα υποστρώματα έκκρισης του συστήματος όσο αυτά παρέμεναν ακόμα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα είτε για να εμποδίσουν πρόωρες αλληλεπιδράσεις είτε για την καθιέρωση παροδικής ιεράρχησης κατά την έκκριση. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι μικρού μεγέθους ($\approx 15 \text{ kD}$), διαλυτές, όξινες (pI 4.0 – 6.0), με πιθανή αμφιπαθή καρβοξυτελική α-έλικα πλούσια σε λευκίνες.

Στη *Yersinia* οι σαπερόνες αυτές ονομάστηκαν Syc (specific Yop chaperon). Γενικά, αυτές κωδικοποιούνται από ένα γονίδιο που εντοπίζεται πλησίον της πρωτεΐνης Yop (*Yersinia outer*

² Το σπειραμμένο σπείραμα είναι δομικό μοτίβο στις πρωτεΐνες. Σε αυτό συμμετέχουν δύο ως έξι α-έλικες οι οποίες δημιουργούν συνήθως μία αριστερόστροφη υπερέλικα όπως τα νήματα στο σκοινί (Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι διμερής ή τριμερής). Συνήθως το μοτίβο αυτό εμπεριέχει επαναλήψεις επτάδας. Η αλληλεπιδρούσα επιφάνεια των α-ελίκων συνήθως εμπεριέχει τα υδρόφοβα αμινοξέα, όπως λευκίνη, στις θέσεις 4 και 7 στην επανάληψη επτάδας. Γνωστές πρωτεΐνες με τέτοια μοτίβα είναι για παράδειγμα κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες και η τροπομοσίνη.

proteins) που εξυπηρετούν. Οι σαπερόνες αυτές δεν συνιστούν ομοιογενή ομάδα αλλά φαίνεται να ανήκουν σε τέσσερις κύριες υποοικογένειες: οι Τάξης I σαπερόνες δεσμεύονται σε δραστικές πρωτεΐνες, οι Τάξης II σε πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς, οι Τάξης III σε εκκριτινόμενες πρωτεΐνες που δομούν το εξωκυττάριο τμήμα του εκκριτικού συστήματος τύπου III και τέλος στις γενικής χρήσης σαπερόνες που εξασφαλίζουν την διαλυτότητα των υποστρωμάτων έκκρισης μέσω παροδικών αλληλεπιδράσεων στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Τα κύρια χαρακτηριστικά των υποοικογενειών αυτών περιγράφονται στα εδάφια που ακολουθούν.

1.4.1 Τάξης I (IA και IB) Σαπερόνες

1.4.1.1 Βιολογικός ρόλος

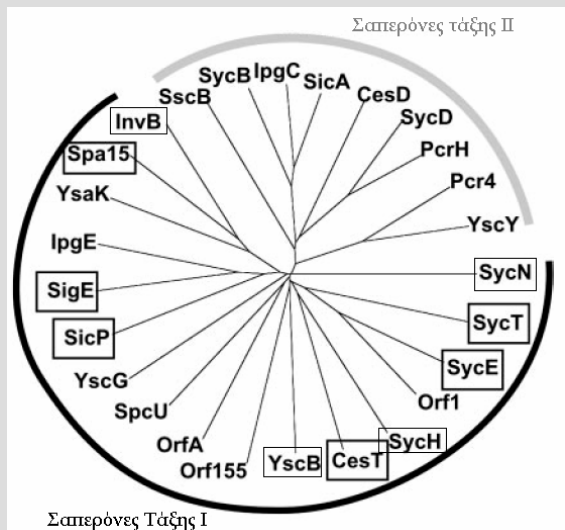
Η SycE, σαπερόνη της δραστικής πρωτεΐνης YopE, χαρακτηρίζει την πρώτη τάξη (Wattiau & Cornelis, 1993). Αυτές οι σαπερόνες δεσμεύονται ειδικά στις δραστικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν και η απουσία τους μπορεί να μειώσει δραστικά, αν όχι να απολέσει τελείως, την έκκριση των προς μεταφορά πρωτεϊνών. Έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις, σχετικά με την δράση των σαπερονών αυτών, ανάλογες των διαφορετικών τύπων παρατηρήσεων που έλαβαν χώρα στα επιμέρους πειράματα. Οι σαπερόνες τάξης I SycE και SycH δεσμεύονται στις συγγενείς τους δραστικές πρωτεΐνες YopE και YopH αντίστοιχα, σε μοναδικές περιοχές μεταξύ των καταλοίπων 20 και 70 (Sory *et al.*, 1995). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι η σαπερόνη έχει δράση «σωματοφύλαξης» της δραστικής πρωτεΐνης στην οποία δεσμεύεται, προστατεύοντας το σημείο δέσμευσης από πρώιμες αλληλεπιδράσεις που διαφορετικά θα οδηγούσαν σε αποδόμηση της πρωτεΐνης. Σε πειράματα (Boyd *et al.*, 2000) όπου μόνο η δραστική πρωτεΐνη YopE συντίθεται, φαίνεται να εκκρίνεται απουσία της σαπερόνης της καθώς και απουσία της αλληλουχίας πρόσδεσης της σαπερόνης, γεγονός που δηλώνει ότι η παρουσία της σαπερόνης ίσως είναι απαραίτητη όταν η YopE συναγωνίζεται τις άλλες δραστικές πρωτεΐνες για έκκριση μέσω του συστήματος τύπου III, συμβάλλοντας έτσι στην καθιέρωση μιας παροδικής ιεραρχίας. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι μόνο ένα υποσύνολο των δραστικών πρωτεϊνών διαθέτουν σαπερόνες καθώς επίσης και από το γεγονός ότι κάθε σαπερόνη τάξης I είναι αυστηρά εξειδικευμένη ως προς τη δραστική πρωτεΐνη που δεσμεύει. Οι πρώτες προσδιορισμένες δομές σαπερονών-δραστικών πρωτεϊνών υποδεικνύουν ότι οι σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III διατηρούν το αμινοτελικό άκρο του υποστρώματος τους σε 'κατάσταση έκκρισης', δηλαδή σε αποδιπλωμένη ή σχεδόν αποδιπλωμένη μορφή και ίσως λειτουργούν σαν εικινήτες για την αποδίπλωση ολόκληρης της δραστικής πρωτεΐνης με την βοήθεια της ATPάσης του συστήματος. Κάτι τέτοιο είναι πιθανό να συμβαίνει καθώς ο διάυλος του εκκριτικού συστήματος τύπου III όπως ήδη αναφέραμε, φαίνεται να έχει διάμετρο μόνο περί τα 20 Å. Η αλληλεπίδραση των σαπερονών αυτών καθώς και του συμπλόκου σαπερόνης-δραστικής πρωτεΐνης αλλά και της δραστικής πρωτεΐνης με την ATPάση του συστήματος έχει δειχθεί για την περίπτωση της CesT (Gauthier & Finlay, 2003). Οι συγγραφείς εξέτασαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της σαπερόνης τάξης I CesT, της δραστικής πρωτεΐνης Tir και της υποθετικής ATPάσης EscN χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbend Assay), δοκιμές υπέρθεσης³ (gel overlay) και ανοσοκατακρήμνισης.

Η πρόσφατα χαρακτηρισθείσα ως τάξης I σαπερόνη SycO (Letzelter *et al.*, 2006) έστρεψε εκ νέου το ενδιαφέρον στην θεώρηση των σαπερονών των εκκριτικών συστημάτων τύπου III ως πρωτεΐνες που σκοπό έχουν να εμποδίσουν τις πρόωρες αλληλεπιδράσεις των δραστικών πρωτεϊνών εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα, κατασκευάζοντας ποικίλα συντήγματα τμημάτων της δραστικής πρωτεΐνης YopO με την πράσινη φθορίζουσα

³ Βιολογική τεχνική κατά την οποία δείγμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε SDS-PAGE και στην συνέχεια μονιμοποιείται σε μεμβράνη. Ακολούθως η μεμβράνη επωάζεται με την πρωτεΐνη-στόχο η οποία είναι σημασμένη για να καταδείξει την θέση/θέσεις που δεσμεύεται στο πηκτωμα και κατά συνέπεια την πρωτεΐνη/πρωτεΐνες με τις οποίες αλληλεπιδρά.

πρωτεΐνη GFP ο Letzelter και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η σαπερόνη «καλύπτει» την επικράτεια μεμβρανικού εντοπισμού που διαθέτει η δραστική πρωτεΐνη.

Εικόνα 1.3. Φυλογενετική ανάλυση των σαπερονών των μη μαστιγιακών εκκριτικών συστημάτων τύπου III όπου διαχωρίζονται οι τάξης I από τις τάξεις II σαπερόνες. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW. Τα πλαίσια δηλώνουν τις σαπερόνες που έχουν χαρακτηριστεί δομικά και είναι όμοιες. Κωδικοί πρόσβασης GenBank: *Y. enterocolitica* SycN, NP_863520; *Y. enterocolitica* SycT, NP_863508; *Y. pestis* SycE, AAC62588; *P. aeruginosa* Orf1, AAA66490; *Y. enterocolitica* SycH, NP_863547; *E. coli* CesT, P58233; *Y. enterocolitica* YscB, NP_863534; *Y. enterocolitica* Orf155, NP_052379; *E. amylovora* OrfA, AAF63399; *P. aeruginosa* SpcU, AAP82960; *Y. enterocolitica* YscG, NP_863539; *S. enterica* serovar Typhimurium SicP, AAF63399; *S. enterica* serovar typhimurium SigE, NP_460063; *S. flexneri* IpgE, AAP78997; *Y. enterocolitica* YsaK, AAK84111; *S. enterica flexneri* Spa15, AAP79011; *S. enterica* serovar Typhimurium InvB, NP_461816; *S. enterica* serovar Typhimurium SscB, NP_460368; *Y. enterocolitica* SycB, AAM47500; *S. flexneri* IpgC, AAP78992; *S. enterica* serovar Typhimurium SicA, NP_461807; *E. coli* CesD, NP_312603; *Y. enterocolitica* SycD, NP_863513; *P. aeruginosa* PcrH, AAO91772; *P. aeruginosa* Pcr4, AAC45943; *Y. enterocolitica* YscY, NP_863518. Τροποποιημένο σχήμα από το άρθρο του Gosh, (2004).



Οι τάξης I σαπερόνες φαίνεται να διαχωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες με βάση τον αριθμό των υποστρωμάτων έκκρισης με τον οποίο αλληλεπιδρούν. Πολλές από αυτές (τάξη IA) φαίνεται να είναι εξειδικευμένες για μία δραστική πρωτεΐνη, ενώ το γονίδιο τους γειτνιάζει με το αντίστοιχο της δραστικής πρωτεΐνης την οποία εξυπηρετούν, και στις περισσότερες των περιπτώσεων ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται περιπτώσεις γνωστών σαπερονών τάξης I από τα φυτοπαθογόνα εκκριτικά συστήματα τύπου III.

Πίνακας 1.1 Σαπερόνες τάξης I από φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Οργανισμός	Σαπερόνη	Δραστική Πρωτεΐνη	Τάξη	Θέση δέσμευσης	Συνεισφορά στην έκκριση	Συνεισφορά στην σταθερότητα
<i>E. amylovora</i>	DspB/F	DspA/E	IA	A	+	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	ShcA	HopPsyA	IA	1-166	+	-
	ShcB1	HopPsyB1	IA	A	A	+
	HrpG [‡]	HrpV [¶]	ND	A	-	-
	AvrF	AvrE	IA	A	A	A
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	ShcS1 [§]	HopS1	IA [¥]	A	+	A
		HopO1-1		111-175	+	-
		HopO1-2		A	A	A
	ShcS2 [§]	HopS1	IA [¥]	A	A	A
		HopS2		A	A	A
		HopO1-1		111-175	+	+
	ShcO1 [§]	HopO1-2		A	A	A
		HopS1	IA [¥]	A	+	+
ShcF	HopS2		A	A	A	
	HopO1-1		111-175	+	+	
	HopO1-2		A	A	A	
ShcM	HopF	IA	IA	A	-	+
	HopPtoV	IA	IA	76-125	+	+
	HopPtoM	IA	IA	100-400	+	+

Οργανισμός	Σαπερόνη	Δραστική Πρωτεΐνη	Τάξη	Θέση δέσμησης	Συνεισφορά στην έγκριση	Συνεισφορά στην σταθερότητα
<i>X. campestris</i> <i>pv. vesicatoria</i>	HraB [#]	AvrBs1 AvrBs3 XorF1 XorJ	IB	A A	+ +	- -

Πίνακας 1.1 Όπου A, αδιευκρίνιστο. [#]Η HrpG της ομάδας I των φυτοπαθογόνων τύπου III εκκριτικών συστημάτων (T3SS), είναι μία υποθετική σαπερόνη τάξης I. [§]Αυτές οι T3S σαπερόνες είναι ομόλογες. [#]Ομόλογα του HraB υπάρχουν στα παθογόνα *Xanthomonas*, *R. solanacearum* and *Burkholderia pseudomallei*. [¶]Η HrpV δεν εκκρίνεται από το T3SS. [¥]Σε αντίθεση με τις γνωστές IA σαπερόνες, οι ShcS1 και ShcO1 δεσμεύονται σε διαφορετικές δραστικές πρωτεΐνες, αλλά κωδικοποιούνται από γονίδια που γειτονεύουν με τουλάχιστον ένα από τα δραστικά γονίδια, τα προϊόντα των οποίων μεταφέρουν. Τα + υποδηλώνουν ότι οι σαπερόνες έχουν βρεθεί να συνεισφέρουν είτε στην έγκριση είτε στην σταθερότητα των δραστικών πρωτεϊνών, ενώ τα - υποδηλώνουν είτε ότι δεν έχειδειχθεί η συνεισφορά τους πειραματικά, είτε ότι δεν συνεισφέρουν (Buttner & Bonas, 2006).

Στην τάξη IB ανήκουν σαπερόνες που φαίνεται να εξυπηρετούν πληθώρα δραστικών παραγόντων/πρωτεϊνών, ενώ το γονίδιο τους εδράζει συχνά εντός της νησίδας παθογένειας του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Επαναθεωρώντας την υπόθεση ότι οι τάξεις I σαπερόνες μπορούν να διαθέτουν ρόλους εκκινητή της αποδίπλωσης των υποστρωμάτων έγκρισης, η χρήση των σαπερονών τάξης IB ίσως να εξυπηρετούσε και δραστικές πρωτεΐνες για τις οποίες δεν έχουν βρεθεί εξειδικευμένες σαπερόνες IA. Από την άλλη πλευρά καθώς έχουν χαρακτηριστεί πολλά σύμπλοκα σαπερονών-δραστικών πρωτεϊνών τα μοτίβα δέσμησης της σαπερόνης πάνω σε μία δραστική πρωτεΐνη έχουν χαρακτηριστεί και δεν φαίνεται να τα διαθέτουν όλες οι δραστικές πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά υπάρχουν αδημοσίευτα αποτελέσματα στο εργαστήριο (Χαρόβα, Πανόπουλος & Κοκκινίδης) όπου από πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες (SAXS), μία καλά μελετημένη δραστική πρωτεΐνη της *P. syringae* *pv. phaseolicola* που δεν φαίνεται να διαθέτει ειδική σαπερόνη για την έγκριση της παρουσιάζει αρκετά επίμηκες σχήμα στο διάλυμα ώστε η διατομή της να έχει διάμετρο μικρότερη των 20 Å.

1.4.1.2 Ιστορική αναδρομή του προσδιορισμού των δομών των τάξης I σαπερονών

Τον Νοέμβριο του 2001 δημοσιεύτηκαν στα περιοδικά Nature και Nature Structural Biology συγχρόνως οι πρώτες δομές από δύο διαφορετικές σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Παρόλη την απουσία σημαντικής ομοιότητας σε αμινοξικό επίπεδο, οι δομές έφεραν κοινό πρότυπο δευτεροταγών στοιχείων (α-β-β-β-α-β-β-α) τα οποία διπλωναν σε ένα σάντουιτς 2 επιπέδων: το πρώτο επίπεδο αποτελείται από ένα β-φύλλο αντιπαράλληλων β-κλώνων και το δεύτερο από τις α-έλικες (CATH 3.30.1460.10), ενώ οργανώνονταν σε διμερή με την κύρια συμμετοχή της α2 έλικας. Η δομή της σαπερόνης SicP από τη *Salmonella* προσδιορίστηκε έχοντας δεσμευμένη την επικράτεια της δραστικής πρωτεΐνης που συνοδεύει, (CBD, Chaperone Binding Domain), SptP (Stebbins & Galan, 2001), ενώ η δεύτερη σαπερόνη ήταν η SycE από την *Yersinia pseudotuberculosis* (Birtalan & Gosh, 2001). Η επικράτεια CBD της δραστικής πρωτεΐνης SptP βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση να περιελίσσεται γύρω από τη σαπερόνη SicP.

Τον επόμενο μήνα του ίδιου έτους δημοσιεύτηκαν οι δομές δύο ακόμα σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III: η CesT από την εντεροαιμοραγική *E. coli* O157:H7 και η SigE από την *Salmonella enterica* (Luo *et al.*, 2001). Η τοπολογία ήταν επίσης η ίδια με αυτή που εμφάνιζαν οι προηγούμενα χαρακτηρισμένες σαπερόνες εκτός ενός επιρρόσθετου β-κλώνου στο καρβοξυτελικό άκρο της CesT. Η ίδια σαπερόνη φάνηκε να έχει σχηματίσει ένα διαφορετικό διμερές στο κρυσταλλικό πλέγμα που όμως ήταν αποτέλεσμα αντιμετάθεσης επικρατειών (domain swap).

Το επόμενο έτος δημοσιεύτηκε η δομή της σαπερόνης SycE αυτή τη φορά από την *Yersinia pestis* (Evdokimov *et al.*, 2002) ενώ στην δομή αυτή ήταν ορατό και μέρος των καρβοξυτελικών αμινοξέων σε β-κλώνο ο οποίος είχε αντιπαράλληλη τοποθέτηση με τον β1 κλώνο της σαπερόνης. Η σπουδαιότητα της θέσης του β1 κλώνου της SycE διευκρινίσθηκε περαιτέρω με την δημοσίευση της Birtalan και των συνεργατών της, τον Μάιο του ίδιου έτους, όπου παρουσιάζουν την δομή της SycE, αυτή τη φορά σε σύμπλοκο με το τμήμα δέσμησης

της δραστηκής πρωτεΐνης, YopE. Είναι πλέον εμφανές ότι όπως και στην περίπτωση της SicP με το τμήμα δέσμευσης του SptP, ο β1 κλώνος παίζει κύριο ρόλο στην αλληλεπίδραση. Η Birtalan και οι συνεργάτες της προτείνουν πλέον την ύπαρξη ενός τρισδιάστατου σιναύλου για έγκριση τον υποστρωμάτων από το εκκριτικό σύστημα τύπου III.

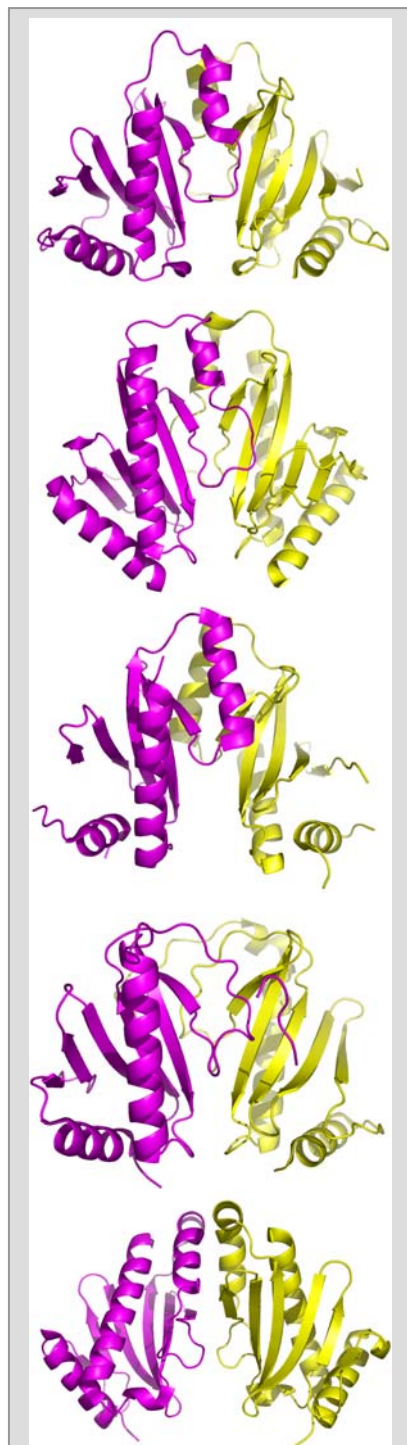
Στις αρχές του 2003 δημοσιεύτηκε ξανά η δομή της σαπερόνης SycE από τους Trame και McKay, αυτή τη φορά από την *Y. enterocolitica*. Η δομή είναι σαφώς ίδια με τις προηγούμενες περιπτώσεις, αυτή τη φορά όμως είναι ορατό όλο το καρβοξυτελικό τμήμα της σαπερόνης, το οποίο ναι μεν δεσμεύεται στον β1 κλώνο αλλά όχι σε αυτόν της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας παρά σε αυτόν ενός γειτονικού διμερούς συμμετέχοντας στις κρυσταλλικές επαφές μέσω αντιμετάθεσης επικρατειών.

Το επόμενο έτος ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της σαπερόνης Sra15 από την *Shigella flexneri* (van Eerde *et al.*, 2004), η οποία έχει χαρακτηριστεί ήδη ως σαπερόνη ευρείας ειδικεύσης (τάξης IB) καθώς φαίνεται να δεσμεύει πολλές δραστηκές πρωτεΐνες. Αν και διαθέτει την ίδια τοπολογία με τις προηγούμενες προσδιορισμένες σαπερόνες, ο διμερισμός της λαμβάνει χώρα διαφορετικά. Οι α2 έλικες είναι εστραμμένες αυτή τη φορά κατά 30° μεταξύ τους καταρρίπτοντας έτσι την θεώρηση της Birtalan για ένα τρισδιάστατο σιναύλο έγκρισης, ενώ οι συγγραφείς έχουν καταφέρει και σε πειράματα σκέδασης στις μικρές γωνίες (SAXS) για να αποδείξουν ότι η περιστροφή αυτή των 30° δεν οφείλεται στην κρυστάλλωση της πρωτεΐνης αλλά παρατηρείται και στο διάλυμα.

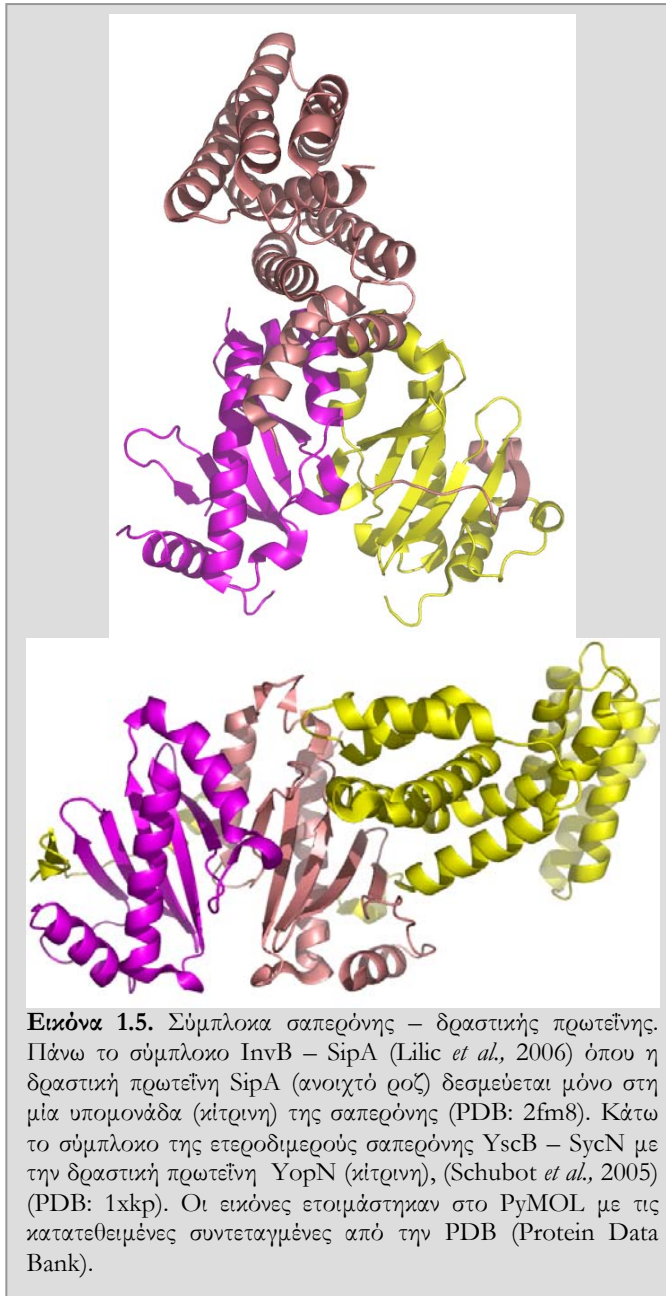
Τον Ιούνιο του 2004 προσδιορίστηκε η δομή της σαπερόνης SycH (Phan *et al.*, 2004) έχοντας δεσμευμένη την επικράτεια CBD όχι της δραστηκής πρωτεΐνης YopH που εξυπηρετεί αλλά τμήμα του αρνητικού ρυθμιστή του εκκριτικού συστήματος τύπου III της *Y. pestis*, YscM2. Ο τρόπος δέσμευσης στην σαπερόνη του αρνητικού ρυθμιστή είναι ίδιος με αυτόν τον προηγούμενα παρατηρούμενων αλληλεπιδράσεων μεταξύ σαπερόνης – δραστηκής πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο αρνητικός ρυθμιστής εκκρίνεται με τον ίδιο τρόπο που εκκρίνονται οι δραστηκές πρωτεΐνες όταν παραστεί ανάγκη απομάκρυνσης του.

Τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους δημοσιεύτηκε και η πρώτη δομή σαπερόνης από το εκκριτικό σύστημα τύπου III φυτοπαθογόνου βακτηρίου. Η AvrPphF ORF1 από την *P. syringae* pv *phaseolicola* (Singer *et al.*, 2004). Η σαπερόνη αυτή διαθέτει επίσης τα τυπικά πλέον δομικά χαρακτηριστικά των σαπερόνων τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Το μεθεπόμενο έτος (2006) η ομάδα του Schubot και των συνεργατών του δημοσίευσε την δομή της ετεροδιμερούς σαπερόνης YscB-SycN από την *Y. pestis* σε σύμπλοκο αυτή τη φορά με το μεγαλύτερο μέρος της δραστηκής πρωτεΐνης YopN.



Εικόνα 1.4. Σαπερόνες τάξης I. Τα μονομερή παρουσιάζονται με διαφορετικό χρώμα. Από πάνω προς τα κάτω: SycE (Evdokimov *et al.*, 2002), AvrPphF ORF1 (1s28), SigE (1k3s), SycT, Spa15.



1. Ύπαρξη ενός καταλοίπου λευκίνης (L) ή φαινυλαλανίνης (F) εντός της α1 έλικας
2. Ύπαρξη των καταλοίπων [CYGLF]x[LIVF]x[LIVMD] εντός του β1 κλώνου
3. Ύπαρξη των καταλοίπων [LF]xxx[YVFIL] εντός της α3 έλικας.

Στα παραπάνω μοτίβα με x σημειώνεται θέση για οποιοδήποτε αμινοξύ, ενώ τα αμινοξέα εντός των παρενθέσεων υποδηλώνουν την παρουσία ενός εξ αυτών στην συγκεκριμένη θέση του μοτίβου.

1.4.2 Τάξης II Σαπερόνες

Η δεύτερη αυτή ομάδα σαπερονών θεωρήθηκε σημαντική για την έκκριση των πρωτεϊνών διάνοιξης – μεταφοράς. Χαρακτηριστική είναι σε αυτήν την ομάδα η ύπαρξη σε σειρά τριών τετρατριοπεπτιδικών επαναλήψεων (TPRs) 34 αμινοξέων (Pallen *et al.*, 2003), (Εικόνα 1.6).

Τον Ιούλιο του ίδιου έτους δημοσιεύεται από δύο ερευνητικές ομάδες και η σαπερόνη SycT από την *Y. enterocolitica* (Locher *et al.*, 2005, Buttner *et al.*, 2005). Η κύρια διαφοροποίηση της σαπερόνης αυτής είναι η ολοκληρωτική απουσία της α2 έλικας, ενώ τα αντίστοιχα αμινοξέα που βρίσκονται στην θέση αυτή εξακολουθούν να συμμετέχουν στον σχηματισμό της μεσεπιφάνειας του διμερούς. Τέλος, τον Μάρτιο του 2006 δημοσιεύτηκε η δομή της IB σαπερόνης InyB⁴ από την *Salmonella* σε σύμπλοκο με τη δραστηκή πρωτεΐνη SipA (Lilic *et al.*, 2006). Η κύρια ιδιαιτερότητα του συμπλόκου αυτού είναι ότι μόνο η μία υπομονάδα της σαπερόνης συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τη δραστηκή πρωτεΐνη, ενώ η υπόθεση των συγγραφέων ότι ίσως η σαπερόνη να είναι σε θέση να μεταφέρει συγχρόνως δύο δραστηκές πρωτεΐνες δεν αποδείχτηκε πειραματικά. Οι συγγραφείς παρουσίασαν επίσης στο άρθρο τους την συγκριτική μελέτη όλων των ως τώρα δομικά προσδιορισμένων σαπερονών και καθόρισαν τα κοινά πλέον μοτίβα δέσμευσης των δραστηκών πρωτεϊνών των σαπερονών τάξης I ως εξής:

⁴ Το γονίδιο *inyB* βρίσκεται στην ίδια θέση με το γονίδιο *sya15* της *S. flexneri*

Το μοτίβο αυτό εμφανίζεται συχνά να συμμετέχει στην μοριακή αναγνώριση σε διάφορες πρωτεΐνες. Σημαντικό είναι επίσης να σημειώσουμε ότι παρά την πληθώρα προσδιορισμένων δομών που φέρουν TPR επαναλήψεις καμία εξ αυτών δεν έχει προέλθει από προιαρωτικό οργανισμό.

LCRH_YERPS	36	LEQL	YS	AFNQ	YQSG	KYED	HKV	Q	CVLD	HYDS	RFPL	GL	CACR	QAMG	QYDL	IHSYS	V	AIMD	IKEP	PPFP	PHAF	ECLL	QK	GELAE	ESGL	F	QELI	ADK						
CESD/BCOLI	32	LNDL	HS	YAYT	YQSG	GVIT	ARNL	PHL	TYLE	HN	YD	PL	SL	CHQR	LSNH	ED	QLC	PAR	ATLV	MQDP	PRAS	YYS	C	ISY	LL	VGN	KKM	KKAF	KAL	MWC	NK			
SPAT_SALTY	37	MDGL	YAH	YEFY	YNQ	GRLE	DE	ETFR	FCI	YD	FN	BY	TMCI	AAVC	QLK	QFK	CDL	YAV	FTLL	KN	YR	PV	FTC	QC	OLL	MR	KA	K	QCE	PEL	NER	TEDE		
BCRH/BORPE	40	QQA	LYAH	GHGA	YEQ	GRY	ADAL	KMF	CL	VAC	PL	EB	RY	IL	AL	AAA	QGL	GLY	EH	AL	Q	Y	AA	AL	Q	L	D	S	P	R	L	L	H	G
LCRH/CHLTR	78	LEEL	TY	VAYT	YFYS	QSG	KYQ	EAL	GL	Q	HL	TAS	KP	Q	CH	KY	PL	GL	SS	CH	QL	K	M	Y	D	E	A	F	G	F	L	A	F	D
YSCY/YREN	10	QEFL	LL	NG	WL	QL	CG	HA	E	R	A	C	L	L	D	A	L	L	T	L	N	P	E	H	L	A	C	R	C	R	L	V	A	L
PPP5_HUMAN	26	AEEL	K	T	C	A	N	D	Y	F	K	A	K	D	Y	E	N	A	I	K	F	S	C	A	I	E	L	N	P	S	N	A	Y	G

Εικόνα 1.6. TPR επαναλήψεις από επιλεγμένες σαπερόνες τάξης II σε στοίχιση με επαναλήψεις TPR γνωστής δομής (φωσφατάση 5). Με κόκκινο παρουσιάζονται τα κατάλοιπα που μεταλλάχθηκαν και σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με την YorD (κοίλη επιφάνεια) και με μπλε εκείνα που εντοπίζονται στην κυρτή επιφάνεια και επηρεάζουν την αλληλεπίδραση με την YorB. Με § σημειώνονται οι θέσεις των απαραίτητων καταλοίπων του μοτίβου TPR. Οι 3 επαναλήψεις TPR σημειώνονται με τα σύμβολα ~ (TPR1), = (TPR2) και - (TPR3). Η ονοματολογία των αλληλουχιών/είδος δίνεται σύμφωνα με την SWISSPROT. Οι κωδικοί πρόσβασης στην βάση Entrez για τις πρωτεΐνες είναι: 126027, 2865283, 59800320, 33593253, 15605305, 14579340, 1709744, (Edqvist *et al.*, 2006).

Η Edqvist και οι συνεργάτες της (2006) θέλοντας να μελετήσουν την σχέση δομής – λειτουργίας της σαπερόνης τύπου II LcrH (SycD) από το εκκριτικό σύστημα της *Yersinia*, εξέτασαν την συνεισφορά διαφορετικών αμινοξέων στην σταθερότητα της σαπερόνης, στην ικανότητα δέσμευσης των υποστρωμάτων της, στην ικανότητα έκκρισης και στην ρύθμιση του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Επιβεβαίωσαν τον ρόλο των TPR επαναλήψεων στη σταθερότητα της σαπερόνης και της λειτουργίας της όταν μετέλλαξαν τα συντηρημένα και άκρως απαραίτητα κατάλοιπα του μοτίβου (υπ' αριθμό: 8, 20 και 27) ενώ έδειξαν ότι διαφορετικά αμινοξέα και κατά συνέπεια διαφορετικές θέσεις της σαπερόνης τύπου II αλληλεπιδρούν ξεχωριστά με την πρωτεΐνη διάνοιξης-μεταφοράς YorB και την πρωτεΐνη διάνοιξης – μεταφοράς YorD. Κατασκευάζοντας ένα θεωρητικό μοντέλο της δομής της LcrH οι μεταλλαγές που επηρέαζαν την δέσμευση της YorB χαρακτηρογραφήθηκαν στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων που προέβαλαν από την κοίλη επιφάνεια του μοντέλου των επαναλήψεων TPR, ενώ αντίθετα η YorD φαίνεται να δεσμεύεται στην εξωτερική κυρτή πλευρά της σαπερόνης. Επίσης, το διπλό μετάλλαγμα Y40A/F44A βρέθηκε ικανό να διατηρεί σταθερά τα υποστρώματα του εντός του βακτηρίου, ενώ έκκριση αυτών δεν λάμβανε χώρα.

1.4.3 Τάξης III Σαπερόνες

Σε αυτήν την κατηγορία σαπερονών ομαδοποιούνται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις υπομονάδες των εξωκιτάρων συστατικών των εκκριτικών συστημάτων εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος με σκοπό την παρεμπόδιση του πρώιμου πολυμερισμού τους.

Στην περίπτωση της PscF, της υπομονάδας της βελονοειδούς δομής από την *P. aeruginosa*, οι Quinaud *et al.*, (2005) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη παραμένει σε μονομερή κατάσταση όταν συνεκφραζόταν με τους κυτταροπλασματικούς παράγοντες PscE και PscG σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο σε αναλογία 1:1:1. Μεταλλάγματα έλλειψης των δύο αντίστοιχων γονιδίων ήταν ανίκανα να εκκρίνουν την PscF, ενισχύοντας την υπόθεση της χρήσης των PscE και PscG για την αποφυγή του πρόωρου πολυμερισμού της PscF εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος, οδηγώντας έτσι στο χαρακτηρισμό της τρίτης τάξης σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Σε αυτήν την τάξη σαπερονών ανήκουν επίσης οι σαπερόνες FliT, FlgN και FliS του μαστιγίου, καθώς η αλληλεπίδραση τους με τα αντίστοιχα υποστρώματα εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος παρεμποδίζει τις ανώριμες αλληλεπιδράσεις των εξωκιτάρων δομικών αυτών πρωτεϊνών (Page & Parsot, 2002). Η σαπερόνη FliT αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του καλύμματος του μαστιγίου, FliD, ενώ η FlgN με τις πρωτεΐνες του αγρίστρου, FlgK και FlgL. Η σαπερόνη FliS έχει χαρακτηριστεί δομικά σε σύμπλοκη μορφή με την φλαγγελίνη, FliC. Η FliS είναι μονομερής και διαθέτει μόνο α-έλικες

ενώ δεσμεύει την FliC σε εκτενή διαμόρφωση (Evdokomov *et al.*, 2003). Τα σύμπλοκα σαπερονών – υποστρωμάτων στην συνέχεια αλληλεπιδρούν με την ΑΤΡάση του μαστιγίου, FliI, ή με το σύμπλοκο FliI-FliH⁵. Η αποχώρηση του αρνητικού ρυθμιστή της ΑΤΡάσης, FliH, επιτρέπει την υδρόλυση του ΑΤΡ από την FliI και την σύγχρονη εξαγωγή των υποστρωμάτων διαμέσου της εκκριτικής μηχανής, ενώ η σαπερόνη απομακρύνεται και επιστρέφει στο κυτταρόπλασμα (Thomas *et al.*, 2004).

Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά μερικών σαπερονών τάξης III. Η τάξη αυτή των σαπερονών αποτελείται από πρωτεΐνες που δεν φέρουν ομοιότητες σε επίπεδο αλληλουχίας καθιστώντας την τάξη αυτήν ως την πιο ετερογενή τάξη των σαπερονών των εκκριτικών συστημάτων τύπου III.

Πίνακας 1.2 Σαπερόνες διαφορετικών τάξεων και χαρακτηριστικά της αλληλουχίας τους.

Σαπερόνη	Τάξη	AA	pI	Προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή	Αναγνώριση διπλώσης	Δείκτης διπλώσης
FliT [‡]	III	122	5.07	α-α-α-β	-	0.144
FlgN [‡]	III	140	5.36	α-α-α-β	-	-0.053
PscE	III	67	6.56	α-α-α	YscE (1zw0)	0.167
PscG	III	115	5.06	α-α-α-α-α	TPR repeats	0.178
SycD (LcrH)	II	168	4.7	α-α-α-α-α-α-α	3 TPR repeats	0.068
FliJ [‡]	-	147	7.85	α-α	-	-0.140
YscO	-	154	7.75	α-α	-	-0.200

[‡]Οι σαπερόνες των μαστιγιακών συστημάτων τύπου III ομαδοποιούνται στην τάξη III καθώς δεν φέρουν τα χαρακτηριστικά ούτε των τάξης I ούτε των τάξης II ενώ υποβληθούν την έγκριση των εξωκυττάρων συστατικών των μαστιγίων. (FliT *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18 και FlgN: *Salmonella typhimurium*, NCBI: AAC38037) [‡]H FliJ έχει χαρακτηριστεί ως σαπερόνη γενικής χρήσης (Minamino *et al.*, 2000). Η προβλεπόμενη δευτεροταγής δομή όπως προκύπτει από το εργαλείο PsiPRED. Το μοτίβο αναγνώρισης διπλώματος όπως προκύπτει από τον mGenTREADER. Ο δείκτης διπλώσης υπολογίζεται από το εργαλείο FOLDINDEX (Κεφάλαιο 2, σελ 35). AA: Αριθμός Αμινοξέων.

Από αυτήν την τάξη των σαπερονών, οι πρωτεΐνες FliS και YscE διαθέτουν προσδιορισμένες δομές οι οποίες παρουσιάζουν δομική ομολογία μεταξύ τους. Δομική ομολογία παρουσιάζεται επίσης μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών και της αμινοτελικής επικράτειας των πρωτεϊνών του ακροφυσίου της βελονοειδούς δομής IpaD και BipD (σελ. 10-11), οι οποίες φαίνεται να διαθέτουν ενσωματωμένη την σαπερόνη τους στην αμινοξική αλληλουχία (Johnson *et al.*, 2006).

1.4.4 Σαπερόνες Γενικής Χρήσεως

Ως γενικής χρήσεως σαπερόνη του εκκριτικού συστήματος τύπου III έχει κυρίως χαρακτηριστεί από τους Minamino και συνεργάτες (2000) η μαστιγιακή πρωτεΐνη FliJ από την *Salmonella*. Η FliJ βρέθηκε να παρεμποδίζει τον σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων των FliE και FlgG κατά την συνέκφραση τους ενώ είναι άμεσα απαραίτητη για την έγκριση της φλαγγελίνης. Η FliJ φαίνεται να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της FliH, του αρνητικού ρυθμιστή της μαστιγιακής ΑΤΡάσης, καθώς και με την διαλυτή κυτταροπλασματική επικράτεια της FlhA (Fraser *et al.*, 2003). Η ανάλογη πρωτεΐνη στο μη-μαστιγιακό εκκριτικό σύστημα της *Yersinia* είναι η YscO, η οποία επίσης ήταν απαραίτητη για την υψηλού βαθμού έκφραση και έγκριση υποστρωμάτων του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Payne & Straley, 1998).

Πρόσφατα οι Evans *et al.*, (2006) έδειξαν ότι η FliJ φαίνεται να λειτουργεί ως συνοδός των τάξης III σαπερονών FlgN και FliT αλλά όχι της FliS. Η πρωτεΐνη φάνηκε να μην αναγνωρίζει υποστρώματα έγκρισης ή υποστρώματα έγκρισης μαζί με τις σαπερόνες ενώ αναγνωρίζει τις ελεύθερες σαπερόνες. Καθώς η FliJ σχετίζεται με το σύμπλοκο της ΑΤΡάσης φαίνεται πως η κύρια λειτουργία της είναι η συνοδεία των σαπερονών μετά την παράδοση του

⁵ Οι πρωτεΐνες της οικογένειας FliH/YscL έχουν αναγνωριστεί μέσω PsiBLAST από τους Pallen και συνεργάτες (2006) ως πρωτεΐνες φέρουσες ομολογίες με την υπομονάδα E της νΑΤΡάσης και των υπομονάδων b και δ της F₀F₁ ΑΤΡάσης.

υποστρώματος έκκρισης στην ΑΤΡάση του συστήματος, συμμετέχοντας στον μηχανισμό ανακύκλωσης της σαπερόνης στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα.

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η δομική μελέτη της ως τότε υποθετικής τάξης ΙΑ σαπερόνης, AvrPphF ORF1, από την *P. syringae* pv *phaseolicola* και ακολούθως των υποθετικών σαπερονών HrpG και HrpO του εκκριτικού συστήματος τύπου III του ίδιου βακτηρίου. Συγκεκριμένα, κατά την έναρξη της εργασίας η ως τότε υποθετική τάξης ΙΑ σαπερόνη AvrPphF ORF1 δεν διέθετε γνωστή δομή ενώ δεν υπήρχαν άλλες δομικά μελετημένες σαπερόνες από φυτοπαθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια στην βιβλιογραφία. Οι πρωτεΐνες HrpG και HrpO επιλέχθηκαν στην συνέχεια καθώς διέθεταν το μικρό μέγεθος, όξινο θεωρητικό pI και προβλεπόμενη καρβοξυτελική α-έλικα πλούσια σε λευκίνες. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμβαδίζουν με τα κοινά χαρακτηριστικά των σαπερονών των εκκριτικών συστημάτων τύπου III, ενώ δεν ήταν τίποτα άλλο γνωστό γι' αυτές τις πρωτεΐνες. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες υποκλωνοποιήθηκαν σε φορέα έκφρασης και υπερεκφράστηκαν σε διαλυτή μορφή από ετερόλογο σύστημα έκφρασης. Εκτός από την τάξης ΙΑ σαπερόνη AvrPphF ORF1 μελετήθηκε περιορισμένα και η αντίστοιχη δραστική πρωτεΐνη AvrPphF ORF2, ενώ κατασκευάστηκε και ένα μετάλλαγμα έλλειψης της πρωτεΐνης HrpG. Στοχεύοντας πρωταρχικά σε κρυσταλλογραφικές μελέτες όλες οι υπό μελέτη πρωτεΐνες καθώς και η σύμπλοκη μορφή των σαπερόνη AvrPphF ORF1 – δραστική πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους στην παραγωγή κρυστάλλων. Από αυτές κρυστάλλωσαν οι πρωτεΐνες AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 ανεξάρτητα. Συλλογή δεδομένων περιθλάσης έλαβε χώρα για τους κρυστάλλους της AvrPphF ORF1, ενώ ο προσδιορισμός της δομής της ολοκληρώθηκε τελικά από άλλη ερευνητική ομάδα μαζί συγχρόνως με την δομή της ελεύθερης δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 (Singer *et al.*, 2004). Όλα τα δείγματα υπεβλήθησαν σε πειράματα σκέδασης ακτίνων-X στις μικρές γωνίες (SAXS) στο διάλυμα για να καθοριστεί το γενικό τους σχήμα και παρήχθησαν μοντέλα χαμηλής διακριτικότητας έως 15 Å. Επίσης έγιναν μετρήσεις κυκλικού διχρωισμού για τον προσδιορισμό της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών HrpG και HrpO, ενώ οι πρωτεΐνες ελέγχθηκαν ανά ζεύγη για την ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν μέσω μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

1.6 Δομή της διατριβής

Η παρούσα διατριβή παρουσιάζεται σε 7 κεφάλαια.

Στο 1^ο κεφάλαιο αναλύεται το θεωρητικό υπόβαθρο των εκκριτικών συστημάτων τύπου III με έμφαση στις γνωστές σαπερόνες και παρουσιάζονται οι στόχοι της εργασίας.

Στο 2^ο κεφάλαιο αναλύονται οι μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν εκτενώς ενώ παρουσιάζεται το γενικό σχήμα της επεξεργασίας των δεδομένων για κάθε μέθοδο.

Στο 3^ο κεφάλαιο αναλύονται τα δομικά χαρακτηριστικά του συμπλόκου σαπερόνης - δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF1/ORF2 μέσω σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες και η συμπεριφορά του συμπλόκου στα πειράματα κρυστάλλωσης. Παρουσιάζεται δε το γενικό σχήμα του συμπλόκου σε χαμηλή διακριτικότητα.

Στο 4^ο κεφάλαιο αναλύεται η κρυστάλλωση της τάξης ΙΑ σαπερόνης AvrPphF ORF1, η συλλογή δεδομένων περιθλάσης και η επεξεργασία τους ενώ παρουσιάζεται επίσης και η δομή της πρωτεΐνης στο διάλυμα σε χαμηλή διακριτικότητα.

Στο 5^ο κεφάλαιο παρουσιάζεται η περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG και συζητείται το κατά πόσον η υπόθεση, βασισμένη στην ανάλυση της αλληλουχίας της και της γονιδιακής θέσης, ως μίας τάξης Ι σαπερόνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III έχει και πειραματική βάση. Οι δυσκολίες που προέκυψαν για την μελέτη της συγκεκριμένης πρωτεΐνης επικεντρώνονται στον

υψηλό αριθμό καταλοίπων κυστεΐνης, η οξείδωση των οποίων προσδίδει υψηλή ετερογένεια στο δείγμα. Μελετήθηκε επίσης ένα μετάλλαγμα έλλειψης των 14 καρβοξυτελικών καταλοίπων της πρωτεΐνης αυτής το οποίο οδήγησε σε σχηματισμό σταθερού διμερούς σωματιδίου στο διάλυμα.

Στο 6^ο κεφάλαιο παρουσιάζεται η περίπτωση της πρωτεΐνης HrpO. Στα μοντέλα χαμηλής διακριτικότητας της πρωτεΐνης από δεδομένα SAXS η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να μην διαθέτει σφαιρική δομή στους 13°C. Σε πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης καταγράφοντας το σήμα του κυκλικού διχρωισμού στα 222 nm αλλά και με την συλλογή φασμάτων ανά 4°C η θερμοκρασία μετάπτωσης της HrpO εκτιμάται στους 20°C χωρίς την παρουσία ενδιάμεσης μορφής κατά την μετάπτωση. Η HrpO σε αντίθεση όμως με μέλη της οικογένειας των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών φαίνεται να διαθέτει υψηλά ποσοστά δευτεροταγούς δομής.

Τέλος στο 7^ο κεφάλαιο συζητώνται τα αποτελέσματα της διατριβής εκτενώς ανά περίπτωση πρωτεΐνης, συσχετίζονται με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας και αναλύονται οι μελλοντικές προοπτικές.

1.7 Αναφορές

- Alfano J.R., & Collmer A., 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, 8, 1683.
- Alfano J.R., & Collmer A., 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42,385.
- Aldridge P. & Hughes K.T., 2001. How and when are substrates selected for type III secretion? *TRENDS Microbiol.* 9, 209.
- Buttner, C.R., Cornelis, G.R., Heinz, D.W. & Niemann, H.H., 2005. Crystal Structure of Yersinia Enterocolitica Type III Secretion Chaperone SycT. *Protein Sci.* v14 pp.1993.
- Birtalan S.C. & Ghosh P., 2001. Structure of the Yersinia type III secretory system chaperone SycE. *Nature Struct. Biol.* 8, 974.
- Birtalan S.C., Phillips R.M. & Ghosh P., 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell*, 9, 971.
- Bogdanove A. J., Wei Z.-M., Zhao L., Beer S. V., 1996, *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homologue of yopN of Yersinia. *J. Bacteriol.* 178, 1720.
- Boyd A.P., Lambermont I., & Cornelis G.R., 2000. Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for Delivery into Eukaryotic Cells: Role of the SycE Chaperone Binding Domain of YopE. *J Bacteriol*, 182, 4811.
- Boucher C., Martinel A, Barberis P., Alloing G., Zischek C., 1986. Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Molec. Gen. Genet.* 205, 270.
- Buttner D. & Bonas U., 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 9,193.
- Gauthier A. & Finlay B.B., 2003. Translocated Intimin Receptor and Its Chaperone Interact with ATPase of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185,6747.
- Chang J.H., Urbach J.M., Law T.F., Arnold L.W., Hu A., Gombar S., Grant S.R., Ausubel F.M., & Dangel J.L., 2005. A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*102, 2549.
- Collmer A., 1998. Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1, 329.
- Cornelis G.R., 2000. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B355, 681.
- Deane J.E., Roversi P., Cordes F.S., Johnson S., Kenjale R., Daniell S., Booy F., et al., 2006. Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *PNAS.* 103, 12529.
- 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.
- Ding Z., Atmakuri K. & Christie P.J., 2003. The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* 11, 527.

- vanEerde A., Hamiaux C., Perez J., Parsot C. & Dijkstra B.W., 2004. Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. EMBO Rep. 5, 477.
- Economou A., Cristie P.J., Fernadez R.C., Palmer T., Plano G.V. & Pugsley A.P., 2006. Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. Mol Microbiol 62,308-319.
- Edqvist P.J., Bröms, J.E., Betts H.J., Forsberg Å., Pallen M.J. & Francis M.S., 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion. Mol Microbiol 59, 31.
- 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, 17474.
- Evdokimov A.G., Tropea J. E., Routzahn K. M. & Waugh D.S., 2002. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. Acta Cryst D58, 398.
- Evdokimov A.G., Phan J., Tropea J.E., Routzahn K.M., Peters III H.K., Pokross M. & Waugh D.S., 2003. Similar modes of polypeptide recognition by export chaperones in flagellar biosynthesis and type III secretion. Nature Struct. Biol. 10, 789.
- Fraser G.M., Gonzalez-Pedrajo B. & Tame J.R.H., 2003. Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus. J. Bacteriol. 185,5546-5554.
- Gaudriault S., Brisset M.-N., Barney M.-A., 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. FEBS Letters 428, 224.
- Gauthier A. & Finlay B.B., 2003. Translocated Intimin Receptor and Its Chaperone Interact with ATPase of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185,6747.
- Gosh P., 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol. Biol. Rev. 68, 771.
- Groisman E.A. & Ochman H., 1996. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. Cell 87, 791.
- He S.Y., Nomura K. & Whittam T.S., 2004. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. Biochim Biophys Acta 1694,181.
- Hueck C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Mol. Biol. Rev. 62, 379.
- Hienonen E., Romantschuk M. & Taira S., 2006. Stabilization of heterologous transcripts with hrpA, mRNA of a type III secretion system component. Microbial Cell Factories 2006, 5(Suppl 1),P72. Poster Presentation.
- Joardar V., Lindeberg M., Jackson R.W., Selengut J., Dodson R., Brinkac L.M., Daugherty S.C. et al., 2005. Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition. J. Bacteriol., 187, 6488.
- Johnson S., Roversi P., Espina M., Olive A., Deane J.E., Birket S., Field T., Picking W.D. et al., 2006. Self-chaperoning of the Type III Secretion System needle tip proteins IpaD and BipD. J.Biol.Chem.
- Kim J.F., Ham J.H., Bauer D.W., Collmer A. & Beer S.V., 1998. The hrpC and hrpN operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by plcA and homologs of hemolysin / adhesion genes and accompanying activator / transporter genes. Mol. Plant Microb. Interact. 11, 563.
- Kubori T., Matsushima Y., Uralil J., Lara-Tejero M., Sukhan A., Galan J.E. & Aizawa S.I., 1998. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III secretion system. Science 280,602.
- Lee J., Klusener B., Tsiamis G., Stevens C., Neyt C., Tampakaki A.P., Panopoulos N.J., et al., 2001. HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 289.
- Lee S.H. & Galan J.E., 2004. Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. Mol Microbiol.51, 483.
- Letzelter M., Sorg I., MotaL.J., Meyer S., Stalder J., Feldman M., Kuhn M., Callebaut I. & Cornelis G.R., 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. EMBO J. 25, 3223.
- 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.
- Lindgren P.B., Peet R.C. & Panopoulos N.J., 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. J. Bacteriol. 168, 512.
- Locher M., Lehnert B., Krauss K., Heesemann J., Groll M. & Wilharm G., 2005. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. J. Biol. Chem. 280, 31149.

- Luo Y., Bertero M.G., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Wenk M.R., Creagh L., et al., 2001. Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nature Struct. Biol.* 8,1031.
- Marlovits T.C., Kubori T., Sukkan A., Thomas D. R., Galan J.E. & Unger V.M., 2004. Structural Insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science*, 5;306(5698),1040.
- Marlovits T.C., Kubori T., Lara-Tejero M., Thomas D., Unger V.M. & Galán J.E., 2006. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*. 441, 637.
- Marie C., Broughton W.J. & Deakin W.J., 2001. Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol*, 4,336.
- Michiels T., Vanooteghem J.C., Lambert de Rouvroit C. China B., Gustin A., Boudry P., & Cornelis G.R., 1991. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 173, 4994.
- Minamino T., Chu R., Yamaguchi S. & Macnab R.M., 2000. Role of FliJ in Flagellar Protein Export in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* 182,4207.
- Neyt C. & Cornelis G.R., 1999. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* 31, 143.
- Nizan R., Barash I., Valinsky L., Lichter A., Manulis S., 1997. The presence of hrp genes on the pathogenicity - associated plasmid of the tumorigenic bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant-Microb. Inter.* 10, 677.
- Page, A.-L. & Parsot, C., 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* 46, 1.
- Pallen M.J., Fransis M.S. & Futterer K., 2003. Tetratricopeptide-like repeats in type III secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol Lett* 223,53.
- Payne P.L. & Straley S.C., 1998. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J. Bacteriol.* 180,3882.
- Phan J., Tropea J.E. & Waugh D.S., 2004. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Cryst. D*60, 1591.
- Plotnikova M., Rahme L. G., Ausubel F. M., 2000. Pathogenesis of the Human Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124, 1766.
- Pugsley A., 1993, The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria *Microbiol. Rev.* 57, 50.
- 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.* 346,1 147.
- Singer A.U., Desveaux D., Betts L., Chang J. H., Nimchuk Z., Grant S. R., Dangl J.L. & Sodnek J., 2004. Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure*, 12, 1669.
- Sory M.P., Boland A., Lambermont I., & Cornelis G.R. (1995) Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11998.
- Stebbins C. E. & Galan J.E., 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*. 414, 77.
- Pallen M.J., Beatson S.A. & Bailey C.M., 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 201.
- Pallen M.J., Bailey C.M. & Beatson S.A., 2006. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the F₀F₁ and vacuolar ATPases. *Protein Sci.* 15, 935.
- Tampakaki A.P., Fadouloglou V.E., Gazi A.D., Panopoulos N.J. & Kokkinidis M., 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* 6, 805.
- Thomas J., Stafford G.P. & Hughes C., 2004. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 3945.
- Thomas N.A. & Finlay B.B., 2003. Establishing order for type III secretion substrates – a hierarchical process. *TRENDS Microbiol.* 11, 398.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdaoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(40), 14941.

- Trame C.B. & McKay, 2003. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Acta Cryst.* D59, 389.
- Quinaud M., Chabert J., Faudry E., Neumann E., Lemaire D., Pastor A., et al., 2005. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280, 36293.
- Wangelnik & Bonas, 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 178, 1061.
- Wattiau P. & Cornelis G.R., 1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* 8, 123.
- Wei Z.-M. & Beer S. V., 1995. hrpL activates *Erwinia amylovora* hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *J. Bacteriol.* 175, 6201.
- Yip C.K. & Strynadka C.J., 2006. New structural insights into the bacterial type III secretion system. *TiBS.* 31 ,223.

Σύνοψη κύριων μεθοδολογιών και επεξεργασία δεδομένων

*“As Thomson scattering is independent of the frequency
of the radiation the world of X-rays is colorless with
shades of gray...”*

MHJ Koch

Η βιοπληροφορική ανάλυση της νησίδας παθογένειας *hrp/hrv* από την *P. syringae* pv *phaseolicola* κατέδειξε δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, ως υποθετικές σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών επιλέχθηκαν να συμπεριληφθούν στην παρούσα μελέτη για να εξακριβωθεί ο βιολογικός τους ρόλος. Τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pPROEX-HT (Gibco BRL, Prolayes, 1996). Ο φορέας αυτός προσθέτει ένα αμινοτελικό ακροφυσίο ιστιδινών στο παραγόμενο προϊόν διευκολύνοντας έτσι την απομόνωση της πρωτεΐνης με την χρήση χρωματογραφίας στήλης ακινητοποιημένου μετάλλου (Ni). Ο φορέας προσδίδει επίσης αλληλουχία κατάλληλη για την αναγνώριση και πρόσδεση πρωτεάσης με σκοπό την μετέπειτα απομάκρυνση ολόκληρου του επιπρόσθετου αμινοτελικού τμήματος. Το στέλεχος DH5α του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *Escherichia coli* επιλέχθηκε για την ετερόλογη έκφραση των προϊόντων των γονιδίων αυτών. Καθορίστηκαν τα πρωτόκολλα απομόνωσης των πρωτεϊνών ακολουθώντας τρία βασικά χρωματογραφικά βήματα: i) την χρήση στήλης ακινητοποιημένου μετάλλου (Ni), ii) την απομάκρυνση του ακροφυσίου ιστιδινών και iii) την χρήση στήλης μοριακής διήθησης. Η στήλη μοριακής διήθησης προσέφερε συγχρόνως τον πρώτο υδροδυναμικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών. Η μελέτη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών έγινε μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωσισμού, ενώ η μελέτη της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής τους μέσω πειραμάτων σκέδασης ακτίνων-X στις μικρές γωνίες. Η μέθοδος διάχυσης ατμών χρησιμοποιήθηκε για την σάρωση συνθηκών με σκοπό την εύρεση εκείνων που θα ήταν ικανές να οδηγήσουν σε οργανωμένη κατακρήμνιση τις υπό μελέτη πρωτεΐνες για παραγωγή κρυστάλλων. Συλλογή δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X έλαβε χώρα από κρυστάλλους της AvrPphF ORF1 αρχικά στην εργαστηριακή γεννήτρια ακτίνων-X του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας και στην συνέχεια στο ευρωπαϊκό συγχροτρόνιο DESY. Στο παρόν κεφάλαιο αναλύονται οι μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν εκτενώς ενώ παρουσιάζεται το γενικό σχήμα της επεξεργασίας των δεδομένων για κάθε μέθοδο.

2.1 Ανάλυση πρωτεϊνικής αλληλουχίας με βιοϋπολογιστικές μεθόδους

Η αμινοξική αλληλουχία εμπεριέχει πληροφορία για την τρισδιάστατη διευθέτηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο και την σταθερότητα της. Μελετώντας τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης της νησίδας παθογένειας του εκκριτικού συστήματος τύπου III καθώς και γονιδίων που φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτού του είδους την έκκριση είναι δυνατόν να εξαγάγουμε πληροφορίες και να συγκεντρώσουμε τις πρώτες ενδείξεις για την πιθανή εμπλοκή μιας πρωτεΐνης στην δόμηση, την οργάνωση ή την ρύθμιση της εκκριτικής συσκευής. Τα γονίδια άγνωστης λειτουργίας *avrPphF* ORF1 και *avrPphF* ORF2 κλωνοποιήθηκαν από τους Tsiamis *et al.*, (2000). Το επίσης άγνωστου ρόλου προϊόν του γονιδίου *hhrG* επιλέχθηκε για μελέτη καθώς η ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας έδειξε την πιθανότητα ύπαρξης μοτίβων σαπερόνης τάξης I. Τέλος, το προϊόν του γονιδίου *hhrO* φαίνεται να αποτελεί ομόλογο του προϊόντος του γονιδίου *jurO*.

Σαν κύρια μέθοδος αλληλουχικής σύγκρισης με τις πρωτογενείς βάσεις δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η PSI-BLAST. Η μέθοδος PSI-BLAST εμπεριέχει ένα αλγόριθμο τοπικής στοίχισης βασισμένο σε ευριστικές προσεγγίσεις⁵. Όταν επιλεχτεί ένα μικρό κλάσμα αλληλουχιών από την βάση δεδομένων τότε σε αυτό χρησιμοποιείται η σχολαστική προσέγγιση στηριζόμενη στον αλγόριθμο Smith-Waterman (1981), (Schäffer *et al.*, 2001). Η μέθοδος είναι σε θέση να ταυτοποιήσει και να στοιχίσει περιοχές ομοιότητας μεταξύ δύο αλληλουχιών ενώ επιτρέπει την παρουσία κενών κατά την στοίχιση. Μία σειρά μοτίβων που στηρίζεται σε κοινά χαρακτηριστικά προσδιορισμένων τρισδιάστατων δομών συμπεριλαμβάνεται στη μέθοδο στοίχισης. Τα μοτίβα αυτά ονομάζονται επίσης προφίλ (profile) ή πίνακες βαθμολόγησης ειδικών θέσεων (position specific scoring matrices) ή κρυφά μοντέλα Markov⁶ (Hidden Markov Models). Η ικανότητα επιτυχούς έρευνας μέσω μοτίβων αυξάνει με την χρήση επαναληπτικών κύκλων. Σε αυτούς τους κύκλους οι νέες αλληλουχίες στοιχίζονται πολλαπλά με την υπό μελέτη αλληλουχία, νέα μοτίβα καθορίζονται και ξεκινά νέα έρευνα της βάσης δεδομένων (Altschul *et al.*, 1997, Altschul & Koonin, 1998). Τα αποτελέσματα της PSI-BLAST κρίνονται βάση της τιμής E (E-value ή expected value) κάθε δυνητικά ομόλογης αλληλουχίας. Η τιμή - E ενός αναμενόμενου αποτελέσματος x αντιπροσωπεύει τις φορές που θα περιμέναμε να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα x τυχαία. Η τιμή-E εξαρτάται από δύο ποσότητες: τον αριθμό των επαναλήψεων της δοκιμής, N, (δηλαδή τον αριθμό των αλληλουχιών που συγκρίνεται με την υπό μελέτη-αλληλουχία) επί την πιθανότητα, p, να επιτευχθεί το αποτέλεσμα (ομοιότητα μεταξύ των συγκρινόμενων αλληλουχιών), $E=Np$. Ειδικά στην BLAST οι E-τιμές δεν αναφέρονται σε ολόκληρη την αλληλουχία αλλά στο τμήμα της αλληλουχίας (στην ομόλογη επικράτεια) που παρουσιάζει την ομοιότητα με την υπό μελέτη αλληλουχία. Αναζητήσεις ομόλογων αλληλουχιών στην συγκεκριμένη μελέτη έλαβαν χώρα μέσω PSI-BLAST χρησιμοποιώντας την βάση NRDB (non redundant database). Οι προεπιλεγμένες παράμετροι του διακομιστή χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις (πίνακας BLOSUM 65, τιμή-E = 0.005 για συνυπολογισμό των αποτελεσμάτων στους επόμενους κύκλους, ποινές κενού: δημιουργίας 11, επέκτασης 1; άνευ φίλτρου).

Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PSI-PRED (Jones, 1999) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Η μέθοδος χρησιμοποιεί 4 ξεχωριστά νευρωνικά δίκτυα, τα οποία εκπαιδεύονται από τα μοτίβα αλληλουχιών που προκύπτουν από την PSI-BLAST.

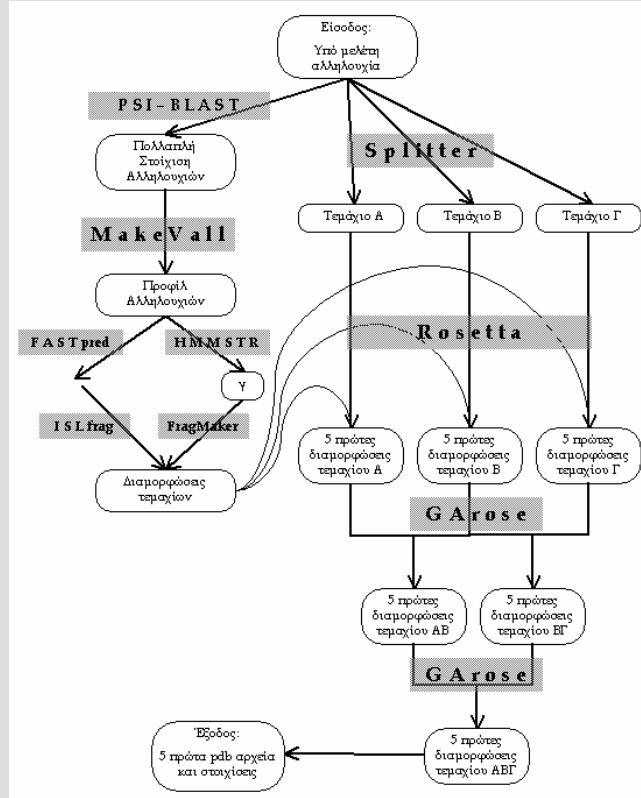
Καθώς καμία από τις υπό μελέτη πρωτεϊνικές αλληλουχίες δεν παρουσίασε ομοιότητα με αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών της βάσης NRDB χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση

⁵ Η ευριστική προσέγγιση είναι ελάχιστα πιο ανακριβής από την σχολαστική αλλά πολλές φορές ταχύτερη από αυτήν.

⁶ Τα κρυφά μοντέλα Markov (HMM) είναι στατιστικά μοντέλα κατά τα οποία το υπό μοντελοποίηση σύστημα υποτίθεται ότι είναι μία ανέλιξη Markov αγνώστων παραμέτρων. Κατά την διαδικασία καθορίζονται οι κρυμμένες παράμετροι από τις παρατηρούμενες παραμέτρους του μοντέλου. Αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται περαιτέρω στην αναγνώριση μοτίβων.

απομακρυσμένων ομολόγων ή αναλόγων⁷ αλληλουχιών η μέθοδος της αναγνώρισης μοτίβου αναδίπλωσης (fold recognition ή threading). Η χρήση της αναγνώρισης μοτίβου αναδίπλωσης στηρίζεται στο γεγονός ότι η δομή συντηρείται περισσότερο από ότι η αλληλουχία σε μακρινά συγγενικές πρωτεΐνες. Η μέθοδος διαπραγματεύεται το πόσο καλά ένα (δομικό) μοτίβο αναδίπλωσης ταιριάζει και μπορεί να υιοθετηθεί από την υπό μελέτη αμινοξική αλληλουχία. Αρχικά είχαν χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση αλληλουχίας αναδίπλωσης τα καλά μελετημένα πρωτεϊνικά μοτίβα αλλά οι Jones *et al.*, πρότειναν το 1992 την διαδικασία του threading κατά την οποία μία αλληλουχία συνταιριάζει σε μία δομή λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα των λεπτομερών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων που συμμετέχουν. Για την αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων αυτών χρησιμοποιείται μία συνάρτηση ενέργειας όπως συμβαίνει και στις περιπτώσεις προσομοιώσεων της *ab initio* πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Οι υπό μελέτη αλληλουχίες εξετάστηκαν συγκεκριμένα με τους διακομιστές αναγνώρισης αναδίπλωσης 3D-PSSM (Kelley *et al.*, 2000), PHYRE και mGenTHREADER (McGuffin & Jones, 2003).

Εικόνα 2.1. Σχηματική αναπαράσταση της ροής επεξεργασίας μιας αλληλουχίας όπως προσφέρεται από τον διακομιστή *ab initio* πρωτεϊνικής αναδίπλωσης I-sites/HMMSTR/Rosetta. Σε λευκό πλαίσιο τα διακριτά στάδια της διαδικασίας ενώ σε γκρι τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται. MakeVall: Υπολογίζει πρωτεϊνικά μοτίβα βάση της πολλαπλής στοίχισης της PSI-BLAST. FASTpred: Δεδομένων των πρωτεϊνικών μοτίβων προβλέπει τις διεδρες γωνίες του σκελετού (I-sites), ISLfrag: δημιουργεί ένα σετ πιθανών διαμορφώσεων για κάθε I-site. HMMSTR: πρόβλεψη δευτεροταγούς τοπικής δομής, FragMaker: δημιουργεί σύνολο πιθανών διαμορφώσεων με την χρήση του HMMSTR. Rosetta: ερευνά τον χώρο των πρωτεϊνικών διαμορφώσεων επιλέγοντας τυχαία από τα τεμάχια, καταγράφει τις συντεταγμένες των ατόμων βάση των διεδρων γωνιών και η λύση γίνεται αποδεκτή ή απορρίπτεται με χρήση κριτηρίου τύπου Monte Carlo. Υπολογίζονται οι συναρτήσεις της ενέργειας και χρησιμοποιείται προσομοίωση απόπτωσης. SPLITTER: διαίρει την υπό εξέταση αλληλουχία σε αλληλεπικαλυπτόμενα τεμάχια. GArose: αλγόριθμος για την συναρμολόγηση των προβλεπόμενων τεμαχίων. Εικόνα επεξεργασμένη από το άρθρο των Bystroff & Shao, (2002)



συντεταγμένες των ατόμων βάση των διεδρων γωνιών και η λύση γίνεται αποδεκτή ή απορρίπτεται με χρήση κριτηρίου τύπου Monte Carlo. Υπολογίζονται οι συναρτήσεις της ενέργειας και χρησιμοποιείται προσομοίωση απόπτωσης. SPLITTER: διαίρει την υπό εξέταση αλληλουχία σε αλληλεπικαλυπτόμενα τεμάχια. GArose: αλγόριθμος για την συναρμολόγηση των προβλεπόμενων τεμαχίων. Εικόνα επεξεργασμένη από το άρθρο των Bystroff & Shao, (2002)

Οι αλληλουχίες εξετάστηκαν ακόμα και για το κατά πόσον μπορούν να δομήσουν σφαιρικές πρωτεΐνες έχοντας ικανό ποσοστό υδρόφοβων αμινοξέων σε σχέση με τα φορτισμένα τους κατάλοιπα με την χρήση του προγράμματος FoldIndex© (Prilusky *et al.*, 2005, <http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>). Ο αλγόριθμος στηρίζεται στα αποτελέσματα του Uversky (2000) για τη διάκριση μεταξύ διπλωμένων και εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών. Ο Uversky (2000) χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους: μέσο φορτίο $|\langle R \rangle|$ (απόλυτη τιμή της

⁷ Ως ανάλογες αλληλουχίες χαρακτηρίζονται οι αλληλουχίες που παρά την χαμηλή αμινοξική τους ομολογία τείνουν να αποκτήσουν όμοια τρισδιάστατη δομή. Δεν διαθέτουν κοινό πρόγονο και η ομοιότητα τους αυτή οφείλεται σε εξελικτική σύγκλιση.

διαφοράς μεταξύ του αριθμού των θετικά και αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων σε pH 7.0, διαιρούμενο με τον συνολικό αριθμό των καταλοίπων), και μέση υδροφοβικότητα $\langle H \rangle$, [άθροισμα όλων των δεικτών υδροφοβικότητας των καταλοίπων κάνοντας χρήση της κλίμακας Kyte/Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) διαιρούμενο με τον αριθμό των συνολικών καταλοίπων] καθόρισε το όριο μεταξύ των εγγενώς αδίπλωτων και των σφαιρικών πρωτεϊνών με την εξίσωση $|\langle R \rangle| = 2.785 \langle H \rangle - 1.151$. Οι Prilusky *et al.*, (2005) εξήγαγαν τον δείκτη αναδίπλωσης I_F (Fold index): $I_F = 2.785 \langle H \rangle - |\langle R \rangle| - 1.151$. Θετικές τιμές του δείκτη αναπαριστούν σφαιρικές πρωτεΐνες ή επικράτειες ενώ οι αρνητικές αναπαριστούν πρωτεΐνες που πιθανότατα ανήκουν στην οικογένεια των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών (IUPs, Intrinsically Unfolded proteins, Uversky, 2002).

Καθώς οι υπό μελέτη πρωτεΐνες σχετίζονται με ένα εκκριτικό σύστημα η αλληλουχία τους εξετάστηκε επίσης για την παρουσία διαμεμβρανικών α -ελίκων με το πρόγραμμα DAS (Cserzo *et al.*, 1997). Το DAS προβλέπει διαμεμβρανικές περιοχές στις προκαρυωτικές πρωτεΐνες με βάση την μέθοδο Dense Alignment Surface. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται σε διαγράμματα σημείου (dot-plots)⁸ χαμηλής αυστηρότητας της υπό μελέτη αλληλουχίας με ένα σύνολο μη-ομόλογων μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ειδικούς πίνακες βαθμολόγησης.

Η πρόβλεψη της μετάπτωσης της δευτεροταγούς δομής της HrpO από α -έλικα σε τυχαίο σπείραμα εξετάστηκε με το πρόγραμμα AGADIR (Muñoz & Serrano, 1996) (www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadirstart.html) λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης που παρατηρήθηκε στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού. Το πρόγραμμα υπολογίζει το μέσο ποσοστό α -έλικας σε πεπτιδία σε συνάρτηση με τη μεταβολή της θερμοκρασίας, της ιοντικής ισχύος και του pH του διαλύματος κάνοντας χρήση της συνεισφοράς της ενέργειας στο σχηματισμό και σταθεροποίηση των α -ελίκων καθώς και της μεταβολής της κατά τη μετάπτωση.

Τέλος, στην περίπτωση της HrpO χρησιμοποιήθηκε επίσης ο διακομιστής I-sites/HMMSTR/Rosetta (Bystroff & Shao, 2002) (www.bioinfo.rpi.edu/~bystroff/hmmstr/server.php) για την *ab initio* κατασκευή ενός τρισδιάστατου μοντέλου της καθώς η HrpO βρέθηκε μονομερής στο διάλυμα και εν τω μεταξύ δεν είχε προκύψει για αυτήν κανένα στατιστικά σημαντικό μοτίβο αναδίπλωσης. Ο τρόπος λειτουργίας του διακομιστή περιγράφεται στην εικόνα 2.1.

2.2 Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μικροοργανισμών στην παραγωγή πρωτεϊνών είναι ποικίλα. Οι γρήγοροι ρυθμοί ανάπτυξης τους, η εύκολη διαχείριση του γενετικού υλικού τους, η πληθώρα διαφορετικών στελεχών, η εύκολη απόδοση στην παραγωγή του προϊόντος στο τεχνικό περιβάλλον που δεν επηρεάζεται από εποχικούς παράγοντες και οι μικρές απαιτήσεις τους, τα καθιστούν εξαιρετικά εργαλεία για την παραγωγή ετερόλογων προϊόντων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η σημαντικότερη αιτία για την επιλογή ενός βακτηρίου ως μικροοργανισμού έκφρασης είναι το γεγονός ότι οι υπό εξέταση πρωτεΐνες εκφράζονται φυσιολογικά στην *P. syringae*, ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο. Διασφαλίζεται έτσι η ορθή μετάφραση του γονιδίου καθώς και η ορθή αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εντός του συγγενικού κυτταροπλασματικού περιβάλλοντος. Έχει δείχθει μάλιστα ότι δραστικές πρωτεΐνες από φυτοπαθογόνα βακτήρια όταν εκφραστούν ετερόλογα σε ζωοπαθογόνα αναγνωρίζονται και εκκρίνονται, (Εδάφιο 1.3.1). Για την παραγωγή των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε για τους παραπάνω λόγους το Gram αρνητικό βακτήριο *E. coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος DH5 α .

⁸ Τα διαγράμματα-σημείου (dot-plots) είναι δισδιάστατοι πίνακες που χρησιμοποιούνται στην απεικόνιση της ομοιότητας μεταξύ δύο πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Η αλληλουχία της μίας πρωτεΐνης προσδιορίζει τον οριζόντιο άξονα και η άλλη τον κάθετο. Οι κυψελίδες στον πίνακα σιάζονται ανάλογα με το αν το συγκεκριμένο ζεύγος καταλοίπων είναι ταυτόσημο ή διαθέτει ομόλογες ιδιότητες.

Παρότι το στέλεχος DH5α δεν χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών καθώς έχει ενεργές τις δύο μεγάλες ομάδες πρωτεασών Lon και OmpT δεν παρουσιάστηκε σοβαρό πρόβλημα κατά την παραγωγή των πρωτεϊνών AvrPphF ORF1, HrpG και HrpO. Ειδικά για τις δραστικές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III έχει δειχθεί (Losada & Hutcheson, 2005) ότι η Lon πρωτεάση είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση τους. Στην συγκεκριμένη περίπτωση του δραστικού παράγοντα AvrPphF ORF2, η πρωτεΐνη συνεκφραζόταν με την σαπερόνη της AvrPphF ORF1, με αποτέλεσμα να προστατεύεται ικανοποιητικά από την Lon πρωτεάση.

Για την μετέπειτα διαχείριση των ετερόλογων προϊόντων και την εύκολη απομόνωση τους από την *E. coli* επιλέχθηκε η χρήση ακροφυσίων ιστιδίνης. Για την παραγωγή των χιμαιρικών πρωτεϊνών τα αντίστοιχα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης pPROEX-HT (GIBCO BRL, Polayes, 1996) σε κατάλληλες θέσεις έτσι ώστε οι πρωτεΐνες να παράγονται με ακροφύσιο ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο τους ακολουθούμενο από αλληλουχία αναγνώρισης της rTEV πρωτεάσης για την μετέπειτα απομάκρυνση του ακροφυσίου. Το συνολικό ακροφύσιο έχει μέγεθος 20 καταλοίπων και η παρουσία του στο αμινοτελικό άκρο συγκαλύπτει το γενικό σήμα έκκρισης των υποστρωμάτων του εκκριτικού συστήματος τύπου III (βλ. εδάφιο 1.3.4). Η πρωτεάση rTEV παράγεται στο εργαστήριο φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών το οποίο επιπροσθέτως διευκολύνει στην απομάκρυνση της από το δείγμα.

Ο φορέας pPROEX-HT διαθέτει την pBR322 αρχή αντιγραφής, το γονίδιο της β-λακταμάσης που προσδίδει την ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, το γονίδιο *lacI^Q* που επιτρέπει την επαγόμενη έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου από το IPTG καθώς και τον ισχυρό υποκινητή *trc*, υβρίδιο μεταξύ του υποκινητή της τρυπτοφάνης (-35 περιοχή) και του οπερονίου της λακτόζης (-10 περιοχή) (Polayes, 1996).

Οι κλώνοι επιλέγονται για την ορθότητα τους με βάση το πρότυπο περιοριστικών πέψων, την παραγωγή της πρωτεΐνης και την παρουσία του γονιδίου κατά την διαδικασία αλληλούχισης του φορέα με χρήση κατάλληλων εκκινητών.

2.3 Χρωματογραφία

Ιστορικά η χρωματογραφία περιλάμβανε την επιβράδυνση των διαλυτών ουσιών συγκριτικά με το μέτωπο του διαλύτη που προχωρά μέσα σε στερεό μέσο. Το όνομα χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να περιγράψει τον διαχωρισμό των φυσικών χρωστικών σε χαρτί διηθήσεως λόγω της διαφορικής επιβράδυνσης αυτών.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς οι υγρές χρωματογραφίες στήλης συγγένειας και μοριακής διήθησης.

2.3.1 Χρωματογραφία Συγγένειας

Βασίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση του ζητούμενου βιομορίου σε κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (μήτρα) που φέρει ειδικό δεσμευτή (ligand). Έπειτα από την φόρτωση του βιολογικού δείγματος το υλικό εκπλένεται για την απομάκρυνση των μη προσροφημένων βιομορίων και εν συνεχεία γίνεται έκλουση της πρωτεΐνης-στόχου με περίσσεια διαλυτού δεσμευτή ή άλλης κατάλληλης ουσίας.

Λόγω της παραγωγής των υπό μελέτη πρωτεϊνών με ακροφύσιο ιστιδινών χρησιμοποιήθηκε μήτρα φέρουσα κατάλληλη χημική ομάδα, NTA (Nitrilotriacetic acid), η οποία έχει την ικανότητα να προσαρτίζει μέταλλα (Ni). Το ακροφύσιο των έξι ιστιδινών είναι σε θέση να προσροφάται στο υλικό μέσω του Νικελίου ενώ η υπό μελέτη πρωτεΐνη εκλύεται από την στήλη παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου. Το ιμιδαζόλιο ανταγωνίζεται την δέσμευση του ακροφυσίου ιστιδινών στο νικέλιο. Η μήτρα φορτωνόταν κάθε φορά με καινούρια Ni πριν από την χρήση της.

2.3.2 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης

Σύμφωνα με αυτήν ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών εξαρτάται από την υδροδυναμική τους ακτίνα, η οποία είναι ανάλογη του μοριακού βάρους για σφαιρικές πρωτεΐνες. Τα συστατικά του προς διαχωρισμού μίγματος δεν αλληλεπιδρούν με το χρωματογραφικό υλικό, το οποίο αποτελείται από σφαιρίδια που φέρουν πόρους. Η κατανομή των πρωτεϊνών γίνεται μεταξύ δύο υγρών φάσεων. Τα μικρού μεγέθους μόρια κινούνται και στο χώρο εντός των πόρων των σφαιριδίων, ενώ τα μεγάλου μεγέθους μόρια αποκλείονται από αυτόν κινούμενα στο χώρο εκτός των σφαιριδίων. Ως νεκρός όγκος χαρακτηρίζεται ο όγκος εκτός των σφαιριδίων. Με αυτόν τον τρόπο η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται σταδιακά, οι μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνες εκλύονται πρώτες από τη στήλη και ακολούθως εκείνες με διαδοχικά μικρότερα μοριακά βάρη, (βλ. εδάφιο 2.4).

2.4 Υδροδυναμική ανάλυση

Τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη πρωτεϊνών εξετάστηκαν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Για το μέγεθος των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό υλικό Sephacryl⁹ S-100 (Amersham) το οποίο έχει διαχωριστικό εύρος 1 - 100 kD¹⁰. Το υλικό πακεταρίστηκε σε στήλη XK 16/100 (Pharmacia) με την βοήθεια του συστήματος ÄKTA purifier (Amersham) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας. Κάνοντας χρήση διάταξης προσαρμογής (adaptor) στο ένα άκρο της στήλης ο συνολικός όγκος στρώματος ήταν 160 cm³. Η στήλη ελέγχθηκε με δείγμα ακετόνης και ο νεκρός της όγκος προσδιορίστηκε με δείγμα Μπλε Δεξτράνης. Ακολούθως η στήλη βαθμονομήθηκε με τη βοήθεια των πρωτεϊνών αναφοράς: Ριβονουκλεάσης Α (MW = 13.7 kD, R_h = 16.4 Å), Χυμοθρυψινογόνο Α (25 kD, 20.9 Å), Οβαλβουμίνης (43 kD, 30.5 Å) και Αλβουμίνης του ορού των βοοειδών (BSA, Bovine Serum Albumin, 67 kD, 35.5 Å). Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλυσης και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h καθορίστηκε άμεσα¹¹ από διάγραμμα που έφερε στον άξονα y τις τιμές του όγκου έκλυσης κάθε πρωτεΐνης – μάρτυρα και στον άξονα x τις τιμές των υδροδυναμικών τους ακτίνων (www.celbio.duke.edu/faculty/Erickson), (Εικόνα 2.2). Η σχέση μεταξύ του όγκου έκλυσης και του φαινομενικού μοριακού βάρους προσδιορίστηκε έμμεσα μέσω του συντελεστή $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ όπου V_e είναι ο όγκος έκλυσης, V_o ο νεκρός όγκος και V_t ο συνολικός όγκος της στήλης. Ο συντελεστής K_{av} καθορίζει το ποσοστό των πόρων του χρωματογραφικού υλικού που μπορούν να καταληφθούν από το συγκεκριμένου μεγέθους σωματίδιο. Οι εξισώσεις παρουσιάζονται στην εικόνα 2.2. Οι τιμές του υδροδυναμικού όγκου υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας χρησιμοποιώντας τον τύπο $V_h = 4/3 \pi R_h^3$. Σε περιπτώσεις μη σφαιρικών πρωτεϊνών η αναγωγή στο μοριακό βάρος δεν έχει καμία φυσική αξία πλέον και η υδροδυναμική ακτίνα είναι η μόνη ουσιαστική παράμετρος. Το 2002 ο Uversky παρουσίασε μία σειρά εξισώσεων για την συσχέτιση του υδροδυναμικού όγκου μίας πρωτεΐνης από τον αριθμό των καταλοίπων της και την κατάσταση αναδίπλωσης της, στηριζόμενος σε ήδη καλά μελετημένες πρωτεΐνες της βιβλιογραφίας. Οι σχέσεις αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:

$$1. \log(V_h^N) = (2.197 \pm 0.037) + (1.072 \pm 0.015) * \log(N) \text{ για τις φυσικές πρωτεΐνες,}$$

⁹ Το Sephacryl παράγεται από ενδομοριακή σύνδεση αλληλικής δεξτράνης και N,N-δισακυλαμιδίου του μεθυλενίου. Είναι χημικά σταθερό σε όλα τα συχνά χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ λειτουργεί σε εύρος pH 2-11. Το μέγεθος των πόρων ελέγχεται επιμελώς από τις κατασκευάστριες εταιρίες. Στην S-100 το χρήσιμο εύρος διαχωρισμού είναι από 1.000 ως 100.000 D.

¹⁰ Η βέλτιστη ανάλυση για μία στήλη όγκου 100 cm³ παρουσιάζεται σε όγκο έκλυσης 60 ml (Scopes, 1984). Στη δεδομένη περίπτωση η στήλη είναι γύρω στα 160 cm³ και εκτιμάται ότι έχει βέλτιστη ανάλυση γύρω στα 96 ml όγκου έκλυσης. Από την βαθμονόμηση της στήλης η βέλτιστη ανάλυση είναι για βιομόρια μεγέθους πλησίον των 43 kD.

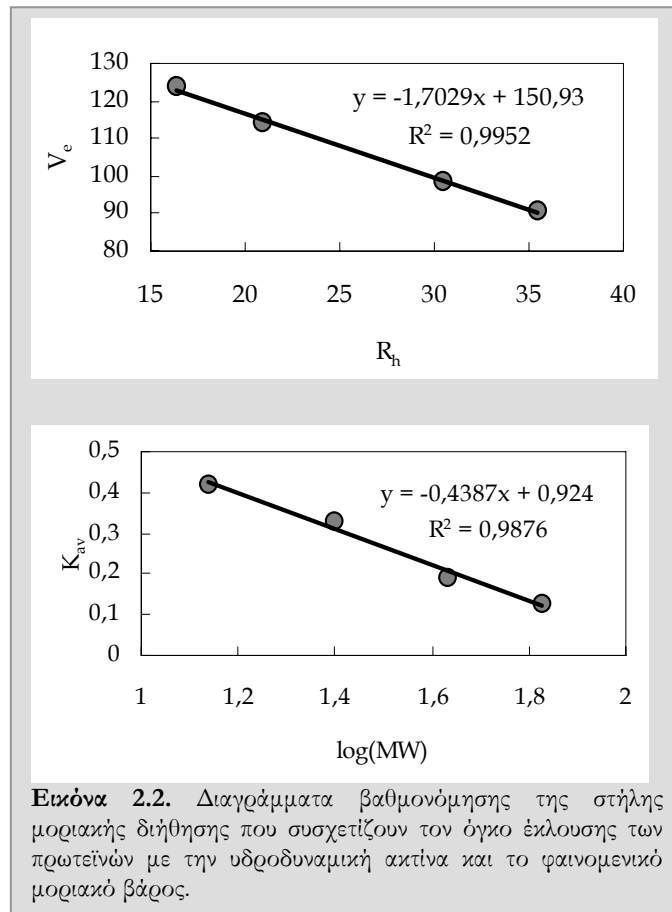
¹¹ Συνήθως στην βιβλιογραφία η Υδροδυναμική ακτίνα συνδέεται με τον όγκο έκλυσης μέσω της k_{av} (Siegel & Monte, 1966).

2. $\log(V_h^{MG}) = (2.46 \pm 0.13) + (1.020 \pm 0.053) * \log(N)$ για τις πρωτεΐνες σε κατάσταση εύπλαστης σφαίρας (molten globule),
3. $\log(V_h^{PMG}) = (2.41 \pm 0.29) + (1.18 \pm 0.12) * \log(N)$ για τις πρωτεΐνες σε κατάσταση προ- εύπλαστης σφαίρας (pre-molten globule),
4. $\log(V_h^{U(urea)}) = (1.866 \pm 0.026) + (1.565 \pm 0.026) * \log(N)$ για τις αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες με την χρήση ουρίας,
5. $\log(V_h^{U(GdmCl)}) = (1.723 \pm 0.041) + (1.655 \pm 0.018) * \log(N)$ για τις αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες με την χρήση υδροχλωρικής γουανιδίνης,
6. $\log(V_h^{NU(coil)}) = (1.997 \pm 0.078) + (1.498 \pm 0.035) * \log(N)$ για τις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες σε κατάσταση τυχαίου σπειράματος και
7. $\log(V_h^{NU(PMG)}) = (2.33 \pm 0.12) + (1.234 \pm 0.047) * \log(N)$ για τις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες σε κατάσταση προ-εύπλαστης σφαίρας

όπου N είναι ο αριθμός των αμινοξέων.

Η ανάλυση μέσω μοριακής διήθησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στους 20°C. Η ροή ήταν 0.8 ml/min και η απορρόφηση του εκλύσματος καταγραφόταν για δύο μήκη κύματος στα 280 και 255 nm με τη χρήση του λογισμικού UNICORN3.0 (Amersham). Τα δείγματα φορτωνόντουσαν στη στήλη με λούπα των 2 ml.

Για την επιπλέον επεξεργασία των μοντέλων χαμηλής διακριτικότητας που παρήχθησαν από τα πειράματα σκέδασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα HYDRO (García de la Torre *et al.*, 2000). Το πρόγραμμα υπολογίζει τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά και την γυροσκοπική ακτίνα από την λεπτομερή ατομική δομή χρησιμοποιώντας μεθοδολογίες μοντελοποίησης μέσω σφαιριδίων (Carrasco & García de la Torre, 1999). Όλα τα άτομα εκτός των υδρογόνων αντικαθίστανται από σφαιρίδια συγκεκριμένης ακτίνας. Το σωματίδιο που παράγεται με αυτόν τον τρόπο αποτελείται από αλληλεπικαλυπτόμενες σφαίρες. Το πρόγραμμα μπορεί επίσης να επεξεργαστεί μοντέλα ψευδών ατόμων ή ψευδών καταλοίπων.



Εικόνα 2.2. Διαγράμματα βαθμονόμησης της στήλης μοριακής διήθησης που συσχετίζουν τον όγκο εκλύσεως των πρωτεϊνών με την υδροδυναμική ακτίνα και το φαινομενικό μοριακό βάρος.

2.5 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών & πειράματα σύρωσης συνθηκών

2.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες διαθέτουν καλά καθορισμένη επιφάνεια με φορτισμένες και πολικές ομάδες, ώστε αν θεωρηθούν ως μεγάλα πολυσθενή μόρια, η διαλυτότητα τους να μπορεί να καθοριστεί σε σημαντικό βαθμό βάσει της θεωρίας Debye-Huckel¹² (Debye & Huckel, 1923). Παρακάτω παρουσιάζονται οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών υπό την σκοπιά της προαναφερόμενης θεώρησης.

2.5.1.1 Ιοντική ισχύς

Διαλύματα τα οποία περιέχουν διαλυτά ιόντα δεν συμπεριφέρονται ως ιδανικά διαλύματα εκτός περιπτώσεων όπου τα ιόντα βρίσκονται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση. Καθώς η συγκέντρωση των ιόντων αυξάνεται στο διάλυμα ένα νοητό «νέφος» αντίθετων φορτισμένων ιόντων τείνει να δημιουργηθεί γύρω από ένα ιόν. Αυτό το «νέφος» τροποποιεί την αλληλεπίδραση με τα μόρια νερού και κατά συνέπεια την διαλυτότητα του ιόντος.

Σαν αποτέλεσμα των παραπάνω παρατηρήσεων στις χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων αυξάνεται η διαλυτότητα τους καθώς αυξάνεται η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με τα μόρια του νερού και ισχύει η σχέση:

$$\log S - \log S_0 = \frac{Az_+z_-\sqrt{\mu}}{1 + aB\sqrt{\mu}}$$

Η εξίσωση συσχετίζει την διαλυτότητα του άλατος, S , σε συγκεκριμένη ιοντική ισχύ, μ , με την διαλυτότητα απουσία του ηλεκτρολύτη, S_0 . Οι σταθερές A και B εξαρτώνται από την θερμοκρασία και την διηλεκτρική σταθερά.

Η αύξηση της διαλυτότητας για τα περισσότερα ιόντα σε χαμηλή ιοντική ισχύ παρατηρείται συστηματικά και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι περισσότερο διαλυτές σε διάλυμα παρουσία χαμηλού ποσοστού ηλεκτρολυτών παρά στο νερό. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως εναλάτωση (salting-in).

Κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος, τα επιπρόσθετα ιόντα ανταγωνίζονται μεταξύ τους καθώς και με τον διαλύτη για τα μόρια νερού. Ως συνέπεια η απομάκρυνση μορίων νερού από τον διαλύτη μειώνει την διαλυτότητα. Το φαινόμενο αυτό καλείται εξαλάτωση (salting-out) και σε υψηλότερες τιμές ιοντικής ισχύος το φαινόμενο εξαλάτωσης είναι ανάλογο της ιοντικής ισχύος. Στην παρακάτω εξίσωση καθορίζεται από τον όρο K_s :

$$\log S - \log S_0 = \frac{Az_+z_-\sqrt{\mu}}{1 + aB\sqrt{\mu}} - K_s \mu$$

Και τα δύο φαινόμενα εξαλάτωσης και εναλάτωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών. Η χρήση διαφορετικών ιόντων έχει διαφορετική επίδραση στην διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Η επίδραση αυτή ακολουθεί την σειρά Hofmeister (Hofmeister, 1888, Neagu *et al.*, 2001), όπου μικρά υψηλού φορτίου ιόντα είναι δραστικότερα από τα μεγάλα χαμηλότερου φορτίου ιόντα.

2.5.1.2 pH

Η επίδραση του pH είναι εξίσου σημαντική επίδραση στην διαλυτότητα του βιομορίου. Επηρεάζει τον όρο S_0 της παραπάνω εξίσωσης (βλ. εδάφιο 2.5.1.1) καθώς η διαλυτότητα απουσία ηλεκτρολύτη διαφέρει συναρτήσει του pH και μετατοπίζει τις συνθήκες εξαλάτωσης διατηρώντας τον όρο K_s σταθερό. Η τιμή S_0 ελαχιστοποιείται όταν η τιμή του pH εξισώνεται

¹² Η θεωρία αυτή έχει αναπτυχθεί για να περιγράψει τις ιδιότητες των ιόντων.

με την τιμή του pI της πρωτεΐνης, στο pH δηλαδή εκείνο όπου το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης έχει μηδενική τιμή.

2.5.1.3 Θερμοκρασία

Η διαφοροποίηση της θερμοκρασίας σε συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος δεν επηρεάζει συνήθως τον όρο K_s της εξίσωσης (βλ. εδάφιο 2.5.1.1) αλλά τον όρο S_0 κατά αναλογία με την περίπτωση του pH . Σε υψηλή ιοντική ισχύ οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές στην θερμοκρασία των $25^\circ C$ παρά στην θερμοκρασία των $4^\circ C$. Σε αντίθεση σε χαμηλή ιοντική ισχύ η διαλυτότητα αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας.

2.5.1.4 Οργανικοί διαλύτες

Τα μικτά διαλύματα ύδατος και οργανικών ουσιών παρουσιάζουν μικρότερη διηλεκτρική σταθερά σε σύγκριση με τα αμιγή υδατικά διαλύματα. Η μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς αυξάνει την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των αντίθετων φορτίων των πρωτεϊνικών μορίων και μειώνει την διαλυτότητα. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν επίσης να μειώσουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης μέσω εκτόπισης του δεσμευμένου νερού. Σε γενικές περιπτώσεις η διαλυτότητα της πρωτεΐνης μειώνεται με την μείωση της θερμοκρασίας παρουσία οργανικού διαλύτη (Blundell & Johnson, 1976).

2.5.2 Η κρυσταλλογένεση και η ενέργεια ενεργοποίησης

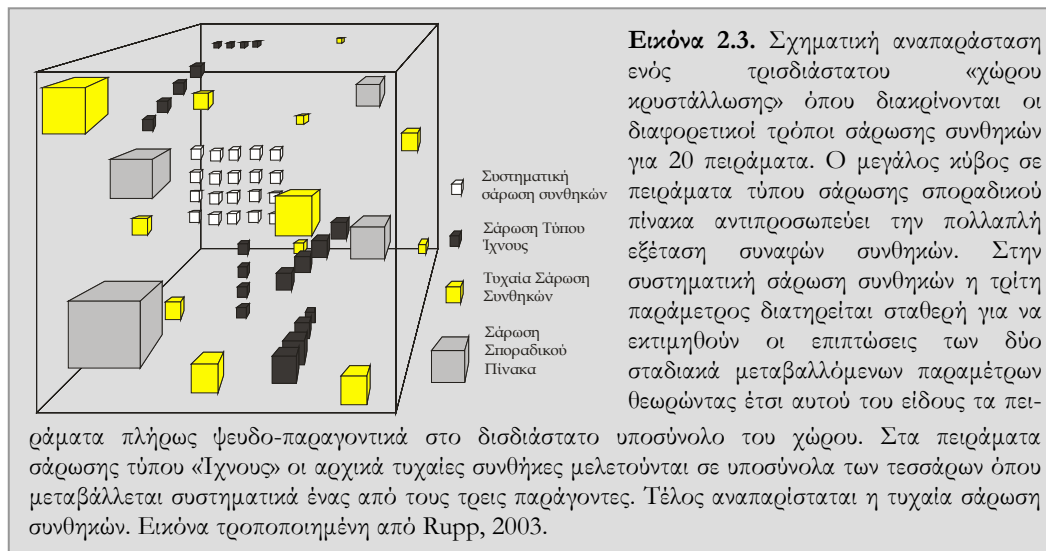
Οι παραπάνω παράγοντες (εδάφιο 2.5.1) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης ώστε το διάλυμα να κορεστεί ή να υπερκορεστεί. Ένα υπερκορεσμένο διάλυμα είναι θερμοδυναμικά ασταθές. Η εξισορρόπηση ενός υπερκορεσμένου πρωτεϊνικού διαλύματος μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό τακτικά διευθετημένων συναθροίσεων των μορίων της πρωτεΐνης (πυρήνες κρυστάλλωσης), ενώ αν ο υπερκορεσμός είναι αρκετά υψηλός η περίσσεια πρωτεΐνης κατακρημνίζεται ως άμορφο ίζημα (Chernov, 2003). Η διαδικασία αυτή αποτελεί και το περιοριστικό βήμα στην κινητική της κρυστάλλωσης καθώς απαιτεί την περισσότερη ενέργεια από οποιοδήποτε προηγούμενο ή επόμενο βήμα για να επιτελεστεί. Για να ξεπεραστεί ο ενεργειακός αυτός φραγμός μπορούμε να παρέχουμε ενέργεια στο σύστημα μέσω αύξησης του υπερκορεσμού του διαλύματος ή να μειώσουμε τον ενεργειακό φραγμό μέσω παροχής στο διάλυμα προϋπαρχόντων κρυστάλλων όπως συμβαίνει στην διαδικασία σποράς (seeding). Το στάδιο της πυρήνωσης είναι ένα δύσκολο και συχνά ανέφικτο σημείο ενώ το στάδιο της ανάπτυξης είναι περισσότερο εύκολο και πιθανό.

Καθώς τα δύο στάδια είναι διακριτά και γενικά δεν απορρέουν από τους ίδιους μηχανισμούς θα αναλυθούν εκτενέστερα στην παράγραφο 2.5.3 κάνοντας χρήση των διαγραμμάτων διαλυτότητας (McPherson, 1999).

2.5.3 Μέθοδοι έρευνας συνθηκών κρυστάλλωσης

Αν αντιληφθούμε τον «χώρο κρυστάλλωσης» σαν χώρο n -διαστάσεων του οποίου οι άξονες αποτελούν τις διαφορετικές παραμέτρους όπως το είδος των χημικών συστατικών και την αναλογία τους, τη συγκέντρωση του δείγματος του μακρομορίου, τη θερμοκρασία, το pH , το είδος του πειράματος κρυστάλλωσης κ.ο.κ, τότε η κρυστάλλωση μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πρόβλημα δειγματοληψίας για την εύρεση της άγνωστης κατανομής των επιτυχών συνδυασμών κάθε παραμέτρου στο χώρο που οδηγεί στην κρυστάλλωση ενός βιομορίου. Στην εικόνα 2.3 παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τρόποι σάρωσης συνδυασμού παραμέτρων για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών που μπορούν να ευνοήσουν την κρυστάλλωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Αν και αποτελεσματικότερη θεωρείται η προσέγγιση της τυχαίας δειγματοληψίας του πολυπαραμετρικού χώρου κρυστάλλωσης για την υψηλή παραγωγή (high

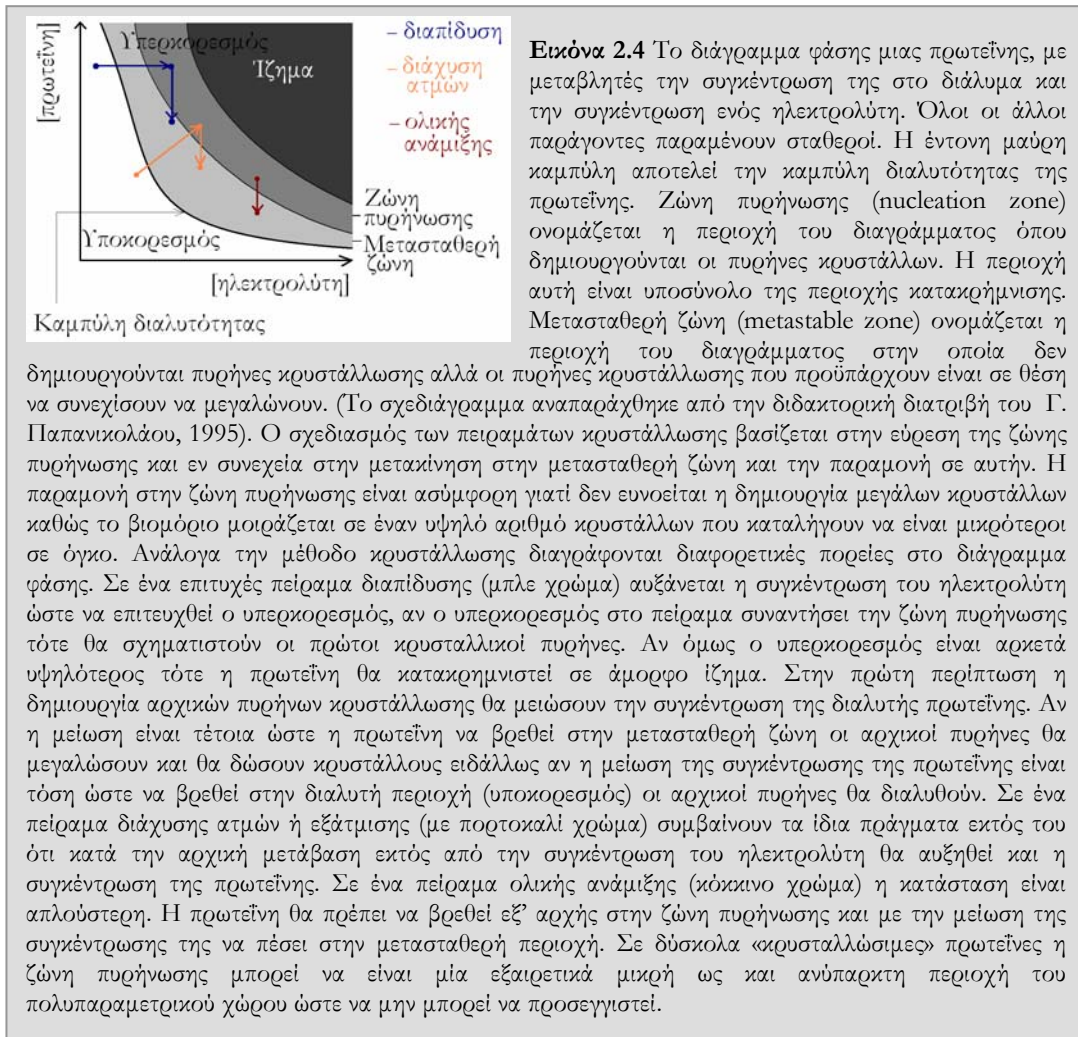
throughput) προσδιορισμένων δομών (structural proteomics), εν τούτοις η πειραματική πραγματοποίηση της είναι εξαιρετικά δύσκολη όταν δεν διατίθεται ρομποτικό σύστημα (Segelke, 2001). Η τυχαία δειγματοληψία μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητικά στο εργαστήριο περιορίζοντας τον πολυπαραμετρικό χώρο κάνοντας χρήση μόνο μερικών μεταβλητών παραμέτρων. Αυτός ο τρόπος σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης καλείται ατελώς παραγοντικός (incomplete factorial), (Carter & Carter, 1979). Στην προσέγγιση του σποραδικού πίνακα (sparse matrix), (Jankarik & Kim, 1991) μειώνεται ακόμα ο αριθμός των δοκιμών και κατά συνέπεια απαιτείται ακόμα λιγότερη ποσότητα δείγματος καθώς σαρώνονται τυχαία συνθήκες που στο παρελθόν έδωσαν πρωτεϊνικούς κρυστάλλους στην βιβλιογραφία. Λόγω της μεροληψίας αυτής συναφείς συνθήκες αντιπροσωπεύονται πολλαπλά στις δοκιμές.



Σε περίπτωση απουσίας θετικών αποτελεσμάτων στην περίπτωση των παραπάνω προσεγγίσεων είναι δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα για την διαλυτότητα του βιομορίου. Η πιο κατάλληλη μέθοδος για την μελέτη της διαλυτότητας της πρωτεΐνης είναι η μέθοδος της συστηματικής σάρωσης συνθηκών, η μελέτη της οποίας καταλήγει στα διαγράμματα διαλυτότητας (Εικόνα 2.4). Τα διαγράμματα διαλυτότητας είναι ιδιοχαρακτηριστικά για το κάθε βιομόριο. Η πλήρης διερεύνηση τους όμως απαιτεί χρόνο και κυρίως μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης, ένα σημαντικό μειονέκτημα σε αντίθεση με όλες τις άλλες μεθόδους σάρωσης συνθηκών.

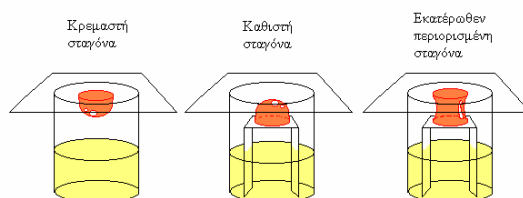
2.5.4 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Οι μέθοδοι κρυστάλλωσης που έχουν αναπτυχθεί είναι ποικίλες και αποσκοπούν στο να φέρουν το διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού. Στην εικόνα 2.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι περιπτώσεις των α) ολικής ανάμιξης (batch): όπου το βιομόριο διαλύεται σε συγκεκριμένο διάλυμα, β) εξάτμισης (evaporation), όπου το διάλυμα συμπυκνώνεται μέσω εξάτμισης, γ) διαπίδυσης (dialysis), όπου το διάλυμα της πρωτεΐνης τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη και μέσω διαπίδυσης υποβάλλεται σε μεταβολή της συγκέντρωσης διαφόρων παραγόντων και δ) η διάχυση ατμών (vapor diffusion) η οποία αναλύεται διεξοδικά στην παράγραφο 2.5.4.1 καθώς αποτέλεσε την κύρια μέθοδο με την οποία ερευνήθηκαν διαφορετικές συνθήκες για την κρυστάλλωση των βιομορίων της παρούσης εργασίας.



2.5.4.1 Μέθοδος διάχυσης ατμών

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών περιλαμβάνει ένα κλειστό σύστημα δύο υδατικών διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των συστατικών τους. Τα διαλύματα αυτά εξισορροπούνται μέσω της τάσης των ατμών του νερού και των τυχόν πτητικών ουσιών που περιέχουν. Οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιούνται συχνά είναι αυτές της κρεμαστής σταγόνας, της καθιστής σταγόνας και της εκατέρωθεν περιορισμένης σταγόνας (σταγόνα σάντουιτς) (Εικόνα 2.5).



Εικόνα 2.5. Για την μέθοδο διάχυσης ατμών χρησιμοποιούνται οι τεχνικές της κρεμαστής σταγόνας, της καθιστής και της εκατέρωθεν περιορισμένης. Με πορτοκαλί χρώμα διακρίνεται το διάλυμα του προς κρυστάλλωση βιομορίου και με κίτρινο το διάλυμα των παραγόντων κρυστάλλωσης. (Γαζή, 2000)

Στην κρεμαστή σταγόνα το διάλυμα που περιέχει το βιομόριο συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος. Σε αυτό το διάλυμα περιέχονται και οι απαιτούμενοι παράγοντες κρυστάλλωσης. Στο κάτω μέρος του συστήματος βρίσκεται το μεγαλύτερο, σε όγκο, διάλυμα της δεξαμενής, που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά όχι το προς κρυστάλλωση βιομόριο. Αποτέλεσμα της

εξισορρόπησης της τάσης ατμών είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας έτσι ώστε η πρωτεΐνη να φτάσει βαθμιαία στον υπερκορεσμό. Αντίστοιχα γεγονότα συμβαίνουν και στα πειράματα καθιστής σταγόνας, εδώ όμως η σταγόνα στηρίζεται σ' ένα υπόβαθρο του κλειστού συστήματος.

2.5.5 Βασικό πρωτόκολλο σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης

Για την αρχική σάρωση του πολυπαραμετρικού χώρου κρυστάλλωσης κάθε πρωτεΐνης στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε μικτή προσέγγιση η οποία περιλάμβανε σαρώσεις τύπου Σποραδικού Πίνακα, συστηματικών συνθηκών και τύπου Ίχνους καθώς έτοιμα διαλύματα των τριών αυτών προσεγγίσεων διατίθενται στο εμπόριο. Συγκεκριμένα τα Crystal Screen I και II της Hampton Research καθώς και τα αντίστοιχα τους Structure Screen I και II από την Molecular Dimensions χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν 100 συνθήκες της προσέγγισης τύπου Σποραδικού Πίνακα (Sparse Matrix). Στη συνέχεια τα συστηματικά screen του Θεϊκού Αμμωνίου/pH, PEG4000/pH, MPD/pH, NaCl/pH, LiCl/PEG/pH και PEG/ion screen της Hampton Research χρησιμοποιήθηκαν για να καλύψουν 168 επιπλέον συνθήκες του πολυπαραγοντικού χώρου. Τέλος τα screen JBS3, JBS7 και JBS9 της Jena Biosciences καθώς και το MacroSol Screen της Molecular Dimensions χρησιμοποιήθηκαν στην προσέγγιση Ίχνους για να καλύψουν επιπλέον 120 συνθήκες. Στις συνολικά 388 συνθήκες υπήρχαν αλληλεπικαλύψεις που μειώνουν τον αριθμό των πραγματικά μεμονωμένων συνθηκών που ελέγχθηκαν. Η συμβολή της θερμοκρασίας ελέγχθηκε μόνο ως επιπλέον παράμετρος στις προσεγγίσεις Σποραδικού Πίνακα και Ίχνους όπου εκτός της θερμοκρασίας των 18°C δοκιμάστηκε και η θερμοκρασία των 7°C.

Τα πειράματα κρυστάλλωσης κρεμαστής σταγόνας λαβαίνουν χώρα σε πλαστικά πιάτα Limbro τα οποία καλύπτονται με κατάλληλα σιλικοναρισμένες καλυπτρίδες με μήκος πλευρών 22 x 22 mm.

Τα αποτελέσματα των κρυστάλλωσεων λόγω του όγκου των πειραμάτων εξετάζονταν στις 16 h, 5 ημέρες, 2 βδομάδες, 2 μήνες, 6 μήνες, 1 χρόνο και 2 χρόνια στο στερεοσκόπιο και σε όλο το εστιακό βάθος της σταγόνας. Στην περίπτωση παρουσίας κρυστάλλων στην υπό εξέταση σταγόνα ακολουθούσε προσθήκη κατάλληλης χρωστικής για την εξακρίβωση της πρωτεϊνικής φύσης του κρυστάλλου.

Από τις παραπάνω αρχικές σαρώσεις ακόμα και αν δεν προέκυπταν επιτυχείς συνδυασμοί παραγόντων για την κρυστάλλωση των υπό μελέτη βιομορίων εξάγονταν συμπεράσματα για την διαλυτότητα αυτών. Τα συμπεράσματα αυτά χρησιμοποιούνταν για να περιορίσουν τον πολυπαραμετρικό χώρο σε περιοχές όπου ευνοούταν η όχι βίαιη κατακρήμνιση της πρωτεΐνης σε άμορφο ίζημα. Σε αυτό το υποσύνολο του χώρου χρησιμοποιούνταν σε δεύτερο στάδιο η τυχαία δειγματοληψία με την βοήθεια του προγράμματος CRYSTOOL (Segelke, 2001) (www-structure.llnl.gov/crstool/crstool.html). Το πρόγραμμα διαβάζει την πληροφορία από το αρχείο παραμέτρων που καθορίζεται από τον χρήστη και δημιουργεί τυχαίους συνδυασμούς των παραμέτρων αυτών. Συνήθως δοκιμάστηκαν ανά περίπτωση 24 ή 48 τυχαίες συνθήκες του περιορισμένου χώρου.

Αν δεν παρατηρούνται κρύσταλλοι ούτε μετά το δεύτερο στάδιο οι προσπάθειες εστιάζονται εκ νέου στην παραγωγή της πρωτεΐνης και στην παρασκευή ενός ποιοτικά αρτιότερου δείγματος. Το νέο αυτό δείγμα υποβάλλεται εξ αρχής σε έναν επαναληπτικό κύκλο πειραμάτων κρυστάλλωσης. Η AvrPphF ORF1 κρυστάλλωσε έπειτα από την απομάκρυνση των 20 επιπλέον αμινοξέων που προσαρτούσε ο φορέας pPROEX-HT στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης συμπεριλαμβανομένου του ακροφυσίου ιστιδινών και της θέσης αναγνώρισης της πρωτεάσης rTEV. Η πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 κρυστάλλωσε έπειτα από παραγωγή του συμπλόκου AvrPphF ORF1 και ORF2 και διαχωρισμό των συστατικών του στην στήλη μοριακής διήθησης. Στην περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG δοκιμάστηκε επίσης ένα μετάλλαγμα έλλειψης καθώς και προετοιμασία του δείγματος με ιωδοξικό νάτριο για την προστασία των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων ενώ το σύμπλοκο AvrPphF ORF1 και ORF2 δοκιμάστηκε και ύστερα από αναγωγική μεθυλίωση των λυσινών του.

2.6 Αλληλεπίδραση ακτίνων-X με την ύλη

2.6.1 Σκέδαση Thomson

Οι ακτίνες-X, ως ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, προκαλούν ισχυρή ταλάντωση των ηλεκτρονίων, που βρίσκονται στις στοιβάδες των ατόμων της ύλης, την οποία διαπερνούν. Όταν φορτισμένα σωματίδια όπως τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται γίνονται πηγές δευτερογενούς ακτινοβολίας. Καθώς η δευτερογενής εκπομπή ακτινοβολίας οφείλεται στο ταλαντώμενο ηλεκτρικό πεδίο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, είναι σύγχρονη με αυτήν και αποτελείται από ακτίνες-X. Οι δευτερογενείς ακτίνες-X διαθέτουν το ίδιο μήκος κύματος με την πρωτογενή ακτινοβολία. Αυτού του είδους η σκέδαση στην οποία δεν παρατηρείται αλλαγή στο μήκος κύματος ονομάζεται σκέδαση Thomson και αποτελεί τον κύριο τύπο σκέδασης που εμπλέκεται στην περίθλαση ακτίνων-X.

2.6.2 Σκέδαση Compton

Οι ακτίνες-X συμπεριφέρονται όμως και ως φωτόνια ορμής $h\nu/c$. Η ορμή τους μεταφέρεται όταν τα σωματίδια συγκρούονται ανελαστικά με τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών στοιβάδων τα οποία και εκτρέπονται από την αρχική τους τροχιά και η ακτινοβολία μετατρέπεται σε ακτίνες-X χαμηλότερης ενέργειας (μεγαλύτερου μήκους κύματος). Καθώς η μεταβολή της ενέργειας εξαρτάται από τις συνθήκες σύγκρουσης των σωματιδίων, οι σκεδαζόμενες ακτίνες-X διαθέτουν συνεχές φάσμα σε μήκη κύματος μεγαλύτερο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Αυτή η σκέδαση είναι γνωστή ως σκέδαση Compton. Η παρουσία του φαινομένου αυτού εμπλέκεται ως θόρυβος στα πειράματα σκέδασης ακτίνων-X.

2.6.3 Ατομικός παράγοντας σκέδασης

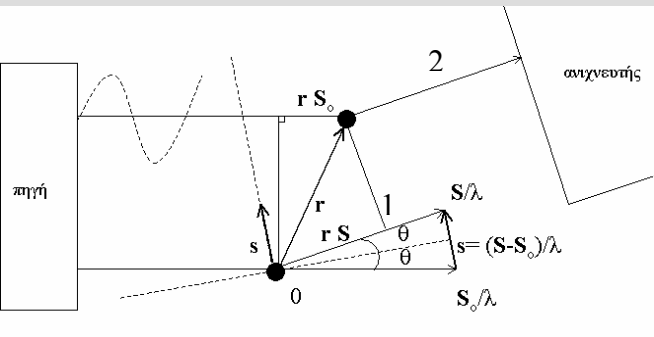
Η σκέδαση από ένα άτομο μπορεί να περιγραφεί θεωρώντας το ηλεκτρονιακό νέφος ως σφαιρικά συμμετρικό γύρω από τον πυρήνα του ατόμου. Η ηλεκτρονική πυκνότητα (ρ) στην θέση \mathbf{r} σημειώνεται ως $\rho(\mathbf{r})$. Λόγω της κεντροσυμμετρίας γύρω από την αρχή των συντεταγμένων, όπου τοποθετείται εξ ορισμού ο πυρήνας του ατόμου, η σκέδαση είναι πάντα πραγματική (βρίσκεται κατά μήκος του πραγματικού άξονα σε ένα διάγραμμα Argand¹³). Ο ατομικός παράγοντας σκέδασης (ή ατομικός παράγοντας σχήματος) f ισούται με:

$$f = \int_r \rho(\mathbf{r}) \exp[2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}] d\mathbf{r} \quad \text{και} \quad f = 2 \int_r \rho(\mathbf{r}) \cos[2\pi \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}] d\mathbf{r}$$

Καθώς το άτομο θεωρείται σφαιρικά συμμετρικό δεν διαφέρει αν αλλάζει τον προσανατολισμό του σε σχέση με την κατεύθυνση S, έτσι ο ατομικός παράγοντας σκέδασης εξαρτάται μόνο από το μέτρο του S. $|S| = (2\sin\theta)/\lambda$.

¹³ Το διάγραμμα Argand (ή μιγαδικό επίπεδο) αποτελεί στα μαθηματικά μία αναπαράσταση των μιγαδικών αριθμών. Διαθέτει τον πραγματικό r (real) άξονα και τον κάθετο φανταστικό i (imaginary) άξονα. Μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα τροποποιημένο καρτεσιανό επίπεδο με το πραγματικό μέρος να αναπαρίσταται σαν μετατόπιση κατά μήκος του άξονα x , και το φανταστικό μέρος σαν μετατόπιση στον άξονα των y .

Εικόνα 2.6. Ένα σύστημα 2 ατόμων, το πρώτο βρίσκεται στην αρχή των αξόνων 0 και το δεύτερο απέχει κατά ένα διάνυσμα \mathbf{r} . Διαφορά διαδρομής = $\mathbf{r}\mathbf{S} - \mathbf{r}\mathbf{S}_0$ και $|\mathbf{s}| = (2\sin\theta)/\lambda$. Το συνολικό πλάτος από την σκέδαση των δύο ατόμων είναι



$$F(\mathbf{S}) = \sum_{j=1}^2 f_j \exp(2\pi i \mathbf{s} \mathbf{r}_j) = f_e + f_e \exp(2\pi i \mathbf{s} \mathbf{r}_2)$$

Το $F(\mathbf{S})$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier της κατανομής των ατόμων. Σε σχέση με το κύμα 1 η φάση του κύματος 2 είναι $2\pi \mathbf{s} \mathbf{r}$. (Drenth, 1995).

2.6.4 Σκέδαση από ένα πολυατομικό μόριο

Θεωρώντας μία συνάθροιση N όμοιων ατόμων/σωματιδίων στον χώρο τα οποία συγκροτούνται μεταξύ τους μέσω χημικών δεσμών θα πρέπει πρώτα να συνδυάσουμε τα σκεδαζόμενα κύματα από τα N άτομα. Έστω ότι οι ατομικοί αριθμοί σκέδασης των N ατόμων είναι $f_1, f_2, f_3, \dots, f_N$ και τα αντίστοιχα ανύσματα θέσης $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N$, έτσι ώστε η διαφορά διαδρομής των σκεδαζόμενων κυμάτων σε σχέση με την αρχή των αξόνων να είναι $(\mathbf{S}\mathbf{r}_1), (\mathbf{S}\mathbf{r}_2), \dots$ (Εικόνα 2.6). Το ολικό κύμα που σκεδαζείται από όλα τα άτομα στην κατεύθυνση \mathbf{S} δίδεται από το άθροισμα των επιμέρους ανυσμάτων από την συνεισφορά κάθε ατόμου. Έτσι το συνολικό κύμα δίνεται από τον τύπο:

$$\mathbf{G}(\mathbf{S}) = \mathbf{f}_1 + \mathbf{f}_2 + \mathbf{f}_3 + \dots + \mathbf{f}_N = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i \mathbf{r}_j \mathbf{S})$$

Κατά συνέπεια σε μία συνάθροιση όμοιων σωματιδίων η συνολική σκέδαση εξαρτάται από την κατανομή των σωματιδίων αυτών στον χώρο.

2.7 Σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες

2.7.1 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα

Η σκέδαση από ένα μονοδιάσπαρτο (monodisperse) διάλυμα μακρομορίου δίνεται από τον τύπο:

$$I_M(\mathbf{s}) = N_M I(\mathbf{s}) F(\mathbf{s})$$

όπου, N_M , είναι ο αριθμός των μακρομορίων, $I(\mathbf{s})$ είναι η σκέδαση από ένα μακρομόριο/σωματίδιο στο διάλυμα στρωγγυλοποιημένο στο μέσο όρο προς όλους τους προσανατολισμούς του (averaged over all directions), ή διαφορετικά ο παράγοντας σχήματος και τέλος όπου $F(\mathbf{s})$ είναι ο παράγοντας δομής στο διάλυμα. Ο παράγοντας δομής συμπεριλαμβάνει τις ελκτικές ή απωστικές μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σωματιδίων και δύναται να διαφέρει σημαντικά από την μονάδα στις μικρές γωνίες. Σε ένα διάλυμα άπειρης αραιώσης όμως ο παράγοντας δομής τείνει στην μονάδα και η ένταση της σκέδασης είναι ανάλογη του παράγοντα σχήματος.

Πλαίσιο 2.1. Σχηματική αναπαράσταση μίας πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα. Τα πειράματα σκέδασης σε διαλύματα μακρομορίων περιλαμβάνουν ξεχωριστές μετρήσεις της σκέδασης από το διάλυμα και από τον διαλύτη. Θεωρώντας ότι ο διαλύτης είναι ένα ομοιογενές υπόστρωμα με σταθερή πυκνότητα ρ_s , η διαφορά στο πλάτος σκέδασης από ένα σωματίδιο σε σύγκριση με την σκέδαση από ισοδύναμο όγκο διαλύτη, καθορίζεται από τον μετασχηματισμό Fourier του επιπρόσθετου μήκους σκέδασης $\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) - \rho_s$:

$$F(s) = \int_V \Delta\rho(\mathbf{r}) \exp(is\mathbf{r}) d\mathbf{r}$$

όπου η ολοκλήρωση εκτελείται σε όλο τον όγκο του σωματιδίου. Σε ένα πείραμα σκέδασης η απευθείας καταγραφόμενη ποσότητα είναι η ένταση $I(s) = F(s)F^*(s)$ και όχι το πλάτος $F(s)$. Η ένταση είναι ανάλογη του αριθμού των φωτονίων που σκεδάζονται προς μια συγκεκριμένη διεύθυνση \mathbf{s} . Εικόνα τροποποιημένη (Svergun & Koch, 2003). Όπου $F^*(s)$ είναι ο συζυγής μιγαδικός του $F(s)$.

2.7.2 Η προσέγγιση Guinier και η εξίσωση Debye

Στα ισοτροπικά συστήματα που σκεδάζουν σε διάλυμα ισχύει η προσέγγιση Guinier για τιμές του s πλησίον του 0 (Guinier & Fournet, 1955).

$$I(s) \cong I(0) \exp\left(-\frac{1}{3} R_g^2 s^2\right)$$

όπου R_g είναι η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου, s είναι το άνυσμα σκέδασης ($4\pi \sin\theta/\lambda$) και $I(0)$ η ένταση στην μηδενική γωνία (σε ευθυγράμμιση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία). Η προσέγγιση Guinier έχει ισχύ για τιμές του $2\pi R_g s < 1.3$ στην περίπτωση σφαιροειδών σωματιδίων. Δηλώνει ότι στην περιοχή των πολύ μικρών γωνιών, η ένταση της σκέδασης μπορεί να προσεγγιστεί ως κανονική κατανομή, και το πλάτος της κατανομής αυτής σχετίζεται με την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου. Το διάγραμμα $\ln I(s)$ έναντι του s^2 είναι μία ευθεία σε αυτήν την περίπτωση όπου η κλίση της είναι η γυροσκοπική ακτίνα R_g και το σημείο τομής του άξονα y προσδιορίζει την τιμή $I(0)$. Ως γυροσκοπική ακτίνα ορίζεται η μέση τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των διαφορών των αποστάσεων όλων των ατόμων (N) από το κέντρο της μάζας τους:

$$R_g^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (r_k - \bar{r})^2$$

όπου r_k είναι το άνυσμα θέσης του k -οστού ατόμου και \bar{r} η μέση θέση των ατόμων του σωματιδίου.

Η σκεδαζόμενη ένταση στην μηδενική γωνία $I(0)$ είναι ανάλογη του αριθμού των ηλεκτρονίων του σωματιδίου ή αλλιώς ανάλογη του τετραγώνου της μοριακής μάζας του μακρομορίου σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αυτού. Η τιμή της $I(0)$ δεν είναι πειραματικά δυνατό να παρατηρηθεί καθώς βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με την προσπίπτουσα (πρωτογενή) δέσμη ακτινοβολίας και προσεγγίζεται μέσω της εξίσωσης Guinier. Στην περίπτωση σωματιδίων που αποκλίνουν από το σφαιρικό σχήμα το εύρος της προσέγγισης Guinier περιορίζεται στις ακόμα μικρότερες γωνίες $2\pi R_g s < 1.0$. Το διάγραμμα $\ln I(s)$ έναντι του s^2 μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί η γυροσκοπική ακτίνα της εγκάρσιας διατομής ενός ραβδοειδούς σωματιδίου (R_{gCS} , CS: Cross-Section). Σε περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες είναι αρκετά αποδιπλωμένες ώστε να προσεγγίζουν μία πολυμερή αλυσίδα, οι αποστάσεις μεταξύ στοιχειωδών τμημάτων της πρωτεΐνης μπορούν να είναι αρκετά μεγάλες κάνοντας μη πρακτική πλέον την χρήση της προσέγγισης Guinier (Kirste & Oberthum, 1982). Τότε η συνάρτηση $I(s)$ περιγράφεται στην περιοχή $R_g s < 3$ από την εξίσωση του Debye:

$$\frac{I(s)}{I(0)} = \frac{2}{(s^2 R_g^2)^2} [(s^2 R_g^2) - 1 + \exp(-s^2 R_g^2)]$$

Η σχέση αυτή ισχύει για μία απείρως λεπτή αλυσίδα. Η περιοχή ισχύος της σχέσης περιορίζεται ανάλογα με το ποσοστό αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων τμημάτων της αλυσίδας.

2.7.3 Ο Νόμος του Porod

Μία αρκετά ικανοποιητική προσέγγιση της σκέδασης από το σχήμα του σωματιδίου μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση του νόμου Porod. Σύμφωνα με τον νόμο του Porod στις ευρύτερες γωνίες σκέδασης, η σκέδαση ομογενών σωματιδίων ταλαντώνεται γύρω από μία ευθεία η οποία παρατηρείται στο διάγραμμα του Porod:

$$s^4 I(s) \approx B s^4 + A$$

Από την ασύμπτωτη που παρατηρείται στο παραπάνω διάγραμμα υπολογίζεται η σταθερά Porod, k , από την κλίση της ευθείας και από τον τύπο:

$$V_p = \frac{2\pi^2 I(0)}{Q} = \frac{2\pi^2 I(0)}{\int_0^\infty s^2 [I(s) - k] ds}$$

υπολογίζεται ο ένυδρος όγκος του σωματιδίου, V_p , ο οποίος καλείται και όγκος Porod.

2.7.4 Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων – Μετασχηματισμός Fourier

Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $P(r)$, είναι όμοια με μία μονοδιάστατη συνάρτηση Patterson (§ 2.8.6.1) - αν αφαιρεθεί η πυκνότητα που αντιστοιχεί στην κορυφή της αρχής (origin) - και περιγράφει την κατανομή των αποστάσεων μεταξύ στοιχειωδών όγκων εντός του σωματιδίου παρέχοντας πληροφορίες για την γεωμετρία του μορίου. Ονομάζεται και electron pair distribution function καθώς μπορεί να θεωρηθεί σαν το ιστόγραμμα των αποστάσεων όλων των πιθανών ζευγών ηλεκτρονίων του σωματιδίου. Η σχέση μεταξύ της $p(r)$ και της καμπύλης σκέδασης $I(s)$ για ένα μονοδιάστατο σύστημα δίνεται από την σχέση:

$$p(r) = r^2 \gamma(r).$$

Όπου $\gamma(r)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier της έντασης της σκέδασης:

$$\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} ds$$

Η συνάρτηση $P(r)$ μπορεί να υπολογιστεί ικανοποιητικά μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier (Glatter 1977, Glatter & Kratky, 1982, Svergun 1993), i) ορίζοντας την μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου πέρα από την οποία η συνάρτηση παίρνει την τιμή μηδέν και ii) κάνοντας χρήση γραμμικού συνδυασμού K ορθογώνιων¹⁴ συναρτήσεων, $\phi_k(r)$, ως εξής:

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

¹⁴ Δύο συναρτήσεις καλούνται ορθογώνιες αν το εσωτερικό τους γινόμενο είναι μηδενικό.

όπου οι συντελεστές c_k καθορίζονται μέσω προσέγγισης των πειραματικών δεδομένων, $I_e(s_i)$, ελαχιστοποιώντας την συνάρτηση:

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

όπου $\psi_k(s)$ είναι ο μετασχηματισμός Fourier των συναρτήσεων $\phi_k(r)$, και $\sigma(s_i)$ είναι η τυπική απόκλιση. Η παράμετρος ομαλότητας $\alpha \geq 0$ ρυθμίζει την ισορροπία μεταξύ της προσέγγισης της πειραματικής καμπύλης (πρώτος προσθετός της εξίσωσης) και της ομαλότητας της συνάρτησης $p(r)$, (δεύτερος προσθετός της εξίσωσης).

Η σκέδαση στην μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου μπορούν εκ νέου να εκτιμηθούν μέσω της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων σύμφωνα με τις εξισώσεις:

$$I(0) = 4\pi \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \quad \text{και} \quad R_g = \int_0^{D_{\max}} r^2 p(r) dr \left[2 \int_0^{D_{\max}} p(r) dr \right]^{-1}.$$

Τα σφαιρικά σωματίδια διαθέτουν κωδωνοειδούς σχήματος συναρτήσεις $p(r)$ οι οποίες παρουσιάζουν ένα μέγιστο περίπου στο μισό της μέγιστης διαμέτρου D_{\max} . Τα επιμηκυσμένα σωματίδια διαθέτουν ασύμμετρες κατανομές με καθαρό μέγιστο στις μικρές αποστάσεις που αντιπροσωπεύει την ακτίνα της εγκάρσιας διατομής τους $R_{g,cs}$. Τα επίπεδα σωματίδια διαθέτουν ένα ευρύ μέγιστο μετατοπισμένο σε τιμές μικρότερες του μισού της μέγιστης διαμέτρου του σωματιδίου. Πολύ ανισόμετρα σωματίδια παράγουν καμπύλες της εντάσεως της σκέδασης $I(s)$ χωρίς ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που εξασθενούν βραδύτερα από αυτές των σφαιρικών σωματιδίων. Οι πιο συχνά απαντούμενες αποστάσεις φανερώνονται σαν μέγιστα ή ώμοι στα μοτίβα της σκέδασης. Γενικά όμως οι καμπύλες σκέδασης είναι λιγότερο ενδεικτικές από την συνάρτηση κατανομής αποστάσεων.

2.7.5 *Ab initio* καθορισμός του σχήματος

Η πληροφορία για το σχήμα όμοιων σωματιδίων τυχαία προσανατολισμένων στο διάλυμα σε χαμηλή διακριτικότητα και της εσωτερικής δομής τους είναι δυνατόν να καθοριστεί από την σκέδαση ακτίνων-Χ στις μικρές γωνίες. Η μοντελοποίηση μέσω Ψευδών Ατόμων (Agarwal & Isaacs, 1977) στηρίζεται στην διευθέτηση ψευδών ατόμων ακτίνας r_0 σε μια σφαίρα διαμέτρου $D_{\max} \gg r_0$. Η διάμετρος D_{\max} αποτελεί την μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου όπως αυτή εκτιμάται από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Ο αριθμός των παραμέτρων του μοντέλου $M \gg (D_{\max}/r_0)^3$ είναι πολύ μεγάλος για τις συμβατικές μεθόδους ελαχιστοποίησης. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις τύπου Monte Carlo¹⁵ όπως η προσομοίωση ανόπτησης¹⁶. (Chacon *et al.*, 1998, Svergun *et al.*, 1999). Το πρόγραμμα DAMMIN (Svergun *et al.*, 1999) με τη χρήση προσομοίωσης ανόπτησης επιλέγει τη διαμόρφωση πακεταρισμένων ψευδών ατόμων X που προσεγγίζουν τα πειραματικά δεδομένα ελαχιστοποιώντας την συνάρτηση:

$$f(X) = \chi^2 + \alpha P(X)$$

όπου χ είναι η ασυμφωνία μεταξύ της πειραματικής και της υπολογιζόμενης καμπύλης, $P(X)$ είναι η ποινή για την εξασφάλιση του συμπαγούς και συνεχούς μοντέλου και $\alpha > 0$ η βαρύτητα της τιμής $P(X)$. Πρακτικά το πρόγραμμα ξεκινάει από μία τυχαία διαμόρφωση x σε «υψηλή» θερμοκρασία T . Κάνει ένα μικρό βήμα (τυχαία τροποποίηση της διαμόρφωσης: x') και

¹⁵ Η μέθοδος Monte Carlo είναι μία ομάδα υπολογιστικών αλγορίθμων για την προσομοίωση ποικίλων φυσικών και μαθηματικών συστημάτων. Διαχωρίζονται από άλλες μεθόδους καθώς είναι στοχαστικές, δηλαδή μη-ντετερμινιστικές κάνοντας χρήση τυχαίων αριθμών (ή συχνότερα ψευδο-τυχαίων αριθμών) σε αντίθεση με τους ντετερμινιστικούς αλγόριθμους.

¹⁶ Η προσομοίωση ανόπτησης (simulated annealing, SA) είναι ένας γενικής χρήσεως πιθανοκρατικός μετά – αλγόριθμος για την αντιμετώπιση του προβλήματος της καθολικής βελτιστοποίησης (global optimization). Εντοπίζει μία καλή προσέγγιση του καθολικού βελτιστού μιας δεδομένης συναρτήσεως εντός μεγάλου χώρου έρευνας. Εφευρέθηκε ανεξάρτητα από τους S. Kirkpatrick, C. D. Gelatt και M. P. Vecchi το 1983, και από τον V. Černý το 1985.

υπολογίζει την διαφορά $\Delta = f(x') - f(x)$. Αν $\Delta < 0$ αποδέχεται το βήμα αν $\Delta > 0$ το αποδέχεται με μια συγκεκριμένη πιθανότητα $e^{-\Delta/T}$. Κάνει ακόμα ένα βήμα από την διαμόρφωση x αν η x' έχει απορριφθεί ή από την x' αν έχει γίνει αποδεκτή. Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές. Ακολούθως μειώνεται η θερμοκρασία σε $T' = cT$, $c < 1$. Το σύστημα συνεχίζει να ψύχεται ωστόσο δεν παρατηρείται βελτίωση στο $f(x)$, (Svergun, 1999). Κατά την ανάκτηση του σχήματος του σωματιδίου από τα δεδομένα σκέδασης σε διάλυμα η επιλογή του εναντιόμορφου γίνεται αυθαίρετα και δεν λαμβάνεται υπόψη παρά μόνο κατά την σύγκριση δύο διαφορετικά παραγόμενων μοντέλων του ίδιου σωματιδίου μεταξύ τους (βλ. εδάφιο 2.7.7).

2.7.6 Σύγκριση μοντέλων σε ατομική διακριτικότητα με δεδομένα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες

Σε περιπτώσεις όπου μοντέλα σε ατομική διακριτικότητα έχουν προσδιοριστεί μέσω κρυσταλλογραφίας ή NMR είναι πιθανή μία πιο λεπτομερής ερμηνεία των δεδομένων σκέδασης από διάλυμα. Σαν αρχική προϋπόθεση όμως είναι απαραίτητη η όσο τον δυνατόν ακριβέστερη εκτίμηση του τρόπου σκέδασης αυτών των μοντέλων στο διάλυμα. Ισχύει δε ο τύπος:

$$I(s) = \left\langle \left| A_a(\mathbf{s}) - \rho_b A_s(\mathbf{s}) + \delta \rho_b A_b(\mathbf{s}) \right|^2 \right\rangle_{\Omega}$$

όπου $A_a(\mathbf{s})$ είναι το πλάτος της σκέδασης για το σωματίδιο σε κενό, $A_s(\mathbf{s})$ και $A_b(\mathbf{s})$ είναι τα πλάτη σκέδασης από τον αποκλειόμενο όγκο και την σφαίρα ενυδάτωσης αντίστοιχα. Το πρόγραμμα CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995) χρησιμοποιείται υπολογίζοντας για το μακρομόριο μία σφαίρα ενυδάτωσης πάχους 3 Å με ρυθμιζόμενη τιμή πυκνότητας. Το CRY SOL χρησιμοποιεί σφαιρικές αρμονικές για τον υπολογισμό των επιμέρους πλατών $A_{lm}(\mathbf{s})$ για όλους τους όρους της εξίσωσης. Δεδομένων των ατομικών συντεταγμένων ενός σωματιδίου το πρόγραμμα προσεγγίζει την πειραματική καμπύλη σκέδασης χρησιμοποιώντας σαν ελεύθερες παραμέτρους τον αποκλειόμενο όγκο και την αντίθεση (contrast) της σφαίρας ενυδάτωσης $\delta \rho_b$, ή προβλέπει την καμπύλη σκέδασης χρησιμοποιώντας της προκαθορισμένες τιμές των παραμέτρων.

2.7.7 Σύγκριση μοντέλων σε ατομική διακριτικότητα με μοντέλα ψευδών ατόμων ή καταλοίπων

Η Κανονικοποιημένη Χωρική Ασυμφωνία (NSD) υιοθετείται σαν μέτρο της ομοιότητας μεταξύ δύο τρισδιάστατων μοντέλων S_1 και S_2 ως εξής: για κάθε σημείο s_{1i} από το σύνολο σημείων $S_1 = \{s_{1i}, i=1, \dots, N\}$, η ελάχιστη τιμή μεταξύ των αποστάσεων του s_{1i} και όλων των σημείων του συνόλου $S_2 = \{s_{2i}, i=1, \dots, N\}$ σημειώνεται ως $\rho(s_{1i}, S_2)$. Η NSD, $\rho(S_1, S_2)$, μεταξύ των συνόλων S_1 και S_2 καθορίζεται ως

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

όπου N_i είναι ο αριθμός των σημείων στο σύνολο S_i και d_i είναι η μέση απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών σημείων στο σύνολο S_i .

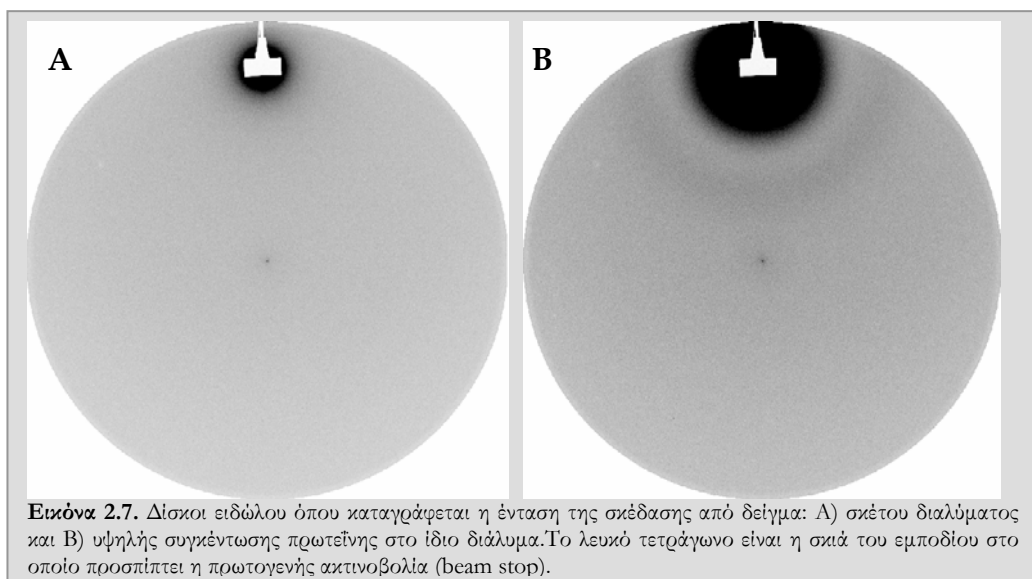
Για ιδανική υπέρθεση μεταξύ δύο μοντέλων η τιμή NSD τείνει στο μηδέν, ενώ ξεπερνά την τιμή 1 αν τα σωματίδια διαφέρουν συστηματικά το ένα από το άλλο.

Κατά την στοιχίση τρισδιάστατων μοντέλων που αναπαρίστανται από συναθροίσεις σημείων υπολογίζονται αρχικά οι κύριοι άξονες αδράνειας των σωματιδίων S_1 και S_2 . Το S_2 περιστρέφεται και μετατοπίζεται ως προς το S_1 για να στοιχιστούν οι κύριοι άξονες των δύο σωματιδίων, ενώ η περίπτωση εναντιόμορφων εξετάζεται επίσης. Τέλος η θέση του S_2 βελτιστοποιείται μέσω ελαχιστοποίησης της τιμής NSD (Kozin & Svergun, 2001). Η

μέθοδος είναι σε θέση να στοιχίσει μοντέλα χαμηλής διακριτικότητας προερχόμενα από σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες στο διάλυμα ή από ηλεκτρονική μικροσκοπία με μοντέλα υψηλής διακριτικότητας.

2.7.8 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων Σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες

Δείγματα των υπό μελέτη πρωτεϊνών σε τρεις τουλάχιστον διαφορετικές συγκεντρώσεις μετρήθηκαν στην γραμμή ακτινοβολίας X33¹⁷ του γερμανικού συγχροτρονίου (DESY) του Αμβούργου σε συνεργασία με τον εκεί εξωτερικό σταθμό του Ευρωπαϊκού Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας (EMBL-Hamburg Outstation). Στα δείγματα προστέθηκε D₂O (2 mM) και φυγοκεντρήθηκαν σε υψηλές στροφές (18000g για 1 min) μόλις πριν την τοποθέτησή τους σε θερμοελεγχόμενη κυψελίδα mica. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 12 - 13°C. Η έκθεση στις ακτίνες-X ήταν συνεχής με εναλλαγή δείγματος / διαλύτη και διαρκούσε 3 min. Τα δείγματα εναλλάσσονταν με το ρυθμιστικό διάλυμα του οποίου η ένταση της σκέδασης επίσης καταγράφεται για 3 min (Εικόνα 2.7). Ο ανιχνευτής ήταν Δίσκος Ειδώλου MAR345 (MarResearch). Τα πρότυπα σκέδασης καταγράφονταν για μία απόσταση 3 έως 4 μέτρων, καλύπτοντας το εύρος του ανύσματος σκέδασης (momentum transfer) $0.15 < s < 5.5 \text{ nm}^{-1}$. ($s=4\pi\sin\theta/\lambda$, όπου 2θ είναι η γωνία σκέδασης και $\lambda=1.5 \text{ \AA}$ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Η ένταση της σκέδασης που καταγράφεται στο δίσκο ειδώλου μετατρέπεται σε μονοδιάστατα δεδομένα μέσω του πακέτου προγράμματος PRIMUS-MAR (ATSAS2.1, Konarev *et al.*, 2003, 2006). Τα δεδομένα στρογγυλεύθηκαν στον μέσο όρο έπειτα από κανονικοποίηση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η συνάρτηση απόκρισης του ανιχνευτή για την βαθμονόμηση των δεδομένων υπολογίστηκε επίσης στο PRIMUS. Ο άξονας του ανύσματος της σκέδασης δημιουργούταν χρησιμοποιώντας πρότυπα από καθορισμένα δείγματα με κατάλληλες περιοδικότητες. Τα τελικά αρχεία δεδομένων περιέχουν τρεις στήλες δεδομένων, εκ των οποίων η πρώτη αντιστοιχεί στο άνυσμα σκέδασης, η δεύτερη στην ένταση και η τρίτη στην τυπική απόκλιση των σφαλμάτων (standard error), $\sigma(s)$. Το άνυσμα σκέδασης μπορεί να δίνεται είτε ως $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ είτε ως $S = 2\sin\theta/\lambda$ σε μονάδες nm^{-1} ή \AA^{-1} . Τα δεδομένα αναλύθηκαν για την παρουσία ή όχι φθοράς λόγω ακτινοβολίας με την επαναληπτική ακτινοβολία του ίδιου δείγματος και την σύγκριση των τιμών τους.



Εικόνα 2.7. Δίσκοι ειδώλου όπου καταγράφεται η ένταση της σκέδασης από δείγμα: Α) σκέτου διαλύματος και Β) υψηλής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο ίδιο διάλυμα. Το λευκό τετράγωνο είναι η σιάα του εμποδίου στο οποίο προσπίπτει η πρωτογενής ακτινοβολία (beam stop).

¹⁷ Η γραμμή ακτινοβολίας X33 εδράζει στον αποθηκευτικό δακτύλιο DORIS III του DESY.

Για την ελαχιστοποίηση των φαινόμενων αλληλεπίδρασης των σωματιδίων, την απαλοιφή δηλαδή του παράγοντα δομής από την καμπύλη της εντάσεως της σκέδασης, οι πειραματικές καμπύλες σκέδασης καταγράφονται σε δείγματα του σωματιδίου με διαφορετικές συγκεντρώσεις και ακολουθεί η μαθηματική εξαγωγή (extrapolation) των δεδομένων σε άπειρη διάλυση.

Η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου R_g και η αρχική ένταση $I(0)$ υπολογίζονται αρχικά από την προσέγγιση Guinier επίσης μέσω του PRIMUS. Το ίδιο συμβαίνει και για την σταθερά Porod, K , καθώς και για τον όγκο Porod, V_p , του σωματιδίου.

Για τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, το PRIMUS αλληλεπιδρά με το πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier GNOM (Semenyuk & Svergun, 1991; Svergun, 1992).

Η μοντελοποίηση μέσω ψευδών ατόμων έγινε με το πρόγραμμα DAMMIN (Svergun *et al.*, 1999). Είναι φανερό ότι διαφορετικές τυχαίες αρχικές κατανομές των ψευδών ατόμων στο χώρο έρευνας καταλήγουν σε διαφορετικές λύσεις με τον ίδιο βαθμό ερμηνείας των δεδομένων. Γι' αυτό τα 15 μοντέλα κάθε μελέτης υπερτίθενται ανά ζεύγη με τα εκτελέσιμα DAMSEL/DAMAVER/SUPCOMB (Kozin & Svergun, 2000). Το μοντέλο αναφοράς επιλέγεται κατάλληλα από το πρόγραμμα έτσι ώστε να απέχει λιγότερο από το μέσο όρο. Το εκτελέσιμο DAMSUP παρατάσσει τα μοντέλα σύμφωνα με το μοντέλο αναφοράς. Στη συνέχεια το DAMAVER υπολογίζει ένα χάρτη πιθανοτήτων από τα παραταγμένα μοντέλα και τέλος το DAMFILT φιλτράρει αυτό το χάρτη παράγοντας το πιθανότερο μοντέλο (most probable). Στα 15 αυτά μοντέλα εκτιμώνται οι τιμές Κανονικοποιημένης Χωρικής Ασυμφωνίας NSD (Normalized Spatial Discrepancy), (βλ. εδάφιο 2.7.7). Τιμές NSD ανώτερες των 0.7 δίνουν μεγάλες περιοχές εξάπλωσης που υποδεικνύουν την αστάθεια των μοντέλων. Σε αυτές τις περιπτώσεις περισσότερη πληροφορία απαιτείται για τον αξιόπιστο καθορισμό του σχήματος του σωματιδίου. Για την περαιτέρω βελτιστοποίηση του μέσου μοντέλου το εκτελέσιμο DAMSTART παράγει από αυτό έναν σταθερό πυρήνα ψευδών ατόμων ο οποίος εισάγεται εκ νέου στο DAMMIN.

Στο πρόγραμμα GASBOR (Svergun *et al.*, 2001) γίνεται χρήση προσομοίωσης ανόπτησης μεν αλλά αντί μοντέλο ψευδών ατόμων παράγονται μοντέλα ψευδών καταλοίπων. Καθώς οι πρωτεΐνες είναι διπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο χώρο, που συντίθενται από κατάλοιπα αμινοξέων, μία πρωτεΐνη μπορεί να αναπαρασταθεί από ένα σύνολο K ψευδών καταλοίπων επικεντρωμένα στις θέσεις C_α με συντεταγμένες $\{r_i\}$. Ο αριθμός των καταλοίπων που ζητείται από το πρόγραμμα να τοποθετήσει στον χώρο έρευνας πρέπει να είναι ίσος με αυτόν της πρωτεΐνης. Επίσης το πρόγραμμα δεν αφαιρεί την σταθερά Porod, K , από τα πειραματικά δεδομένα όπως στην περίπτωση του DAMMIN αλλά αντιθέτως απαιτείται χρήση των δεδομένων των υψηλών τιμών s ($s = 4\pi s \sin\theta/\lambda$). Το πρόγραμμα είναι ικανό γι' αυτό να προσεγγίσει την πειραματική καμπύλη ως και την διακριτικότητα των 5 Å, χρησιμοποιώντας ακόμα και δεδομένα από σκέδαση ακτίνων-X στις ευρείες γωνίες (WAXS, Wide-Angle X-ray Scattering). Πολλές διαφορετικές εκτελέσεις του προγράμματος λαμβάνουν χώρα λόγω της υψηλής αμφισημίας της μεθόδου για την επικύρωση του μοντέλου μέσω επαναληψιμότητας.

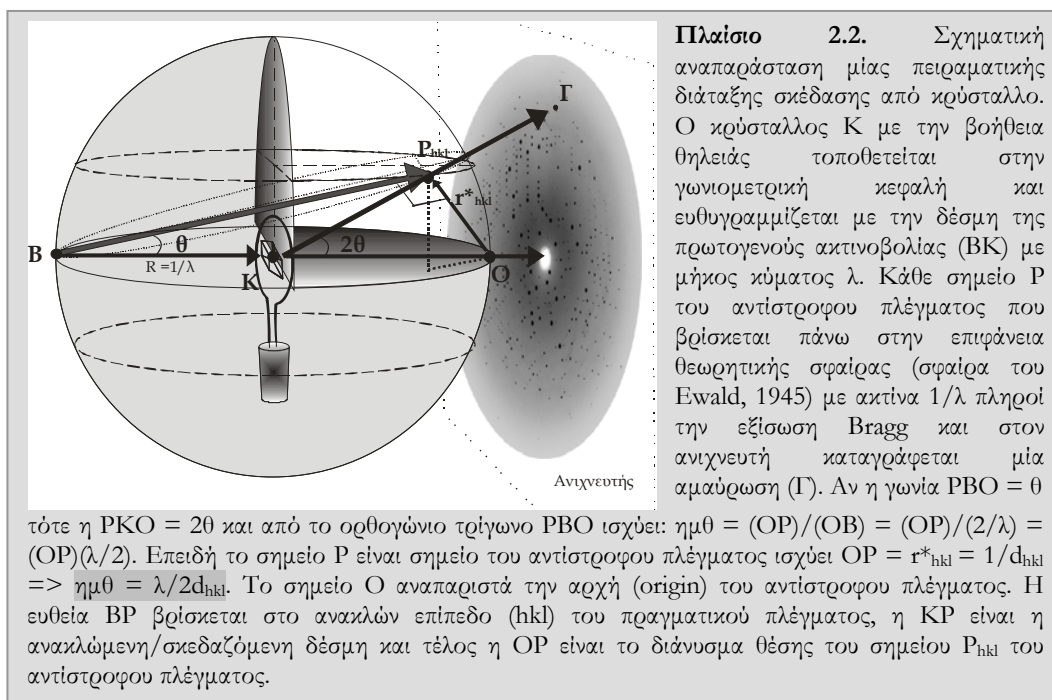
Μία επέκταση του προγράμματος GASBOR είναι το πακέτο προγραμμάτων CREDO (Petoukhov *et al.*, 2002). Σε αυτό υπάρχει η δυνατότητα χρήσης ενός γνωστού τμήματος, σε ατομική διακριτικότητα ή μοντέλο ψευδών ατόμων/καταλοίπων από πειράματα σκέδασης σε μικρές γωνίες κάποιου μικρότερου τμήματος του υπό μελέτη σωματιδίου, ως επιπλέον περιορισμό, ενώ το πρόγραμμα καλείται να τοποθετήσει στον χώρο έρευνας το άγνωστο τμήμα του υπό μελέτη σωματιδίου.

2.8 Κρυσταλλογραφία Βιολογικών Μακρομορίων

2.8.1 Η αναγκαιότητα της κρυστάλλωσης

Για την μελέτη της τρισδιάστατης δομής των μορίων σε ακόμα υψηλότερη διακριτική ικανότητα, όπου ζητείται ο ακριβής κατά το δυνατόν καθορισμός της θέσης των ατόμων, αναπτύχθηκε η μέθοδος ανάλυσης σκεδαζόμενων ακτίνων-X από κρυστάλλους (κρυσταλλογραφία ακτίνων-X). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε αργότερα και για την μελέτη βιολογικών μακρομορίων, βρίσκοντας ευρεία εφαρμογή στην μελέτη της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς δομής των πρωτεϊνών. Λόγω του ότι κάθε άτομο σκεδάζει τις ακτίνες-X πολύ αδύναμα, δεν είναι δυνατόν να παραχθεί η εικόνα του μορίου από ένα και μόνο μοναδικό μόριο. Το πρόβλημα λύθηκε με την ανάλυση περίθλασης από κρυστάλλους του μορίου. Οι κρύσταλλοι περιέχουν πολλά διατεταγμένα μόρια σε πανομοιότυπο προσανατολισμό, έτσι κάθε μόριο σκεδάζει όμοια, και οι περιθλωμένες ακτίνες από όλα τα μόρια συζευγνούνται ώστε τελικά παράγονται ισχυρές δέσμες ακτίνων-X, οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν και να αναλυθούν.

Οι κρύσταλλοι περιγράφονται από το κρυσταλλικό τους πλέγμα, το οποίο δομείται από επαναλήψεις της στοιχειώδους κυψελίδας. Η στοιχειώδη κυψελίδα είναι το βασικό ελάχιστο παραλληλεπίπεδο το οποίο με την εφαρμογή μεταθέσεων είναι σε θέση να πληρώσει ολόκληρο το κρυσταλλικό πλέγμα. Στην περίπτωση που ο κρύσταλλος διαθέτει στοιχεία συμμετρίας – όπως συμβαίνει συνήθως – τότε η στοιχειώδη κυψελίδα δύναται να διαθέτει περισσότερα του ενός όμοια αντικείμενα. Η ασύμμετρη μονάδα είναι το βασικό επαναλαμβανόμενο αντικείμενο που σχετίζεται με τα άλλα πανομοιότυπα αντικείμενα μέσω πράξεων συμμετρίας.



2.8.2 Σκέδαση ακτίνων-X από κρύσταλλο – Παράγοντας δομής

Αν θεωρήσουμε ότι το σύνολο των ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα αντιστοιχεί σε ένα μόριο και τα ανύσματα θέσης \mathbf{r}_j των διαφορετικών ατόμων υπολογίζονται βάση της αρχής των αξόνων της στοιχειώδους κυψελίδας τότε ο τύπος:

$$F(\mathbf{S}) = \sum_{\substack{\text{στοιχ.} \\ \text{κυψ.}}} f_j \exp(2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}_j)$$

αναπαριστά τον παράγοντα δομής στην κρυσταλλογραφία και εξαρτάται από την διεύθυνση των ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα. Καθώς ένας κρύσταλλος αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό στοιχειωδών κυψελίδων, το συνολικό κύμα που σκεδάζεται από αυτόν είναι το άθροισμα της σκέδασης από όλες τις στοιχειώδεις κυψελίδες αναφορικά με την αρχή του συστήματος συντεταγμένων (origin). Η αρχή του συστήματος συντεταγμένων ορίζεται σε ένα σημείο του κρυσταλλικού πλέγματος. Οι παράγοντες δομής από κάθε στοιχειώδη κυψελίδα διαθέτουν σταθερό πλάτος αλλά παρουσιάζουν αλλαγή φάσης (phase shift) ώστε να στρέφονται σε διαφορετικές κατευθύνσεις σε ένα διάγραμμα Argand (βλ. εδάφιο 2.6.3), η συνολική σκέδαση από τον κρύσταλλο είναι μηδενική εκτός των ειδικών περιπτώσεων όπου το εσωτερικό γινόμενο των ανυσμάτων σκέδασης και μεταθέσεως του κρυσταλλικού πλέγματος είναι ακέραιος αριθμός οπότε όλοι οι παράγοντες δομής στρέφονται προς μία διεύθυνση σε ένα διάγραμμα Argand (σκεδάζουν σε φάση) και η σκέδαση από τον κρύσταλλο αποκτά σημαντική τιμή. Έτσι ο κρύσταλλος δεν σκεδάζει, εκτός και αν ισχύουν οι συνθήκες Laue: $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S} = h$, $\mathbf{b} \cdot \mathbf{S} = k$ και $\mathbf{c} \cdot \mathbf{S} = l$. Τα ανύσματα h , k και l ορίζουν επίσης το σύστημα συντεταγμένων του πλέγματος στον αντίστροφο χώρο. Έτσι ισχύει η εξίσωση:

$$F(hkl) = \sum_{j=1}^N f_j \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)$$

όπου το \mathbf{S} έχει αντικατασταθεί από το επίπεδο hkl περιγράφοντας τον παράγοντα δομής μιας συγκεκριμένης ανάκλασης hkl από τον κρύσταλλο.

Λόγω λοιπόν της υψηλής περιοδικότητας ενός κρυστάλλου η συνολική σκέδαση ανακατανέμεται σε ειδικές διευθύνσεις που καθορίζονται από το αντίστροφο πλέγμα και η διακριτή τριδιάστατη συνάρτηση $I(hkl)$ δίνεται από τον τύπο:

$$I(hkl) = \mathbf{F}(hkl) \cdot \mathbf{F}^*(hkl) = F(hkl)^2$$

όπου $\mathbf{F}^*(hkl)$ είναι ο συζυγής μιγαδικός.

2.8.3 Επεξεργασία αρχικών δεδομένων

Αρχικά προσδιορίζεται ο προσανατολισμός του κρυστάλλου και η σχετική θέση των αξόνων του κρυσταλλικού πλέγματος. Καθορίζεται επίσης η χωροομάδα συμμετρίας του κρυστάλλου και αποδίδονται στις ανακλάσεις οι δείκτες Miller hkl . Η ένταση των ανακλάσεων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την μέθοδο του profile fitting. Με τη χρήση της μεθοδολογίας αυτής αφού καθορίζεται το προφίλ των ισχυρότερων ανακλάσεων εφαρμόζεται στη συνέχεια στις ασθενείς ανακλάσεις. Η συγχώνευση (merging) ανακλάσεων που σχετίζονται λόγω συμμετρίας καθορίζει το μέγεθος του πειραματικού σφάλματος σ . Οι ανακλάσεις στη συνέχεια χαρακτηρίζονται ως προς την σημαντικότητα τους βάση της αναλογίας της έντασης προς το σφάλμα, $I/\sigma(I)$. Η απορρόφηση είναι η μεγαλύτερη πηγή εισαγωγής σφαλμάτων στα δεδομένα καθώς η διαδρομή των ακτίνων X είναι διαφορετική για κάθε ανάκλαση. Στην ιδανική περίπτωση οι ανακλάσεις που σχετίζονται μέσω συμμετρίας δεν παρουσιάζουν διαφορές ως προς την ένταση τους. Το συνολικό σφάλμα υπολογίζεται έτσι από τον τύπο:

$$R_{\text{symm}} = \frac{\sum (I_h - \bar{I}_h)}{\sum \bar{I}_h}$$

όπου I_h είναι οι παρατηρούμενες τιμές των εντάσεων και \bar{I}_h οι μέσες τιμές τους. Ο παράγοντας R είναι περίπου 5% για αποδεκτά δεδομένα και περίπου 10% για αδύναμα. Σημαντική παράμετρος είναι επίσης και η πληρότητα των δεδομένων. Καθώς όμως ο παράγοντας R_{symm} εξαρτάται από την πολλαπλότητα των δεδομένων χρησιμοποιείται επίσης ο παράγοντας R_{meas} ο οποίος φέρει κατάλληλο όρο για την διόρθωση των συνεισφορών των ανακλάσεων σύμφωνα με την πολλαπλότητα τους. Ο παράγοντας R_{meas} δίνεται από τον τύπο:

$$R_{meas} = \frac{\sum_h \sqrt{\frac{n_h}{n_h - 1}} \sum_i^{n_h} |\bar{I}_h - I_{h,i}|}{\sum_h \sum_i^{n_h} I_{h,i}} \quad \text{με} \quad \bar{I}_h = \frac{1}{n_h} \sum_i^{n_h} I_{h,i}$$

όπου n_h είναι η πολλαπλότητα των δεδομένων (Diederichs & Karplus, 1997) .

Η συγχώνευση των δεδομένων αναφέρεται στην εύρεση ανακλάσεων με κοινούς δείκτες hkl ή στην εύρεση συμμετρικών ανακλάσεων ώστε να συμπεριληφθούν οι ταυτόσημες ανακλάσεις εντός του ίδιου συνόλου δεδομένων ή διαφορετικών. Η αναγωγή τους σε κοινή κλίμακα (scaling) λαμβάνει χώρα όταν το άθροισμα των εντάσεων ενός συνόλου δεδομένων εξισώνεται με το άθροισμα του δεύτερου. Η διαδικασία αναγωγής σε κοινή κλίμακα γίνεται σε στοιβάδες (bins, shells) εξαρτώμενες από την διακριτικότητα. Αυτό συμβαίνει γιατί i) η διαφορά στην διαδρομή των διαθλωμένων ακτίνων-X συνεπάγεται διαφορετικό βαθμό απορρόφησης και ii) η αλλοίωση λόγω φθοράς από την συνεχή ακτινοβολία επηρεάζει διαφορετικά τα δεδομένα σε σχέση με την διακριτικότητα. Κατά συνέπεια τα συστηματικά λάθη που υπεισέρχονται εξαρτώνται από την διακριτικότητα.

2.8.4 Στατιστική ανάλυση Wilson

Η κατανομή Wilson (Wilson, 1942, 1949) είναι η κατανομή πιθανοτήτων των παραγόντων δομής. Ισχύει όταν γνωρίζουμε πόσα άτομα από κάθε είδος είναι στον κρύσταλλο, αλλά δεν γνωρίζουμε την θέση τους. Φέρει όλη την σφαιρικά στρωγγυλοποιημένη στο μέσο όρο (spherically averaged) πληροφορία της σκέδασης σε υψηλή διακριτικότητα. Οι αποκλίσεις που παρουσιάζονται στο διάγραμμα Wilson από μία ευθεία γραμμή είναι γνωστές ως επιδράσεις Debye (Giacovazzo, 1998) καθώς μοντελοποιούνται από την εξίσωση Debye (Debye, 1915) και οφείλονται κυρίως στην στερεοχημεία της μοριακής δομής (Zwart & Lamzin, 2003). Στην κρυσταλλογραφία η στρωγγυλοποίηση λαμβάνει χώρα προς όλες τις κατευθύνσεις του παράγοντα δομής για μία δεδομένη απόσταση του αντίστροφου πλέγματος, ενώ δεν υπολογίζεται η περιοδικότητα του πλέγματος ή άλλα φαινόμενα πακεταρίσματος καθιστώντας την εξίσωση Wilson έγκυρη αυστηρά και μόνο για μία στοιχειώδη κυψελίδα ή μόριο.

Από την προσεγγιστική ευθεία Wilson:

$$\ln \frac{\overline{F_{rel}^2}}{\sum_{i=1}^N f_{oi}^2} = -2B(\sin \theta / \lambda)^2 + \ln K$$

η οποία ισχύει για τα δεδομένα υψηλής διακριτικότητας υπολογίζεται ο συντελεστής B της ομοιόμορφης θερμικής δόνησης των ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυστάλλου (καθολικός θερμικός παράγοντας) και εκτιμάται ο συντελεστής K ο οποίος χρησιμοποιείται για να μπου οι εντάσεις στην απόλυτη κλίμακα. Όπου F_{rel} είναι οι σχετικοί (relative) παράγοντες δομής ($\overline{F_{rel}^2} = K \overline{F_{abs}^2}$) και F_{abs} οι απόλυτοι. f_{oi} είναι ο ατομικός παράγοντας σκέδασης στην θερμοκρασία του απολύτου μηδενός, που για γωνία σκέδασης $\theta = 0^\circ$ ισούται με τον ατομικό αριθμό του στοιχείου.

2.8.5 Μετασχηματισμός Fourier – Εξίσωση Ηλεκτρονικής Πυκνότητας

Η ηλεκτρονική πυκνότητα (ρ) σε κάθε σημείο x, y, z του πραγματικού χώρου σχετίζεται με τις ανακλάσεις hkl που προκύπτουν από το αντίστροφο πλέγμα μέσω μετασχηματισμού Fourier:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l \mathbf{F}(hkl) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)]$$

Για την επιτέλεση του μετασχηματισμού είναι απαραίτητη η γνώση των παραγόντων δομής $\mathbf{F}(\text{hkl})$. Οι παράγοντες δομής είναι όμως μιγαδικές ποσότητες (αριθμοί) οι οποίοι χαρακτηρίζονται από πλάτος και φάση: $\mathbf{F}(\text{hkl}) = |\mathbf{F}(\text{hkl})| \exp[i\alpha]$. Το πλάτος τους, $|\mathbf{F}(\text{hkl})|$, είναι ανάλογο της τετραγωνικής ρίζας της έντασης, $I(\text{hkl})$, των παρατηρούμενων ανακλάσεων και συνεπώς πειραματικά γνωστό. Οι φάσεις όμως, $\alpha(\text{hkl})$, δεν μπορούν να παρατηρηθούν άμεσα.

Ένας ειδικός όρος της εξίσωσης μετασχηματισμού Fourier είναι ο $\mathbf{F}(000) = |\mathbf{F}(000)| \exp[0]$. Η τιμή της φάσης σε αυτήν την περίπτωση είναι μηδενική καθώς δεν υπάρχει στην πραγματικότητα διαφορά φάσης με την πρωτογενή ακτινοβολία. Η ανάκλαση (000) δεν είναι πειραματικά δυνατό να παρατηρηθεί καθώς βρίσκεται σε ευθυγράμμιση με την πρωτογενή ακτινοβολία. Παρόλα αυτά ο παράγοντας δομής $\mathbf{F}(000)$ προσθέτει έναν σταθερό όρο στον μετασχηματισμό Fourier, ο οποίος αντιστοιχεί στον συνολικό αριθμό των ηλεκτρονίων στην στοιχειώδη κυψελίδα. Η συνεισφορά στον χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας από όλους τους άλλους όρους του μετασχηματισμού έχει μέση τιμή το μηδέν. Έτσι η τιμή της μέσης ηλεκτρονικής πυκνότητας στην στοιχειώδη κυψελίδα είναι μηδενική αν ο όρος $\mathbf{F}(000)$ δεν ενσωματώνεται στην πρόσθεση Fourier. Κατά την εφαρμογή της εξίσωσης προστίθεται ένας σταθερός όρος στην εξίσωση για την απομάκρυνση της αρνητικής ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ο σταθερός αυτός όρος για την αναγωγή σε απόλυτη κλίμακα¹⁸ υπολογίζεται από την ευθεία του διαγράμματος Wilson, (§ 2.8.4).

2.8.6 Μοριακή Αντικατάσταση

Η μέθοδος της Μοριακής Αντικατάστασης χρησιμοποιείται για την εύρεση των φάσεων στην κρυσταλλογραφία. Σε αυτήν την μέθοδο απαιτείται η χρήση ενός πρωταρχικού μοντέλου, συνήθως από μια ομόλογη πρωτεΐνη. Η ομόλογη δομή τοποθετείται μέσα στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυστάλλου ώστε να υπολογιστούν οι αρχικές φάσεις. Η τοποθέτηση της ομόλογης δομής στον χώρο της στοιχειώδους κυψελίδας απαιτεί την εξαδιάσταση αναζήτηση που αντιστοιχεί στις τρεις συντεταγμένες θέσης x , y και z και σε τρεις γωνίες περιστροφής κατά Euler που ορίζουν τον προσανατολισμό της ομόλογης δομής. Η εξαδιάστατη έρευνα προς χάριν της ταχύτητας των υπολογισμών χωρίζεται σε δύο τριδιάστατες αναζητήσεις. Αρχικά ερευνάται ο σωστός προσανατολισμός του μακρομορίου μέσω συνάρτησης περιστροφής και στην συνέχεια η θέση του στον χώρο της στοιχειώδους κυψελίδας.

2.8.6.1 Συνάρτηση Patterson

Στην Μοριακή Αντικατάσταση χρησιμοποιείται η συνάρτηση Patterson, ο υπολογισμός της οποίας δεν απαιτεί την γνώση των φάσεων παρά μόνο τα διαθέσιμα τα πλάτη των παραγόντων δομής. Μπορούν έτσι να κατασκευαστούν οι χάρτες Patterson μέσω του υπολογισμού της ομώνυμης συνάρτησης:

$$P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}|^2 \cos 2\pi(hu + kv + lw)$$

Η συνάρτηση Patterson αναπαριστά την συνέλιξη (convolution)¹⁹ της κατανομής της ηλεκτρονικής πυκνότητας με την αντίστροφη αυτής. Αναφέρεται δε στον πραγματικό χώρο και καθορίζεται σε κάθε σημείο u , v , w ενός τριδιάστατου πεδίου που γεμίζει το χώρο με το μέγεθος και το σχήμα μιας στοιχειώδους κυψελίδας. Οι συντεταγμένες u , v , w αναπαριστούν

¹⁸ Η αναγωγή των πειραματικών παραγόντων δομής, F_{obs} , σε απόλυτη κλίμακα είναι σημαντική επίσης για την σύγκριση τους με τους εξ' υπολογισμού παράγοντες δομής, F_{calc} . Οι εξ' υπολογισμού παράγοντες δομής αναφέρονται στο προτεινόμενο μοντέλο δομής.

¹⁹ Η συνέλιξη είναι μία μαθηματική πράξη η οποία παράγει από δύο συναρτήσεις, f και g , μία τρίτη. Η τρίτη συνάρτηση αναπαριστά το ποσοστό υπέρθεσης μεταξύ της f και μιας ανεστραμμένης και μετατιθέμενης μορφής της g .

ένα διάνυσμα μεταξύ ενός ατόμου 1 (x_1, y_1, z_1) και ενός άλλου ατόμου 2 (x_2, y_2, z_2) έτσι ώστε $(u, v, w) = (x_1 - x_2, y_1 - y_2, z_1 - z_2)$. Μια κορυφή στον χάρτη Patterson με στοιχεία (u, v, w) δηλώνει την παρουσία ανύσματος με σημείο έναρξης την αρχή του χάρτη και σημείο κατάληξης την θέση (u, v, w) . Το συγκεκριμένο αυτό διάνυσμα δηλώνει ότι τουλάχιστον μια θέση του στην ανταποκρινόμενη δομή έχει και τα δύο της άκρα σε ατομικές θέσεις. Αν το ζεύγος των ατόμων αυτών ανήκει στο ίδιο μόριο τότε το αντίστοιχο διάνυσμα είναι σχετικά βραχύ και το σημείο κατάληξης του είναι σχετικά κοντά στην αρχή των αξόνων του χάρτη Patterson. Αυτά τα διανύσματα ονομάζονται self-vectors. Στην αντίθετη περίπτωση όπου το ζεύγος των ατόμων ανήκει σε διαφορετικά μόρια τότε τα αντίστοιχα διανύσματα ονομάζονται cross-vectors. Η σπουδαιότητα του διαχωρισμού αυτού έγκειται στο γεγονός ότι η 'εσωτερική' περιοχή του χάρτη Patterson που εμπεριέχει τα self-vectors διανύσματα είναι ίδια για όμοια μόρια. Αν ένας αριθμός ταυτόσημων μορίων εμπεριέχεται στην ασύμμετρη μονάδα τότε η κατανομή των διανυσμάτων self-vectors είναι η ίδια εκτός από μία περιστροφή η οποία αντιστοιχεί σε μη-κρυσταλλογραφική περιστροφή στον πραγματικό χώρο των μορίων.

2.8.6.2 Συνάρτηση αυτό-περιστροφής

Αν η συνάρτηση Patterson, P_{nat} , υπερτεθεί με μία ορθώς περιστραμμένη συνάρτηση του εαυτού της, P_{mod} , τότε θα αποκαλυφθούν μέγιστα σημεία, κορυφές υπέρθεσης, τα οποία αντικατοπτρίζουν την μη κρυσταλλογραφική συμμετρία του σωματιδίου. Η προκύπτουσα συνάρτηση ονομάζεται συνάρτηση αυτοπεριστροφής:

$$R(\kappa, \phi, \omega) = \int_{F_{min}}^{F_{max}} P_{nat}(\mathbf{u}) P_{mod}(\kappa, \phi, \omega, \mathbf{u}) d\mathbf{u}$$

(Rossmann & Blow, 1962).

2.8.7 Σύνθεση διαφορών Fourier

Για την αποφυγή φαινομένων εισαγωγής προκατάληψης (bias) στις υπολογιζόμενες φάσεις από το χρησιμοποιούμενο μοντέλο συνήθως χρησιμοποιούνται εναλλακτικοί υπολογισμοί Fourier της ηλεκτρονικής πυκνότητας. Σε αυτούς το πλάτος κάθε όρου είναι της μορφής $(|n\mathbf{F}_{obs}| - |\mathbf{F}_{calc}|)$, έτσι μειώνεται η επιρροή από το μοντέλο αφαιρώντας τα πλάτη του εξ υπολογισμού παράγοντα δομής από κάποιο πολλαπλάσιο των παρατηρούμενων πλατών σε κάθε όρο της σύνθεσης Fourier.

Για $n=1$ η σειρά Fourier καλείται σύνθεση $\mathbf{Fo}-\mathbf{Fc}$:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l (|Fo| - |Fc|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) - a'_{calc}]$$

Ένας ισουψής χάρτης αυτής της σύνθεσης δίνει έμφαση στα λάθη του τρέχοντος μοντέλου αλλά δεν διαθέτει την οικεία εμφάνιση της μοριακής επιφάνειας που προσφέρει ένας χάρτης σύνθεσης \mathbf{Fo} και είναι δύσκολος να ερμηνευθεί στην αρχή της βελτιστοποίησης του μοντέλου, ενώ είναι αρκετά χρήσιμος κοντά στο τέλος του προσδιορισμού της δομής.

Ένας ευκολότερα ερμηνεύσιμος χάρτης είναι ο χάρτης $2\mathbf{Fo}-\mathbf{Fc}$ ο οποίος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l (2|Fo| - |Fc|) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz) - a'_{calc}]$$

2.8.8 Βελτιστοποίηση του μοντέλου

Η βελτιστοποίηση είναι το τελευταίο στάδιο του προσδιορισμού μιας δομής. Το μοντέλο που έχει προκύψει έπειτα από τον προσδιορισμό των φάσεων τροποποιείται κατάλληλα ώστε να

προκύψει η καλύτερη δυνατή συμφωνία μεταξύ των εξ υπολογισμού (από το τρέχον ατομικό μοντέλο) παραγόντων δομής F_{calc} και των πειραματικών F_{obs} . Η συμφωνία μεταξύ F_{calc} και F_{obs} ελέγχεται σε όλα τα βήματα μέσω του παράγοντα R.

$$R = \frac{\sum \|F_{obs} - F_{calc}\|}{\sum |F_{obs}|}$$

Καθώς ο παράγοντας R επηρεάζεται από τον αριθμό των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του μοντέλου και τον αριθμό των γνωστών δεδομένων η τιμή του μπορεί να ελαχιστοποιηθεί και σε περιπτώσεις ελλιπούς μοντέλου ή συσσωρευσης σφαλμάτων. Για αυτούς τους λόγους χρησιμοποιείται επιπλέον ο παράγοντας R_{free} ως ανεξάρτητος έλεγχος της αξιοπιστίας του μοντέλου (Brünger, 1992). Το αρχικό σύνολο δεδομένων διαχωρίζεται σε δύο άνισα υποσύνολα. Το υποσύνολο εργασίας (working set) και το υποσύνολο ελέγχου (testing set). Το υποσύνολο ελέγχου διαθέτει το 5% των δεδομένων, ενώ το υποσύνολο εργασίας το υπόλοιπο 95%. Το υποσύνολο ελέγχου δεν συμμετέχει στη βελτιστοποίηση και από αυτό υπολογίζεται ο παράγοντας R_{free} . Αν η βελτιστοποίηση που λαμβάνει χώρα επιτυγχάνει τη μείωση του παράγοντα R και συγχρόνως επιτυγχάνει και τη μείωση του παράγοντα R_{free} , δεχόμενοι μία διαφορά της τάξης του 5% μεταξύ των παραγόντων, τότε το βήμα της βελτιστοποίησης γίνεται αποδεκτό και συνεχίζουμε στο επόμενο βήμα από αυτό το σημείο.

Η βελτιστοποίηση λαμβάνει χώρα με τη μέθοδο προσομοίωσης ανόπτησης για την υπερσκέλιση των τοπικών ενεργειακών ελάχιστων και την εύρεση του καθολικού τοπικού ελάχιστου της συνάρτησης στόχου. Στην περίπτωση χρήσης συνάρτησης όπου λαμβάνει χώρα τροποποίηση μόνο των ατομικών θέσεων κατά την ελαχιστοποίηση τότε η βελτιστοποίηση καλείται βελτιστοποίηση θέσεων (positional refinement) ενώ κατά τον προσανατολισμό τμημάτων του μοντέλου μεταξύ τους ως δομικά άκαμπτα μέρη η βελτιστοποίηση καλείται rigid body.

2.8.9 Βασικό πρωτόκολλο συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων Κρυσταλλογραφίας

Η συλλογή δεδομένων περιθλασης από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους πραγματοποιήθηκε στις γραμμές ακτινοβολίας BW7A και X11²⁰ του ευρωπαϊκού συγχροτόνιου DESY.

Κατάλληλος κρύσταλλος επιλέγεται με την βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (στερεοσκοπίου), φέρων ευκρινή περωτικά στοιχεία (έδρες και ακμές), ενώ αποφεύγονται οι περιπτώσεις κρυστάλλων με οπτική διδυμία και σχισμές. Ο κρύσταλλος μεταφέρεται με την βοήθεια ειδικής θηλιάς (βρόχου) στην γωνιομετρική κεφαλή ώστε να επιτευχθεί γρήγορα και ικανοποιητικά η ευθυγράμμιση του με την δέσμη της πρωτογενούς ακτινοβολίας. Κατά την τοποθέτηση του στην γωνιομετρική κεφαλή συναντά και το ρεύμα αζώτου, το οποίο τον ψύχει στους -170°C. Η ευθυγράμμιση επιτυγχάνεται με διαδοχικές ρυθμίσεις των ειδικών κοχλιών της γωνιομετρικής κεφαλής. Αποσκοπεί δε στην εύρεση κατάλληλης θέσης ώστε κατά την πλήρη περιστροφή του κρυστάλλου, αυτός να παραμένει σταθερά στη θέση αυτή. Η διαδικασία λόγω του εξαιρετικά μικρού μεγέθους των πρωτεϊνικών κρυστάλλων λαμβάνει χώρα με την βοήθεια κατάλληλα τοποθετημένης μεγεθυντικής κάμερας. Ακολούθως ασφαρίζεται ο πειραματικός κλωβός και η διαδικασία συλλογής δεδομένων λαμβάνει χώρα μέσω κατάλληλου λογισμικού.

Η μέθοδος συλλογής δεδομένων είναι η μέθοδος περιστρεφόμενου κρυστάλλου. Ορίζεται έτσι η γωνία περιστροφής, ο χρόνος ακτινοβολίας ανά περιστροφή²¹, η απόσταση του ανιχνευτή και η συνολική περιστροφή του κρυστάλλου. Η τελευταία εξαρτάται από την χωροομάδα συμμετρίας του κρυστάλλου.

Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή MARCCD (MarResearch). (Γα χαρακτηριστικά των γραμμών ακτινοβολίας παρουσιάζονται στο παράρτημα III).

²⁰ Οι γραμμές ακτινοβολίας BW7A και X11 εδράζουν στον αποθηκευτικό δακτύλιο DORIS III.

²¹ Κατά την διαδικασία συλλογής χρησιμοποιείται ακτινοβολία συγχροτόνιου και καθώς η ακτινοβολία δεν είναι σταθερής έντασης ορίζεται η δόση ακτινοβολίας και όχι ο χρόνος ακτινοβολίας.

Η επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων έγινε με τα προγράμματα DENZO (HKL package, Otwinowski & Minor, 1997) ή MOSFLM (CCP4, Collaborative Computational Program number 4, Powel, 1999).

Στη συνέχεια το πρόγραμμα TRUNCATE (CCP4) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των πλατών των παραγόντων δομής F_{obs} από τις εντάσεις, I . Η διαδικασία περιλαμβάνει τον υπολογισμό της βέλτιστης εκτίμησης του F από τις I και τα $\sigma(I)$ ακολουθώντας την διαδικασία French & Wilson (1978). Η κατανομή Wilson υπολογίζεται σε ένα πρώτο γύρο για τα κεντροσυμμετρικά²² και ακεντρικά²³ δεδομένα. Στη συνέχεια τα F τοποθετούνται σε μία κατά προσέγγιση απόλυτη κλίμακα κάνοντας χρήση του παράγοντα κλίμακας K που υπολογίζεται από το διάγραμμα Wilson (Πλαίσιο 2.3). Το πρόγραμμα παράγει επίσης μία σειρά χρήσιμων στατιστικών των κατανομών της έντασης όπως την αθροιστική κατανομή η οποία αποκτά χαρακτηριστικό σιγμοειδές σχήμα σε περιπτώσεις πλήρους κρυσταλλικής διδυμίας²⁴.

Η συνάρτηση Patterson για τα δεδομένα των κρυστάλλων της AntiPphF ORF1 υπολογίστηκε με το πρόγραμμα FFT (CCP4), ενώ η συνάρτηση αυτοπεριστροφής με τα προγράμματα POLARRFN και MOLREP (CCP4).

Αρχικά βήματα για την βελτιστοποίηση του μοντέλου έλαβαν χώρα με τα προγράμματα REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) (CCP4) και CNS (Brunger *et al.*, 1990, Pannu & Read, 1996), ενώ ο διαχωρισμός του συνόλου δεδομένων σε υποσύνολο εργασίας και υποσύνολο ελέγχου έλαβε χώρα πριν την έναρξη της βελτιστοποίησης με την βοήθεια της CCP4. Η οπτική παρατήρηση του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας και η υπέρθεση του μοντέλου έλαβε χώρα με το πρόγραμμα γραφικών Xfit (McRee, 1999).

2.9 Κυκλικός διχρωσμός

2.9.1 Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωσμού

Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένα κύματα²⁵, σε ένα δεξιόστροφο και σε ένα αριστερόστροφο ίδιας φάσης, μήκους κύματος και πλάτους ταλάντωσης. Κατά την διέλευση επίπεδα πολωμένου φωτός από μέσο που έχει την ιδιότητα να απορροφά διαφορετικά το αριστερά κυκλικά πολωμένο φως από το δεξιά κυκλικά πολωμένο φως, παράγεται ένα κύμα που αντί να ταλαντώνεται σε ένα επίπεδο περιστρέφεται ελλειψοειδώς και ονομάζεται ελλειπτικά πολωμένο φως (Sreerama & Woody, 2004). Επίσης κατά την διέλευση ενός επίπεδα πολωμένου φωτός από μέσο που έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης για το δεξιά από ότι για το αριστερά πολωμένο φως τότε το αρχικό επίπεδα πολωμένο φως στρέφει την γωνία του επιπέδου ταλάντωσης του και το φαινόμενο ονομάζεται κυκλική διπλοδιαθλαστικότητα (ORD, Optical Rotatory Dispersion). Και τα δύο φαινόμενα δημιουργούνται από την ασύμμετρη μοριακή δομή της ύλης και σχετίζονται μεταξύ τους μέσω του μετασχηματισμού Kronig-Kramer²⁶.

²² Στις κεντροσυμμετρικές ανακλάσεις η φάση υπόκειται σε περιορισμούς. Κάθε άτομο διαθέτει ένα συμμετρικό άτομο έτσι ώστε η συνδυασμένη συνεισφορά στον παράγοντα δομής να είναι $e^{2\pi i(h|S|)} + e^{2\pi i(h|S|)} = e^{2\pi i\varphi_c}(e^{2\pi i\varphi} + e^{-2\pi i\varphi}) = e^{2\pi i\varphi_c}(2\cos \varphi)$. Η φάση μπορεί έτσι να είναι $\varphi_c \pm \pi$ αν $\cos \varphi > 0$ ή $\varphi_c + \pi$ αν $\cos \varphi < 0$. Στην πραγματικότητα οι τιμές που παίρνει το φ_c είναι 0, $\pi/6$, $\pi/4$, $\pi/3$, κ.ο.κ. Συγκεκριμένα στην χωροομάδα $P2_12_12_1$ με συμμετρικές θέσεις τις x, y, z και $-x+1/2, y+1/2, -z$, για την ζώνη $(h \ 0 \ l)$ και h άρτιο όλες οι φάσεις είναι 0 ή π , ενώ για h περιττό $\pi/2$ και $-\pi/2$.

²³ Στις ακεντρικές ανακλάσεις η φάση για κάθε άτομο κατανέμεται τυχαία και δεν υπόκειται σε περιορισμούς

²⁴ Η περίπτωση της κρυσταλλικής διδυμίας εμφανίζεται συχνά και αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στην κρυσταλλογραφία. Λαμβάνει χώρα όταν δύο διαφορετικοί κρύσταλλοι διαμοιράζονται μερικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος κατά συμμετρικό τρόπο. Ως αποτέλεσμα παρατηρείται η ενδοανάντιξη δύο ξεχωριστών κρυστάλλων σε πληθώρα ειδικών διαμορφώσεων.

²⁵ Το κυκλικά πολωμένο φως με την σειρά του μπορεί να αναλυθεί σε δύο επίπεδα πολωμένα κύματα ίδιου μήκους κύματος και πλάτους ταλάντωσης με διαφορά φάσεως όμως $\pm 90^\circ$ τα οποία ταλαντώνονται σε κάθετα επίπεδα. Όταν η διαφορά φάσεως των δύο κυμάτων είναι $+90^\circ$ τότε το κυκλικά πολωμένο φως κινείται δεξιόστροφα ενώ όταν η διαφορά τους είναι -90° κινείται αριστερόστροφα.

²⁶ Ο μετασχηματισμός Kramers-Kronig συσχετίζει το πραγματικό μέρος μίας αναλυτικής μιγαδικής συνάρτησης με το ολοκλήρωμα που εμπεριέχει το φανταστικό μέρος της συνάρτησης και το αντίστροφο.

Στην περίπτωση διαλύματος μίας οπτικά ενεργής ουσίας ισχύουν οι παρακάτω σχέσεις. Ο κυκλικός διχρωσμός ορίζεται ως:

$$\Delta\epsilon(\lambda) = \epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)$$

όπου $\epsilon_L(\lambda)$ και $\epsilon_R(\lambda)$ είναι οι συντελεστές απόσβεσης για τα αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένα συστατικά του κύματος, όπου λ το μήκος κύματος. Το $\Delta\epsilon(\lambda)$ εκφράζεται σε μονάδες $[1/M \cdot \text{cm}]$, όπου M η γραμμομοριακή συγκέντρωση.

Ο κυκλικός διχρωσμός μετατρέπεται σε γραμμομοριακή ελλειπτικότητα, $[\theta]$, μέσω της σχέσης:

$$[\theta] = 3298 \Delta\epsilon$$

Η γραμμομοριακή ελλειπτικότητα είναι επίσης μία μέτρηση του φαινομένου του κυκλικού διχρωσμού και εκφράζεται ως:

$$[\theta] = 100 \cdot \theta / C \cdot l$$

όπου C και l είναι η γραμμομοριακή συγκέντρωση και το μήκος διαδρομής (cm) του κύματος εντός του μέσου. Εκφράζεται σε μονάδες $[\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmole}^{-1}]$ ή σε μονάδες $[\text{deg} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$.

Οι πρωτεΐνες είναι ασύμμετρα μόρια καθώς αποτελούνται από L-αμινοξέα ενώ οι δευτεροταγείς δομές που σχηματίζουν είναι επίσης ασύμμετρες και κατά συνέπεια οπτικά ενεργές. Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού στις πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε τρία εύρη μηκών κύματος: i) Στην περιοχή του άπω – υπεριώδους (κάτω των 250 nm) όπου κυριαρχεί η συνεισφορά των πεπτιδικών δεσμών, ii) στην περιοχή του εγγύς- υπεριώδους (250 – 300 nm) όπου συμβάλλουν κυρίως οι πλευρικές αρωματικές ομάδες και iii) η ορατή περιοχή (300 – 700 nm) όπου συνεισφέρουν τα χρωμοφόρα που δυνητικά φέρουν μερικές πρωτεΐνες.

Στην περιοχή του πεπτιδικού δεσμού το σήμα του κυκλικού διχρωσμού είναι σε θέση να δώσει πληροφορία για το είδος της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Οι α-έλικες και τα β-φύλλα χαρακτηρίζονται από ένα χαρακτηριστικό ζεύγος τιμών των διεδρων γωνιών τους που επαναλαμβάνεται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Μία άλλη σημαντική δευτεροταγής δομή είναι η β-στροφή που σχηματίζεται από τρία αμινοξέα και σταθεροποιείται από έναν δεσμό υδρογόνου μεταξύ της πρώτης και τρίτης αμινομάδας. Συγκεκριμένες διεδρες γωνίες διαθέτει επίσης και η έλικα πολυπρολίνης τύπου II, η οποία συναντάται σε μικρό βαθμό στις πρωτεΐνες. Οι δομές αυτές με τις επαναλαμβανόμενες φ και ψ γωνίες δίνουν χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωσμού. Στην περίπτωση των α-ελίκων εμφανίζονται αρνητικές κορυφές στα 222 και 208 nm ενώ εμφανίζεται μία θετική κορυφή στα 192 nm. Στην περίπτωση των β-φύλλων εμφανίζονται δύο τυπικά φάσματα. Στο πιο συχνά απαντούμενο παρατηρείται μία αρνητική κορυφή στα 215 nm και μία θετική στα 198 nm. Στην περίπτωση των ελίκων πολυπρολίνης τύπου II εμφανίζεται μία αρνητική κορυφή στα 206 nm και μία θετική στα 226 nm. Αυτό το φάσμα χαρακτηρίζει συνήθως αραιές περιπτώσεις πρωτεϊνών που θεωρούνται εγγενώς αδίπλωτες.

2.9.2 Επεξεργασία δεδομένων κυκλικού διχρωσμού

2.9.2.1 Εκτίμηση ποσοτών δευτεροταγούς δομής

Όλες οι μέθοδοι ανάλυσης των φασμάτων κυκλικού διχρωσμού στο άπω υπεριώδες στηρίζονται στην υπόθεση ότι το φάσμα μίας πρωτεΐνης μπορεί να αναπαρασταθεί από έναν γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων των δευτεροταγών δομών που την αποτελούν, συμπεριλαμβάνοντας έναν όρο σφάλματος που αντιστοιχεί στην συνεισφορά από τα αρωματικά χρωμοφόρα και τους δισουλφιδικούς δεσμούς στην περιοχή του άπω υπεριώδους:

$$C_\lambda = \sum f_k B_{k\lambda}$$

όπου C_λ το φάσμα κυκλικού διχρωσμού της πρωτεΐνης, $B_{k\lambda}$ τα φάσματα των στοιχειωδών δευτεροταγών δομών και f_k το κλάσμα κάθε δευτεροταγούς δομής k .

Για ένα σύνολο N πρωτεϊνών αναφοράς γνωστής δομής και φασμάτων κυκλικού διχρωσμού διαθέτουμε N γραμμικές εξισώσεις με κοινά στοιχεία τα φάσματα των στοιχειωδών δευτεροταγών δομών, $B_{k\lambda}$. Ελαχιστοποιώντας την διαφορά με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος

κυκλικού διχρωισμού θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε τα B_{kl} χρησιμοποιώντας ως περιορισμό ότι το άθροισμα των συνεισφορών των φασμάτων δευτεροταγούς δομής ισούται με 1. Παρόλα αυτά λόγω του μεγαλύτερου αριθμού των αγνώστων η λύση γίνεται εξαιρετικά ασταθής και κατά συνέπεια αναξιόπιστη. Αντί της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιείται η μέθοδος Ψευδο-Ορθογώνιας Παλινδρόμησης (Ridge regression) μέσω του προγράμματος CONTIN (Provencher & Glockner, 1981). Η μέθοδος προσεγγίζει το πειραματικό φάσμα (C_{λ}^{obs}) ως γραμμικό συνδυασμό των φασμάτων αναφοράς ελαχιστοποιώντας την συνάρτηση:

$$\sum_{\lambda} (C_{\lambda}^{calc} - C_{\lambda}^{obs})^2 + \alpha^2 \sum_{j=1}^N (v_j - N^{-1})^2$$

όπου α είναι η τιμή εξομάλυνσης και v_j είναι ο συντελεστής του φάσματος κυκλικού διχρωισμού για την j -οστή πρωτεΐνη αναφοράς που χρησιμοποιείται για την κατασκευή του φάσματος C_{λ}^{calc} . Οι δευτεροταγείς δομές που ανταποκρίνονται στο πειραματικό φάσμα υπολογίζονται με την χρήση των συντελεστών v_j :

$$f_k^{calc} = \sum_j v_j f_k^j$$

Ως περιορισμοί χρησιμοποιούνται οι κανόνες $f_k \geq 0$ και $\sum f_k = 1$. Η μέθοδος δίνει ένα εύρος λύσεων εξαρτώμενο από την τιμή α , μικρές τιμές της α δίνουν λύσεις πλησιέστερες στην μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων ενώ μεγαλύτερες τιμές τείνουν να δίνουν λύσεις μεροληπτώντας υπέρ συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα επιλέγει λύσεις βασισμένες σε συγκεκριμένα κριτήρια. Στο πρόγραμμα CONTIN/LL, οι πρωτεΐνες του συνόλου αναφοράς διευθετούνται σε σειρά αυξανόμενης τιμής απόστασης RMS από το πειραματικό/υπό μελέτη φάσμα και οι πιο απομακρυσμένες τιμές απορρίπτονται ώστε να δημιουργηθεί ένα μικρότερο σύνολο αναφοράς. Σαν αποτέλεσμα καταλήγουμε με ένα σύνολο λύσεων για κάθε συνδυασμό. Η τελική λύση είναι η μέση λύση όλων των λύσεων που ικανοποιούν τους εξής κανόνες επιλογής: i) το άθροισμα των κλάσμάτων να είναι μεταξύ 0.95 και 1.05, ii) κάθε κλάσμα να είναι μεγαλύτερο του -0.025, iii) η τιμή RMSD μεταξύ του υπολογιζόμενου (μέσω ανασύστασης) και του πειραματικού φάσματος να είναι μικρότερη της 0.25 Δε και iv) το κλάσμα σε α -έλικα εκτιμάται από το πλήρες σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς και καθορίζεται η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή αποδοχής ως το τέταρτο κριτήριο για την σωστή λύση. Η απόδοση της ανάλυσης χαρακτηρίζεται από την τιμή της μέσης τετραγωνικής ρίζας της απόκλισης (RMSD) μεταξύ του πειραματικού και ανασυσταμένου φάσματος. Η RMS απόκλιση υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i^N (\theta_i^{exp} - \theta_i^{calc})^2}{N}}$$

όπου θ_i^{exp} και θ_i^{calc} είναι τα πειραματικά και ανασυσταμένα φάσματα αντίστοιχα.

Το πρόγραμμα SELCON3 περιλαμβάνει την τελευταία έκδοση της μεθόδου Αυτό-συνέπειας (self-consistent) για τον υπολογισμό της δευτεροταγούς δομής (Sreerama & Woody, 1993). Σε αυτή τη μέθοδο το υπό ανάλυση πειραματικό φάσμα περιλαμβάνεται σε έναν πίνακα φασμάτων κυκλικού διχρωισμού, C . Ο πίνακας F , αποτελεί τον πίνακα αναφοράς γνωστών προτύπων δευτεροταγούς δομής και καθορίζεται με βάση αυτόν τον πίνακα ο πίνακας X έτσι ώστε:

$$F = X C.$$

Ο πίνακας X φέρει την πληροφορία της σχέσης του πειραματικού φάσματος με αυτή της δευτεροταγούς δομής.

Η αρχική υπόθεση για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής είναι συνήθως το φάσμα της πρωτεΐνης αναφοράς με τις περισσότερες ομοιότητες. Η λύση αντικαθιστά την αρχική ειασσία και η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε κύκλους ώστε να φτάσει σε σύγκλιση. Η εξίσωση του πίνακα C , επιλύεται μέσω της μεθόδου Ανάλυσης Ιδιαζουσών Τιμών (SVD, singular value decomposition). Η λύση επιλέγεται ώστε να πληροί τα προαναφερθέντα 4 κριτήρια (σελίδα 72) που ισχύουν και στην περίπτωση του προγράμματος CONTIN/LL.

Στην μέθοδο που περιέχεται στο πρόγραμμα CDSSTR (Johnson, 1999) μόνο ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών αναφοράς απαιτείται για καλή ανάλυση των δεδομένων, οι οποίες επιλέγονται τυχαία. Ένας υψηλός αριθμός συνδυασμών πρωτεϊνών συντίθεται από ένα μεγάλο σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς δίνοντας ευκαμψία στην μέθοδο. Οι λύσεις εξασφαλίζονται επίσης μέσω μεθόδων αυτοσυνέπειας και χρήση αλγόριθμου Ανάλυσης ιδιαιζουσών τιμών (βλ. εδάφιο 2.9.2.3.2) και επιλέγονται για το αν πληρούν τα 4 προαναφερθέντα κριτήρια.

Τα τρία παραπάνω προγράμματα και το σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς που απαιτούνται συνδυάζονται στο λογισμικό πακέτο CDPPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro>) (Sreerama & Woody, 2000).

Στο πακέτο προγραμμάτων CDPPro ανήκει και το πρόγραμμα καθορισμού της τριτοταγής δομικής κλάσης των πρωτεϊνών βασισμένο στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού, CLUSTER (Sreerama *et al.*, 2001). Το πρόγραμμα στηρίζεται στην μέθοδο των Venyaminov και Vassilenko (1994). Με την χρήση 46 φυσικών πρωτεϊνών και 7 αποδιατεταγμένων στο εύρος μήκους κύματος 190-236 nm, κατασκευάζεται ένας χώρος 24 διαστάσεων που αντιπροσωπεύει τις τιμές της ελλειπτικότητας στα 24 μήκη κύματος. Πρωτεΐνες που ανήκουν σε διαφορετικές τριτοταγείς κλάσεις σχηματίζουν ξεχωριστές ομάδες σε αυτόν τον 24-D χώρο. Το CLUSTER καταχωρεί την υπό μελέτη πρωτεΐνη στην ανάλογη κλάση ($\alpha + \beta$, α/β , all α ή all β) στηριζόμενη στο πειραματικό της φάσμα και επιλέγει το κατάλληλο σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς για την περαιτέρω ανάλυση του φάσματος από τα προγράμματα CONTILL, CDSSTR και SELCON3.

2.9.2.2 Θερμοδυναμικός καθορισμός της αποδιάταξης

Ο κυκλικός διχρωισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Στην απλή μελέτη της καταγραφής του σήματος του κυκλικού διχρωισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας και σε περίπτωση μετάπτωσης δύο μόνο μορφών (από την F, αναδιπλωμένη (folded) στην U, αποδιατεταγμένη (Unfolded)) ισχύουν οι σχέσεις:

$$K = [F]/[U] = [F]/(1-[F]) \text{ και } \Delta G = nRT \ln K$$

όπου K είναι η σταθερά αποδιάταξης και ΔG η ελεύθερη ενέργεια της αναδιπλώσης. Το κλάσμα αναδιπλωμένης μορφής σε κάθε θερμοκρασία ισούται με:

$$\alpha = [F]/([F]+[U]) = K/(1+K) = (\theta_{\text{obs}} - \theta_U)/(\theta_F - \theta_U)$$

όπου θ_{obs} είναι η ελλειπτικότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας, θ_U η ελλειπτικότητα της αποδιατεταγμένης μορφής και θ_F η ελλειπτικότητα της αναδιπλωμένης μορφής. Για την προσέγγιση της σιγμοειδούς καμπύλης του σήματος κυκλικού διχρωισμού κατά την θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη χρησιμοποιούνται οι εξισώσεις:

$$\Delta G = \Delta H(1-T/T_M) - \Delta C_p((T_M - T) + T \ln(T/T_M)), K = \exp(-\Delta G/(RT)), \alpha = K/(1+K) \text{ και } [\theta]_{\text{obs}} = \alpha([\theta]_F - [\theta]_U) + [\theta]_U$$

όπου T_M είναι η θερμοκρασία μετάπτωσης και ΔC_p η θερμοχωρητικότητα της μετάπτωσης. Αρχικές τιμές των ΔH , ΔC_p , T_M , $[\theta]_F$ και $[\theta]_U$ εκτιμώνται και οι τιμές που δίνουν την καλύτερα εναρμονισμένη καμπύλη στην πειραματική προσεγγίζονται με την χρήση μη γραμμικών μεθόδων ελαχίστων τετραγώνων. Οι εξισώσεις γίνονται πιο πολύπλοκες σε περιπτώσεις εμφάνισης ενδιάμεσων μορφών κατά την αποδιάταξη. Εκτενές άρθρο για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών δεδομένων από καμπύλες μετάπτωσης είναι των Marky & Breslauer, (1987).

Η προσέγγιση της καμπύλης αποδιάταξης έλαβε χώρα με το λογισμικό της εταιρείας Jasco Corp. αφού διαπιστώθηκε μέσω της ανάλυσης SVD ότι κατά την αποδιάταξη υπάρχουν μόνο δύο μορφές, η αναδιπλωμένη και η αποδιατεταγμένη.

2.9.2.3 Επεξεργασία φασμάτων στο άπω υπεριώδες κατά την διάρκεια θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης

2.9.2.3.1 Ισοδιχρωικό σημείο

Η καταγραφή φασμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά την πορεία της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης και η υπέρθεση τους μπορεί να δηλώσει την απουσία ή

παρουσία ενδιάμεσων μορφών ανάλογα με την εμφάνιση ή όχι ενός κοινού ή περισσότερων iso-διασταυρούμενων σημείων (iso-crossing points), (Koide *et al.*, 1999). Στην περίπτωση καταγραφής φασμάτων κυκλικού διχρωισμού η συνολική ελλειπτικότητα των επιμέρους συστατικών παραμένει ανεξάρτητη της θερμοκρασίας στο μήκος κύματος λ όπου η ελλειπτικότητα της φυσικής (native) μορφής διασταυρώνεται με αυτή της αποδιατεταγμένης. Στην απλή περίπτωση αποδιάταξης δύο σταδίων όπου η φυσική πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται για να φτάσει στην μετουσιωμένη μορφή της άνευ συνάθροισης ενδιάμεσων πληθυσμών τότε όλα τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού περνούν από ένα κοινό σημείο καλούμενο ισοδιχρωικό.

2.9.2.3.2 Ανάλυση ιδιζουσών τιμών / SVD

Η ανάλυση ιδιζουσών τιμών ή SVD (Singular Value Decomposition) είναι ένα ισχυρό υπολογιστικό εργαλείο για την μελέτη πινάκων με ποικίλες εφαρμογές. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα μια γενική μέθοδος υπολογισμού του αριθμού των ανεξάρτητων συνιστωσών (διαφορετικών καταστάσεων της πρωτεΐνης) που εμφανίζονται λόγω χάρη στην διάρκεια μίας διαδικασίας μετάπτωσης. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την αποσύνθεση των φασμάτων του κυκλικού διχρωισμού κατά την διάρκεια της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης σε ορθογώνια φάσματα βάσης.

Τα φάσματα του άνω υπεριώδους σε όλες τις θερμοκρασίες ορίζουν έναν πίνακα A , όπου κάθε στήλη αντιστοιχεί σε ένα φάσμα σε συγκεκριμένη θερμοκρασία. Αν υπάρχει M αριθμός σημείων σε κάθε φάσμα και N αριθμός διαφορετικών θερμοκρασιών, ο πίνακας A είναι ένας πίνακας $M \times N$ στοιχείων. Η μέθοδος ανάλυσης ιδιζουσών τιμών χρησιμοποιείται για να αναλύσει τον πίνακα A στο γινόμενο τριών πινάκων: $A=UWV^T$. Οι στήλες του πίνακα U (πίνακας $M \times N$) αποτελούν ορθογώνια φάσματα βάσης ή άνυσματα. Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού είναι μία γραμμική υπέρθεση (linear superposition) των φασμάτων βάσης. Τα διαγώνια συστατικά του πίνακα W (πίνακας $N \times N$) ονομάζονται ιδιάζουσες τιμές (singular values) και διευθετούνται κατά σειρά μειωμένης τιμής. Τέλος τα συστατικά του πίνακα V , v_j^k , αντιστοιχούν στις προβολές του k -οστού πειραματικού φάσματος στο άνυσμα βάσης u_j .

Το γινόμενο WV^T καθορίζει την θερμοκρασιακά εξαρτημένη βαρύτητα (dependent weight) που εφαρμόζεται στα επιμέρους φάσματα βάσης όταν δομούνται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού ως εξής:

$$[\theta] = \sum_{j=1}^L w_j v_j^k u_j$$

όπου L είναι ο ελάχιστος αριθμός απαραίτητων συνιστωσών για την αναδόμηση των φασμάτων. Στις περισσότερες πειραματικές περιπτώσεις μόνο οι πρώτοι L όροι συνεισφέρουν σημαντικά στην ανακατασκευή των πειραματικών φασμάτων. Οι ιδιάζουσες τιμές w_j που παίρνουν πολύ μικρή τιμή ($j > L$) αντιστοιχούν σε v_j^k που διευθετούνται σε τυχαίες διακυμάνσεις γύρω από το μηδέν σαν συνάρτηση του k και αναπαριστούν θόρυβο. Το L αναπαριστά τον αριθμό των ανεξάρτητων συνιστωσών (μορφών) κατά την μετάπτωση, τον ελάχιστο δηλαδή αριθμό θερμοδυναμικών σταδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία αποδιάταξης. Ο ελάχιστος αριθμός συνιστωσών L καθορίζεται ως εξής: i) από τις ιδιάζουσες τιμές, ii) εξετάζοντας την αλλαγή με την θερμοκρασία των προβολών v_j^k των πειραματικών φασμάτων στο φορέα βάσης u_j , iii) το σχήμα των φασμάτων βάσης u_j και iv) την μειωμένη τιμή ελαχίστου τετραγώνου κατά την αναδόμηση των φασμάτων:

$$\chi_p^2 = \frac{1}{(NM - 1)} \sum_{k=1}^N \sum_{i=1}^M \left[\frac{([\theta](\lambda_i, T_k) - [\theta]_{calc, p}(\lambda_i, T_k))^2}{\sigma^k(\lambda_i)^2} \right]$$

όπου $[\theta]_{calc, p}(\lambda_i, T_k)$ είναι η καλύτερη αναδόμηση του k -οστού πειραματικού φάσματος χρησιμοποιώντας τις πρώτες p συνιστώσες στην εξίσωση αναδόμησης. Το L είναι η ελάχιστη τιμή του p για την οποία ισχύει: $\chi_p^2 \leq 1$.

Άρθρα αναφοράς και εγχειρίδια που αναφέρονται στην μέθοδο SVD: Wall *et al.*, (2003), Ακριβής & Δούγαλης (2000), Chen *et al.*, (1996).

Η Ανάλυση διαζουσών τιμών για τα πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης έλαβε χώρα στο λογισμικό EXCEL (MICROSOFT) κάνοντας χρήση του επιπρόσθετου εκτελέσιμου BiPlot.

2.10 Αναφορές

- Agarwal R.C. & Isaacs N.W., 1977. Method for obtaining a high resolution protein map starting from a low resolution map. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 2835.
- Altschul S.F. & Koonin E.V., 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST-a tool for discovery in protein databases. TIBS 23, 444.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389.
- Blundell T.L., & Johnson L.N., 1976. Protein Crystallography. Academic Press Inc. London LTD, pp 60-68.
- Brünger A.T., Krukowski A. & Erickson J., 1990. Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. Acta Cryst A46, 585.
- Brünger A.T., 1992. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. Nature 355, 472.
- Bystroff C. & Shao Y., 2002. Fully automated *ab initio* protein structure prediction using I-SITES, HMMSTR and ROSETTA. Bioinformatics 18, S54.
- Carter C.W. Jr & Carter C.W., 1979. Protein Crystallization using Incomplete Factorial experiments. J. Biol. Chem. 254, 12219.
- Chacón, P., F. Morán, J. F. Díaz, E. Pantos, and J. M. Andreu. 1998. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. Biophys. J. 74, 2760.
- Chen L., Hodgson K.O. & Doniach S., 1996. A lysozyme folding intermediate revealed by solution X-ray Scattering. J. Mol. Biol. 261, 658.
- Chernov A. A., 2003. Protein crystals and their growth. J. Struct. Biol. 142, 3-21.
- Collaborative Computational Project, Number 4, 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Cryst D50, 760.
- Cserzo M., Wallin E., Simon I., von Heijne G. & Elofsson A. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. Prot. Eng. 10,673.
- Debye P., 1915. Zerstreuung von Roentgenstrahlen. Ann. Physik. 46, 809.
- Debye P. & Hückel E., 1923. The theory of electrolytes. I. Lowering of freezing point and related phenomena. Physik. Z. 24, 185.
- Diederichs K. & Karplus P.A., 1997. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. Nat. Struct. Biol. 4, 269.
- Drenth J., 1995. Principles of Protein X-ray Crystallography, Springer-Verlag New York, pp 79.
- French G.S. & Wilson K.S., 1978. On the treatment of negative intensity observations. Acta. Cryst. A34, 517.
- García de la Torre J., Huertas M. L., & Carrasco B., 2000. Calculation of Hydrodynamic Properties of Globular Proteins from Their Atomic-Level Structure. Biophys J 78,719-730.
- Giacovazzo C., 1998. Direct phasing in crystallography. Oxford University Press
- Glatter O., 1977. A new method for the evaluation of small-angle scattering data. J. Appl. Cryst. 10, 415.
- Glatter O., 1982. Small-Angle X-ray Scattering, edited by O. Glatter & O. Kratky, pp. 119-196. London: Academic Press.
- Guinier A., Fournet G., 1955. Ed: C. B. Walker, and K. L. Yudowitch, Small-Angle Scattering of X-Rays (Wiley, New York), p. 17.
- Hofmeister F., 1888. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. Exp. Pathol. Pharmakol., 24, 247.
- Jankarik J. & Kim S.-H., 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. J. Appl. Cryst. 24, 409.
- Johnson, Jr., W.C. 1999. Analyzing protein CD for accurate secondary structures. Proteins Struct. Funct. Genet. 35, 307.
- Jones D.T., Taylor W.R. & Thornton J.M., 1992. A new approach to protein fold recognition. Nature 358, 86.
- Jones D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J. Mol. Biol. 292, 195.

- Kelley L. A., MacCallum R. M. & Sternberg M. J. E., 2000. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299(2), 499.
- Kirste R.G. & Oberthur R.C., 1982. In: Glatter O, Kratky O (eds) *Small-angle X-ray scattering*. Academic Press, New York, p 402.
- Koide S., Bu Z., Risal D., Phan T.-N., Nakagawa T., Tamura A. & Engelman D.M., 1999. Multistep denaturation of *Borrelia burgdorferi* OspA, a protein containing a single-layer β -sheet. *Biochem.* 38, 4757.
- Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J. & Svergun D.I., 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* 36, 1277.
- 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.
- Kozin & Svergun D.I., 2000. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Cryst* 34, 33.
- Kyte J. & Doolittle R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105.
- Losada L.C. & Hutcheson S.W., 2005. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol* 55,941-
- Marky L.A. & Breslauer K.J., 1987. Calculating Thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers.* 26, 1601.
- McGuffin L.J. & Jones D.T., 2003. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics* 19, 874.
- McPherson A., 1999. *Crystallization of Biological macromolecules*. Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, New York, pp 144-150.
- McRee D.E., 1999. XtalView/Xfit- a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density, *J. Struct. Biol.* 125, 156.
- Muñoz V. & Serrano L., 1996. Development of the Multiple Sequence Approximation Within the AGADIR model of α -helix formation: comparison with Zimm-Bragg and Lifson-Roig formalisms. *Biopolymers* 41, 495.
- Murshudov G.N., Vagin A.A. & Dodson E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst D*53, 240.
- Neagu A., Neagu M. & Der A., 2001. Fluctuations and the Hofmeister Effect. *Biophys. J.* 81, 1285.
- Otwinowski Z. & Minor W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307.
- Pannu N.S. & Read R.J., 1996. Improved structure refinement through maximum likelihood. *Acta Cryst.* A52, 659.
- Petoukhov M.V., Eadt N.A., Brown K.A. & Svergun D.I., 2002. Addition of Missing Loops and Domains to Protein Models by X-Ray Solution Scattering. *Biophys. J.* 83, 3113.
- Polayes D.A., 1996. Prokaryotic protein expression and purification with the PPROEXTMHT expression system. *Focus* 18, 50.
- Porod G., 1982. General Theory, in *Small-Angle X-ray Scattering*, edited by O. Glatter & O. Kratky. London: Academic Press.
- Powell H.R., 1999. The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Cryst.* D55, 1690.
- Provencher, S.W. & Glockner J., 1981. Estimation of globular protein secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155, 155.
- Prilusky J., Felder C.E., Zeev-Ben-Mordehai T., Rydberg E.H., Man O., Beckmann J.S., Silman I. & Sussman J. L., 2005. FoldIndex©: a simple tool to predict whether a given protein sequence is intrinsically unfolded. *Bioinformatics.* 21, 3435.
- Rossmann M.G. & Blow D.M., 1962. The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit, *Acta Cryst.* 15, 24.
- Rupp B., 2003. Maximum-likelihood crystallization. *J Struct Biol* 142, 162.
- Scopes R., 1984. *Protein purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag. New York
- Smith T.F. & Waterman M.S., 1981. Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology* 147, 195.
- Siegel L.M., & Monte K.J., 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. *Biochim Biophys Acta* 112, 346.
- Sreerama N. and Woody R.W., 1993. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 209, 32.
- 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.

- Sreerama N., Venyaminov S.Y., & Woody R.W., 2001. Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra Based on the Tertiary Structure Classification. *Anal Biochem* 299, 271.
- Sreerama N. & Woody R.W., 2004. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods Enzymol.* 383, 318.
- Segelke B.W., 2001. Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening *J Crystal Growth* 232, 553.
- Semenyuk A.V. & Svergun D.I., 1991. GNOM - a program package for small-angle scattering data processing. *J. Appl. Cryst.* 24, 537.
- Schäffer A.A., Aravind L., Madden T.L., Shavirin S., Spouge J.L., Wolf Y.I., Koonin E.V. & Altschul S.F., 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucl. Acid. Res.* 29, 2994.
- Svergun D.I., 1992. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria *J Appl Cryst.* 25, 495.
- Svergun D.I., 1993. A direct indirect method of small-angle scattering data treatment. *J Appl Cryst* 26, 258.
- Svergun, D. I., C. Barberato, and M. H. J. Koch. 1995. CRY SOL: a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Cryst.* 28, 768.
- Svergun D.I., 1999. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing *Biophys J.* 76, 2879.
- 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.
- Uversky V.N., 2002. Natively Unfolded Proteins: A point where biology waits for physics. *Prot. Sci.* 11, 739.
- Uversky V.N., 2002. What does it mean to be natively unfolded? *Eur J Biochem* 269, 2.
- Venyaminov S.Y., & Vassilenko K.S., 1994. Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 222, 176.
- Volkov V.V. & Svergun D.I., 2003. Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *J Appl. Cryst.* 36, 860.
- Wall M.E., Rechtsteiner A. & Rocha L.M., 2003. Singular value decomposition and principal component analysis. In *A Practical Approach to Microarray Data Analysis* (D.P. Berrar, Dubitzky W., Granzow M., eds). Kluwer: Norwell, MA. pp 91-109.
- Wilson A.J.C., 1942. Determination of absolute from relative X-ray data intensities. *Nature.* 150, 151.
- Wilson A.J.C., 1949. The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Cryst* 2, 318-321.
- Zwart P.H. & Lamzin V.S., 2003. The influence of positional errors on the Debye effects. *Acta Cryst.* D60, 220.
- Ακριβής Γ.Δ. & Δούγαλης Β.Α., 2000. Μετάφραση: Αριθμητικές Μέθοδοι & Προγράμματα για Μαθηματικούς Υπολογισμούς (Forsythe G.E., Malcom M.A. & Moler G.B.). ΠΕΚ, Ηράκλειο.
- Γαζή Α.Δ., 2000. Κρυσταλλογραφικές μελέτες του μεταλλάγματος A31P της πρωτεΐνης ROP. Διπλωματική εργασία. Επιβλέπων καθηγητής: Μ. Κοκκινίδης. Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών του συμπλόκου σαπερόνης – δραστηκής πρωτεΐνης AnrPphF ORF1/ORF2

“The problem of crystallization screening may not be a problem of arriving at an appropriate combination of factors but rather a problem of finding a protein that crystallizes...”

BW Segelke

Το οπερόνιο *anrPphF* της *P. syringae* pv. *phaseolicola* φαίνεται να κωδικοποιεί για ένα πιθανό ζεύγος μίας δραστηκής πρωτεΐνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III και της συγγενικής της τάξης I σαπερόνης. Το οπερόνιο κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης και τα προϊόντα του βρέθηκαν να συνεκφράζονται σε ετερόλογο σύστημα *E.coli* και να συν-καθαρίζονται σε στήλη ακινητοποιημένου μετάλλου (Γαζή, 2002).

Στην παρούσα διατριβή η αναλογία των συστατικών του συμπλόκου αναλύεται βάση των αποτελεσμάτων της στήλης μοριακής διήθησης. Πειράματα σκέδασης από διάλυμα καταδεικνύουν την ύπαρξη ενός σωματιδίου που αποτελείται από δύο επικράτειες. Το μέγεθος και σχήμα του σωματιδίου προσομοιάζει το γενικό σχήμα άλλων συμπλόκων σαπερονών-δραστηκών πρωτεϊνών. Τα πειράματα κρυστάλλωσης για το σύμπλοκο δεν έδωσαν αποτέλεσμα ενώ και οι δύο πρωτεΐνες κρυστάλλωσαν εύκολα όταν δοκιμάστηκαν ανεξάρτητα.

3.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο *anrPphF* ORF2 κλωνοποιήθηκε από την ομάδα του καθ. J. Mansfield (Wye College, UK) από τις φυλές 5 και 7 της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (EMBL/GenBank κωδικοί πρόσβασης: AF231452 και AF231453) με βάση την ικανότητα του να προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας (HR, hypersensitive response) σε ποικιλίες

φασολιού που έφεραν το γονίδιο ανθεκτικότητας, R1. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι όμοια και στις δύο φυλές της *P. syringae* pv. phaseolicola. Το γονίδιο αυτό αποτελεί το δεύτερο και τελευταίο πλαίσιο ανάγνωσης του οπερονίου *avrPphF*, ενώ το πρώτο πλαίσιο κωδικοποιεί για μία μικρή πρωτεΐνη 15 kD, και όξινο θεωρητικού pI, με υψηλό ποσοστό καταλοίπων λευκίνης και προβλεπόμενη αμφιπαθή καρβοξυτελική α-έλικα (Tsiamis *et al.*, 2000, Γαζή, 2002). Στο 5' άκρο του οπερονίου εδράζει υποκινητής ο οποίος φέρει το μοτίβο hrp-box και ελέγχεται από τον εναλλακτικό παράγοντα σίγμα της μεταγραφής, HrpL (Innes *et al.*, 1993, Pirhonen *et al.*, 1996). Η περιεκτικότητα του οπερονίου σε ζεύγη βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης (GC) είναι 47 % συνολικά (40 % για το πρώτο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και 52.5 % για το δεύτερο), σημαντικά χαμηλότερη από το ποσοστό 59 - 61 % που αναφέρεται για το γενωμικό DNA του είδους *Pseudomonas syringae* (De Ley, 1968).

Μέσω πειραμάτων υβριδοποίησης εντοπίστηκε επίσης το γονίδιο *avrPphF* ORF2 στο πλασμίδιο pAV511 της *P. syringae* pv. phaseolicola στέλεχος 1449B, αριστερά από την νησίδα παθογένειας και κοντά σε γονίδια μολυσματικότητας όπως το *avrPphC* και ένα ομόλογο του *avrD*. Το στέλεχος RW60 της *P. syringae* pv. phaseolicola (παράγωγο του στελέχους 1449B, φυλή 7), έχει απολέσει το πλασμίδιο pAV511. Το στέλεχος αυτό δεν είναι μολυσματικό σε ποικιλίες φασολιού που είναι ευπαθείς στο αρχικό στέλεχος 1449B, όπως οι ποικιλίες Tendergreen και Canadian Wonder. Όσο αφορά την ποικιλία του φασολιού Tendergreen, η ικανότητα μολυσματικότητας αποκαταστάθηκε μόνο όταν στο στέλεχος RW60 εισήχθει το γονίδιο *avrPphF*. Υποκλωνοποίηση του *avrPphF* απουσία του πλασμιδίου pAV511 το στέλεχος RW60 επιτάχυνε την αντίδραση υπερευαισθησίας του Canadian Wonder (Tsiamis, *et al.*, 2000).

Η πλήρης αλληλουχία του γενώματος της *P. syringae* pv phaseolicola 1448A (Joardan *et al.*, 2005) κατέδειξε τον υψηλό βαθμό συντήρησης των γονιδίων της σε σύγκριση με το φυλογενετικά αποκλίνοντα παθότυπο (pathovar) της τομάτας (*P. syringae* pv tomato DC3000), (Buell *et al.*, 2003). Σχεδόν 4133 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης αναγνωρίστηκαν ως υποθετικά ορθόλογα²⁷ σε αυτούς τους δύο παθότυπους. Παρόλο που οι δύο παθότυποι διαθέτουν ξεχωριστό φάσμα ξενιστών, η μελέτη των ORF που εμπλέκονται στην μολυσματικότητα και στην επιβίωση αποκάλυψαν ένα σημαντικό βαθμό επικάλυψης. Στο υποσύνολο αυτό ανήκει και η περίπτωση του οπερονίου *avrPphF*. Στη *P. syringae* pv tomato DC3000 εδράζει ένα οπερόνιο δύο ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης το οποίο ελέγχεται από ένα hrp-box και παρουσιάζει ομοιότητα με το οπερόνιο *avrPphF* της *P. syringae* pv phaseolicola. Οι Shan *et al.*, (2004) μελετώντας το νέο αυτό οπερόνιο ονόμασαν τα προϊόντα των δύο ανοικτών αυτών πλαισίων ανάγνωσης ShcF_{Pto} (Specific Hop Chaperone F) και HopF_{Pto} αφού κατέδειξαν την μεταξύ τους αλληλεπίδραση με το σύστημα δύο υβριδίων της ζύμης και παρατήρησαν την σταθεροποίηση της HopF_{Pto} στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα παρουσία της ShcF_{Pto}. Το γονίδιο *hopF_{Pto}* διαθέτει το σπάνιο κωδικόνιο έναρξης ΑΤΑ κάτι που δεν συμβαίνει με το *avrPphF* ORF2. Παρόλο που το κωδικόνιο ΑΤΑ έχει αναφερθεί ως λειτουργικό μόνο στα μιτοχονδριακά γονίδια οι Robert-Seilaniatz *et al.* (2005) έδειξαν ότι το γονίδιο συνθέτει μια λειτουργική πρωτεΐνη με δράση 'αμολυσματικότητας' (πρόκληση του φαινομένου HR) σε φυτά καπνού της ποικιλίας W38. Αναφέρουν επιπλέον την ύπαρξη μιας υποθετικής θέσης μυριστιλίωσης²⁸ στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Ανάλυση μέσω μεταλλαγών στη συγκεκριμένη θέση οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι αυτή είναι απαραίτητη για την αγκυροβόληση στην ευκαρυωτική μεμβράνη και για τις περαιτέρω λειτουργίες της HopF_{Pto} στα φυτικά κύτταρα.

Η υπερέκφραση της δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 σε ετερόλογο σύστημα έκφρασης οδήγησε το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού (≈ 90%) σε αδιάλυτα συσσωματώματα. Με την παρουσία απορρυπαντικού (Triton-X 100) στο διάλυμα λύσης των κυττάρων, ένα

²⁷Ως ορθόλογα χαρακτηρίζονται τα γονίδια διαφορετικών ειδών που έχουν εξελιχθεί από κοινό προγονικό γενετικό τόπο. Τα ορθόλογα γονίδια έχουν την τάση να αποκλίνουν αλλά συνήθως παρουσιάζουν ομοιότητα σε αμινοξικό, δομικό και λειτουργικό επίπεδο.

²⁸ Η μυριστιλίωση είναι μία μετά-μεταφραστική τροποποίηση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Κατ' αυτήν την τροποποίηση μία μυριστινική ομάδα δεσμεύεται ομοιοπολικά στην α αμινομάδα μίας αμινοτελικής γλυκίνης με την βοήθεια του ενζύμου N-μυριστοϋλτρανσφεράση. Η μυριστιλίωση παίζει σημαντικό ρόλο στην στόχευση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών στην μεμβράνη και στην αλυσίδα μεταφοράς σήματος κατά την απόκριση των φυτικών κυττάρων στην αβιοτική καταπόνηση.

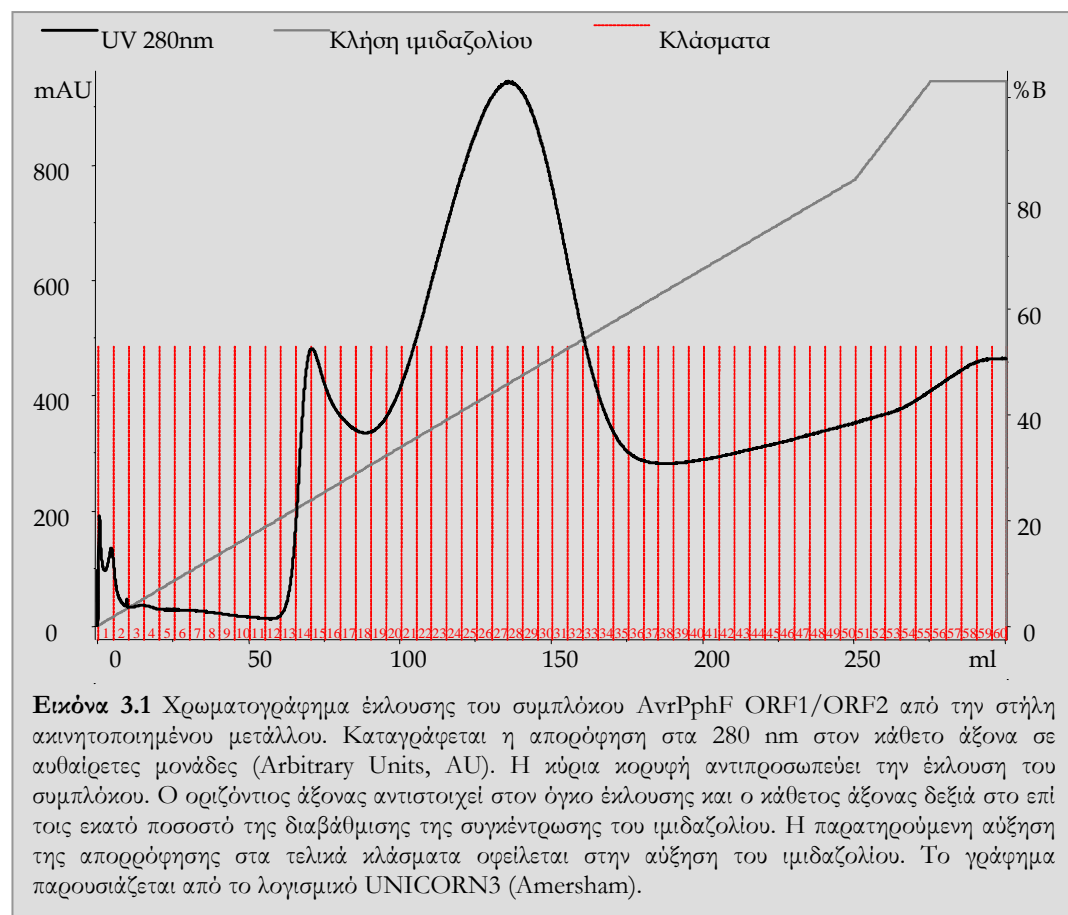
υψηλότερο ποσοστό της δραστηκής πρωτεΐνης βρέθηκε στο διαλυτό κλάσμα (Γαζή, 2002). Μόνο η συνέκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης με την σαπερόνη AvrPphF ORF1 οδήγησε στην συστηματική παραγωγή διαλυτής μορφής της δραστηκής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2.

3.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Επαγωγή της έκφρασης του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2

Υγρή ολονύχτια προαλλιέργεια 250 ml κυττάρων *E. coli* DH5α μετασχηματισμένα με την πλασμιδική κατασκευή pProEX-HT-AvrPphF²⁹ (Γαζή, 2002), χρησιμοποιείται ως προαλλιέργεια για τον εμβολιασμό 10 λίτρων LB, 2 g/l γλυκόζης, 100 µg/ml αμικιλίνης. Ακολουθεί επώαση της νέας καλλιέργειας στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.5. Σε αυτό το σημείο η έκφραση των πρωτεϊνών επάγεται με την προσθήκη 1 mM IPTG και η καλλιέργεια μεταφέρεται για επώαση στους 32°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση μετά από 4 ώρες και 30 λεπτά. Η κυτταρική πάστα (≈30 g) φυλάγεται στους -20°C.

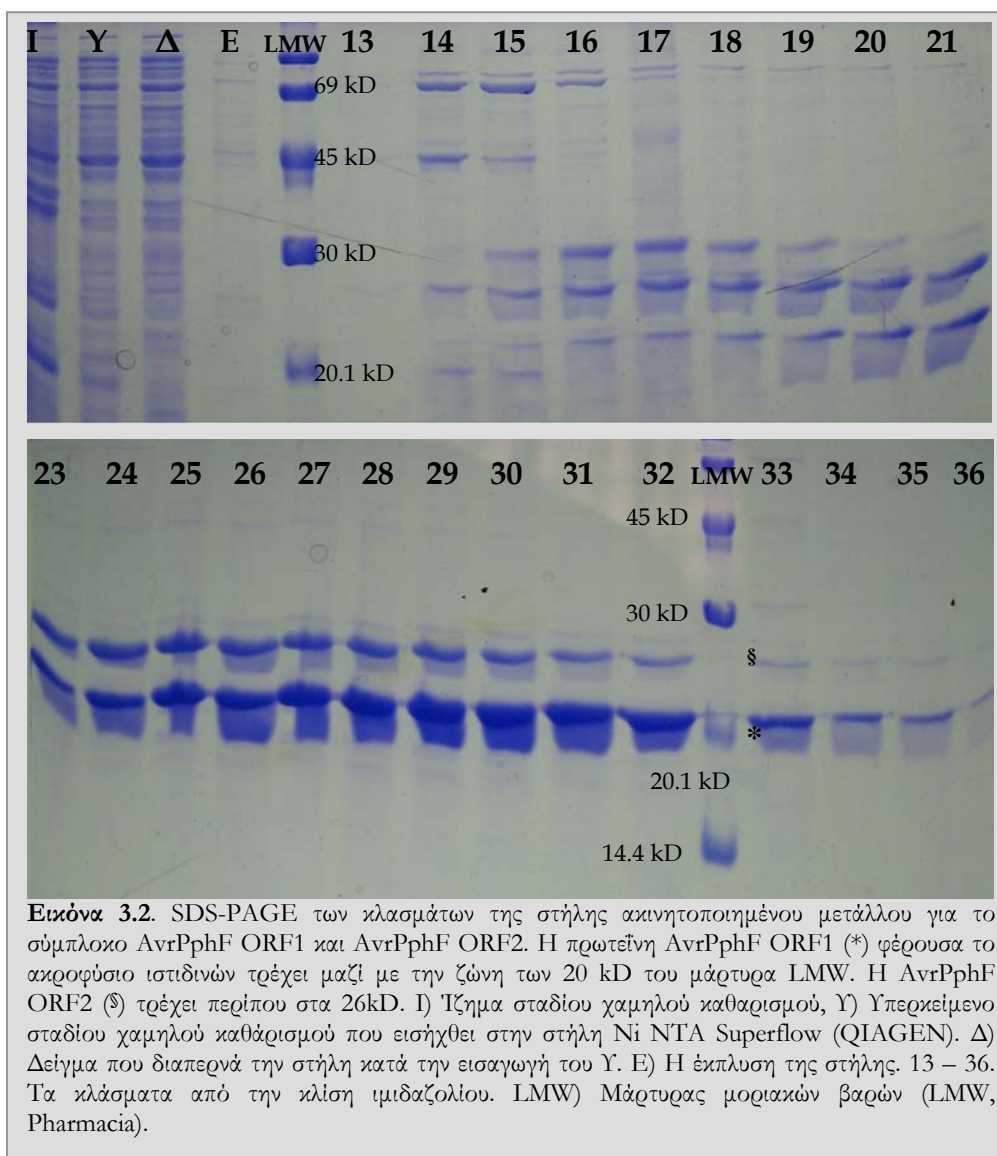
3.2.2 Απομόνωση του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2



²⁹ Το ένθεμα που κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPROEX-HT προήλθε από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Το προϊόν της PCR περιλάμβανε: i) όλη την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPphF* ORF1 χρησιμοποιώντας κατάλληλο εκκινητή για την ορθή σύντηξη του γονιδίου και την διατήρηση του πλαισίου ανάγνωσης με σκοπό την παραγωγή χημικακής πρωτεΐνης φέρουσας ακροφύσιο ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο, ii) την μη κωδική περιοχή ενδιάμεσα των δύο ORF, στην οποία εδράζει θέση δέσμευσης ριβοσώματος (RBS) και iii) όλη την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPphF* ORF2. Παράρτημα 8.1

3.2.2.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού

Η κυτταρική πάστα, η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες AvrPphF HT-ORF1 φέρουσα αιροφύσιο ιστιδινών, (HT, His Tag) και AvrPphF ORF2 άνευ αιροφυσίου, επαναδιαλύεται σε 400 ml διαλύματος 50 mM HEPES/NaOH pH 7.6, 150 mM NaCl, 15 mM Ιμιδαζόλιο. Ακολούθως προστίθενται αναστολείς πρωτεασών³⁰. Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπερηχοβόληση (sonication) για 4 συνολικά λεπτά ανά 30 sec με ενδιάμεσα διαλλείματα του ενός λεπτού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18000 g στους 6°C και τα κλάσματα υπερκείμενου (κλάσμα διαλυτών συστατικών) και ιζήματος (κλάσμα κυτταρικών υπολειμμάτων) φυλάγονται ξεχωριστά.



3.2.2.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού

3.2.2.2.1 Χρωματογραφία Στήλης Συγγενείας Ακινητοποιημένου Μετάλλου

Το διαλυτό κλάσμα φορτώνεται σε στήλη Ni-NTA Superflow (Qiagen) των 25 ml που έχει εξισοροπηθεί με το διάλυμα λύσης των κυττάρων και η οποία είναι συνδεδεμένη με

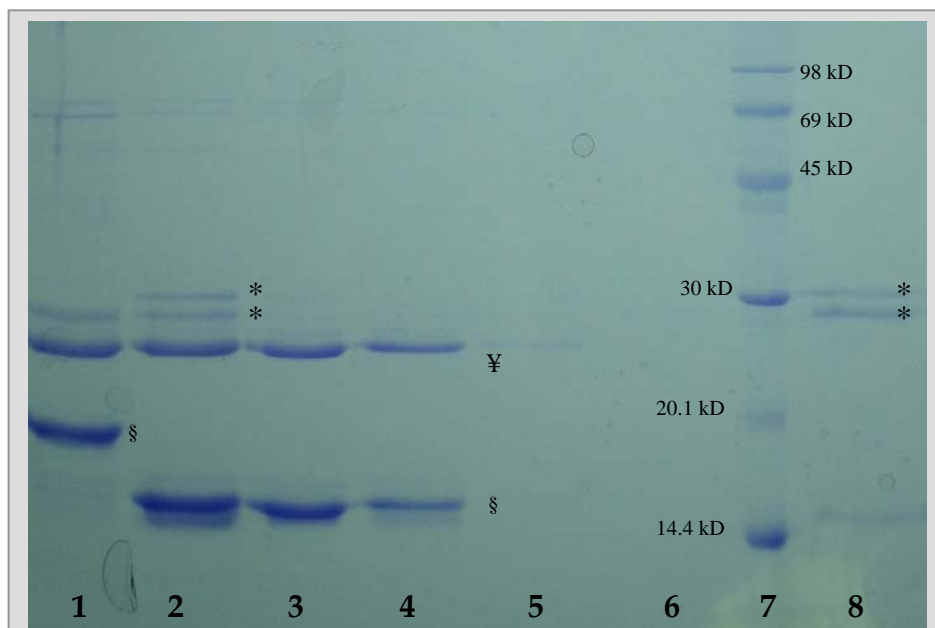
³⁰Οι αναστολείς που χρησιμοποιούνται τυπικά είναι 1 mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride), 1 mM βενζαμιδίνη και 5 μg/ml λευπεπίνη. Το PMSF καταστέλλει μη-αντιστρεπτά της πρωτεάσης σερίνης. Καταστέλλει επίσης αλλά αντιστρεπτά την παπαΐνη και την ακετυλχολινεστεράση. Η βενζαμιδίνη είναι ισχυρός καταστολέας της θρομβίνης και της τρυψίνης. Τέλος η λευπεπίνη είναι αντιστρεπτός ανταγωνιστικός καταστολέας των πρωτεασών σερίνης και κυστεΐνης.

εξωτερική αντλία P1 (Pharmacia). Η ροή φόρτωσης είναι 10 ml/min και η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους 4°C. Ακολούθως η στήλη ξεπλένεται με 150 ml διαλύματος 50 mM HEPES/NaOH pH 7.6, 150 mM NaCl, 15 mM Ιμιδαζόλιο με την ίδια ροή. Μετά το πέρας της έκπλυσης η στήλη μεταφέρεται στους 20°C για να συνδεθεί με το FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) σύστημα ÄKTA-purifier (Amersham). Το σύμπλοκο εκλύεται με κλίση ιμιδαζολίου από 25 mM ως 250 mM συνολικού όγκου διαλύματος έκλυσης 250 ml, ενώ συλλέγονται κλάσματα ανά 5 ml. Στο τελευταίο βήμα η στήλη ξεπλένεται με διάλυμα σταθερής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (300 mM) σε 50 mM HEPES/NaOH pH 7.6, 150 mM NaCl (Εικόνα 3.1).

Τα κλάσματα της στήλης συλλέγονται ξεχωριστά και αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) (Εικόνα 3.2).

3.2.2.2 Ενζυμική απομάκρυνση του ακροφυσίου ιστιδινών

Από την ανάλυση της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης επιλέγονται τα κατάλληλα κλάσματα της στήλης ακινητοποιημένου μετάλλου (στη συγκεκριμένη περίπτωση τα κλάσματα 23 ως 31) που φέρουν το σύμπλοκο και ακολουθεί διαπίδυση σε 2 lt διαλύματος αντίδρασης rTEV: 25 mM Tris/HCl 8.0, 50 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, 5 mM β-μεριαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί εκτίμηση της ποσότητας του συμπλόκου με τη μέθοδο Bradford και στο δείγμα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της πρωτεάσης rTEV σε αναλογία μαζών 1/20. Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 3 ώρες. Ακολούθως στο δείγμα προστίθεται ιμιδαζόλιο ως τελική τιμή 10 mM και φυγοκεντρείται στις 1500 g για 30 min. Τα κλάσματα που προκύπτουν από την φυγοκέντρηση φυλάσσονται ξεχωριστά.



Εικόνα 3.3 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS πολυακρυλαμίδης. 1) δείγμα AvrPphF HT-ORF1 και AvrPphF ORF2 μετά την πρώτη χρωματογραφία ακινητοποιημένου μετάλλου, 2) Το ίδιο δείγμα με προσθήκη της πρωτεάσης rTEV [(*) 2 αχνές ζώνες στα 30 kD, λίγο παραπάνω από την ζώνη του (ψ)AvrPphF ORF2] μετά από 3 h επώαση στους 30°C, η απομάκρυνση του ακροφυσίου ιστιδινών είναι πλήρης αφού η (§)AvrPphF ORF1 τρέχει τώρα χαμηλότερα, αυτό το δείγμα φορτώνεται στην 2^η στήλη ακινητοποιημένου μετάλλου για την προσρόφηση των ελεύθερων ακροφυσίων ιστιδινών και της rTEV, 3) Δείγμα που διαπερνά την δεύτερη στήλη ακινητοποιημένου μετάλλου, 4) δείγμα που συνεχίζει να απομακρύνεται κατά την πρώτη έκπλυση, 5) δείγμα που απομακρύνεται κατά την δεύτερη έκπλυση, 6) δείγμα που απομακρύνεται κατά την Τρίτη έκπλυση, 7) LMW, Pharmacia, 8) Η πρώτη έκλυση της στήλης όπου παρατηρείται η πρωτεάση rTEV.

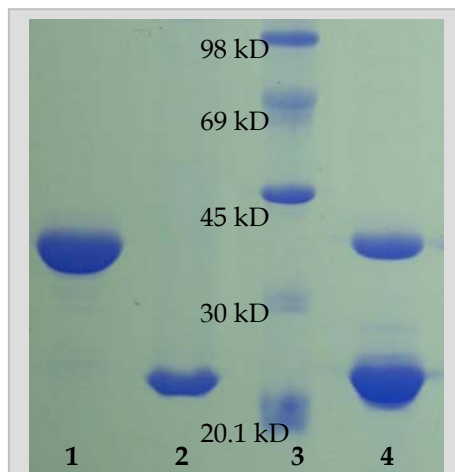
3.2.2.2.3 Παραλαβή απομονωμένου συμπλόκου άνευ ακροφυσίων

Το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα φυγοκέντρησης φορτώνεται σε δεύτερη εξισσοροπημένη στήλη Ni-NTA αγαρόζης (όγκου στρώματος 5 ml) για την προσρόφηση των

ακροφυσίων ιστιδίνης και της rTEV, η οποία φέρει επίσης ακροφύσιο ιστιδινών. Το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 άνευ ακροφυσίου ιστιδινών παραλαμβάνεται απευθείας από την έξοδο της στήλης κατά την φόρτωση. Η στήλη εκπλένεται με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Ιμιδαζόλιο, συνολικού όγκου 45 ml το οποίο συλλέγεται σε τρία διαφορετικά κλάσματα των 15 ml για την περίπτωση που μέρος του συμπλόκου δεν έχει απελευθερωθεί απευθείας από την στήλη στο προηγούμενο βήμα. Τα κλάσματα αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος.

3.2.2.4 Στήλη Μοριακής Διήθησης Sephacryl S-100

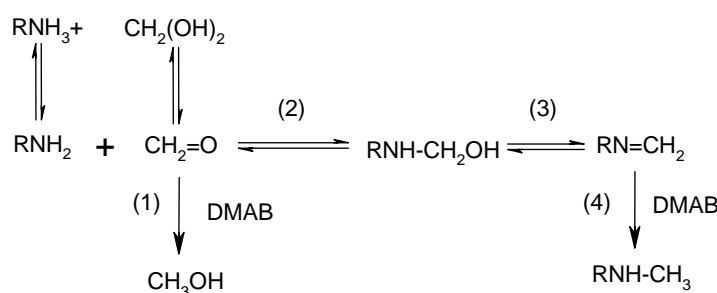
Στη συνέχεια το δείγμα συγκεντρώνεται μέσω διαδιύλισης (dia-filtration) με AMICON Ultra ως τα 3 ml. Το δείγμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση τυχόν πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη Sephacryl S-100, συνδεδεμένη σε σύστημα ÄKTA purifier (Amersham). Τα κλάσματα της στήλης αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Εκείνα που εμπεριέχουν το σύμπλοκο καθώς και εκείνα που εμπεριέχουν μεμονωμένα τις πρωτεΐνες AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 συλλέγονται και συγκεντρώνονται ανεξάρτητα μέσω διαδιύλισης με Amicon Ultra. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται και οι πηκτές (εικόνα 3.4) αναλύονται με το λογισμικό ImageQuant 5.0 (Molecular Dimensions) για την εκτίμηση του ποσοστού των δύο πρωτεϊνών στο σύμπλοκο. Ακολουθεί ακαριαίο πάγωμα των δειγμάτων σε υγρό άζωτο και φύλαξη τους στους -80°C μέχρι την στιγμή της χρήσης τους.



Εικόνα 3.4 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS πολυακρυλαμίδης. Τα τελικά δείγματα της απομόνωσης όπως προκύπτουν έπειτα από συγκέντρωση των κλασμάτων που αντιστοιχούν στις τρεις κορυφές της στήλης μοριακής διήθησης: 1) AvrPphF ORF2 (3^η κορυφή), 2) AvrPphF ORF1 (2^η κορυφή), 3) Μάρτυρας LMW (Pharmacia) και 4) το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 (1^η κορυφή).

3.2.3 Προστασία των αμινομάδων της λυσίνης με χημική τροποποίηση

Η αναγωγική μεθυλίωση έλαβε χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Rayment (1997) τροποποιημένο κατά Schubot και Waugh (2004). Το πρωτεϊνικό δείγμα (≈ 10 mg/ml) υπόκειται σε εκτενή διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM HEPES/NaOH pH 7.6, 150 mM NaCl. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα ο οποίος καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και τοποθετείται στον αναδευτήρα σε χαμηλές στροφές στους 4°C . Προστίθενται σταδιακά ποσότητες DMAB (DiMethylAmine – Borane complex, $(\text{CH}_3)_2\text{NH}:\text{BH}_3$) και φορμαλδεΐδης (απαλλαγμένης από μεθανόλη) ανά περιόδους 2 ωρών επί δύο φορές. Τέλος το δείγμα επωάζεται με τα παραπάνω αντιδραστήρια για 16 h. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Στην συνέχεια το δείγμα φορτώνεται σε στήλη μοριακής διήθησης για να διαχωριστεί η πρωτεΐνη από τα αντιδραστήρια.

3.2.4 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες

Τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται αναλυτικά στο εδάφιο 2.7.8. Τέσσερα διαφορετικά δείγματα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 μετρήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Το πρώτο δείγμα του συμπλόκου μετρήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις (3, 6 και 12 mg/ml) σε διάλυμα 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2mM DTT. Το δεύτερο δείγμα περιλάμβανε χωριστά το κλάσμα 21³¹ της στήλης μοριακής διήθησης (3.7 και 1.8 mg/ml) σε διάλυμα 25 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM DTT. Το τρίτο δείγμα περιλάμβανε χωριστά το 20^ο κλάσμα της στήλης μοριακής διήθησης σε συγκέντρωση 3.6 mg/ml και στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, το τέταρτο δείγμα μεθυλιωμένου συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 μετρήθηκε σε συγκεντρώσεις 3.5 και 1.8 mg/ml στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Η συλλογή δεδομένων για κάθε δείγμα παρουσιάζεται αναλυτικά στο Παράρτημα 8.6.

3.2.5 Πειράματα Κρυστάλλωσης

Η στρατηγική των πειραμάτων κρυστάλλωσης που ακολουθήθηκε αναλύεται διεξοδικά στο εδάφιο 2.5.5. Εξετάστηκαν διαφορετικά παρασκευασμένα δείγματα του συμπλόκου τα οποία είτε είχαν, είτε δεν είχαν υποστεί αναγωγική μεθυλίωση καθώς επίσης και η δραστηκή πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 μεμονωμένα ως έλεγχος των πειραμάτων κρυστάλλωσης του συμπλόκου. Η δοκιμασία της μεμονωμένης δραστηκής πρωτεΐνης κρίθηκε απαραίτητη καθώς η εμφάνιση κρυστάλλων στις σταγόνες κρυστάλλωσης του συμπλόκου δεν συνεπάγεται αυτόματα την κρυστάλλωση του συμπλόκου. Η διαλυτότητα και η συμπεριφορά της ελεύθερης σαπερόνης AvrPphF ORF1 ήταν ήδη γνωστή και καλά καταγεγραμμένη (Κεφάλαιο 4) οπότε δεν χρησιμοποιήθηκε ως επιπλέον έλεγχος των κρυσταλλώσεων του συμπλόκου. Όλα τα δείγματα βρίσκονταν σε διάλυμα 25 mM Tris/HCl pH 8.5, 150 mM NaCl.

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης-Σχηματισμός συμπλόκου 2:1

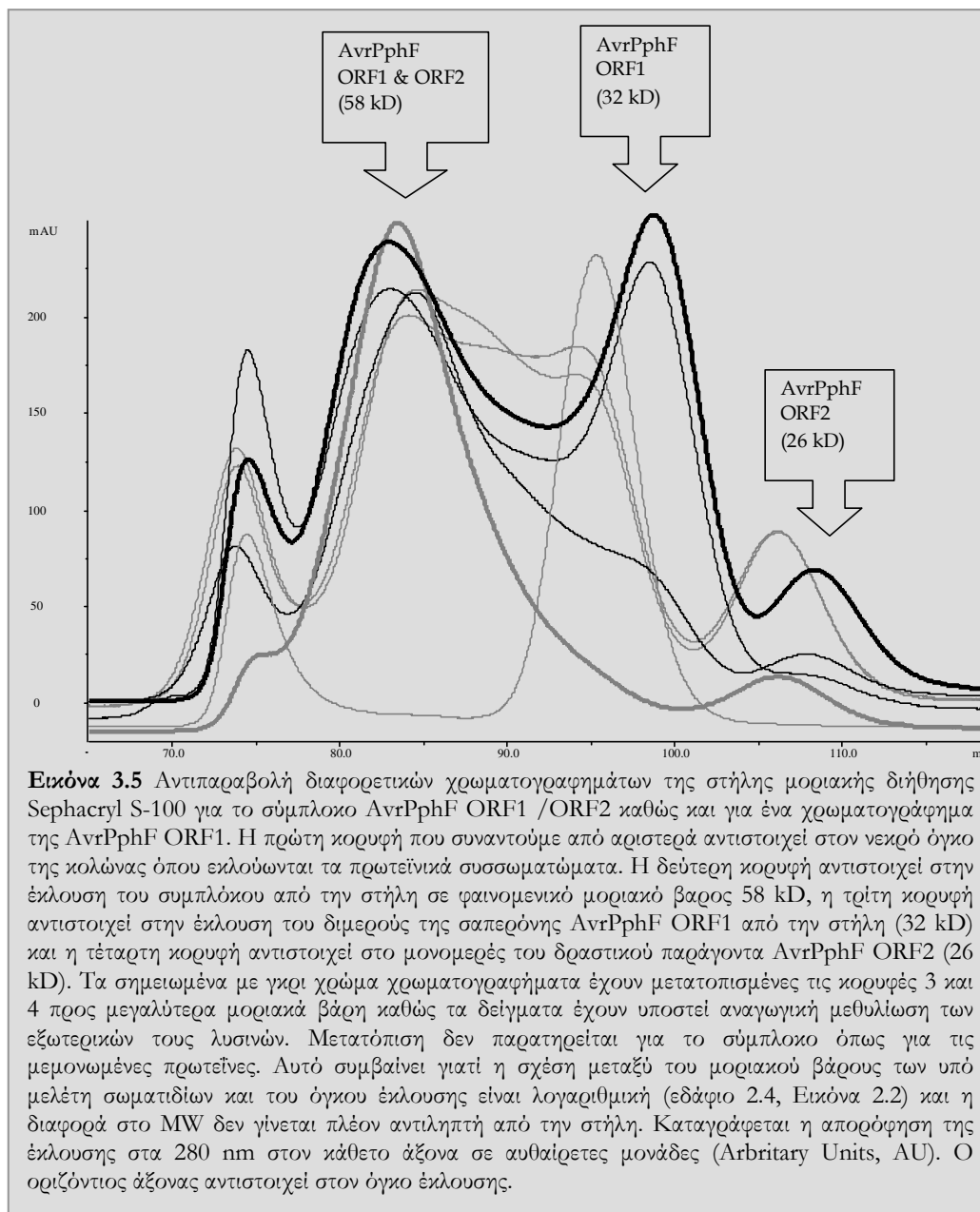
Κατά την ανάλυση του δείγματος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης εμφανίζονται 3 κύριες κορυφές (Εικόνα 3.5). Η πρώτη κορυφή που εκλύεται πέραν του νεκρού όγκου της στήλης αντιστοιχεί σε φαινομενικό μοριακό βάρος 58 kD και κατά την ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS – PAGE) στο δείγμα συνυπάρχουν και οι δύο πρωτεΐνες AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 (Εικόνα 3.4). Εκτός από το σύμπλοκο όμως τα συστατικά του απαντούνται και σε ελεύθερη μορφή. Συγκεκριμένα η σαπερόνη AvrPphF ORF1 εκλύεται από την στήλη με φαινομενικό μοριακό βάρος 32 kD, ως διμερές, ενώ ο δραστηκός παράγοντας AvrPphF ORF2 ως μονομερές (26 kD).

Το μοριακό βάρος του συμπλόκου είναι 58 kD, γεγονός που υποδηλώνει ότι στην συμπλοκοποιημένη μορφή τηρείται η αναλογία 2 μορίων σαπερόνης προς 1 μόριο δραστηκής

³¹ Τα κλάσματα 20 και 21 της στήλης μοριακής διήθησης περιέχουν την κοινή κορυφή που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2. Παρόλα αυτά φυλάχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά στα πειράματα κρυστάλλωσης και σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες.

πρωτεΐνης, όπως και στις περισσότερες περιπτώσεις σαπερονών/δραστηκών πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Εδάφιο 1.4.1.2, Εικόνα 1.5).

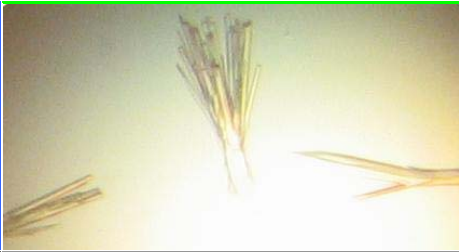
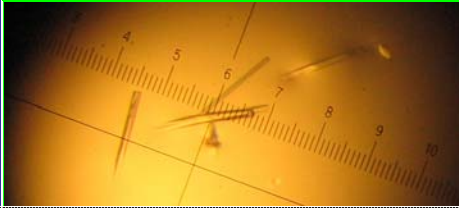
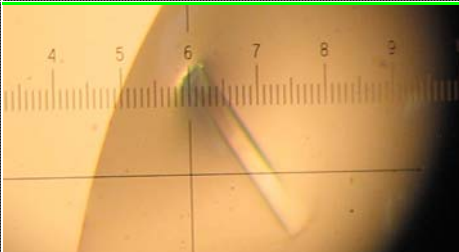
Επιπλέον στην Εικόνα 3.4 η ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στην σαπερόνη είναι διπλάσια εκείνης που αντιστοιχεί στον δραστικό παράγοντα όπως εκτιμάται από το λογισμικό ImageQuant 5.0.



3.3.2 Πειράματα κρυστάλλωσης

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κρυστάλλωσης παρουσιάζονται για την πρώτη καταγραφή τους ύστερα από 2 εβδομάδες στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Ενδεικτική καταγραφή αποτελεσμάτων πειραμάτων κρυσταλλώσεων για το σύμπλοκο AnrPphF ORF1/ORF2 και για την ελεύθερη δραστική πρωτεΐνη AnrPphF ORF2.

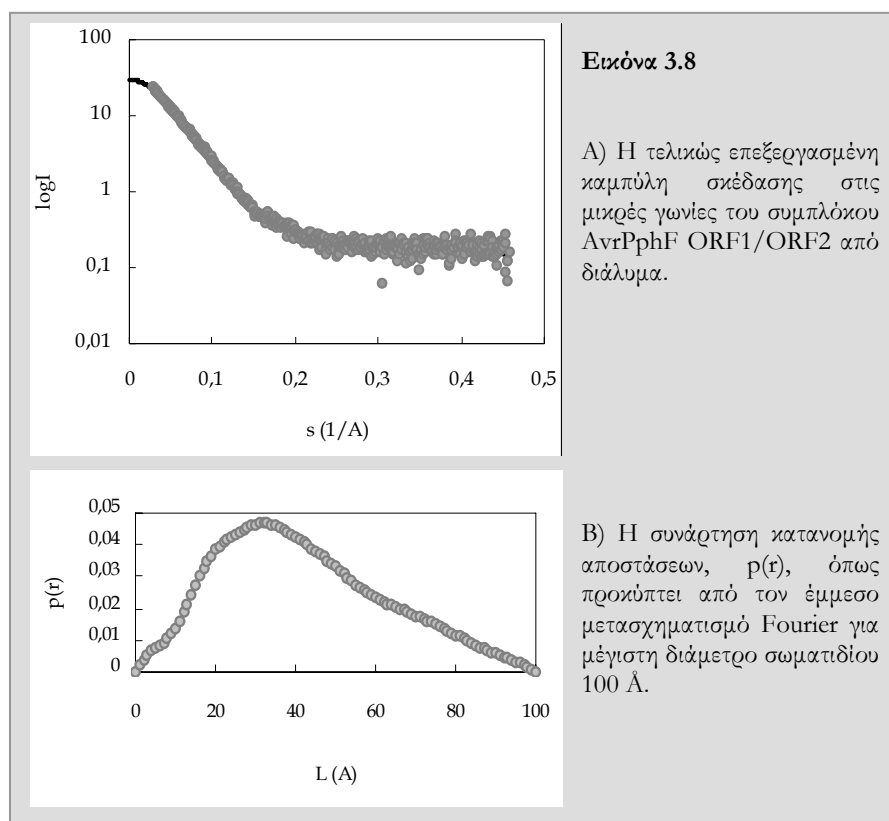
CSIβ	Σύμπλοκο AnrPphF ORF1 & ORF2 με μεθυλωμένες λυσίνες	Σύμπλοκο AnrPphF ORF1 & ORF2 (κλάσμα 21)	Σύμπλοκο AnrPphF ORF1 & ORF2 (κλάσμα 20)	Σύμπλοκο AnrPphF ORF1 & ORF2 με μεθυλωμένες λυσίνες 2 ^ο καθαρισμός	AnrPphF ORF2 με μεθυλωμένες λυσίνες (κλάσματα 26 & 27 από την στήλη μοριακής διήθησης)
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					

Πίνακας 3.1 Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του γκρι καταγράφονται οι συνθήκες εκείνες όπου παρατηρείτε διαφορετικούς βαθμούς κατακρήμνισης. Με μαύρο πλέγμα καταγράφονται τα βαριά άμορφα ιζήματα και με γκρι χρώμα τα ελαφρύτερα. Με άσπρο οι σταγόνες που παρέμειναν διαυγείς. Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του μπλε καταγράφονται οι διαφορετικού βαθμού διαχωρισμοί φάσεως που παρατηρούνται. Με καφέ συμβολίζεται το ιζήμα καφέ χρώματος που

Πίνακας 3.1 (συνέχεια από προηγούμενη σελίδα) παράγεται χαρακτηριστικά σε περίπτωση μετουσιωμένης πρωτεΐνης. Συνήθως από τέτοια ιζήματα δεν παράγονται κρύσταλλοι. Με ανοιχτό πορτοκαλί συμβολίζονται οι συνθήκες όπου παρουσιάζεται είδος γέλης. Αυτές οι συνθήκες αποτελούν κάποια βελτίωση σε σχέση με την κατακρήμνιση, αν και συγχέονται με την ελαφριά μορφή του καφέ ιζήματος. Οι συνθήκες που απέδωσαν κρυστάλλους σημειώνονται με την αντίστοιχη φωτογραφία τους.

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα του δεύτερου μέρους (συνθήκες 25 ως 48) του εμπορικού screen: Crystal Screen I (Hampton Research) που δοκιμάστηκε για τα δείγματα: AvrPphF ORF1/ORF2, 20^ο κλάσμα της στήλης μοριακής διήθησης με συγκέντρωση 3.9 mg/ml, το 21^ο επίσης κλάσμα ελέγχθηκε ξεχωριστά σε συνθήκες κρυστάλλωσης με συγκέντρωση 4.1 mg/ml, το δείγμα AvrPphF ORF1/ORF2 το οποίο είχε υποστεί αναγωγική μεθυλίωση ελέγχθηκε σε συγκέντρωση 3.9 mg/ml και τέλος ελέγχθηκε ως επανάληψη από βελτιωμένο πρωτόκολλο καθαρισμού το σύμπλοκο που είχε υποστεί αναγωγική μεθυλίωση. Το δείγμα AvrPphF ORF2 (26^ο και 27^ο κλάσμα της στήλης μοριακής διήθησης) το οποίο είχε επίσης υποστεί αναγωγική μεθυλίωση ελέγχθηκε μεμονωμένα σε συγκέντρωση 2.1 mg/ml, χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου των πειραμάτων κρυστάλλωσης του συμπλόκου. Κρυσταλλοί παρουσιάστηκαν σε πολλές συνθήκες του Crystal Screen I στην περίπτωση της μεμονωμένης δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 παρά την χαμηλή της συγκέντρωση (2.1 mg/ml). Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται 3 συνθήκες από το δεύτερο ήμισυ των συνθηκών του Crystal Screen I (συνθήκες 29, 39, 41) που έδωσαν κρυστάλλους, ενώ παρουσιάστηκαν ακόμη κρύσταλλοι της δραστικής πρωτεΐνης στις συνθήκες 6, 9, 15 και 22 του ίδιου screen (Παράρτημα 8.5.2).

3.3.3 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες για το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2



Στην εικόνα 3.8 Α παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης του πρώτου δείγματος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2. Στο διάγραμμα εμφανίζεται ο λογάριθμος της έντασης της σκέδασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å]. Η καμπύλη αποτελεί συγχώνευση διαφορετικών μετρήσεων από δείγματα διαφορετικής συγκέντρωσης ως

εξής: Για τις μικρές γωνίες (μικρές τιμές s , αριστερή πλευρά διαγράμματος) έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έντασης που προέρχονται από το αραιό διάλυμα (3 mg/ml) του συμπλόκου, για τις μέσες γωνίες έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές έντασης από διάλυμα του συμπλόκου με συγκέντρωση 6 mg/ml και για τις ευρείες γωνίες (μεγάλες τιμές s δεξιά πλευρά διαγράμματος) οι τιμές προέρχονται από το πιο συμπυκνωμένο δείγμα (12 mg/ml).

Χρησιμοποιώντας τη προσέγγιση Guinier: $\ln I(s)$ συναρτήσει του s^2 (εδάφιο 2.7.2) στις μικρές γωνίες ελέγχθηκε η γραμμικότητα³² τους σε όλες τις δευτερογενείς³³ καμπύλες που συλλέχθηκαν από τα διαφορετικά δείγματα. Εκτιμήθηκαν μέσω της προσέγγισης Guinier η γυροσκοπική ακτίνα και η σιεδάζομενη ένταση στην μηδενική γωνία $I(0)$ (Πίνακας 3.2). Συγκρίνοντας τις διαφορετικές τιμές της $I(0)$ με την αντίστοιχη τιμή που προκύπτει για δείγμα 5 mg/ml της πρωτεΐνης BSA, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας μοριακού βάρους, οι τιμές του σωματιδίου εκτιμήθηκαν στα $46.8 \text{ kD} \pm 7.4$. Η μέση τιμή είναι μικρότερη από την εκτίμηση του μοριακού βάρους του συμπλόκου από την στήλη μοριακής διήθησης και δύναται να εμπεριέχει λάθη από την μη σωστή εκτίμηση της συγκέντρωσης των υπό μελέτη δειγμάτων.

Εναλλακτικά, η ανεξάρτητη της συγκέντρωσης εκτίμηση του μοριακού βάρους του σωματιδίου μπορεί να επιτευχθεί μέσω του ένυδρου όγκου (ή όγκου Porod) (εδάφιο 2.7.3). Παρά την εμφάνιση γραμμικής σχέσης στην περιοχή Guinier, ο όγκος Porod δεν μπορεί να εκτιμηθεί σταθερά (Πίνακας 3.2) από τα δεδομένα σκέδασης, παρουσιάζοντας υψηλή απόκλιση και αντικατοπτρίζοντας ένα μεγαλύτερο μοριακού βάρους σωματίδιο κατά μέσο όρο σε σύγκριση με το MW όπως αυτό εκτιμάται από την τιμή του $I(0)$ και την σύγκριση με πρωτεΐνη μάρτυρα. Οι παρούσες ασυμφωνίες στον όγκο Porod ίσως είναι ενδεικτικές κάποιου βαθμού πολυδιασποράς του δείγματος, αν δεν οφείλονται σε ενσωμάτωση σφαλμάτων κατά την μέτρηση.

Στην εικόνα 3.8 Β παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων (pair distribution function) για το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου εκτιμάται στα 100 Å ενώ η γυροσκοπική του ακτίνα στα 32.8 Å.

Πίνακας 3.2 Η εφαρμογή της προσέγγισης Guinier στις μικρές γωνίες και της προσέγγισης Porod για διαφορετικά δείγματα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 και διαφορετικές επεξεργασίες αυτών.

Πίνακας 3.2			Guinier			Porod			
Δείγμα*	Επεξεργασία ^Y		Όρια ^δ (sR_g)	R_g (Å)	$I(0)$	Όρια ^ε	R_g (Å)	V (Å ³)	$I(0)$
20γ (3.6 mg/ml)	20γ1	<u>199</u> -(aver (198&200)), (198*0.98)	0.9-1.6	32 ± 0.0719	580190 ± 1440	1-1089	47.7	132890	784270
	20γ2	<u>199-200</u>	0.918- 1.53	33.6 ± 0.102	610170 ± 1960	20-1089	33.6	77524	621111
21γ (3.7 mg/ml)	Su1	<u>41</u> -(aver (42&40)), (42*1.035)	0.767- 1.41	31.5 ± 0.0861	569510 ± 1350	70-2180	31.7	156170	574060
	Su2	<u>41</u> -(aver (42&40)), (42*1.030)	0.731- 1.39	31.5 ± 0.0845	571020 ± 1280	75-2180	31.5	195440	571400
	Su4	<u>41-40</u>	0.698- 1.43	31.6 ± 0.082	577330 ± 1280	70-2180	30.6	253240	564020
rm	Me1 (3.5 mg/ml)	<u>36-35</u>	0.856- 1.28	37.6 ± 0.259	642220 ± 3540	73-2180	31.3	68516	559260

³² Η γραμμικότητα στην περιοχή Guinier $0.4 < sR_g < 1.5$ υποδηλώνει την μονοδιασπορά του δείγματος στην περίπτωση σφαιροειδούς σωματιδίου. Εδάφιο 2.7.2.

³³ Ως δευτερογενείς καμπύλες αναφέρονται οι καμπύλες σκέδασης που προκύπτουν από την αφαίρεση της σκέδασης του διαλύτη από την πειραματική καμπύλη του δείγματος. Στην συνέχεια αυτές οι καμπύλες συγχωνεύονται κατάλληλα για την παρασκευή της τελικής καμπύλης.

Πίνακας 3.2			Guinier			Porod			
Δείγμα*	Επεξεργασία [¥]		Όρια [§] (sR _g)	R _g (Å)	I(0)	Όρια [£]	R _g (Å)	V (Å ³)	I(0)
Me2 (3.5 mg/ml)	36-(aver (35&37)), (37*1.040)		0.821-1.30	35.7 ± 0.179	605890 ± 2450	74-2180	31.1	73862	546070
Me3 (1.8 mg/ml)	38-37		0.840-1.47	29.8 ± 0.192	459840 ± 2820	97-2180	28.3	191580	446980
Me4 (1.8 mg/ml)	38-(aver (39&37)), (39*1.020)		0.789-1.54	29.9 ± 0.129	478050 ± 2030	88-2180	30.0	538250	479030

*Τα δείγματα όπως έχουν μετρηθεί στην X33 γραμμή ακτινοβόλησης (Παράρτημα 8.6)

[¥]Η επεξεργασία των πρωτογενών καμπύλων για την παραγωγή των δευτερογενών (καμπύλες που προέρχονται εξ ολοκλήρου από δείγμα μίας συγκέντρωσης και δεν έχουν υποστεί συγχώνευση) δεν ακολούθησε το κλασικό πρωτόκολλο καθώς παρουσιάστηκαν ασυνέπειες κατά την σκέδαση του ίδιου διαλύτη στις διαφορετικές μετρήσεις πριν και μετά την μέτρηση του δείγματος. Οι ασυνέπειες αυτές είχαν να κάνουν με την ρύθμιση της γραμμής ακτινοβόλησης X33 και δεν οφείλονται στην σταθερή εξασθένηση της πρωτογενούς ακτινοβολίας όπως συμβαίνει φυσιολογικά στις γραμμές ακτινοβόλησης των συγχρότρων. Συγκεκριμένα η τιμή που καταγραφόταν στην δίοδο PIN είχε αυξομειώσεις παρά την σταθερή πτώση στην ένταση της πρωτογενούς ακτινοβολίας (Παράρτημα 8.6). Κάθε υπογεγραμμένος αριθμός αντικατοπτρίζει τον αριθμό αρχείου μέτρησης. Για παράδειγμα στην πρώτη περίπτωση στο 199 αρχείο έχει μετρηθεί η σκέδαση από το δείγμα του συμπλόκου με 3.6 mg/ml συγκέντρωση. Το 198 και το 200 είναι οι μετρήσεις από τον διαλύτη πριν και μετά την μέτρηση του δείγματος αντίστοιχα. Σε κανονικές συνθήκες ο μέσος όρος της έντασης της σκέδασης από τις δύο μετρήσεις του διαλύτη αφαιρείται από την ένταση της σκέδασης που καταγράφηκε για το δείγμα. Στην συγκεκριμένη περίπτωση οι τιμές της έντασης του διαλύτη (198) έχουν πολλαπλασιαστεί με το παράγοντα 0.98 για να συμπίπτουν με τις τιμές του διαλύτη στο αρχείο 200 και ακολούθως υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών.

[§]Τα όρια στα οποία εφαρμόζεται η προσέγγιση Guinier και τα οποία έχουν φυσική σημασία αναλύονται διεξοδικά στο εδάφιο 2.7.2.

[£] Για την συνάρτηση Porod λαμβάνεται υπόψη ολόκληρη η καμπύλη της έντασης της σκέδασης. Οι αριθμοί εδώ δηλώνουν τα πειραματικά σημεία της καμπύλης. Κυρίως έχουν αφαιρεθεί τα πρώτα σημεία που είναι πολύ κοντά στην κατεύθυνση της πρωτογενούς ακτινοβολίας. Ο αποκλεισμός τους στηρίζεται στην προσέγγιση Guinier.

[¶]Δείγμα συμπλόκου AvrPpHF ORF1/ORF2 που έχει υποστεί αναγωγική μεθυλίωση (εδάφιο 3.2.3).

3.3.4 Έλεγχος της ολιγομερικής κατάστασης του συμπλόκου στο διάλυμα

Λόγω των ενδείξεων πολυδιάσπαρτου δείγματος η τελικώς επεξεργασμένη καμπύλη σκέδασης του συμπλόκου αναλύθηκε για την παρουσία ή όχι των μεμονωμένων συστατικών αυτού με το πρόγραμμα OLIGOMER (Konatev *et al.*, 2003). Για ένα σύστημα το οποίο διαθέτει ευκρινή συστατικά με γνωστές εντάσεις σκέδασης (παράγοντες σχήματος, form factors), το πρότυπο σκέδασης είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των παραγόντων σχήματος:

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s),$$

όπου v_k και $I_k(s)$ είναι ο επιμέρους/κλασματικός όγκος³⁴ (volume fraction) και η ένταση της σκέδασης του k-οστού συστατικού, αντίστοιχα. Δεδομένης της πειραματικής σκέδασης του μείγματος, $I_{exp}(s)$, και των καμπύλων σκέδασης των επιμέρους συστατικών, $I_k(s)$, εκτελείται ένας θετικός γραμμικός αλγόριθμος ελαχίστων τετραγώνων (Lawson & Hanson, 1974) για την εύρεση των κλασματικών όγκων ελαχιστοποιώντας την ασυμφωνία:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left(\frac{\mu I(s_j) - I_{exp}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right)^2,$$

όπου N είναι ο αριθμός των πειραματικών σημείων και μ ο παράγοντας κλίμακας.

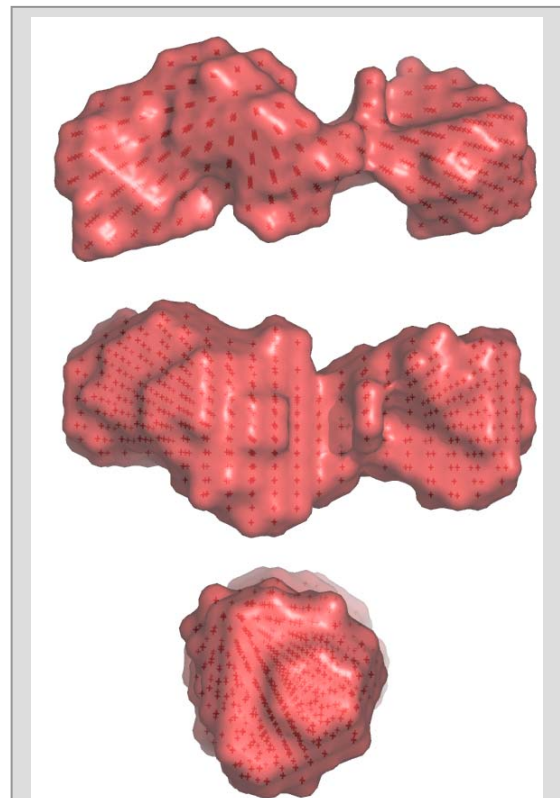
³⁴ Ο επιμέρους ή κλασματικός όγκος είναι μία χρήσιμη εναλλακτική της έκφρασης κλασματική γραμμομοριακότητα (mole fraction) όταν μεταχειριζόμαστε μείγματα συνήθως φέροντα υψηλή ανομοιογένεια μεγέθους.

Θεωρώντας ότι στο διάλυμα εμπεριέχονται τρεις μορφές σωματιδίων: i) του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2, ii) της ελεύθερης σαπερόνης AvrPphF ORF1 και iii) της ελεύθερης δραστηκής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 το πρόγραμμα καλείται να αποδώσει την αναλογία τους στο διάλυμα. Ως παράγοντες σχήματος (form factors) χρησιμοποιήθηκαν: i) για την μεμονωμένη AvrPphF ORF1 η πειραματική καμπύλη σκέδασης της σαπερόνης AvrPphF ORF1 (εδάφιο 4.3.3) ή η θεωρητική η οποία υπολογίζεται από το μοντέλο ατομικής διακριτικότητας (Κωδικός πρόσβασης PDB: 1s28), ii) για την δραστηκή πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 η πειραματική καμπύλη σκέδασης της μεμονωμένης πρωτεΐνης ή η θεωρητική που υπολογίζεται από το μοντέλο ατομικής διακριτικότητας (Κωδικός πρόσβασης PDB: 1s21) για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη, και iii) για το σύμπλοκο η θεωρητική καμπύλη σκέδασης που υπολογίζεται από τα προσδιορισμένα σύμπλοκα σαπερόνης – δραστηκής πρωτεΐνης SycN – YscB –YopN (PDB: 1xkr, Schubot *et al.*, 2005) ή InvB - SipA (PDB: 2fm8, Lilic *et al.*, 2006). Η ερμηνεία της πειραματικής καμπύλης για το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 στηρίζεται αποκλειστικά (100%) στο σωματίδιο του μεγαλύτερου μεγέθους με $\chi^2 = 0.886$ ενώ δεν συμμετέχουν καθόλου οι παράγοντες σχήματος των μεμονωμένων συστατικών (μηδενικοί κλασματικοί όγκοι).

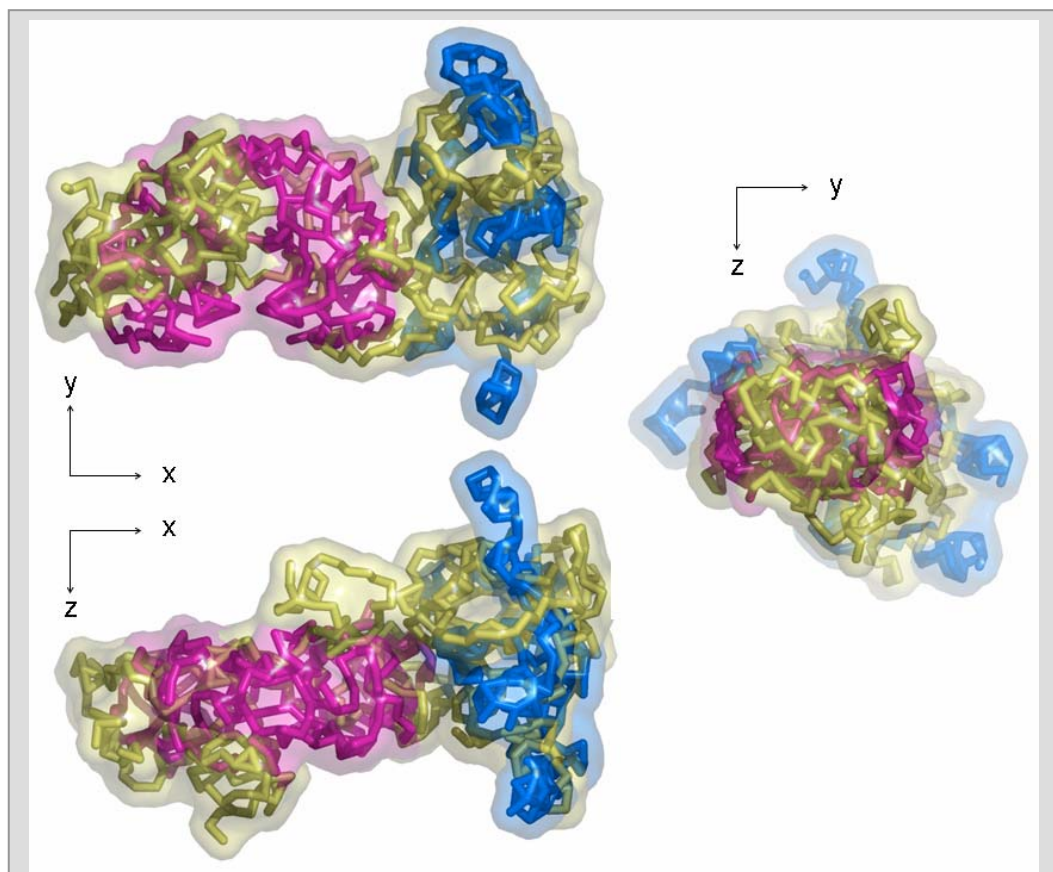
Συνεπώς η τυχόν πολυδιασπορά του δείγματος οφείλεται σε διαφορετικές καταστάσεις της συμπλόκου μορφής.

3.3.5 Ab initio καθορισμός του σχήματος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2

Θεωρώντας ότι η τυχόν πολυδιασπορά του δείγματος οφείλεται σε διαφορετικές καταστάσεις της συμπλόκου μορφής προχωρήσαμε στον καθορισμό του γενικού σχήματος του συμπλόκου βάση της καμπύλης σκέδασης με σκοπό την επανασύσταση του μέσου σωματιδίου στο διάλυμα. Δεκαπέντε ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας διαμέτρου 100 Å χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας έλαβαν χώρα μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (SA, Simulated Annealing) με την χρήση ψευδών ατόμων (DAMMIN, εδάφια 2.7.5 & 2.7.8). Η ακτίνα πακεταρίσματος των ψευδών ατόμων ήταν 2.6 Å. Η τιμή της μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας (mean normalized spatial discrepancy, MNSD, εδάφιο 2.7.7) ήταν 0.928 ± 0.225 , αρκετά υψηλή ώστε να υποδηλώνει ασταθείς *ab initio* ανασυστάσεις. Το πιθανότερο μοντέλο υπολογίστηκε και παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.9, (Πίνακας 3.3). Στο πιθανότερο μοντέλο είναι εμφανής η ύπαρξη δύο επικρατειών σε αυτό.



Εικόνα 3.9. Τρεις κάθετες μεταξύ τους απόψεις του πιο πιθανού μοντέλου όπως υπολογίζεται από τον μέσο όρο 15 ανασυστάσεων του προγράμματος DAMMIN. Τα x αναπαριστούν θέσεις ψευδών ατόμων. Αναπαράσταση μέσω του HYDRO. Πρόγραμμα γραφικών PyMOL.



Εικόνα 3.10. Υπέρθηση 2 μοντέλων του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 σε τρεις κάθετες μεταξύ τους αναπαραστάσεις. Το κίτρινο μοντέλο έχει προέλθει από το πρόγραμμα GASBOR χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας σωματιδίου θεωρώντας 472 ψευδή κατάλοιπα ($x=0.35$). Ενώ το ροζ/μπλε μοντέλο έχει παραχθεί από το πρόγραμμα CREDO περιορίζοντας την ελευθερία του συστήματος με την χρήση του μοντέλου της AvrPphF ORF1 από δεδομένα σιέδωσης (ροζ τμήμα του μοντέλου) και αναθέτοντας στο πρόγραμμα να τοποθετήσει επιπλέον 204 ψευδή κατάλοιπα στον εναπομείναντα όγκο (μπλε τμήμα) που θα αντιστοιχούν στην δραστηκή πρωτεΐνη AvrPphF ORF2. Η απεικόνιση έγινε μέσω του προγράμματος γραφικών PyMOL (DeLano Sc.). Στα μοντέλα εμφανίζονται μόνο οι εικονικές συνδέσεις μεταξύ των ψευδών καταλοίπων. Έχουν προβλεφθεί επίσης και ψευδά μόρια νερού για τα μοντέλα αλλά δεν παρουσιάζονται για λόγους ευκρίνειας.

Αιολούθως 5 εκτελέσεις προσομοίωσης ανόπτησης μέσω ψευδών καταλοίπων (GASBOR, εδάφια 2.7.5 & 2.7.8) έλαβαν χώρα χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας με 472 ψευδή κατάλοιπα στο ασύμμετρο μέρος θεωρώντας 134 κατάλοιπα ανά πολυπεπτιδική αλυσίδα σαπερόνης και 204 που αναλογούν στην δραστηκή πρωτεΐνη. Οι παράμετροι του μοντέλου που είχε την χαμηλότερη ασυμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.10, (κίτρινο μοντέλο, Πίνακας 3.3). Τέλος, χρησιμοποιώντας την δομή της AvrPphF ORF1 από το διάλυμα (Εικόνα 5.10) με την πειραματική καμπύλη του συμπλόκου στο πρόγραμμα CREDO υπολογίστηκαν τα επιπλέον 204 ψευδή κατάλοιπα που αναλογούν στην AvrPphF ORF2 σε 5 διαφορετικές εκτελέσεις.

Πίνακας 3.3. Υδροδυναμικές Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα καθώς και υπολογιζόμενες από τα μοντέλα των DAMMIN, GASBOR και CREDO για το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2.

Παράμετροι	Πειραματικές τιμές	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο, Εικ. 4.9)	GASBOR (κίτρινο μοντέλο, Εικόνα 4.10)	CREDO (ροζ & μπλε μοντέλο, Εικ. 4.10)
R_g (Å) *	31.1			
R_g (Å) #	32.8	30.9	30.0	30.7
R_h (Å)	37.4	32.9	32.5	32.9
D_{max} (Å) #	100.0	105.9	104.1	93.4
V (Å ³)	187496	119300	36780	35560

*Η τιμή της υδροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.

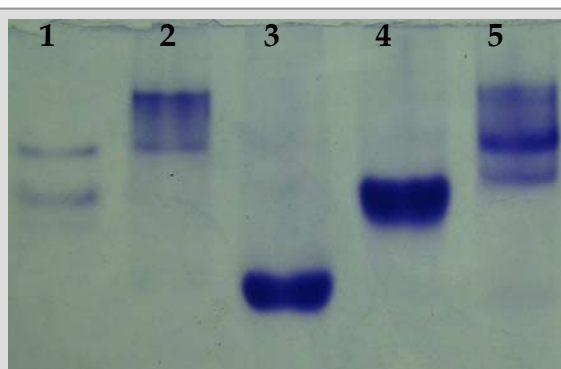
Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $\rho(r)$ μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier.

R_h είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διήθησης.

Οι τιμές των R_g , R_h , D_{max} και V από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).

3.3.6 Εγγενής ηλεκτροφόρηση του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2

Το δείγμα του συμπλόκου ελέγχθηκε επίσης με την ηπιότερη μέθοδο της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Το δείγμα του συμπλόκου πριν την αναγωγική μεθυλίωση φαίνεται να παρουσιάζει δύο κύριες ζώνες (2^η διαδρομή, πήκτωμα εικόνας 3.11) με την δεύτερη να τρέχει πλησίον της 1^{ης} ζώνης που εμφανίζει η δραστική πρωτεΐνη όταν ηλεκτροφορείται μόνη της (1^η διαδρομή εικόνας 3.11). Το δείγμα του συμπλόκου ακολούθως της αναγωγικής μεθυλίωσης όμως εμφανίζεται σε τρεις ζώνες (5^η διαδρομή εικόνας 3.11). Ενισχυμένη αυτή τη φορά όμως είναι η μεσαία ζώνη, η οποία τρέχει μαζί με την 2^η ζώνη του συμπλόκου πριν την αναγωγική μεθυλίωση. Αυτό πιθανώς χαρακτηρίζει την αλλαγή που συντελέστηκε μέσω της διαδικασίας αναγωγικής μεθυλίωσης στα επιφανειακά φορτία της πρωτεΐνης (Ενότητα 3.2.3). Κατά συνέπεια η μεσαία αυτή ζώνη δεν μπορεί να αντιστοιχεί με την 1^η ζώνη της AvrPphF ORF2 (1^η διαδρομή εικόνας 3.11), καθώς η ORF1 στο σύμπλοκο αντιπροσωπεύεται σε διπλάσιο αριθμό μορίων, το σήμα της ζώνης αυτής είναι αρκετά εντονότερο από τις άλλες δύο ζώνες μαζί. Επιπλέον είναι φανερό ότι κανένας από τους τρεις πληθυσμούς δεν μπορεί να αντιπροσωπεύει την διμερή σαπερόνη AvrPphF ORF1 η οποία παρουσιάζει συστηματικά έναν ξεκάθαρο πληθυσμό σε μη αποδιατακτικές ηλεκτροφόρησης είτε πολυακρυλαμίδης είτε αγαρόζης (Εικόνες 4.1 και 5.16).



Εικόνα 3.11. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης. 1) Το AvrPphF ORF2 (26^ο και 27^ο κλάσμα της στήλης μοριακής διήθησης), 2) η σύμπλοκη μορφή ORF1 και ORF2 (κλάσματα 19 και 20 της στήλης μοριακής διήθησης), 3) το AvrPphF ORF1 (24^ο κλάσμα της στήλης μοριακής διήθησης), 4) το AvrPphF ORF1 ύστερα από παραμονή του στους 4°C για 2 μήνες, όταν εξετάστηκε με SAXS φάνηκε ότι έχει δημιουργήσει μη ειδικά συσσωματώματα και 5) δείγμα συμπλόκου που έχει υποστεί αναγωγική μεθυλίωση και έχει περάσει δεύτερη φορά από στήλη μοριακής διήθησης.

3.4 Συμπεράσματα

3.4.1 Το σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ ORF2 δεν είναι μονοδιάσπαρτο σε διάλυμα.

Οι πρωτεΐνες AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 συνεκφράζονται σε ικανοποιητικό βαθμό στο κυτταρόπλασμα της *E.coli* από ετερόλογο σύστημα υπερέκφρασης και παραμένουν στο διαλυτό κλάσμα έπειτα από την διάρρηξη των κυττάρων, (Εδάφιο 3.2.2). Η σαπερόνη AvrPphF ORF1 παράγεται επίσης σε ικανοποιητική ποσότητα και σε διαλυτή μορφή άνευ της δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 (εδάφιο 4.2.2). Κάτι ανάλογο όμως δεν παρατηρήθηκε κατά την μεμονωμένη υπερέκφραση της δραστικής πρωτεΐνης (Γαζή, 2002). Η AvrPphF ORF2 φαίνεται να υπερεκφράζεται στο κυτταρόπλασμα της *E.coli* αλλά όχι σε διαλυτή μορφή, το μεγαλύτερο ποσοστό 75-85 % αυτής πιθανολογείται ότι βρίσκεται σε έγκλειστα σωμάτια (inclusion bodies) καθώς ανιχνεύεται στο αδιάλυτο κλάσμα μετά την διάρρηξη των κυττάρων.

Η περιορισμένη διαλυτότητα της δραστικής πρωτεΐνης δεν επέτρεψε την ανεξάρτητη ανασύσταση του συμπλόκου *in vitro* (στο διάλυμα) μέσω τιτλοδότησης της μία πρωτεΐνης με την άλλη. Κατά συνέπεια πειράματα προσδιορισμού της σταθεράς διαχωρισμού του συμπλόκου (K_d) δεν έλαβαν χώρα. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα γνωστά σύμπλοκα σαπερόνης/δραστικής πρωτεΐνης φαίνεται να είναι αρκετά σταθερά. Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και με την περίπτωση της σαπερόνης AvrPphF ORF1 και της δραστικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 καθώς οι δύο πρωτεΐνες βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν τυχαία κατά τις προσπάθειες απομόνωσης της AvrPphF ORF1 με χρωματογραφία. Η έκφραση της σαπερόνης γινόταν από κατασκευή (construct) που έφερε και τμήμα του δραστικού γονιδίου ORF2 του οπερονίου *avrPphF*. Συνήθως ο συν-καθαρισμός σαν μεθοδολογία ελέγχου αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών είναι σε θέση να φανερώσει κυρίως τις ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις αυτών.

Κατά την εκτέλεση πειραμάτων μοριακής διήθησης του παραγόμενου συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 που ακολούθησε την στήλη νικελίου παρατηρούνται τρεις κύριες κορυφές (εδάφιο 3.3.1). Η πρώτη ανήκει στο σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 σε αναλογία μορίων 2:1, η δεύτερη στο διμερές της σαπερόνης AvrPphF ORF1 και η τρίτη στην μονομερή δραστική πρωτεΐνη AvrPphF ORF2. Κατά την εκτέλεση της στήλης νικελίου όμως το ακροφύσιο ιστιδινών το κουβαλά η διμερής σαπερόνη AvrPphF ORF1. Ως συνέπεια η στήλη νικελίου είναι σε θέση να δεσμεύσει πληθυσμούς είτε μεμονωμένης σαπερόνης είτε του συμπλόκου αλλά τυχόν αδέσμευτη δραστική πρωτεΐνη δεν είναι δυνατό να κατακρατηθεί από το χρωματογραφικό υλικό. Η ύπαρξη απομονωμένης όμως δραστικής πρωτεΐνης στην στήλη μοριακής διήθησης μαρτυρά την αποδέσμευση της από την σαπερόνη. Το φαινόμενο αυτό εξακολουθεί να παρατηρείται όταν από την στήλη μοριακής διήθησης απομονωθεί η κορυφή που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο και υποβληθεί σε νέο κύκλο μοριακής διήθησης. Το νέο χρωματογράφημα διαθέτει επίσης τρεις κορυφές. Η αρχική υπόθεση εργασίας είναι ότι πιθανώς το σύμπλοκο βρίσκεται σε μια δυναμική ισορροπία με τα συστατικά του στο διάλυμα. Η προσεκτικότερη μελέτη των χρωματογραφημάτων (Εικόνα 3.5) παρουσιάζει το περίεργο φαινόμενο του μη πλήρους διαχωρισμού της κορυφής του συμπλόκου από την κορυφή της διμερούς σαπερόνης. Η ένδειξη της απορρόφησης στα 280 nm δεν έφθασε ποτέ τις χαμηλές τιμές της βασικής ευθείας (baseline) μετά την κορυφή του συμπλόκου και πριν την κορυφή της διμερούς σαπερόνης όσες φορές και να υποβλήθηκε το δείγμα των δύο πρωτεϊνών σε μοριακή διήθηση. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται την πιθανή αποδέσμευση των δύο συστατικών κατά την διάρκεια της εξέλιξης του πειράματος, είτε έχει λάβει χώρα και προηγούμενη αποσυμπλοκοποίηση όσο το δείγμα ήταν στο διάλυμα είτε όχι. Η εγγενής (μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση) του συμπλόκου παρουσιάζει παραπάνω του ενός πληθυσμούς (εδάφιο 3.3.6) αλλά δεν φαίνεται να μπορεί κάποιος εξ αυτών να αποδοθεί με ασφάλεια στην ελεύθερη σαπερόνη ή στην ελεύθερη δραστική πρωτεΐνη.

Τα πειράματα σκέδασης σε μικρές γωνίες (SAXS) συμφωνούν επίσης με την μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Τέσσερα διαφορετικά δείγματα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 ελέγχθηκαν για το χαρακτηριστικό πρότυπο σκέδασης στις μικρές γωνίες από

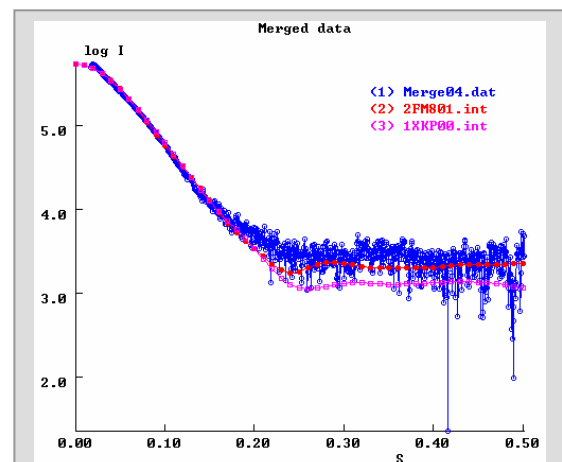
διάλυμα. Παρόλα τα προβλήματα που εμφανίστηκαν κατά τις μετρήσεις στην X33 που έλαβαν χώρα στις 13/2/2006 (εδάφιο 8.6), οι διαφορετικοί τρόποι επεξεργασίας κατέληξαν σε μία ισοδύναμη καμπύλη σκέδασης από το σωματίδιο του συμπλόκου. Το δείγμα φαίνεται να είναι πολυδιάσπαρτο, αν δεχτούμε ότι δεν έχουν εισαχθεί πειραματικά λάθη, λόγω των ασυνεχειών που εμφανίζονται κατά τον υπολογισμό του όγκου Porod. Παρά την εμφανιζόμενη πολυδιασπορά το παρατηρούμενο «μέσο» σωματίδιο από την μέθοδο δεν αντιστοιχεί σε έναν μέσο όρο μεταξύ του συμπλόκου, της μεμονωμένης διμερούς σαπερόνης και της δραστηκής πρωτεΐνης όπως θα αναμέναμε στην εξέταση ενός μείγματος σωματιδίων από την συγκεκριμένη μέθοδο. Σε αντίθεση έχει παραληφθεί ένα σωματίδιο που φαίνεται να επεξηγείται ικανοποιητικά όσο αφορά το μέγεθος από τα δύο μέχρι τώρα χαρακτηρισμένα σύμπλοκα σαπερόνης-τάξης-I/δραστηκής πρωτεΐνης (εδάφια 3.3.4 και 3.4.2). Η παρατηρούμενη ετερογένεια του δείγματος πιθανώς να αντικατοπτρίζει διαφορετικές διαμορφώσεις του συμπλόκου.

Ένας επιπρόσθετος παράγοντας ετερογένειας που θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη είναι η γρήγορη πρωτεόλυση που χαρακτηρίζει την δραστηκή πρωτεΐνη όταν βρίσκεται σε σύμπλοκη μορφή με την σαπερόνη (εδάφιο 3.4.3).

Παρόλα αυτά, όλα τα πειράματα συγκλείουν στην απουσία παρατήρησης μονοδιάσπαρτου δείγματος του συμπλόκου είτε λαμβάνει χώρα κάποιος βαθμός διάσπασης του είτε το σύμπλοκο κατέχει περισσότερες από μία διαμορφώσεις. Ο μεγάλος αριθμός δοκιμών κρυστάλλωσης χωρίς θετικό αποτέλεσμα ενισχύει επίσης την παραπάνω θεώρηση.

3.4.2 Το γενικό σχήμα και μέγεθος του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 προσεγγίζει αυτό των άλλων συμπλόκων σαπερονών – δραστηκών πρωτεϊνών.

Οι παράγοντες σχήματος (form factors) των 2 προσδιορισμένων δομών με κωδικούς πρόσβασης στην PDB: 1xkr (ετεροδιμερής σαπερόνη SycN-YscB σε σύμπλοκο με μεγάλο τμήμα της YopN, Schubot *et al.*, 2005) και 2fm8 (σαπερόνη InvB με δραστηκή πρωτεΐνη SipA, Lilic *et al.*, 2006), (Εικόνα 1.5, σελίδα 19), προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος CRY SOL (εδάφιο 2.7.6). Στην εικόνα 3.12 παρουσιάζονται οι υπολογισμένες καμπύλες των δύο συμπλόκων και αντιπαραβάλλονται με την πειραματική καμπύλη από το δείγμα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2. Στην περιοχή των μικρών γωνιών παρατηρούμε ότι οι καμπύλες συμπίπτουν ικανοποιητικά γεγονός που συνεπάγεται την ομοιότητα στο γενικό σχήμα και μέγεθος των αντίστοιχων συμπλόκων. Παρόλα αυτά η πειραματική καμπύλη είναι πλησιέστερη στην περίπτωση του InvB – SipA παρά στο σύμπλοκο SycN – YscB – YopN. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και η ανάλυση μέσω του προγράμματος OLIGOMER με $\chi^2 = 0.85$. Χαρακτηριστική επίσης είναι και η παρουσία δύο ανεξάρτητων επικρατειών στο πιο πιθανό μοντέλο ψευδών ατόμων (Εικόνα 3.9) Η προαναφερθείσα πιθανή πολυδιασπορά του δείγματος κατά συνέπεια μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές διευθετήσεις των δύο πρωτεϊνικών επικρατειών του συμπλόκου. Μελετώντας τον τρόπο αλληλεπίδρασης άλλων ζευγών σαπερονών – δραστηκών πρωτεϊνών (εδάφιο 1.4.1.2, εικόνα 1.5) είναι φανερό ότι μόνο το αμινοτελικό άκρο της δραστηκής πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με την σαπερόνη σε μία εκτεταμένη διαμόρφωση του ενώ το υπόλοιπο τμήμα παραμένει ανεξάρτητο και συχνά



Εικόνα 3.12. Υπερθεση των υπολογιζόμενων καμπύλων SAXS από το πρόγραμμα CRY SOL των συμπλόκων σαπερόνης – δραστηκής πρωτεΐνης 1xkr και 2fm8 στην πειραματική καμπύλη του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.

διαθέτει αέραια την ενζυμική του δράση (Luo *et al.*, 2001, Birtalan *et al.*, 2002, Neumayer *et al.*, 2004). Σύμφωνα με αυτά τα χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι το αμινοτελικό άκρο της δραστικής πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την σαπερόνη και η σαπερόνη αποτελούν την μία επικράτεια του συμπλόκου ενώ το υπόλοιπο τμήμα της δραστικής πρωτεΐνης αποτελεί μια ξεχωριστή δεύτερη επικράτεια. Σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση έχει δείχθει πειραματικά ότι μόνο το αμινοτελικό τμήμα της AvrPphF ORF2 απαιτείται για την αλληλεπίδραση με την σαπερόνη, (Γαζή, 2002, Μπαστάκη & Πανόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Κατά την σύγκριση της πειραματικής καμπύλης σκέδασης του συμπλόκου με τις προσδιορισμένες δομές άλλων σαπερονών-δραστικών πρωτεϊνών (Εικόνα 3.13) οι αποκλίσεις συσσωρεύονται στις ευρείες γωνίες (υψηλότερη διακριτικότητα) καθώς η δεύτερη επικράτεια των συμπλόκων διαθέτει υψηλή ετερογένεια αντιπροσωπεύοντας την εκάστοτε δραστική πρωτεΐνη.

3.4.3 Η δραστική πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 φαίνεται να αλλάζει την στερεοδιάταξη της κατά την δέσμευση στη σαπερόνη AvrPphF ORF1

Πειράματα σκέδασης από διάλυμα (SAXS) έλαβαν χώρα για μεθυλιωμένο δείγμα της μεμονωμένης πρωτεΐνης AvrPphF ORF2. Η κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή της δραστικής πρωτεΐνης από τους Singer *et al.* (2004) δεν ήταν αριετή για την ικανοποιητική ερμηνεία της πειραματικής καμπύλης σκέδασης στις μικρές γωνίες από διάλυμα SAXS (δεδομένα δεν παρατίθενται). Από την κρυσταλλογραφική δομή λείπουν τα 29 αμινοτελικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης, ενώ το μοτίβο δέσμευσης της σαπερόνης κατά Lilic *et al.*, (2006), (Ενότητα 1.4.1.2) φαίνεται να εντοπίζεται εσωτερικά στην προσδιορισμένη δομή της δραστικής πρωτεΐνης. Ως αποτέλεσμα θεωρείται αναγκαία η αλλαγή της στερεοδιάταξης της δραστικής πρωτεΐνης, ώστε να αποκαλυφθούν τα απαραίτητα κατάλοιπα, για την αλληλεπίδραση με την σαπερόνη AvrPphF ORF1. Πράγματι οι προσπάθειες να επιτευχθεί μοντελοποίηση σταθερού σώματος (rigid body) του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 βάση της πειραματικής καμπύλης σκέδασης από το διάλυμα ήταν ανεπιτυχείς. Ως σταθερά σώματα χρησιμοποιήθηκαν οι δομές των ελεύθερων συστατικών του συμπλόκου όπως προέκυψαν κατά Singer *et al.*, (2004) με κωδικούς πρόσβασης PDB: 1s28 και 1s21. Κανένας σχετικός προσανατολισμός των δύο δομών δεν ήταν σε θέση να προσεγγίσει την πειραματική καμπύλη SAXS.

3.5 Αναφορές

- Birtalan S.C., Phillips R.M. & Ghosh P., 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell.* 9, 971.
- Buell C.R., Joardar V., Lindeberg M., Selengut J., Paulsen I.T., Gwinn M.L., Dodson R.J., Deboy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Daugherty S., Brinkac L., Beanan M.J., Haft D.H., Nelson W.C., Davidsen T., Zafar N., Zhou L., Liu J., Yuan Q., Khouri H., Fedorova N., Tran B., Russell D., Berry K., Utterback T., Van Aken S.E., Feldblyum T.V., D'Ascenzo M., Deng W-L., Ramos A.R., Alfano J.R., Cartinhour S., Chatterjee A.K., Delaney T.P., Lazarowitz S.G., Martin G.B., Schneider D.J., Tang X., Bender C.L., White O., Fraser C.M. & Collmer A., 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100,10181.
- De Ley J., 1968. DNA base composition and hybridization in the taxonomy of the phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6, 63.
- Garcia de la Torre J., Huertas M.L. & B. Carrasco B., 2000. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719.
- Innes R.W., Bent A.F., Kunkel B.N., Bisgrove S.R. & Staskawicz B.J., 1993. Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol* 175, 4859.
- Joardar V., Lindeberg M., Jackson R.W., Selengut J., Dodson R., Brinkac L.M., Daugherty S.C., DeBoy R., Durkin A.S., Giglio M.G., Madupu R., Nelson W.C., Rosovitz M.J., Sullivan S., Crabtree J.,

- Creasy T., Davidsen T., Haft D.H., Zafar M., Zhou L., Halpin R., Holley T., Khouri H., Feldblyum T., White O., Fraser C.M., Chatterjee A.K., Cartinhour S., Schneider D.J., Mansfield J., Collmer A., & Buell C.R., 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.* 187, 6488.
- Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J. & Svergun D.I., 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* 36, 1277.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680.
- Lawson Ch.L. & Hanson R.J., 1974. Solving Least Squares Problems. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.
- 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.
- Luo Y., Bertero M.G., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Wenk M.R., Creagh L., et al., 2001. Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1031.
- Neumayer W., Groll M., Lehmann V., Antoneka U., Kahler S., Heesemann J., & Wilharm G., 2004. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr. Purif.* 35, 237.
- Pirhonen M.U., Lidell M.C., Rowley D., Lee S.W., Silverstone S., Liang Y., Keen, N.T. & Hutcheson S.W., 1996. Phenotypic expression of *Pseudomonas syringae* *avr* genes in *E. coli* is linked to the activities of the *hrp*-encoded secretion system. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 252.
- Robert-Seilaniantz A., Shan L., Zhou J-M. & Tang X., 2005. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Type III Effector HopF2 Has a Putative Myristoylation Site Required for Its Avirulence and Virulence Functions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 130.
- 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.
- Shan L., Oh H-s., Chen J., Guo M., Zhou J., Alfano J.R., Collmer A., Jia X. & Tang X., 2004. The HopPtoF Locus of *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 447.
- Singer A.U., Desveaux D., Betts L., Chang J. H., Nimchuk Z., Grant S. R., Dangel J.L. & Sodnek J., 2004. Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure* 12, 1669.
- Tsiamis G., Mansfield J.W., Hockenhull R., Jackson R.W., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennet M.A., Stevens C. *et al.*, 1998. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrpphF* in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19, 3204.
- Γαζή Α.Δ., 2002. *AvrPphB, AvrPphF: Μελέτες δύο μολυσματικών παραγόντων από την Pseudomonas syringae pv phaseolicola. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Επιβλέπων καθηγητής: Ν.Ι. Πανόπουλος. Πανεπιστήμιο Κρήτης.*

Κρυστάλλωση, προκαταρκτική ανάλυση δεδομένων περιθλασης και πειράματα σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα της AvrPphF ORF1, μίας τυπικής σαπερόνης τάξης IA

“Η αναποδιά έχει μία μονιμότητα πειραματική,
αποτελεί όπως λέμε τον κανόνα”

Οδ. Ελίσης

Η πρωτεΐνη AvrPphF ORF1, που κωδικοποιείται από το πρώτο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του οπερονίου *avrPphF* της *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, φαίνεται να αντιπροσωπεύει μία τάξης IA σαπερόνη του εκκριτικού συστήματος III αν η αλληλουχία της αναλυθεί με μεθόδους αναγνώρισης αναδίπλωσης (Γαζή, 2002). Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η κρυστάλλωση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με θειικό αμμώνιο, η συλλογή δεδομένων περιθλασης ακτίνων-X και η προκαταρκτική ανάλυσή τους. Για την βελτίωση της περιθλασης δοκιμάστηκε η μέθοδος της αναγωγικής μεθυλίωσης των λυσινών. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων αυτών οι ατομικές συντεταγμένες της πρωτεΐνης κατατέθηκαν στην πρωτεϊνική βάση δεδομένων PDB (Protein Data Bank) από την ομάδα του καθηγητή Sondeck (πανεπιστήμιο Βόρειας Καρολίνα Chapel Hill).

4.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο *avrPphF* ORF1 κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε ως μέρος του οπερονίου *avrPphF* από τις φυλές 5 και 7 της *P. syringae* pv *phaseolicola* (Tsiamis *et al.*, 1998, Κεφάλαιο 3). Το πρώτο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, ORF1, κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μήκους 136 αμινοξέων (MW \approx 15 kD), με υψηλό ποσοστό λευκινών και όξινου θεωρητικού ισοηλεκτρικού³⁵ σημείου (pI = 6.3). Ένα μοντέλο της τριδιάστατης δομής της πρωτεΐνης

³⁵ Το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) είναι το pH στο οποίο ένα μόριο φέρει μηδενικό καθαρό ηλεκτρικό φορτίο. Καθώς οι πρωτεΐνες είναι επαμφοτερίζοντα μόρια, διαθέτουν δηλαδή όξινες και βασικές λειτουργικές ομάδες, το σημείο αυτό δύναται να παίρνει συγκεκριμένη τιμή σε περιορισμένο εύρος. Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή που υπολογίζεται από την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης και δύναται να διαφέρει από την πραγματική τιμή που παρατηρείται πειραματικά σε ηλεκτροφόρηση ισοηλεκτρικού εστιασμού. Στην περίπτωση αυτή το pI συμπίπτει με το μηδενικό καθαρό φορτίο της εξωτερικής επιφάνειας του μορίου και κατά συνέπεια εξαρτάται από την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης.

κατασκευάστηκε μέσω αλγορίθμων αναγνώρισης αναδίπλωσης (3D-PSSM και mGenTHREADER, εδάφιο 2.1) χρησιμοποιώντας την CesT (PDB id: 1k3e) ως μήτρα (Γαζή, 2002). Η CesT είναι μία τάξης I σαπερόνη του εκκριτικού συστήματος τύπου III από την εντεροπαθογόνο *E. coli* (εδάφιο 1.4.1). Πρωταρχικός στόχος της εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1. Η μελέτη της δομής της πρωτεΐνης θα μας επέτρεπε να διευκρινίσουμε αν αυτό το είδος σαπερονών επιστρατεύεται και από το εκκριτικό σύστημα τύπου III των φυτοπαθογόνων βακτηρίων ή όχι. Τάξης I σαπερόνες στα εκκριτικά συστήματα τύπου III φυτοπαθογόνων βακτηρίων δεν είχαν βρεθεί και μελετηθεί δομικά ως τότε. Μετά τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής έγινε σαφές ότι η πρωτεΐνη παρουσιάζει τα τυπικά δομικά χαρακτηριστικά μίας τάξης I σαπερόνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III, (Singer *et al.*, 2004).

4.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.1 Επαγωγή της έκφρασης της AvrPphF ORF1

Ολονύκτια υγρή προ-καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* DH5α (80 ml) μετασχηματισμένα με την κατασκευή rProEX-HT-AvrPphF-ORF1 (Γαζή, 2002, Παράρτημα 8.1), χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 4 λίτρων LB + 100μg/ml αμπικιλίνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.5. Σε αυτό το σημείο η έκφραση της χμαιορικής³⁶ πρωτεΐνης επάγεται με προσθήκη 1 mM IPTG στην καλλιέργεια και μεταφορά της στους 32°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση μετά από 4 ώρες και 30 λεπτά. Η κυτταρική πάστα (≈ 10 g) φυλάγεται στους -20°C.

4.2.2 Απομόνωση της AvrPphF ORF1

Η επαναδιάλυση της κυτταρικής πάστας γίνεται σε 90 ml ρυθμιστικού διαλύματος A (5 mM ιμιδαζολίου, 300 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM β-μερικαπτοαιθανόλης). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπέρηχους σε συνολικό χρόνο 10 min παρουσία αναστολέων πρωτεασών. Μετά την φυγοκέντρηση (14.000 x g, 45 min) για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων, το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη 5 ml Ni-NTA αφαρόζης (QIAGEN) εξισορροπημένης με 10 όγκους στρώματος (bed volume) διαλύματος A. Η στήλη πλένεται με 40 όγκους στρώματος με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε βήματα των 10, 20 και 30 mM. Η πρωτεΐνη ελκνύεται σε 6 κλάσματα διαφορετικής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου σε βήματα των 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM. Τα τελευταία 4 κλάσματα έλκνωσης επιλέγονται συνήθως καθώς εκτιμάται από αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης ότι διαθέτουν καθαρή πρωτεΐνη σε ποσοστό ≈ 85%. Τα κλάσματα υπόκεινται σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 5 mM β-μερικαπτοαιθανόλης). Στη συνέχεια επωάζονται με την πρωτεάση rTEV στους 30°C για 2 ώρες ώστε να απομακρυνθεί το ακροφύσιο ιστιδινών και φορτώνονται σε μία δεύτερη στήλη Ni-NTA αφαρόζης. Η στήλη δεσμεύει τα ελεύθερα ακροφύσια ιστιδινών καθώς και την πρωτεάση rTEV, η οποία φέρει επίσης ακροφύσιο ιστιδινών. Η πρωτεΐνη AvrPphF ORF1 απελευθερωμένη πλέον από το ακροφύσιο



Εικόνα 4.1. Εγγενής ηλεκτροφόρηση PAGE του τελικού δείγματος AvrPphF ORF1 σε 2 διαφορετικές ποσότητες.

³⁶ Η πρωτεΐνη παράγεται σε σύντηξη με αμινοτελικό ακροφύσιο 20 επιπλέον αμινοξέων: MSYYHHHHHHHDYDIPTEENLYFQGA, τα υπογραμμισμένα αμινοξέα καθορίζουν την θέση αναγνώρισης της rTEV πρωτεάσης.

ιστιδινών παραλαμβάνεται απευθείας από την έξοδο της κολώνας κατά την φόρτωση του δείγματος. Η παρεληφθείσα πρωτεΐνη συγκεντρώνεται ως τον τελικό όγκο των 1.5 ml και φορτώνεται σε στήλη μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 εξισορροπημένης με το ρυθμιστικό διάλυμα Γ (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM β-μερικαπτοαιθανόλης). Ακολουθεί ισοκρατική έκλουση από την στήλη με το ίδιο διάλυμα ενώ συλλέγονται κλάσματα των 4 ml. Τα κλάσματα αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) και εκείνα που εμπεριέχουν πρωτεΐνη συλλέγονται και υπόκεινται σε διαπίδυση έναντι ρυθμιστικού διαλύματος Δ (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM DTT). Η πρωτεΐνη συγκεντρώνεται μέσω δια-διύλισης ως τα 7-9 mg/ml. Η αναγωγική μεθύλιση του δείγματος έγινε όπως περιγράφεται για την περίπτωση του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2, (εδάφιο 3.2.3).

4.2.3 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα στις μικρές γωνίες

Τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα συλλέχθηκαν στη γραμμή ακτινοβολίας X33 του ευρωπαϊκού συγχροτρονίου (DESY), (εδάφιο 2.7.8). Συλλέχθηκαν δεδομένα σκέδασης από διάλυμα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της AvrPphF ORF1: 11, 5.5 και 2.6 mg/ml. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων εκτιμήθηκαν με την καταγραφή της απορρόφησης τους στα 280 nm. Η συλλογή έλαβε χώρα στους 13°C σε διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT. Η ανάλυση των δεδομένων έλαβε χώρα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2, (Ενότητα 2.7.8).

4.2.4 Κρυστάλλωση της AvrPphF ORF1

Η στρατηγική των πειραμάτων κρυστάλλωσης αναλύεται διεξοδικά στο εδάφιο 2.5.5. Καλοσχηματισμένοι τρισδιάστατοι κρύσταλλοι της AvrPphF ORF1 εμφανίστηκαν εντός 16 h σε σταγόνες που περιείχαν 2 M θειικό αμμώνιο, 2% PEG400, 50 mM HEPES/NaOH pH 7.5 στους 19°C. Οι κρύσταλλοι ήταν ασταθείς και παρουσίαζαν περίοδο ημιζωής³⁷ 24 ωρών. Η συνθήκη αυτή βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του κατακρημνιστή και του PEG400, το pH και την θερμοκρασία. Τελικά, η αντικατάσταση του PEG400 από MPD, η μείωση της θερμοκρασίας (7°C) και η χρήση καθιστών σταγόνων έναντι των κρεμαστών αύξησαν το χρόνο ημιζωής³⁷ των κρυστάλλων στα 2 έτη (Εικόνα 4.2). Οι σταγόνες κρυστάλλωσης προέκυψαν με ανάμιξη 5 μl πρωτεϊνικού δείγματος και 5 μl διαλύματος δεξαμενής.

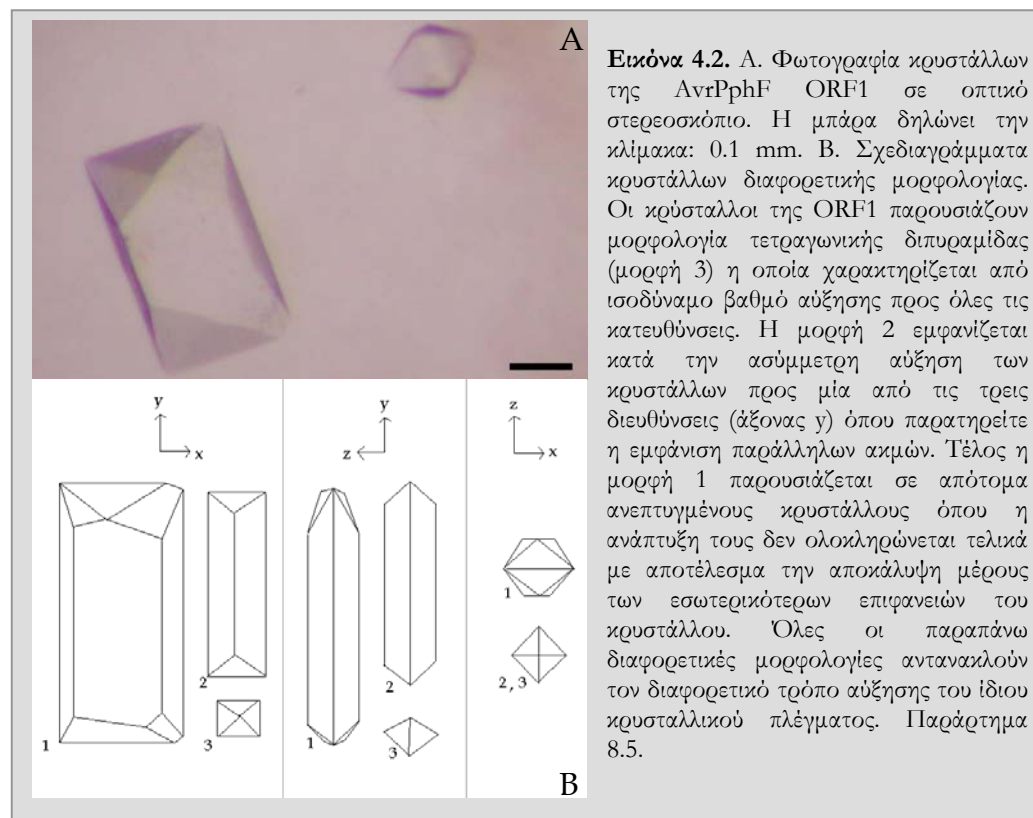
Κρύσταλλοι επίσης παρήχθησαν για το μεθυλιωμένο δείγμα της AvrPphF ORF1. Καθώς ο κύριος κατακρημνιστής κατά τα πειράματα κρυστάλλωσης είναι αλάτι (θειικό αμμώνιο), δοκιμάστηκε να αντικατασταθεί αυτό από θειικό λίθιο, κορεσμένο διάλυμα του οποίου χρησιμοποιούταν σαν κρυστοπροστατευτικό³⁸ στη συνέχεια κατά την συλλογή δεδομένων. Κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας 1.4 – 1.2 M θειικού λιθίου και βελτιστοποιήθηκαν παραπέρα όταν άλλαξε η αναλογία πρωτεϊνικού δείγματος και διαλύματος δεξαμενής στην σταγόνα από 1:1 σε 1:3. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονταν λιγότεροι αρχικοί κρυσταλλικοί πυρήνες που τελικά έφθαναν σε μεγαλύτερα μεγέθη.

³⁷ Ο χρόνος ημίσιας ζωής της ποσότητας μιας ουσίας που υπόκειται σε εκθετική φθορά είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ποσότητα να φθάσει στο μισό της αρχικής της τιμής. Αρχικά ο όρος χρησιμοποιήθηκε στην ραδιενεργό διάσπαση, αλλά εφαρμόζεται επίσης σε πολλά άλλα πεδία ενώ περιλαμβάνει και φαινόμενα που δεν περιγράφονται από εκθετική φθορά.

³⁸ Ως κρυστοπροστατευτικό ορίζεται η ουσία που χρησιμοποιείτε για την προστασία ευαίσθητων υλικών (π.χ. βιολογικοί ιστοί) κατά τον χειρισμό τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (προστασία έναντι του σχηματισμού πάγου). Στην κρυσταλλογραφία χρησιμοποιείται κατά την συλλογή δεδομένων περιθλασης σε ρεύμα αζώτου (-170 °C) ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός πάγου. Ο τυχαίος προσανατολισμός των κρυστάλλων του πάγου που σχηματίζονται οδηγούν σε χαρακτηριστικό πρότυπο σκέδασης (εμφάνιση 5 δακτυλιδιών στον ανιχνευτή σε διακριτικότητες 3.897, 3.669, 3.441, 2.671 και 2.249) κατά την ακτινοβολία του κρυστάλλου.

4.2.5 Συλλογή και επεξεργασία δεδομένων περιθλασης από κρυστάλλους.

Οι κρύσταλλοι της AvrPphF ORF1 ήταν σταθεροί σε χαμηλές θερμοκρασίες (3 - 9°C), αύξηση της θερμοκρασίας είχε σαν αποτέλεσμα την μορφολογική αλλοίωση των κρυστάλλων αλλά και την αλλοίωση της περιθλασης τους. Μορφολογικά κατά την αύξηση της θερμοκρασίας στους 25°C εξαφανίζονταν οι ακμές του κρυστάλλου και ο κρύσταλλος έμοιαζε σαν λιωμένη σταγόνα. Αν οι κρύσταλλοι επωάζονταν στην συνέχεια στους 4°C τότε επανακτούσαν την αρχική τους μορφή.

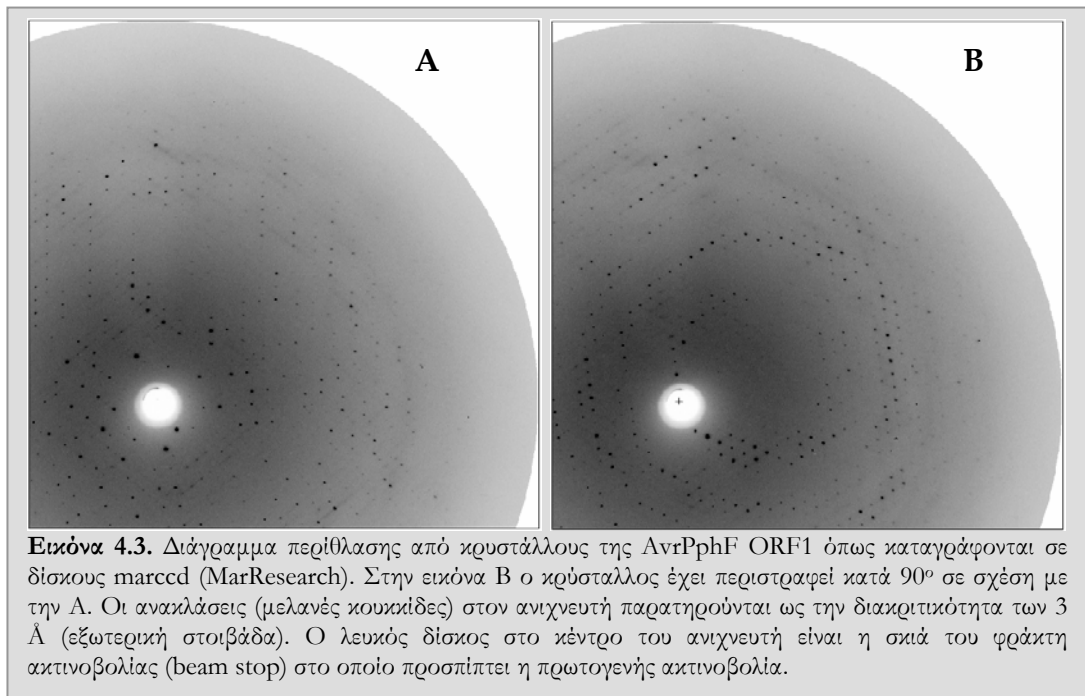


Κρύσταλλοι της AvrPphF ORF1 κατάλληλων διαστάσεων τοποθετήθηκαν στην γραμμή ακτινοβόλησης X11 για τη συλλογή δεδομένων περιθλασης. Η μεταφορά ενός κρυστάλλου γίνεται μέσω βρόχου (cryoloop) κατάλληλου μεγέθους. Κρυοπροστατευτικό διάλυμα κορεσμένου θειικού λιθίου εξισορροπημένο στους 4°C προστίθεται απευθείας μέσα στην σταγόνα κρυστάλλωσης σε 7πλάσιο όγκο. Με τη βοήθεια κατάλληλου βρόχου και την χρήση οπτικού στερεοσκοπίου ο κρύσταλλος 'φαρεύεται' και τοποθετείται απευθείας στη γωνιομετρική κεφαλή³⁹ όπου προσκολλάται μέσω μαγνητικής βάσης, ενώ συγχρόνως ρεύμα αζώτου ψύχει τον κρύσταλλο στους -173°C (Rubinson *et al.*, 2000). Η ευθυγράμμιση έχει προηγηθεί με άδειο βρόχο (εδάφιο 2.8.9). Οι κρύσταλλοι της AvrPphF ORF1 αναπτύσσονται όμως στους 4 - 9°C και αποσταθεροποιούνται σε υψηλότερη θερμοκρασία (εδάφιο 4.2.4), έτσι κατά την διαδικασία τοποθέτησης τους στην γωνιομετρική κεφαλή λάμβανε χώρα σημαντική αλλοίωση του πρότυπου περιθλασης τους. Η όλη διαδικασία εξελισσόταν εντός του πειραματικού κλωβού της γραμμής ακτινοβόλησης, ο οποίος βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον η διαδικασία 'ψαρέματος' του κρυστάλλου από την σταγόνα γινόταν υπό το φως του στερεοσκοπίου με αποτέλεσμα την θέρμανση τους παρά την παρουσία πάγου εκατέρωθεν της πειραματικής διατάξεως.

³⁹ Η γωνιομετρική κεφαλή δίνει την δυνατότητα εύρεσης και επιλογής του προσανατολισμού του κρυστάλλου ως προς τις ακτίνες-X. Η κεφαλή βρίσκεται στην ευθεία μεταξύ της πηγής ακτίνων-X και του ανιχνευτή, ενώ στο συγκεκριμένο σημείο προσπίπτει το ρεύμα του αζώτου.

Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή MARCCD (Εικόνα 4.3). Η συλλογή έλαβε χώρα με έκθεση του κρυστάλλου σε σταθερή δόση ακτινοβολίας (1300 keV) και την ταυτόχρονη περιστροφή του ανά 1° . Τα σημεία περίθλασης εντοπίστηκαν, καταχωρήθηκαν με την τοποθέτηση δεικτών hkl και τα μέγιστα τους ολοκληρώθηκαν για τον υπολογισμό της έντασης με το πρόγραμμα DENZO ενώ τοποθετήθηκαν στην ίδια κλίμακα με τη βοήθεια του προγράμματος SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997). Η αρχική επεξεργασία των δεδομένων παρουσιάζεται στο εδάφιο 2.8.3).

Για την εύρεση της λύσης της δομής μέσω μοριακής αντικατάστασης (εδάφιο 2.8.6) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MOLREP (CCP4) και ως μήτρα η μία πολυπεπτιδική αλυσίδα από το μοντέλο 1s28 (Singer *et al.*, 2004). Η βελτιστοποίηση βρίσκεται σε εξέλιξη και λαμβάνει χώρα σύμφωνα με τα αναφερόμενα στα εδάφια 2.8.8 και 2.8.9.



Εικόνα 4.3. Διάγραμμα περίθλασης από κρυστάλλους της AntiPphF ORF1 όπως καταγράφονται σε δίσκους marccd (MarResearch). Στην εικόνα B ο κρυστάλλος έχει περιστραφεί κατά 90° σε σχέση με την A. Οι ανακλάσεις (μελανές κουκκίδες) στον ανιχνευτή παρατηρούνται ως την διακριτικότητα των 3 Å (εξωτερική στοιβάδα). Ο λευκός δίσκος στο κέντρο του ανιχνευτή είναι η σκιά του φράκτη ακτινοβολίας (beam stop) στο οποίο προσπίπτει η πρωτογενής ακτινοβολία.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Ανάλυση δεδομένων περίθλασης

Οι κρύσταλλοι της AvrPphF ORF1 ανήκουν στην χωρομάδα συμμετρίας P2₁2₁2₁ (ορθογώνιο σύστημα, απλό πλέγμα) με διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας $a = 93.3 \text{ \AA}$, $b = 96.3 \text{ \AA}$, $c = 106.0 \text{ \AA}$. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία από το πρόγραμμα SCALA για το σύνολο των δεδομένων περίθλασης καθώς και για τη στοιβάδα υψηλής διακριτικότητας.

Πίνακας 4.1

	Σύνολο δεδομένων	Στοιβάδα υψηλής διακριτικότητας
Όριο χαμηλής διακριτικότητας	46.42 \AA	2.90 \AA
Όριο υψηλής διακριτικότητας	2.75 \AA	2.75 \AA
Συνολικός αριθμός ανακλάσεων	174942	25325
Αριθμός ανεξάρτητων ανακλάσεων	25468	3638
Πληρότητα	99.9%	100%
Πολλαπλότητα	6.9	7.0
I/ σ (I)	19.7	4.6
R _{symm}	0.067	0.484
R _{meas}	0.073	0.523

Οι παράγοντες R_{symm} και R_{meas} όπως ορίζονται στο εδάφιο 2.8.3.

Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία από το ίδιο σύνολο δεδομένων όπως προκύπτουν από το πρόγραμμα SCALEPACK. Στις δύο πρώτες στήλες των πινάκων 4.2 A και B αναφέρονται τα κατώτερα και ανώτερα όρια των στοιβάδων διακριτικής ικανότητας σε \AA ngström. Στον πίνακα 4.2 A δίνονται οι λόγοι των τιμών των εντάσεων προς την τυπική απόκλιση (I/ σ (I), σήμα προς θόρυβο) σε εκατοστιαίες τιμές. Η τελευταία στήλη αντιστοιχεί στην πληρότητα των δεδομένων. Στον πίνακα 4.2 B παρουσιάζεται η μέση ένταση και ο παράγοντας R (η μέση διαφορά στις μετρήσεις της ίδιας ανάκλασης) καθώς και η τιμή του χ^2 , η οποία ισούται περίπου με την μονάδα αν τα σφάλματα μετρήσεων είναι πράγματι τυχαία και ακολουθούν την κανονική κατανομή.

Επιπλέον για την οπτική παρατήρηση των συστηματικών απουσιών που αναμένονται στην περίπτωση της χωρομάδας P2₁2₁2₁ χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα hklview (CCP4). Πράγματι οι ανακλάσεις h00, 0k0 και 00l δεν παρατηρήθηκαν για τις περιττές τιμές των δεικτών h, k και l (Stout & Jensen 1968, International Tables for X-ray Crystallography 1989, Vol. A). Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζονται επίσης τα τρία διαγράμματα των παραπάνω αξονικών (axial) ανακλάσεων h, k και l από το πρόγραμμα SCALA. Παρατηρούμε ότι οι παρούσες ανακλάσεις ικανοποιούν τον κανόνα $h=2n$, $k=2n$ και $l=2n$ επιβεβαιώνοντας την επιλογή της συγκεκριμένης χωρομάδας συμμετρίας. Παρακάτω στον υπολογισμό των χαρτών Patterson (εδάφιο 2.8.6.1) παρουσιάζεται και η ανάλυση των τομών ή επιπέδων Harker η οποία επίσης υποστηρίζει την συγκεκριμένη χωρομάδα συμμετρίας.

Πίνακας 4.2 Α. Ποσοστιαία πληρότητα δεδομένων ανά στοιβάδα διακριτικότητας.

Στοιβάδα		Εκατοστιαίο ποσοστό ανακλάσεων με I/σ λιγότερο από:								
Κατώτερο	Ανώτερο	0	1	2	3	5	10	20	>20	Σύνολο
30.00-7.30	0.9	1.6	2.4	3.1	3.9	8.2	13.0	85.5	98.5	
7.30-5.80	0.9	1.9	3.6	5.3	7.6	13.6	24.4	75.6	100.0	
5.80-5.07	0.9	2.0	3.0	4.2	7.2	14.8	28.5	71.5	100.0	
5.07-4.61	0.7	1.9	3.1	4.4	6.7	14.8	27.0	73.0	100.0	
4.61-4.28	0.9	1.5	2.6	3.5	6.7	12.6	22.9	77.1	100.0	
4.28-4.03	1.3	2.5	3.9	5.4	8.2	16.2	27.9	72.1	100.0	
4.03-3.83	1.4	3.5	5.2	7.1	12.5	20.7	35.6	64.4	100.0	
3.83-3.66	1.8	3.7	5.6	8.4	13.0	23.7	41.5	58.5	100.0	
3.66-3.52	3.2	5.0	7.5	10.2	16.1	27.0	47.8	52.2	100.0	
3.52-3.40	3.0	5.3	8.2	13.1	19.2	34.7	57.0	43.0	100.0	
3.40-3.29	2.8	6.9	12.1	17.8	25.7	42.8	65.6	34.4	100.0	
3.29-3.20	3.0	7.0	13.0	17.9	26.9	46.9	71.2	28.8	100.0	
3.20-3.12	3.7	9.9	16.9	24.1	36.6	56.6	81.2	18.8	100.0	
3.12-3.04	5.5	13.6	21.6	29.0	43.9	65.0	86.9	13.1	100.0	
3.04-2.97	5.2	12.8	22.7	30.6	45.4	68.4	88.2	11.8	100.0	
2.97-2.91	5.2	15.2	25.7	37.6	52.3	75.5	92.9	7.1	100.0	
2.91-2.85	10.2	21.7	32.8	44.2	60.6	81.9	95.9	4.1	100.0	
2.85-2.80	12.7	27.0	40.9	53.8	67.7	83.3	96.4	3.6	100.0	
2.80-2.75	10.8	27.1	41.1	52.3	68.2	86.1	97.1	2.9	100.0	
2.75-2.70	13.6	28.4	44.4	54.4	71.4	89.2	97.5	2.5	100.0	
Σύνολο	4.3	9.8	15.6	21.0	29.6	43.6	59.3	40.6	99.9	

Πίνακας 4.2 Β Πίνακας στατιστικών στοιχείων για την ορθότητα του επιλεγμένου κρυσταλλικού πλέγματος P2₁2₁2₁

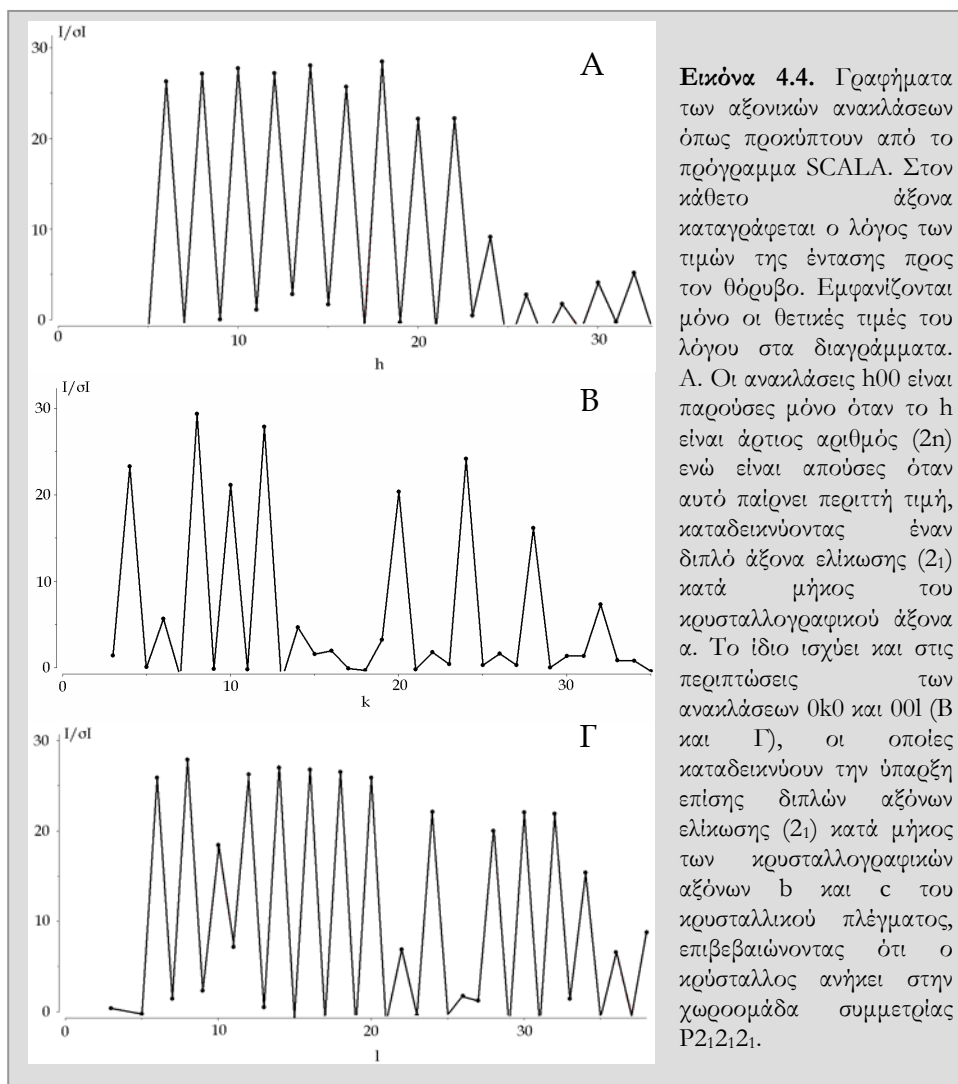
Στοιβάδα		Μέση	Μέσο	Κανον. Γραμμικό Τετράγωνο			
Ανώτερο	Κατώτερο	I	Σφάλμα	Στατ.	χ ²	R	R
όριο (Angstrom)							
30.00	7.30	9814.8	129.7	73.2	0.994	0.019	0.020
7.30	5.80	3273.2	56.5	39.6	0.992	0.032	0.029
5.80	5.07	3426.8	62.6	45.2	1.003	0.035	0.030
5.07	4.61	4176.7	77.5	53.1	0.997	0.034	0.030
4.61	4.28	4087.9	80.3	57.1	0.998	0.037	0.035
4.28	4.03	3701.7	78.1	57.4	0.997	0.040	0.037
4.03	3.83	2527.6	67.6	53.0	0.984	0.052	0.044
3.83	3.66	2625.3	75.5	56.1	0.955	0.053	0.044
3.66	3.52	1893.4	65.4	54.8	1.003	0.069	0.057
3.52	3.40	1505.6	62.9	53.5	1.000	0.085	0.068
3.40	3.29	1153.6	60.9	53.2	1.011	0.108	0.088
3.29	3.20	971.9	59.1	53.2	0.996	0.126	0.108
3.20	3.12	683.7	55.5	52.2	1.018	0.174	0.145
3.12	3.04	518.2	54.8	51.9	0.977	0.221	0.183
3.04	2.97	470.1	52.8	51.9	1.015	0.244	0.204
2.97	2.91	394.4	54.1	51.6	1.002	0.296	0.242
2.91	2.85	285.7	52.2	50.7	0.995	0.384	0.319
2.85	2.80	243.9	51.9	50.6	0.986	0.450	0.353
2.80	2.75	218.1	50.8	50.1	0.981	0.490	0.417
2.75	2.70	186.0	50.4	50.4	0.975	0.560	0.470
Σύνολο ανακλάσεων		2159.4	65.3	53.0	0.994	0.062	0.038

$$R\text{-γραμμικό} = \text{SUM} (\text{ABS}(I - \langle I \rangle)) / \text{SUM} (I)$$

$$R\text{-τετράγωνο} = \text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2) / \text{SUM} (I ** 2)$$

$$\chi^2 = \text{SUM} ((I - \langle I \rangle) ** 2) / (\text{Σφάλμα} ** 2 * N / (N-1))$$

Σε όλα τα αθροίσματα οι μοναδικές ανακλάσεις απολείονται από τους υπολογισμούς



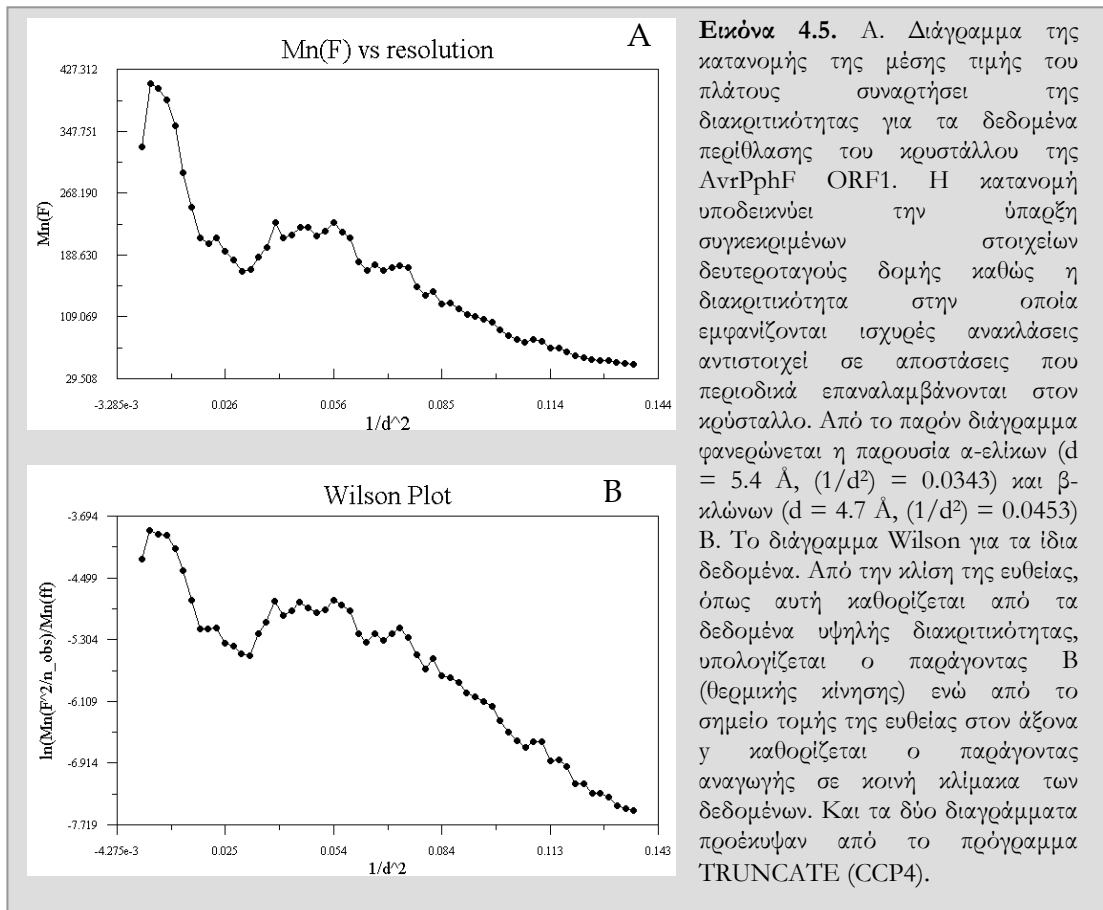
Στη συνέχεια από τον όγκο της στοιχειώδους κυψελίδας και με τη βοήθεια του συντελεστή Matthews (Matthews, 1968) εκτιμήθηκε το ποσοστό του διαλύτη για διαφορετικούς αριθμούς αντιγράφων της AvrPphF ORF1 στην ασύμμετρη μονάδα Πίνακας 4.3.

Αριθμός μορίων ORF1 στην ασύμμετρη μονάδα	Συντελεστής Matthews: V_M ($\text{\AA}^3/D$)	Ποσοστό διαλύτη %
1	14.9	91.7
2	7.5	83.4
3	5.0	75.1
4	3.7	66.8
5	3.0	58.4
6	2.5	50.1
7	2.1	41.8
8	1.9	33.5
9	1.7	25.2
10	1.5	16.9
11	1.4	8.6
12	1.2	0.3

Πίνακας 4.3. Ο συντελεστής Matthews για διαφορετικούς αριθμούς μορίων της AvrPphF ORF1 στην ασύμμετρη μονάδα. Με ανοιχτό γκρι χρώμα σημειώνεται το αποδεκτό εύρος του συντελεστή Matthews για πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.

Καθώς η AvrPphF ORF1 είναι διμερές σε διάλυμα (δεδομένα από στήλη μοριακής διήθησης και σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες, εδάφιο 3.3.1, εικόνα 3.5 και εδάφιο 4.3.3) ο αποδεκτός αριθμός αντιγράφων στην ασύμμετρη μονάδα είναι 4, 6 ή 8. Το μεγάλο μέγεθος των κρυστάλλων (0.35 mm x 0.15 mm x 0.15 mm), η πληθώρα κρυστάλλων στην σταγόνα κρυστάλλωσης συγκριτικά με την χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης (5 – 9 mg/ml) και ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης τους οδηγεί στο συμπέρασμα ύπαρξης υψηλού ποσοστού διαλύτη⁴⁰ στον κρύσταλλο. Για τους παραπάνω λόγους θεωρήθηκε πιθανότερη η παρουσία 4 μονομερών στην ασύμμετρη μονάδα, ο οποίος αντιστοιχεί στο υψηλότερο ποσοστό διαλύτη ($\approx 67\%$).

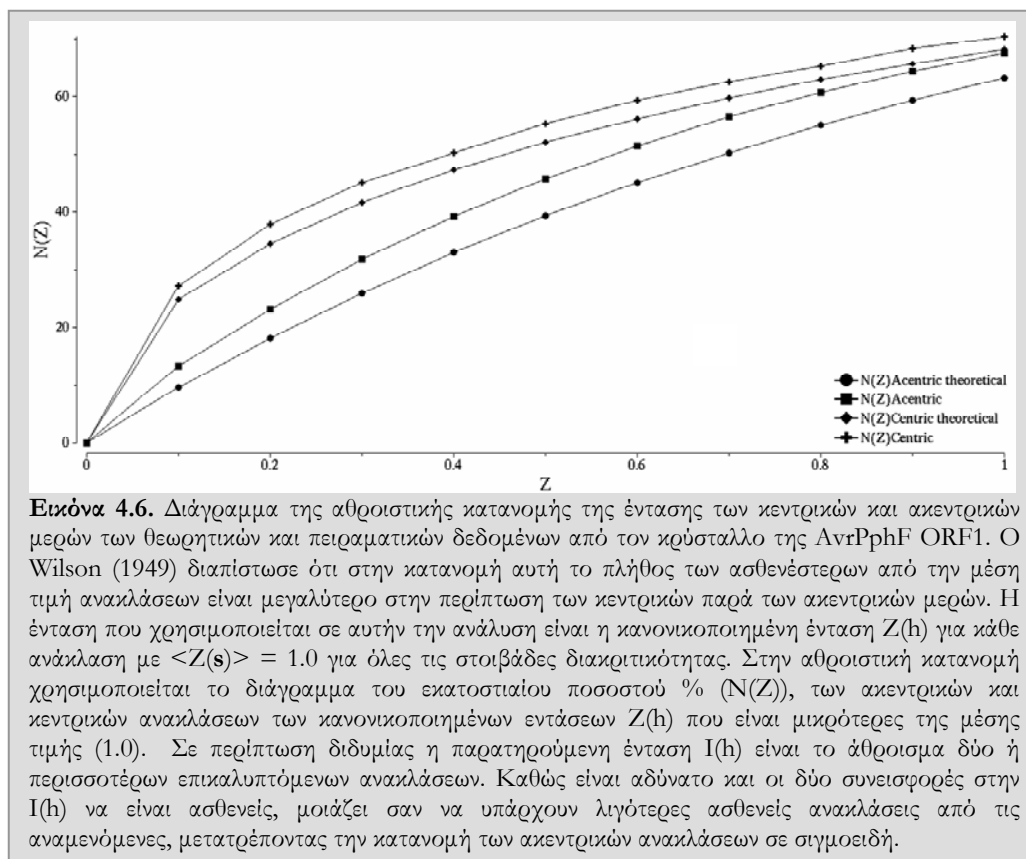
Η επιλογή αυτή βεβαιώθηκε στη συνέχεια από τη συνάρτηση αυτοπεριστροφής (Εικόνα 4.8).



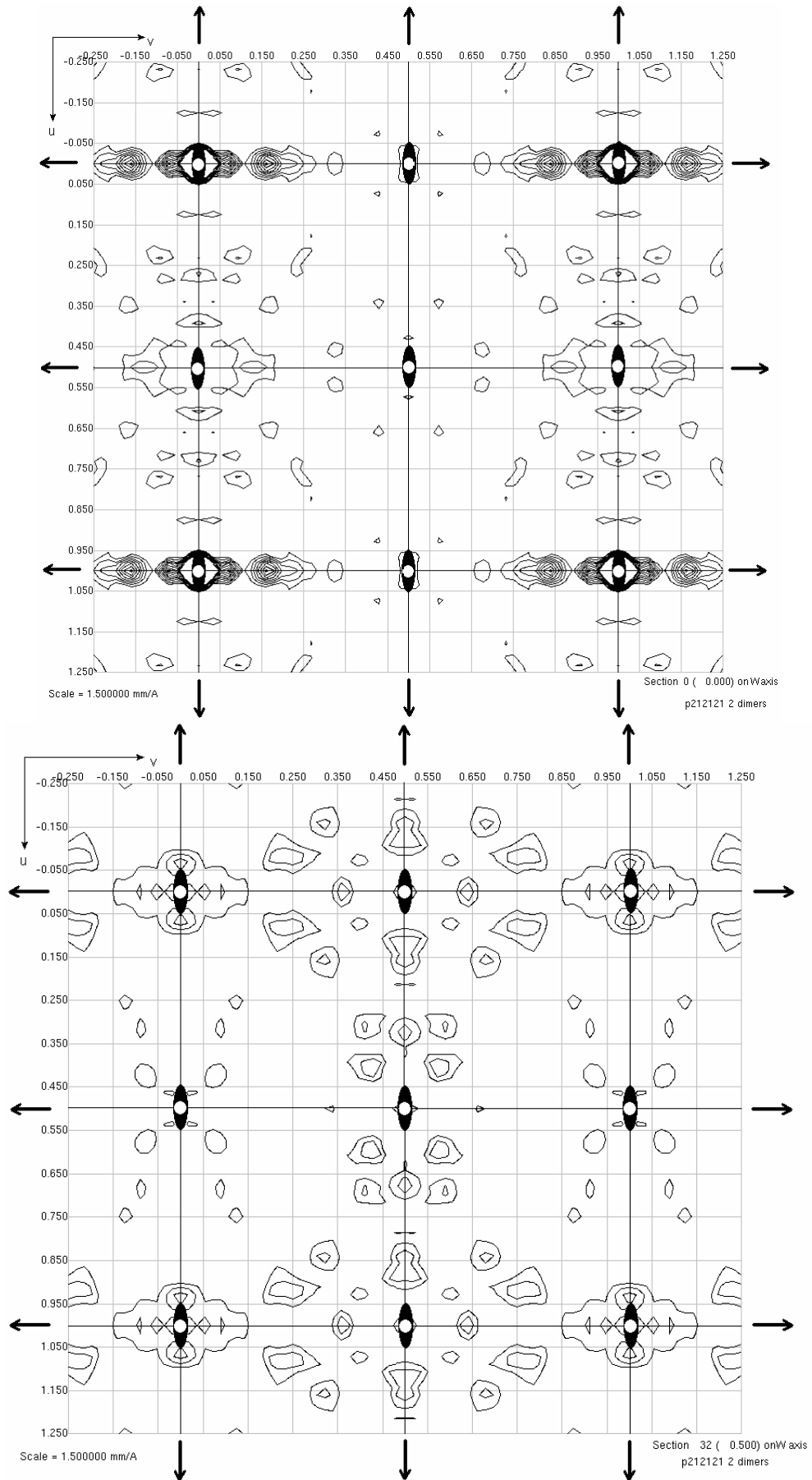
Εικόνα 4.5. Α. Διάγραμμα της κατανομής της μέσης τιμής του πλάτους συναρτήσει της διακριτικότητας για τα δεδομένα περιθλασης του κρυστάλλου της AvrPphF ORF1. Η κατανομή υποδεικνύει την ύπαρξη συγκεκριμένων στοιχείων δευτεροταγούς δομής καθώς η διακριτικότητα στην οποία εμφανίζονται ισχυρές ανακλάσεις αντιστοιχεί σε αποστάσεις που περιοδικά επαναλαμβάνονται στον κρύσταλλο. Από το παρόν διάγραμμα φανερώνεται η παρουσία α -ελίων ($d = 5.4 \text{ \AA}$, $(1/d^2) = 0.0343$) και β -κλώνων ($d = 4.7 \text{ \AA}$, $(1/d^2) = 0.0453$) Β. Το διάγραμμα Wilson για τα ίδια δεδομένα. Από την κλίση της ευθείας, όπως αυτή καθορίζεται από τα δεδομένα υψηλής διακριτικότητας, υπολογίζεται ο παράγοντας Β (θερμικής κίνησης) ενώ από το σημείο τομής της ευθείας στον άξονα y καθορίζεται ο παράγοντας αναγωγής σε κοινή κλίμακα των δεδομένων. Και τα δύο διαγράμματα προέκυψαν από το πρόγραμμα TRUNCATE (CCP4).

Ακολουθώντας για τον υπολογισμό του πλάτους των ανακλάσεων, τον ποιοτικό έλεγχο των δεδομένων για την παρουσία ή απουσία φαινομένου διδυμίας στους κρυστάλλους με την εξέταση των κεντρικών και ακεντρικών μερών (εδάφιο 2.8.4) της αθροιστικής κατανομής της έντασης (Εικόνα 4.6), την αναγωγή των τιμών του πλάτους σε κοινή κλίμακα αναφοράς και τον καθορισμό της συνολικής θερμικής κίνησης μέσω της κατανομής Wilson (Εικόνα 3.5.) τα δεδομένα μεταφέρονται στο πρόγραμμα TRUNCATE (CCP4). Από το διάγραμμα Wilson (εδάφιο 2.8.4, παράρτημα 8.9) ο καθολικός παράγοντας (B) θερμικής κίνησης εκτιμάται στα 71.102. Ο υψηλός θερμικός παράγοντας είναι αναμενόμενος και δικαιολογείται από την παρουσία υψηλού ποσοστού (66.8%) διαλύτη στον κρύσταλλο. Το γεγονός αυτό αντανάκλαται και στην χαμηλή διακριτικότητα στην οποία σκεδάζουν οι κρύσταλλοι ($\approx 3 \text{ \AA}$). Η αθροιστική κατανομή της κανονικοποιημένης εντάσεως των ακεντρικών δεδομένων δεν παρουσιάζει σιγμοειδή μορφή που συνήθως χαρακτηρίζει περιπτώσεις διδυμίας (Εικόνα 4.6)

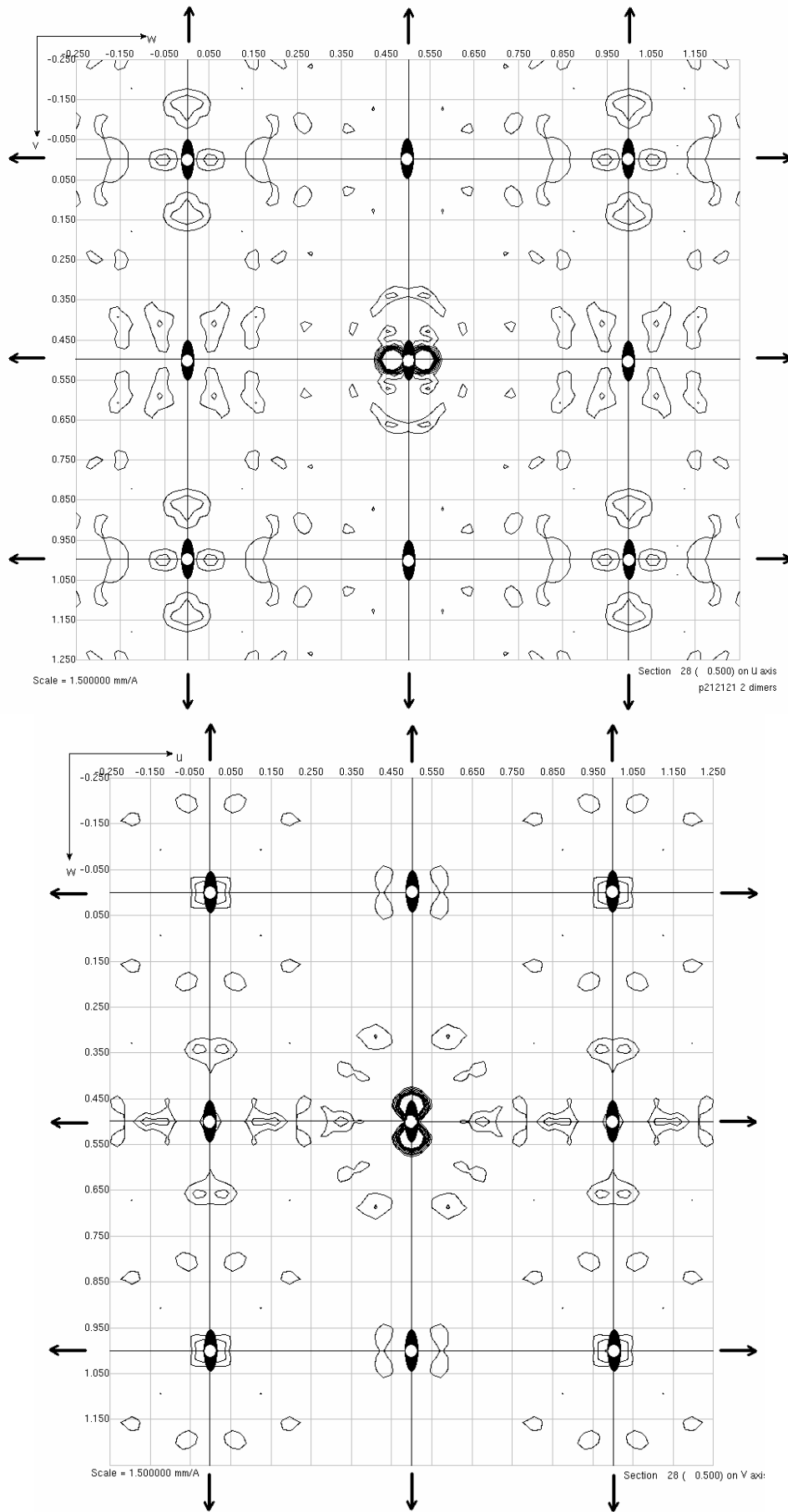
⁴⁰ Το μέγεθος των κρυστάλλων λυσοζύμης, ο αριθμός που εμφανίζονται αυτοί στην σταγόνα κρυστάλλωσης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην σταγόνα κρυστάλλωσης, το ποσοστό διαλύτη και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι ποσότητες που διαπραγματεύονται οι Santarsiero *et al.*, (2002) για την επιτυχία ταχέως κρυστάλλωσης ικανοποιητικού μεγέθους σε νανοσταγόνες.



Η συνάρτηση Patterson υπολογίστηκε στη συνέχεια για τα δεδομένα των φυσικών κρυστάλλων της AvrPphF ORF1 με σκοπό την επιβεβαίωση της χωροομάδας συμμετρίας μέσω της εξέτασης των τομών ή επιπέδων Harker (Stout & Jensen, 1968). Σε συγκεκριμένα δυσδιάστατα επίπεδα του τρισδιάστατου χάρτη Patterson εμφανίζεται αυξημένη πυκνότητα η οποία οφείλεται στη συμμετρία του κρυσταλλικού πλέγματος, τα επίπεδα αυτά ονομάζονται επίπεδα Harker. Η χωροομάδα συμμετρίας $P2_12_12_1$ έχει τέσσερις συμμετρικά σχετιζόμενες θέσεις (Stout & Jensen 1968, International Tables for X-ray Crystallography 1989) με συντεταγμένες: I) x, y, z , II) $-x+(1/2), -y, z+(1/2)$, III) $-x, y+(1/2), -z+(1/2)$ και IV) $x+(1/2), -y+(1/2), -z$. Η αφαίρεση κάθε συμμετρικής θέσης από την άλλη μας παρέχει την λίστα των επιπέδων Harker. Στην συγκεκριμένη περίπτωση της χωροομάδας $P2_12_12_1$ τα επίπεδα Harker συναντιούνται όταν $u=0.5$ ($1/2, 2y+1/2, 2z$), $v=0.5$ ($2x, 1/2, 2z+1/2$), $w=0.5$ ($2x+1/2, 2y, 1/2$). Στην εικόνα 4.7.Ι παρουσιάζεται το επίπεδο uv του χάρτη Patterson για $w=0$ όπου εμφανίζεται και η κορυφή στην αρχή των αξόνων ($u=0, v=0$) (origin peak). Η κορυφή στην αρχή των αξόνων εμφανίζει την υψηλότερη τιμή στον χάρτη και αντιπροσωπεύει τα διανύσματα από τα άτομα της στοιχειώδους κυψελίδας στο εαυτό τους. Επίσης παρουσιάζεται και το επίπεδο uv για $w=0.5$ το οποίο αποτελεί επίπεδο Harker. Παρατηρούμε ότι διαθέτει σημαντική πυκνότητα σε σύγκριση με το επίπεδο uv με $w=0$ αν εξαιρέσουμε τις κορυφές που αντιστοιχούν στην αρχή των αξόνων. Στην εικόνα 4.7. II εμφανίζονται τα επιπλέον επίπεδα Harker: επίπεδο vw για $u = 0.5$ και επίπεδο uv για $w = 0.5$. Σε αυτά τα επίπεδα έχουν εμφανιστεί δύο αρκετά ισχυρές κορυφές με συντεταγμένες $(0.50, 0.50, 0.46)$ και $(0.5, 0.5, 0.54)$ οι οποίες σχετίζονται μεταξύ τους μέσω κρυσταλλογραφικής συμμετρίας. Η τιμή τους φθάνει το 30.8 % του ύψους της κορυφής της αρχής των αξόνων, και υποδηλώνει την ύπαρξη τοπικού διπλού άξονα περιστροφής παράλληλο με τον κρυσταλλογραφικό άξονα b στην θέση $x = 0.25, z = 0.23$ (Epp *et al.*, 1971).



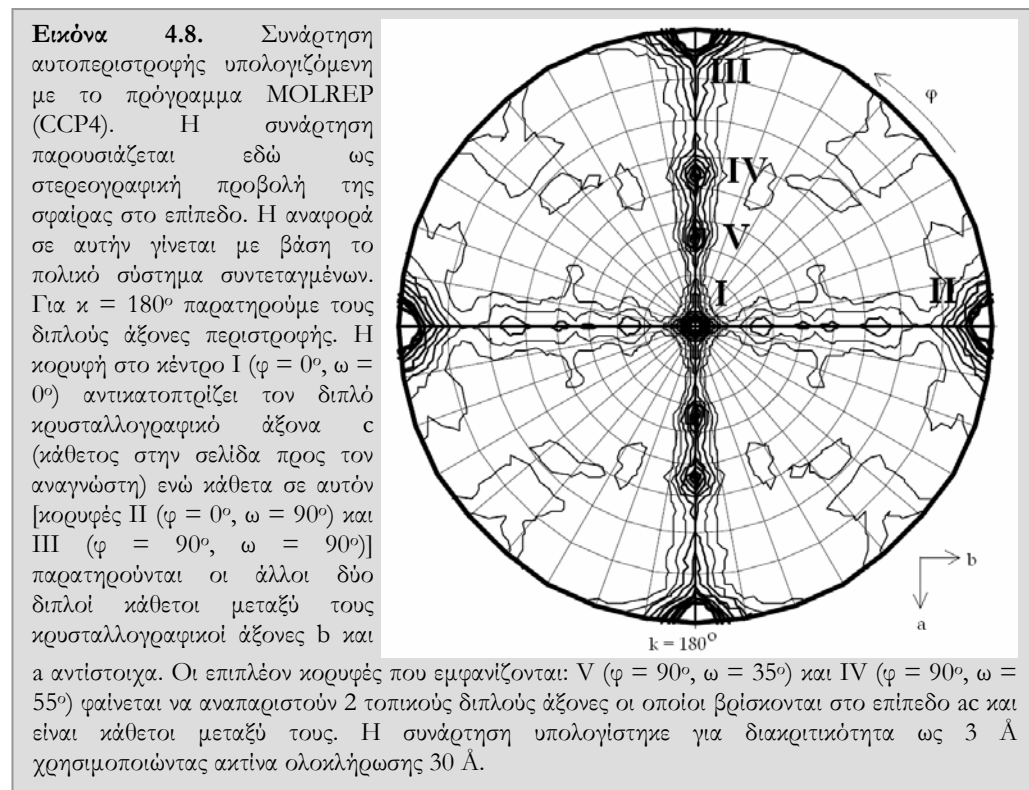
Εικόνα 4.7.I



Εικόνα 4.7.II

Εικόνα 4.7. (προηγούμενες σελίδες) Χάρτες Patterson υπολογιζόμενοι με το πρόγραμμα FFT (CCP4) για δεδομένα από 20 έως 5 Å. Ια). Το επίπεδο uv με $w = 0$ όπου παρατηρείται η έντονη πυκνότητα στην αρχή των αξόνων (0,0,0) και στα ισοδύναμα σημεία (0,1,0), (1,0,0) και (1,1,0) (origin peak). Η κάθε ισοϋψής αντιστοιχεί σε 1σ. Οι έντονες κορυφές (origin peaks) περιλαμβάνουν τον χώρο μιας στοιχειώδους κυψελίδας στο επίπεδο ab με $c = 0$ ενώ έχει γίνει επέκταση του χάρτη προς τις γειτονικές στοιχειώδεις κυψελίδες κατά το 1/4. Κάθε τετράγωνο του χάρτη ορίζει το ασύμμετρο μέρος του. Ιβ). Το επίπεδο uv με $w = 0.5$ είναι ένα από τα επίπεδα Harker για την χωροομάδα $P2_12_12_1$. Ο χάρτης αναπαριστάται όπως και στην περίπτωση Ια. Παρατηρούμε την έντονη πυκνότητα στο uv επίπεδο με $w=0.5$ η οποία πλησιάζει την πυκνότητα του επιπέδου uv με $w = 0$ αν εξαιρεθούν οι κορυφές που παρουσιάζονται στο σημείο της αρχής των αξόνων του χώρου Patterson. Πα) Το επίπεδο uv με $u = 0.5$ αποτελεί επίσης επίπεδο harker ενώ παρατηρείται μια διπλή κορυφή ύψους 30.8 % του origin peak στο σημείο (0.5, 0.5, 0.46) και στο ισοδύναμο αυτού (0.5, 0.5, 0.54). Πβ) Το τελευταίο επίπεδο Harker για την χωροομάδα συμμετρίας $P2_12_12_1$ είναι το uv με $v = 0.5$. Έντονη πυκνότητα παρατηρείται και σε αυτό το επίπεδο ενώ είναι επίσης εμφανής και η διπλή υψηλή κορυφή όπως στο επίπεδο uv με $v = 0.5$. Η χωροομάδα συμμετρίας για την συνάρτηση Patterson προσδιορίζεται από το σύνολο των ανυσμάτων της ανταποκρινόμενης δομής και για αυτό το λόγο είναι πάντα κεντροσυμμετρική⁴¹. Στην περίπτωση της χωροομάδας $P2_12_12_1$ του κρυσταλλικού πλέγματος η χωροομάδα της συνάρτησης Patterson είναι η $Pmmm$. Η χωροομάδα $Pmmm$ διαθέτει 8 συμμετρικές θέσεις οι οποίες σχετίζονται μέσω διπλών αξόνων περι-αναστροφής ($2/m\ 2/m\ 2/m$), στους χάρτες συμβολίζονται με το σήμα : \odot , ενώ με βέλη σημειώνονται τα επίπεδα κατοπτρισμού.

Η συνάρτηση αυτοπεριστροφής (εδάφιο 2.8.2.6) υπολογίστηκε για την αποκάλυψη επιπλέον μη-κρυσταλλογραφικής συμμετρίας, της συμμετρίας δηλαδή του υπό μελέτη σωματιδίου ή διαφορετικά της τοπικής συμμετρίας εντός της ασύμμετρης μονάδας του κρυστάλλου. Η συνάρτηση υπολογίστηκε για το διακριτικό εύρος 15.00 – 3.00 Å των δεδομένων περιθλασης, χρησιμοποιώντας ακτίνα ολοκλήρωσης 30 Å και παρουσιάζεται στην εικόνα 4.8 για $\kappa = 180^\circ$. Στην εικόνα 4.8 φαίνονται οι διπλοί κρυσταλλογραφικοί άξονες συμμετρίας, ενώ εμφανίζονται δύο επιπλέον κορυφές που αντιστοιχούν σε διπλούς άξονες.



⁴¹ Ως κεντροσυμμετρική χωροομάδα αναφέρεται η χωροομάδα η οποία διαθέτει ένα σημείο αναστροφής ως στοιχείο συμμετρίας της. Έτσι για κάθε θέση με συντεταγμένες (x y z) εντός της στοιχειώδους κυψελίδας υπάρχει μία ισοδύναμη θέση με συντεταγμένες (-x -y -z).

4.3.2 Χρήση του ατομικού μοντέλου 1s28.pdb για την ερμηνεία των δεδομένων περιθλάσης

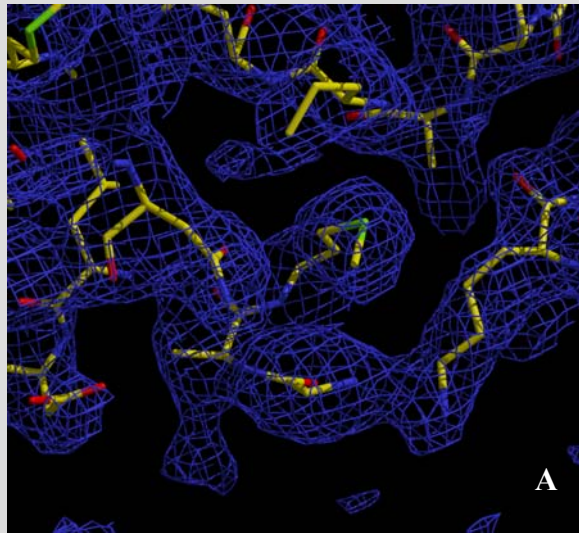
Η τρισιδιάστατη δομή της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 από την *P. syringae* pv *phaseolicola* (κωδικός πρόσβασης PDB: 1s28) όπως κατατέθει από τους Singer και συνεργάτες (2004) χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την ερμηνεία των δικών μας δεδομένων περιθλάσης. Ολόκληρο το τετραμερές της ασύμμετρης μονάδας χρησιμοποιήθηκε ως έχει καθώς οι κρύσταλλοι μας είναι σχεδόν ισόμορφοι (2% διαφορά στις διαστάσεις των αξόνων a, b και c της στοιχειώδους κυψελίδας) με τους κρυστάλλους των Singer *et al.*, (2004). Επιπλέον ακολουθήθηκε η διαδικασία της μοριακής αντικατάστασης (Ενότητα 2.8.6) χρησιμοποιώντας ως αρχικό μοντέλο έρευνας μόνο τη μία πολυπεπτιδική αλυσίδα της AvrPphF ORF1. Τα αρχικά βήματα βελτιστοποίησης του μοντέλου (§ 2.8.9) που έλαβαν χώρα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.4 ενώ η όλη διαδικασία βρίσκεται σε εξέλιξη.

Πίνακας 4.4. Βήματα βελτιστοποίησης και παράγοντες R.

Βήματα Βελτιστοποίησης	R	R_{free}
1. Βελτιστοποίηση άκαμπτου σώματος (REFMAC5). Ως άκαμπτο σώμα ορίστηκε η πολυπεπτιδική αλυσίδα. Περαιτέρω κατατημήσεις της αλυσίδας δεν βελτιστοποίησαν τον παράγοντα R.	0.43	0.44
2. Βελτιστοποίηση Torsion μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.40	0.42
3. Καρτεσιανή βελτιστοποίηση μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.38	0.42
4. Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS). Συνδυασμός ελαχιστοποίησης ενέργειας και βελτιστοποίησης B-παραγόντων (CNS, οι B-παράγοντες υπόκεινται σε περιορισμούς).	0.34	0.34
5. Καρτεσιανή βελτιστοποίηση μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.32	0.38
6. Προσθήκη νερών (CNS)	0.31	0.37
7. Καρτεσιανή βελτιστοποίηση μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.31	0.38
8. Προσθήκη 12 αμινοξέων τα οποία είχαν μείνει εκτός (Xfit)	0.34	0.40
9. Βελτιστοποίηση Torsion μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.34	0.37
10. Βελτιστοποίηση των B-παραγόντων ξεχωριστά για κάθε άτομο (CNS)	0.33	0.36
11. Καρτεσιανή βελτιστοποίηση μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (CNS)	0.30	0.36

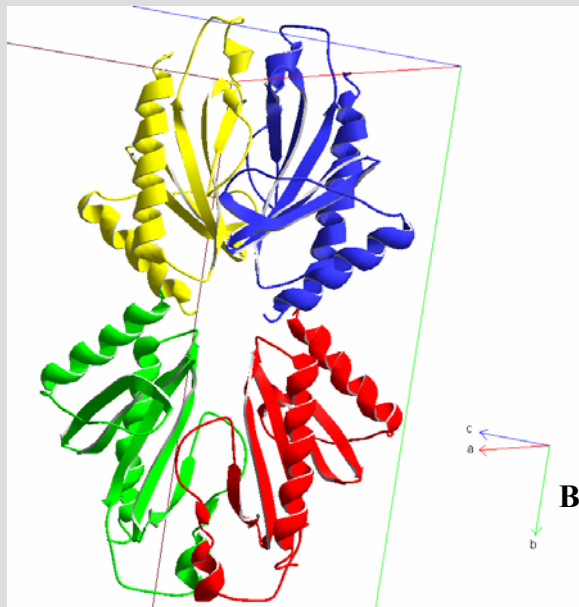
Στην εικόνα 4.9 Α έχει γίνει υπέρθεση του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας (μπλε χρώμα) με το μοντέλο του βήματος 11 από τον πίνακα 4.3. Η ασύμμετρη μονάδα των κρυστάλλων περιλαμβάνει 4 μονομερή της AvrPphF ORF1. Το τετραμερές της ασύμμετρης μονάδας μπορεί να περιγραφεί πλήρως από το μονομερές της AvrPphF ORF1 με την εφαρμογή πράξεων συμμετρίας σε αυτό. Η σημειακή ομάδα συμμετρίας του τετραμερούς είναι η 222⁴². Η 222 διαθέτει τρεις κάθετους μεταξύ τους διπλούς άξονες συμμετρίας. Από αυτούς ο διπλός άξονας συμμετρίας που βρίσκεται κατά μήκος της μακρύτερης διαμέτρου του τετραμερούς (μείζον άξονας) είναι παράλληλος με τον κρυσταλλογραφικό άξονα b όπως προκύπτει από την παρατήρηση του χάρτη Patterson (Εικόνα 4.9 Β) ενώ οι άλλοι δύο (σημειώνονται εδώ ως άξονες P και Q) είναι συνεπίπεδοι των κρυσταλλογραφικών αξόνων a και c και σχηματίζουν γωνία 35° με αυτούς γεγονός που είναι συμβατό με την συνάρτηση αυτό-περιστροφής (Εικόνα 4.8, Εικόνα 4.9 Γ).

⁴² Όπως σημειώνεται κατά Hermann-Mauguin ή D₂ όπως σημειώνεται κατά Schönflies. D (για διεδρο, ή αμφίπλευρο) υποδεικνύει ότι η ομάδα έχει έναν διπλό άξονα συμμετρίας συν έναν άξονα συμμετρίας κάθετο σε αυτόν.

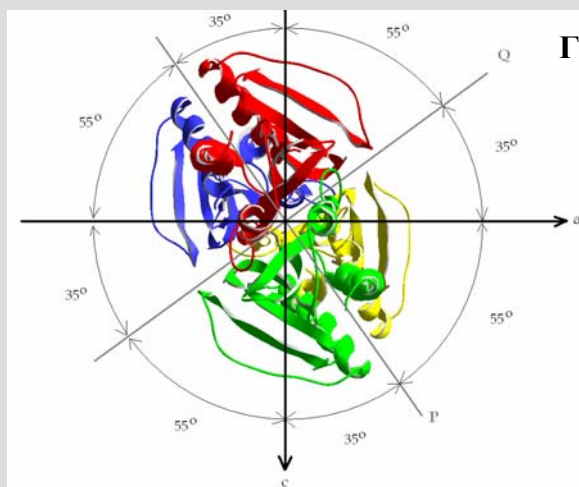


Εικόνα 4.9.

A. Τμήμα χάρτη $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ ηλεκτρονικής πυκνότητας (μπλε, ισούψης 1σ) όπου διακρίνεται το αμινοτελικό άκρο της AnrPphF ORF1 με τα επιπρόσθετα αμινοξέα G και A λόγω της κλωνοποίησης. Στο κέντρο της εικόνας με πράσινο χρώμα διακρίνεται το άτομο του θείου της αρχικής μεθειονίνης. Δεξιά παρατηρείται η πλευρική ομάδα της λυσίνης 50. Ο χάρτης αναπαρίσταται με την βοήθεια του προγράμματος Xfit (McRee, 1999).



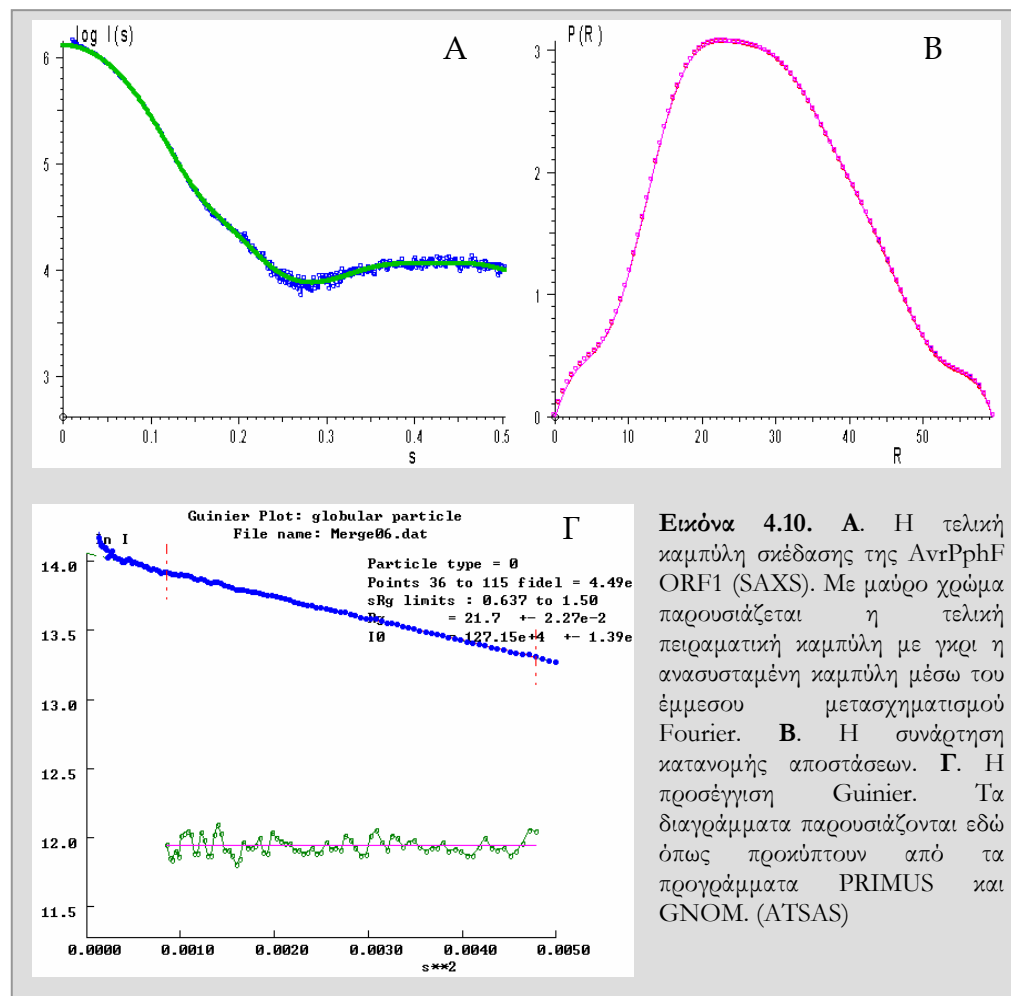
B. Τμήμα της στοιχειώδους κυψελίδας του κρυστάλλου. Η ασύμμετρη μονάδα των κρυστάλλων αποτελείται από 2 διμερή σαπερόνης AnrPphF ORF1 (Το κάθε μονομερές παρουσιάζεται εδώ με διαφορετικό χρώμα). Ο άξονας συμμετρίας του διμερούς, ο οποίος είναι και ο μείζων άξονας τους τετραμερούς σχεδόν ευθυγραμμίζεται με τον κρυσταλλογραφικό άξονα b (εδώ με πράσινο χρώμα). Αυτή η διεύθυνση του τοπικού άξονα συμφωνεί με την εμφάνιση της υψηλής κορυφής στον χάρτη Patterson (Εικόνα 4.7). Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα SPDBV (Guex & Peitsh, 1997).



Γ. Αποψη του τετραμερούς στο επίπεδο ac. Ο κρυσταλλογραφικός άξονας b έρχεται προς τον αναγνώστη. Παράλληλος με αυτόν είναι και ο τοπικός άξονας R. Οι κάθετοι σε αυτόν διπλοί τοπικοί άξονες (P και Q) σημειώνονται με γκρι ευθείες. Οι κρυσταλλογραφικοί άξονες a και c σημειώνονται με μαύρα βέλη. Η σχετική διεύθυνση των τοπικών αξόνων σε σχέση με τους κρυσταλλογραφικούς συμπίπτουν με τις κορυφές που εμφανίζει η συνάρτηση αυτοπεριστροφής (Εικόνα 4.8).

4.3.3 Η δομή της AvrPphF ORF1 στο διάλυμα

Στην εικόνα 4.10 Α παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης του δείγματος AvrPphF ORF1 από διάλυμα. Στο διάγραμμα εμφανίζεται ο λογάριθμος της έντασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης, $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å]. Η καμπύλη αποτελεί συγχώνευση δειγμάτων διαφορετικής συγκέντρωσης ως εξής: Για τις μικρές γωνίες (μικρές τιμές s , αριστερή πλευρά διαγράμματος) έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές της έντασης που προέρχονται από το αραιό διάλυμα συγκέντρωσης 5.5 mg/ml και για τις ευρείες γωνίες (μεγάλες τιμές s δεξιά πλευρά διαγράμματος) οι τιμές που προέρχονται από το πιο συμπυκνωμένο δείγμα (συγκέντρωσης 11 mg/ml).

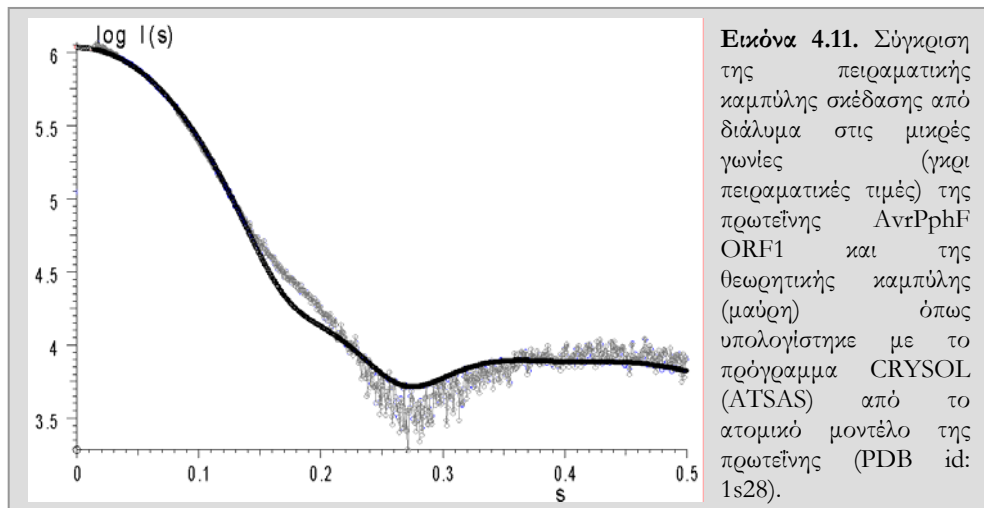


Στην εικόνα 4.10 Γ παρουσιάζεται το διάγραμμα της προσέγγισης Guinier: $\ln I(s)$ συναρτήσει του s^2 . Οι τιμές της έντασης στην μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα εκτιμώνται αντίστοιχα στα 1271500 και 21.7 Å. Ο ένυδρος όγκος (ή όγκος Porod) του σωματιδίου υπολογίζεται στα 62246 Å³, που συνεπάγεται μοριακό βάρος 31.12 kD. Η συνάρτηση Guinier υπολογίστηκε για κάθε αρχική καμπύλη της AvrPphF ORF1 και ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας υπολογίζεται σταθερά στα 21.8 Å, ένδειξη ότι δεν παρατηρείται ιδιο-σύνδεση (self-association) της πρωτεΐνης.

Στην εικόνα 4.10 Β παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων (pair distribution function) για την AvrPphF ORF1 όπως υπολογίζεται από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου εκτιμάται στα 59.5 Å.

4.3.4 Σύγκριση του κρυσταλλογραφικού μοντέλου της AvrPphF ORF1 και του μοντέλου σκέδασης από διάλυμα.

Το σωματίδιο που αντιστοιχεί στην σαπερόνη τάξης I AvrPphF ORF1 όπως "περιγράφεται" από τα πειράματα SAXS είναι διμερές ($R_g = 21.7 \text{ \AA}$, $D_{\max} = 60 \text{ \AA}$, $V_p = 64530 \text{ \AA}^3$, εδάφιο 4.3.3). Καθώς η πρωτεΐνη κρυστάλλωσε ως τετραμερές για την σύγκριση των δύο μοντέλων υψηλής και χαμηλής διακριτικότητας χρησιμοποιήθηκε μόνο το διμερές των A και B πολυπεπτιδικών αλυσίδων του αρχείου pdb 1s28 ή το διμερές των C και D αλυσίδων. Η πειραματική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα του σωματιδίου προσεγγίζει αλλά δεν ταυτίζεται πλήρως με την θεωρητική που υπολογίζεται για το διμερές AB ή το διμερές CD της κρυσταλλογραφικής δομής (Εικόνα 4.11). Η πειραματική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα της πρωτεΐνης συγκρίθηκε επιπρόσθετα και με τις θεωρητικές καμπύλες άλλων κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων δομών των διμερών σαπερόνων τάξης I (Εικόνα 5.9 A, εδάφιο 5.3.6). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι υπάρχει μεγαλύτερη συμφωνία με την θεωρητική καμπύλη που υπολογίζεται από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της διμερούς σαπερόνης SicP (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo, Εικόνα 5.9 A, εδάφιο 5.3.6).



Στη συνέχεια προσδιορίστηκε το σχήμα της σαπερόνης AvrPphF ORF1 από διάλυμα με την χρήση ψευδών ατόμων (DAMMIN, εδάφια 2.7.5 και 2.7.8). Εκτελέστηκαν δεκαπέντε ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας με διάμετρο 60 \AA χρησιμοποιώντας περιορισμούς συμμετρίας διπλού άξονα είτε με ωσειδή (prolate) ανισομετρία (βλ. υποσημείωση εδαφίου 5.3.6) είτε όχι. Σε όλες τις περιπτώσεις τα παραγόμενα μοντέλα δεν κατάφεραν να εξηγήσουν πλήρως την πειραματική καμπύλη ($\chi=2$). Κατά την υπέρθεση των μοντέλων (SUPCOMB, εδάφιο 2.7.7) για την σύγκριση τους και την παραγωγή του πιο πιθανού μοντέλου η τιμή MNSD ήταν ελάχιστα μεγαλύτερη από την τιμή 0.7 που θεωρείται ικανή για την ύπαρξη σταθερών ανακατασκευών (εδάφιο 2.7.8). Στην εικόνα 5.20, (εδάφιο 5.4.3) αντιπαραβάλλεται το ατομικό μοντέλο της SicP με το μοντέλο σκέδασης από διάλυμα που προήλθε μέσω μοντελοποίησης ψευδών καταλοίπων με περιορισμό συμμετρίας διπλού άξονα και 132 ψευδή κατάλοιπα στο ασύμμετρο μέρος, (GASBOR, εδάφιο 2.7.8).

Στον πίνακα 4.4 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα πειραματικά δεδομένα από τα πειράματα σκέδασης και την στήλη μοριακής διήθησης καθώς και οι υπολογιζόμενες αντίστοιχες τιμές από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο 1s28 του διμερούς της AvrPphF ORF1 καθώς και του μοντέλου σκέδασης από διάλυμα, ενώ συγκρίνονται επίσης και με τις θεωρητικές τιμές από το κρυσταλλογραφικό διμερές της σαπερόνης SicP (PDB id: 1jyo).

Πίνακας 4.4. Υδροδυναμικές Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα για την AvrPphF ORF1 καθώς και υπολογιζόμενα από μοντέλα των DAMMIN, GASBOR και από το ατομικό μοντέλο των AvrPphF ORF1 και SicP.

Παράμετροι	Πειραματικές τιμές	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο P2 L)	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο P2 C)	GASBOR (P2)	Διμερές κρυσταλλογραφικό μοντέλο AvrPphF ORF1	Διμερές κρυσταλλογραφικό μοντέλο της SicP
R_g (Å) *	21.7					
R_g (Å) #	21.3	21.4	21.3	20.2	19.7	20.3
R_h (Å)	26.4	25.3	25.5	23.5	25.8	26.1
D_{max} (Å) #	59.5	66.3	66.6	65.3	65.2	68.1
V (Å ³)	64530**	40130	45580	27930	55370	49810

*Η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.
 # Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $\rho(r)$ μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier.
 ** Η τιμή του ένυδρου όγκου (Porod) δεν υπολογίζεται σταθερά από όλο το μήκος της πειραματικής καμπύλης υποδηλώνοντας την ύπαρξη κάποιου σφάλματος στα δεδομένα.
 R_h (Stoke's Radius) είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διήθησης.
 Οι τιμές των R_h , R_s , D_{max} και V από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (García de la Torre *et al.*, 2000).

4.4 Συμπεράσματα

4.4.1 Η AvrPphF ORF1 είναι διμερής στο διάλυμα

Η τριδιάστατη δομή της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 διαθέτει την τυπική τοπολογία των τάξης I σαπερονών του εκκριτικού συστήματος III (Singer *et al.*, 2004). Το ίδιο μοντέλο είναι συμβατό με τα δεδομένα περιθλασης ακτίνων-X που συλλέχθηκαν από κρυστάλλους στην παρούσα διατριβή.

Η ασύμμετρη μονάδα του κρυστάλλου περιέχει τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της υπό μελέτη πρωτεΐνης οι οποίες διευθετούμενες στον χώρο δομούν ένα τετραμερές σωματίδιο. Το τετραμερές αυτό ορίζεται βάση της σημειακής ομάδας συμμετρίας του, 222, ως διμερές διμερών. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι στο διάλυμα ο τετραμερισμός αυτός δεν υφίσταται καθώς στη στήλη μοριακής διήθησης και στα πειράματα σκέδασης σε μικρές γωνίες από διάλυμα η πρωτεΐνη εμφανίζεται ως διμερές (Εδάφια 3.31 και 4.3.3. αντίστοιχα). Ο διμερισμός αυτός είναι συμβατός με την οικογένεια των τάξης I σαπερονών. Στο κεφάλαιο 3 όπου αναλύεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον δραστικό παράγοντα AvrPphF ORF2 φαίνεται ότι η σαπερόνη δεσμεύει τον παράγοντα στην διμερή της μορφή. Τέλος εκμεταλλευόμενοι την ύπαρξη 2 κυστεϊνών⁴³ στην αλληλουχία της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 πραγματοποιήσαμε πειράματα ψευδο-δια-σύνδεσης (pseudo-cross-linking) της πρωτεΐνης. Σε αυτά τα πειράματα δεν χρησιμοποιήθηκε εξωτερικά παρεχόμενος δια-συνδέτης αλλά χρησιμοποιήθηκαν οι εγγενείς κυστεΐνες της πρωτεΐνης για το σκοπό αυτό. Εκτελέστηκε μία τυπική αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακριλαμιδής (SDS-PAGE) άνευ αναγωγικού στο διάλυμα φόρτωσης. Ως αποτέλεσμα ο μισός πληθυσμός της πρωτεΐνης βρέθηκε να σχηματίζει μία ζώνη στο διπλάσιο μοριακό βάρος, 30 kD (παράρτημα 8.2.4).

⁴³ Στην κρυσταλλική δομή της AvrPphF ORF1 η κυστεΐνη υπ' αριθμό 69 βρίσκεται στην μεσεπιφάνεια του διμερούς σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό με την αντίστοιχη κυστεΐνη της δεύτερης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η κυστεΐνη 34 βρίσκεται εκτεθειμένη στην εξωτερική επιφάνεια σε ανηγμένη μορφή. Τα πειράματα ψευδο-δια-σύνδεσης είχαν λάβει χώρα πριν τον προσδιορισμό της δομής της πρωτεΐνης.

4.4.2 Η δομή της ORF1 στο διάλυμα είναι ελαφρώς διαφορετική από ότι η κρυσταλλική της δομή.

Υπολογίζοντας τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά του κρυσταλλογραφικού μοντέλου της AvrPphF ORF1 παρατηρούμε αποκλίσεις σε σύγκριση με τις πρωτογενείς παραμέτρους των πειραμάτων σκέδασης από διάλυμα. Χαρακτηριστικά η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου εκτιμάται συστηματικά στα 21.3 Å έναντι της τιμής 19.7 Å που υπολογίζεται από το πρόγραμμα για το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της διμερούς πρωτεΐνης (HYDRO, εδάφιο 2.4). Οι διαφορές ίσως να παρουσιάζονται λόγω της απουσίας των καρβοξυτελικών αμινοξέων της πρωτεΐνης από το ατομικό μοντέλο ενώ λόγω της πειραματικής φύσης της σκέδασης από διάλυμα τα ευκίνητα μέρη του υπό μελέτη σωματιδίου είναι ικανά να συνεισφέρουν εξίσου. Αν και στον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier των δεδομένων σκέδασης από διάλυμα έχουμε υποεκτιμήσει την μέγιστη διάμετρο του σωματιδίου κατά 5 Å σε σύγκριση με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο η μη σταθερή εκτίμηση του όγκου Porod για τα δεδομένα της AvrPphF ORF1 καταδεικνύει την πιθανή εισαγωγή σφάλματος κατά την επεξεργασία των πρωτογενών καμπύλων. Συγκεκριμένα τα δεδομένα στην υψηλότερη διακριτικότητα της σκέδασης από διάλυμα τίθενται υπό αμφισβήτηση καθώς η απομάκρυνση τους είναι σε θέση να δώσει ορθότερες τιμές του ένυδρου όγκου του σωματιδίου.

Οι επιπλέον διαφορές θα μπορούσαν επίσης να παρουσιάζονται λόγω του διαφορετικού διαλύτη του δείγματος. Η AvrPphF ORF1 στην κρυσταλλική της μορφή ευρίσκεται σε υψηλή ιοντική ισχύ ενώ είναι ορατά και δύο θειικά ιόντα δεσμευμένα σε συμμετρικές θέσεις στην ασύμμετρη μονάδα. Αντίθετα η πρωτεΐνη μετρήθηκε σε χαμηλή ιοντική ισχύ στα πειράματα σκέδασης από διάλυμα παρουσία ιόντων χλωρίου και όχι θειικών ιόντων. Η τελική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα φαίνεται να παρουσιάζει κάποιες αποκλίσεις από την θεωρητική καμπύλη που υπολογίζει το πρόγραμμα CRY SOL από το ατομικό μοντέλο της AvrPphF ORF1 (εικόνα 4.11).

4.4.3 Η AvrPphF ORF1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρωτεΐνη αναφοράς για τον χαρακτηρισμό άλλων σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III

Η πρωτεΐνη AvrPphF ORF1 φαίνεται να διαθέτει τα τυπικά χαρακτηριστικά μίας τάξης I σαπερόνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Διαθέτει το κοινό πρότυπο δευτεροταγών δομών α-β-β-β-α-β-β-α τα οποία διπλώνουν σχηματίζοντας ένα β-φύλλο με τις έλικες να βρίσκονται στη μία πλευρά του φύλλου (κωδικός CATH: 3.30.1460.10) ενώ η α2 έλικα συμμετέχει στον σχηματισμό του διμερούς. Επίσης η AvrPphF ORF1 διαθέτει τα μοτίβα δέσμευσης των δραστικών πρωτεϊνών που διακρίνονται χαρακτηριστικά στις τάξεις I σαπερόνες όπως ορίζονται κατά Lilic *et al.*, (2006). Η συμπεριφορά της στην στήλη μοριακής διήθησης και στα πειράματα σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα ως διμερές κρίνεται εξίσου τυπική για τάξης I σαπερόνη.

Καθώς η πρωτεΐνη AvrPphF ORF1 παρουσιάζει τα τυπικά χαρακτηριστικά μίας τάξης I σαπερόνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III και διαθέτει ένα καλά καθορισμένο πρωτόκολλο καθαρισμού υψηλής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας στη συνέχεια της διατριβής στα πειράματα μοριακής διήθησης, σκέδασης σε μικρές γωνίες από διάλυμα και στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των υποθετικών σαπερονών HrpG και HrpO του εκκριτικού συστήματος τύπου III της *P. syringae* pv phaseolicola.

4.5 Αναφορές

- Epp O., Steigeman W., Formanek H. & Huber R., 1971. Crystallographic evidence for the tetrameric subunit structure of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 20, 432.
- García de la Torre J., Huertas M.L. & Carrasco B., 2000. "Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719.
- Guex N., & Peitsch M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18, 2714.
- Hahn T., Editor, 1989. *International tables for Crystallography.* Kluwer Academic Publishers.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680.
- 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.
- Matthews B.W., 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491.
- McRee D.E., 1999. XtalView/Xfit- a versalite program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* 125, 156.
- Rayment, I., 1997. Reductive alkylation of lysine residues to alter crystallization properties of proteins. *Methods Enzymol.* 276, 171.
- Rubinson K.A., Ladner J.E., Tordova M. & Gilliland G.L., 2000. Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D*56, 996.
- Santarsiero B.D., Yegian D.T., Lee C.C., Spraggon G., Gu J., Scheibe D., Uber D.C., Cornell E.W., Nordmeyer D.R., Kolbe W.F., Jin J., Jones A.L., Jaklevic J.M., Schultz P.G. & Stevens R.C., 2002. An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. *J. Appl. Cryst.* 35, 278.
- Scubot F.D. & Waugh D.S., 2004. A pivotal role for the reductive methylation in the de novo crystallization of a ternary complex composed of *Yersinia pestis* virulence factors YopN, SycN and YscB. *Acta Cryst. D*60,1981.
- Singer A.U., Desveaux D., Betts L., Chang J. H., Nimchuk Z., Grant S. R., Dangel J.L. & Sondek J., 2004. Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure.* 12, 1669.
- Stout G.H. & Jensen L.H., 1968. *X-ray Structure Determination*, pp. 344-352. New York: MacMillan.
- Tsiamis G., Mansfield J.W., Hockenhull R., Jackson r.W., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennett M.A., Stevens C. et al., 1998. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrpphF* in *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19, 3204.
- Wilson A.J.C., 1949. The probability distribution of X-ray intensities. *Acta Cryst.* 2, 318.
- Γαζή Α.Δ., 2002. AvrPphB, AvrPphF: Μελέτες δύο μολυσματικών παραγόντων από την *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Επιβλέπων καθηγητής: Ν.Ι. Πανόπουλος. Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HrpG

“Φτασμένες οι προλήψεις σε μια καθαρότητα μαθηματική θα μας βοηθούσανε να κατανοήσουμε την βαθύτερη δομή του κόσμου”

Οδ. Ελύτης

Η νησίδα παθογένειας, η οποία φέρει το σύνολο γονιδίων που κωδικοποιούν για το Hrp εκκριτικό σύστημα τύπου III της *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola, ελέγχθηκε για την παρουσία γονιδίου που να κωδικοποιεί για υποθετική σαπερόνη τάξης I. Από την βιβλιογραφική και βιοϋπολογιστική έρευνα που έγινε για όλες τις πρωτεΐνες του *hrp/hrv* εκκριτικού συστήματος αναγνωρίστηκε η πρωτεΐνη HrpG σαν υποθετική τάξης I σαπερόνη. Το γονίδιο *hrpG* κλωνοποιήθηκε σε φορέα έκφρασης που προσέδιδε αμινοτελικό ακροφύσιο ιστιδινών στην παραγόμενη πρωτεΐνη (pPROEX-HT, Gibco). Η υπερέκφραση έλαβε χώρα σε κύτταρα *E. coli* DH5α και προσδιορίστηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης της πρωτεΐνης. Ακολούθησαν πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης τα οποία οδηγούσαν όμως συστηματικά την πρωτεΐνη σε συνεχή κατακρήμνιση. Πειράματα κρυστάλλωσης με υψηλά ποσοστά αναγωγικού διευκόλυναν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης χωρίς όμως επιτυχές αποτέλεσμα.

Μοντέλα της δομής της πρωτεΐνης σε χαμηλή διακριτικότητα ως και 15 Å ήταν δυνατό να κατασκευαστούν με δεδομένα από πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες (SAXS). Οι προσπάθειες ερμηνείας της εμφανιζόμενης τετραμέριας της πρωτεΐνης HrpG στα πειράματα σκέδασης και στη στήλη μοριακής διήθησης οδήγησαν στην κατασκευή μεταλλάγματος έλλειψης αυτής, HrpG Δ 133-146. Η ελλειμματική πρωτεΐνη βρέθηκε να είναι διμερές στο διάλυμα και δοκιμάστηκε ει νέου σε πειράματα κρυστάλλωσης, σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα σε μικρές γωνίες και κυκλικού διχρωισμού. Στα πειράματα σκέδασης ακτίνων – X από διάλυμα το σχήμα του διμερούς μεταλλάγματος φαίνεται να προσεγγίζει με αυτό των άλλων σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού όμως εκτιμούνται υψηλότερα ποσοστά α -έλικας και χαμηλότερα ποσοστά β -κλώνων που δεν συνάδουν πλήρως με τα ποσοστά δευτεροταγούς δομής που απαντούνται στις άλλες σαπερόνες τάξης I, ενδείξεις ότι ίσως η HrpG

δεν είναι μία τυπική περίπτωση σαπερόνης τάξης I όπως είναι η AnrPphF ORF1. Ο έλεγχος της οξειδωτικής κατάστασης της HrpG και του μεταλλάγματος HrpG Δ 133-146 είναι ιδιαίτερα δύσκολος λόγω της ύπαρξης 7 κυστεϊνών ανά πολυπεπτιδική αλυσίδα.

5.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο *hrpG* εδράζει εντός της νησίδας παθογένειας του *hrp/hrv* εκκριτικού συστήματος της *P. syringae* pv phaseolicola, στο οπερόνιο *hrcC*. Είναι δε το δεύτερο γονίδιο του οπερονίου, ενώ ακολουθείται από το γονίδιο *hrcC* (Εικόνα 1.2). Στα είδη της *Yersinia* η αντίστοιχη θέση καταλαμβάνεται από το γονίδιο *yscB*, (Hueck, 1998). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια καλά μελετημένη σαπερόνη τάξης I του Ysc εκκριτικού συστήματος τύπου III. Οι τάξης I σαπερόνες παρόλο που δεν παρουσιάζουν ομοιότητα στην αλληλουχία τους και δύσκολα καθορίζεται ο βαθμός συγγένειας τους μέσω Psi-BLAST, εν τούτοις αποτελούνται όλες από περίπου 125 - 140 κατάλοιπα, διαθέτουν όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και την τοπολογία α - β - β - α - β - β - α (εδάφιο 1.4.1). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των τάξης I σαπερονών εμφανίζονται και στην περίπτωση του προϊόντος του γονιδίου *hrpG*. Η πρωτεΐνη HrpG διαθέτει όξινο θεωρητικό pI (4.5), μικρό μέγεθος (\approx 15 kD) και προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή συμβατή με την αναδίπλωση των σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Η ανάλυση του γονιδίου *hrpG* (κωδικός πρόσβασης Entrez: AAS20451) (Gropp & Guttman) πρωτοπαρουσιάστηκε το 2004, ενώ το 2005 οι Wei *et al.*, εστιάζοντες στην μελέτη της πρωτεΐνης HrpV παρατήρησαν την αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη HrpG και παρουσίασαν την δεύτερη ως πιθανή τάξης I σαπερόνη. Ο ισχυρισμός της ερευνητικής ομάδας στηρίχθηκε αποκλειστικά σε αναγνώριση αναδίπλωσης ενώ δεν προέκυπταν περαιτέρω πειραματικά δεδομένα. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η HrpG φαίνεται να δεσμεύει και να καταστέλλει τον αρνητικό ρυθμιστή, HrpV. Σαπερόνες τάξης I έχουν βρεθεί σε πληθώρα περιπτώσεων να δεσμεύουν αρνητικούς ρυθμιστές από αντίστοιχα συστήματα (Cambrone *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2002), ενώ βρέθηκε επίσης από τους Wei *et al* ότι ούτε η πρωτεΐνη HrpG ούτε η πρωτεΐνη HrpV εκκρίνονται.

5.1.1 Το καρβοξυτελικό άκρο των τάξης I σαπερονών

Σε μερικές σαπερόνες τάξης I εκτός της συντηρημένης τοπολογίας α - β - β - α - β - β - α υπάρχει ελεύθερο καρβοξυτελικό άκρο που εκτείνεται πέραν αυτής. Μόνο έμμεσα συμπεράσματα για τον ρυθμιστικό ρόλο του καρβοξυτελικού αυτού άκρου μπορούν να εξαχθούν από τις αντίστοιχες κρυσταλλογραφικές μελέτες. Συνήθως οι τάξης I σαπερόνες εμφανίζονται ως διμερή στο διάλυμα, αλλά και στην κρυσταλλική τους μορφή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η περίπτωση της AnrPphF ORF1, η οποία ειλούεται ως διμερές από την στήλη μοριακής διήθησης, ενώ παρατηρείται και ως διμερές στα πειράματα σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα (Εδάφιο 4.3.3). Η τάξης I σαπερόνη από την *Yersinia*, SycH (Neumayer *et al.*, 2004) βρέθηκε όμως ότι ειλούεται ως τετραμερές από την στήλη μοριακής διήθησης. Οι Phan *et al* (2004) που προσδιόρισαν την κρυσταλλογραφική της δομή έδειξαν ότι βρίσκεται σε διμερή κατάσταση ενώ τα 18 καρβοξυτελικά αμινοξέα της αλληλουχίας της δεν ήταν ορατά στην κρυσταλλική δομή. Αυτά τα συμπληρωματικά κατάλοιπα στην τάξης I σαπερόνη SycE, επίσης από την *Yersinia*, φάνηκε να αλληλεπιδρούν με τον β 1 κλώνο της σαπερόνης (Evdokimov *et al.*, 2002) ενώ οι Birtalan *et al* (2002) έδειξαν ότι σε αυτήν την συγκεκριμένη θέση δεσμεύεται τμήμα του δραστικού παράγοντα, YopE. Τελικά, η ομάδα των Trame & McKay (2003) έδειξαν μέσω της δικής τους κρυσταλλογραφικής δομής για την SycE ότι τα επιπλέον αυτά κατάλοιπα δεσμεύονται στην ίδια θέση, αλλά σε γειτονικά διμερή σαπερόνης, παίζοντας σημαντικό ρόλο στις κρυσταλλικές επαφές του συγκεκριμένου είδους κρυστάλλων. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως *in vitro* τα επιπλέον αυτά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για φαινόμενα ιδιοσύνδεσης (self-association). Τα φαινόμενα αυτά θα μπορούσαν να

ερμηνεύσουν την παρουσία τετραμερούς σωματιδίου στο διάλυμα για την SycH ενώ η βιολογική της μονάδα⁴⁴ φαίνεται να είναι το διμερές. Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω παρατηρήσεις σχετικά με την παρουσία ή όχι των επιπλέον καρβοξυτελικών καταλοίπων στις τάξεις I σαπερόνες και την υψηλή ευκινησία τους, δεδομένου ότι η HrpG μετά το πέρας της προβλεπόμενης α-β-β-β-α-β-β-α τοπολογίας διαθέτει επιπρόσθετα κατάλοιπα, σχεδιάστηκε μεταλλάγμα έλλειψης στο οποίο απαλειφθήσαν τα 14 καρβοξυτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης. Η παρασκευή αυτού του μεταλλάγματος στόχευε στην αποφυγή τυχών προβλημάτων αντιμετάθεσης πρωτεϊνικών επικρατειών (domain swar) και ιδιοσύνδεσης της πρωτεΐνης (self-association). Υπό αναγωγικές συνθήκες η πλήρους μήκους πρωτεΐνη βρέθηκε σε τετραμερή κατάσταση στο διάλυμα, ενώ η ελλειμματική μορφή της πρωτεΐνης σε διμερή.

5.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1 Βιοϋπολογιστικές Μέθοδοι

Οι παράμετροι πρωτοταγούς δομής υπολογίστηκαν από το εργαλείο ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) που διατίθεται μέσω του διακομιστή της ExPASy στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>. Όλες οι υπόλοιπες αναλύσεις έλαβαν χώρα όπως παρουσιάζονται στη παράγραφο 2.1.

5.2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου *hrpG* σε φορέα έκφρασης και παρασκευή του μεταλλάγματος έλλειψης *hrpGΔ133-146*.

Το πλήρους μήκους γονίδιο *hrpG* καθώς και το μεταλλάγμα έλλειψης αυτού ενισχύθηκαν μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας σαν μήτρα την κατασκευή pET16b/HrpG της κ. Μπαστάκη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το πλήρους μήκους γονίδιο ήταν οι εξής:

5' – GACCAATCATGAGCTCGATGGATTTC- 3' (α)

5' – TTAGCAGCCGGATCCACATCAAG – 3' (β)

ενώ για το μεταλλάγμα έλλειψης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

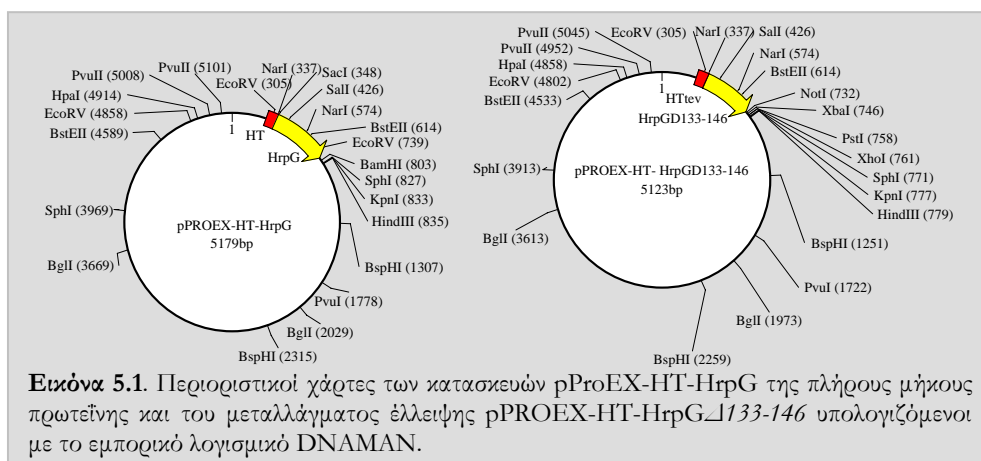
5' – GACCAATCATGAGCTCGATGGATTTC - 3' (α)

5' – AGGGTCGTGCGGCCGCATCACGCGG – 3' (γ)

Με έντονα γράμματα σημειώνονται οι παλινδρομες θέσεις που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες: BspHI για τον α εκκινητή, και NotI για τον γ εκκινητή. Ο εκκινητής β σχεδιάστηκε επίσης με περιοριστική θέση BamHI αλλά τελικά δεν χρησιμοποιήθηκε καθώς η αντίστοιχη θέση στον φορέα ήταν εξαιρετικά κοντά στην θέση NcoI που επίσης θα χρησιμοποιούταν. Το ένζυμο BspHI παράγει 5' εκτεινόμενα άκρα τα οποία είναι συμβατά με τα 5' εκτεινόμενα άκρα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης NcoI.

Το προϊόν της αντίδρασης κλωνοποιήθηκε στις θέσεις NcoI και XhoI του pPROEX-HT φορέα έκφρασης (Life Technologies, Inc.) για την περίπτωση του γονιδίου *hrpG*. Η θέση XhoI του φορέα είχε υποστεί πέψη με ειδική εξονουκλεάση για την παραγωγή τυφλού άκρου. Στην περίπτωση του μεταλλάγματος, *hrpGΔ133-146*, το προϊόν της αντίδρασης PCR κλωνοποιήθηκε στις θέσεις NcoI / NotI του ίδιου φορέα. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν για την παραγωγή της πρωτεΐνης και επικυρώθηκαν μέσω του προτύπου περιοριστικών πέψεων και με αλληλούχηση.

⁴⁴ Η βιολογική μονάδα (ή βιολογικό μόριο) είναι το μακρομόριο το οποίο είτε έχει βρεθεί λειτουργικό είτε πιστεύεται ότι είναι λειτουργικό. Π.χ. το λειτουργικό μόριο ή η βιολογική μονάδα της αιμογλοβίνης διαθέτει 4 πολυπετιδικές αλυσίδες. Η κρυσταλλική ασύμμετρη μονάδα είναι δυνατό να εμπεριέχει: α) ολόκληρη την βιολογική μονάδα, β) τμήμα της βιολογικής μονάδας, οπότε σε αυτή την περίπτωση εφαρμόζονται οι κατάλληλες πράξεις συμμετρίας για την δόμηση ολόκληρης της βιολογικής μονάδας και γ) πολλαπλά αντίγραφα της βιολογικής μονάδας, οπότε σε αυτήν την περίπτωση επιλέγεται ένα από όλα. (Ορισμός κατά PDB: www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/educational_resources/biounit_tutorial.html).



5.2.3 Επαγωγή της έκφρασης της HrpG και της HrpG Δ 133-146

Ολονύχτια υγρή προ-καλλιέργεια *E.coli* DH5α (100 ml) μετασχηματισμένα με την κατασκευή pProEX-HT-HrpG, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 4 lt LB + 100 μg/ml αμπικιλίνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.5. Σε αυτό το χρονικό σημείο η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται με προσθήκη 1 mM IPTG και οι καλλιέργειες μεταφέρονται στους 30°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση μετά από 4 ώρες. Η κυτταρική πάστα φυλάγεται στους -20°C. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και στην περίπτωση του μεταλλάγματος HrpG Δ 133-146.

5.2.4 Απομόνωση της πρωτεΐνης HrpG & του μεταλλάγματος HrpG Δ 133-146

5.2.4.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού

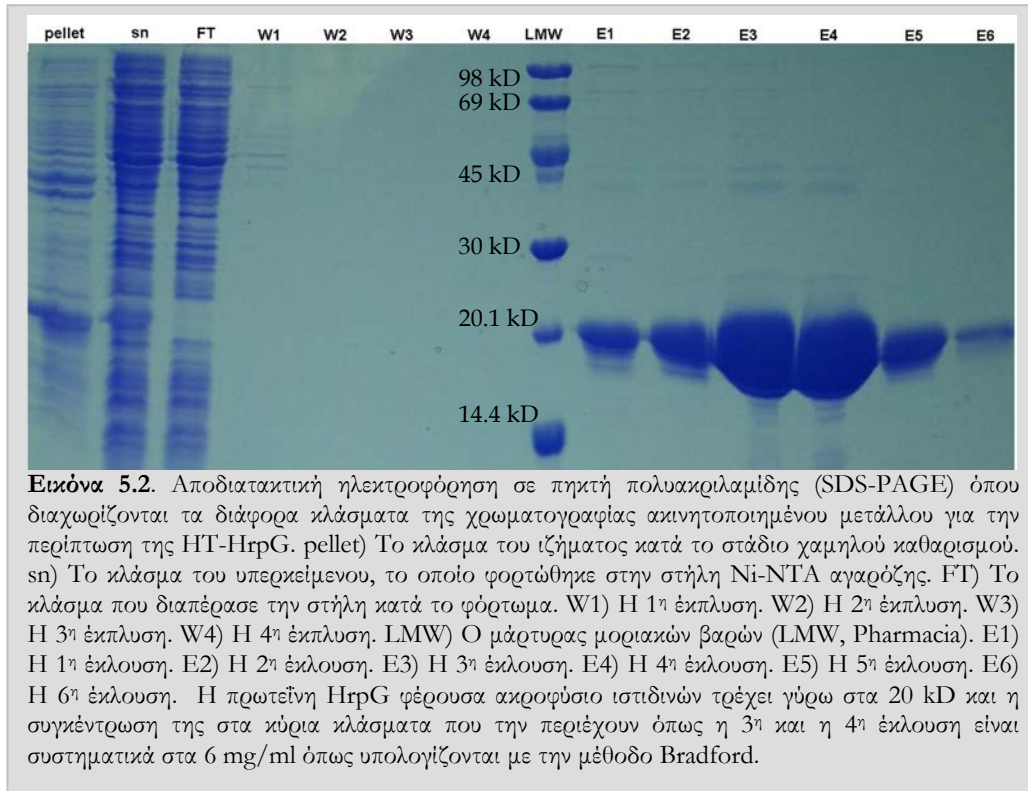
Η κυτταρική πάστα φέρουσα υπερεκφρασμένη την χιμαιρική πρωτεΐνη, HT-HrpG, ομογενοποιείται σε 400 ml διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM Ιμιδαζόλιο, 20% v/v γλυκερόλη. Ακολουθώς προστίθενται αναστολείς πρωτεασών. Τα κύτταρα διαρρηγνύονται με υπερηχοβόληση για 7 λεπτά συνολικά σε παλμούς 30 sec και με ενδιάμεσα διαλείματα ενός λεπτού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18000 g στους 6°C και τα κλάσματα υπερεκίμενου (κλάσμα διαλυτών συστατικών) και ιζήματος (κλάσμα κυτταρικών υπολειμμάτων) φυλάγονται ξεχωριστά.

Στην περίπτωση της HT-HrpG Δ 133-146 τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 ml διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM ιμιδαζολίου και 40 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Οι συνθήκες διάρρηξης των κυττάρων και διαχωρισμού των διαλυτών συστατικών είναι όμοιες με τις συνθήκες που ακολουθούνται για την πλήρους μήκους πρωτεΐνη.

5.2.4.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού

5.2.4.2.1 Χρωματογραφία Στήλης Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου

Το διαλυτό κλάσμα στην περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG φορτώνεται σε στήλη Ni-NTA αραρόζης (Qiagen) των 5 ml που έχει εξισοροποιηθεί με το διάλυμα λύσης των κυττάρων. Ακολουθώς η στήλη ξεπλένεται με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου σε βήματα των 10, 20 και 30 mM καθώς και με αυξανόμενες συγκεντρώσεις άλατος σε βήματα των 100, 200 και 300 mM (NaCl) άνευ αναγωγικού ή γλυκερόλης. Η πρωτεΐνη εκλύεται σε διαφορετικά κλάσματα σε βήματα συγκέντρωσης ιμιδαζολίου από 80 mM έως 300 mM παρουσία 50 mM NaCl και 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Τα κύρια κλάσματα έκλυσης στα οποία περιέχεται είναι αυτά που έχουν 150 και 200 mM ιμιδαζόλιο. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε αυτά τα κλάσματα εκτιμάται συνήθως στα 6 mg/ml.



Στην περίπτωση της HT-HrpG Δ 133-146 το διαλυτό κλάσμα από το στάδιο χαμηλού καθαρισμού αραιώνεται στον διπλάσιο όγκο ώστε να μειωθεί το ποσοστό β-μερκαπτοαιθανόλης στα 20 mM, (το ανώτατο επιτρεπτό όριο για την στήλη Ni-NTA αραρόζης όπως προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία). Τα διαλύματα έκπλυσης και έκλουσης είναι τα ίδια με αυτά της πλήρους μήκους πρωτεΐνης όσο αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα, την ιοντική ισχύ και τα επίπεδα του ιμιδαζολίου με την διαφορά ότι εμπεριέχουν επιπλέον 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Τα κλάσματα της στήλης συλλέγονται ξεχωριστά και αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) (Εικόνα 5.2 και 5.3).

5.2.4.2.2 Ενζυμική απομάκρυνση του ακροφυσίου ιστιδινών

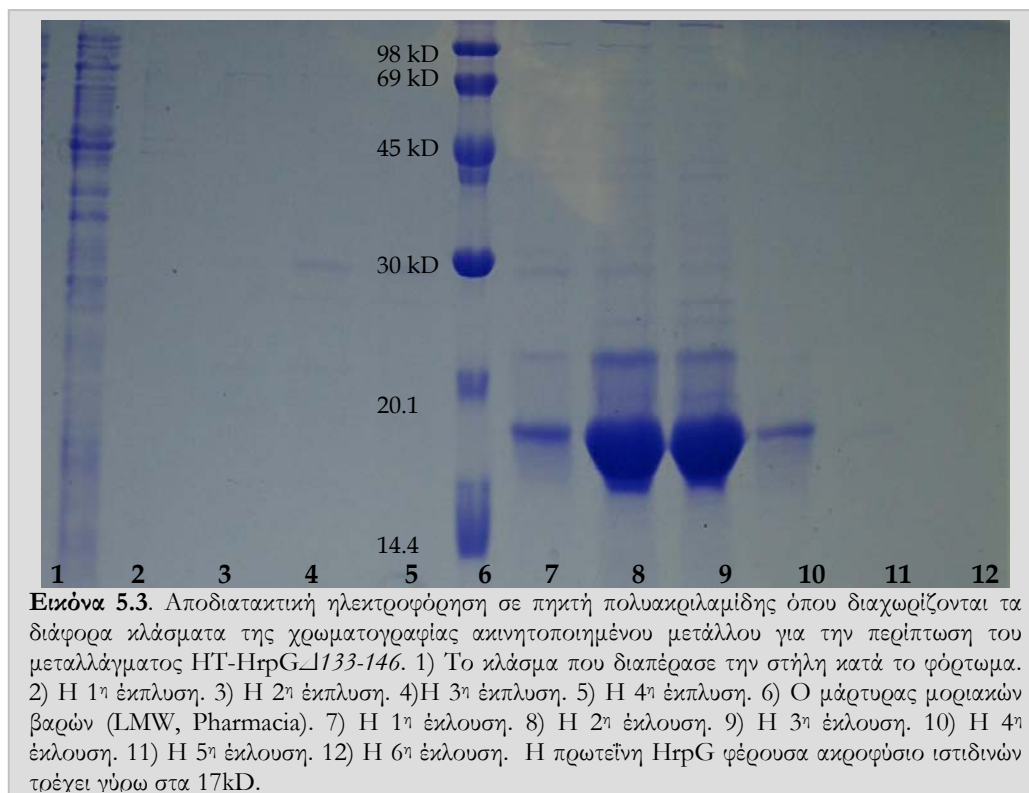
Από το SDS-PAGE επιλέγονται τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη και ακολουθεί διαπίδυση σε 2 lt διαλύματος αντίδρασης rTEV: 50 mM Tris/HCl 8.0, 50 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλης ή 20 mM β-μερκαπτοαιθανόλης στην περίπτωση της HrpG Δ 133-146. Ακολουθεί εκτίμηση της ποσότητας της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και στο δείγμα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της πρωτεάσης rTEV σε αναλογία μαζών 1/10. Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 3 ώρες. Ακολούθως στο δείγμα προστίθεται 10 mM ιμιδαζόλιο και φυγοκεντρείται στα 1500g για 30 min. Τα κλάσματα που προκύπτουν από την φυγοκέντρηση φυλάγονται ξεχωριστά.

5.2.4.2.3 Απομάκρυνση των ελεύθερων ακροφυσίων ιστιδίνης & της πρωτεάσης rTEV από το δείγμα

Το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα φορτώνεται σε δεύτερη εξισσοροπημένη στήλη Ni-NTA αραρόζης (όγκου στρώματος 5ml) για την απομάκρυνση των ακροφυσίων ιστιδίνης και της πρωτεάσης rTEV⁴⁵ από το δείγμα. Η HrpG ή η HrpG Δ 133-146 απελευθερωμένη πλέον από το ακροφύσιο ιστιδινών παραλαμβάνεται απευθείας από την έξοδο της κολώνας κατά την φόρτωση. Η στήλη πλένεται με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Ιμιδαζόλιο, συνολικού όγκου 45 ml το οποίο συλλέγεται σε τρία διαφορετικά κλάσματα των 15 ml για την περίπτωση που μέρος της πρωτεΐνης δεν έχει απελευθερωθεί απευθείας από την στήλη στο προηγούμενο βήμα. Τα κλάσματα αναλύονται με

⁴⁵ Η πρωτεάση rTEV παράγεται φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών

αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης και υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος.



Εικόνα 5.3. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης όπου διαχωρίζονται τα διάφορα κλάσματα της χρωματογραφίας ακινητοποιημένου μετάλλου για την περίπτωση του μεταλλάγματος HT-HrpG₁₁₃₃₋₁₄₆. 1) Το κλάσμα που διαπέρασε την στήλη κατά το φόρτωμα. 2) Η 1^η έκπλυση. 3) Η 2^η έκπλυση. 4) Η 3^η έκπλυση. 5) Η 4^η έκπλυση. 6) Ο μάρτυρας μοριακών βαρών (LMW, Pharmacia). 7) Η 1^η έκλουση. 8) Η 2^η έκλουση. 9) Η 3^η έκλουση. 10) Η 4^η έκλουση. 11) Η 5^η έκλουση. 12) Η 6^η έκλουση. Η πρωτεΐνη HrpG φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών τρέγει γύρω στα 17kD.

5.2.4.2.4 Στήλη Μοριακής Διήθησης

Στη συνέχεια το δείγμα συγκεντρώνεται μέσω διαδιύλισης (diafiltration) με AMICON Ultra ως τα 3 ml. Όσο αφορά την πλήρους μήκους πρωτεΐνη έντονα προβλήματα συσσωματώσεων απαντώνται κατά την διαδιύλιση της γεγονός που δεν ισχύει στην περίπτωση του μεταλλάγματος. Το δείγμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών συσσωματώσεων και το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη 170 ml Sephacryl S-100. Τα κατάλληλα κλάσματα που εμπεριέχουν την πρωτεΐνη όπως εκτιμάται από αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακριλαμίδης συλλέγονται και συγκεντρώνονται μέσω διαδιύλισης με Amicon Ultra. Ακολουθεί ακαριαίο πάγωμα του δείγματος σε υγρό άζωτο και φύλαξη του στους -80°C μέχρι την στιγμή της χρήσης του.

5.2.5 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα στις μικρές γωνίες

Τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα συλλέχθηκαν στη γραμμή ακτινοβολήσης X33 όπως αναφέρεται αναλυτικά στο εδάφιο 2.7.8. Για την περίπτωση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης μετρήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις της HrpG στα 11, 6.6, 3.3 και 1.1 mg/ml όπως εκτιμήθηκε από την απορρόφηση⁴⁶ του δείγματος στα 280 nm, σε διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 20 mM DTT. Η έκθεση στις ακτίνες - X ήταν συνεχόμενη με εναλλαγή δείγματος / διαλύματος και διαρκούσε 3 λεπτά. Με τον ίδιο τρόπο μετρήθηκαν δείγματα του μεταλλάγματος σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 15, 9 και 4.5 mg/ml σε διάλυμα 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM DTT, 2 mM EDTA.

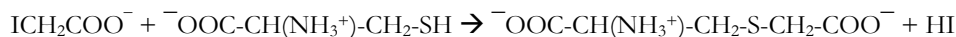
⁴⁶ Η απορρόφηση καταγράφηκε σε δύο διαφορετικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (6 M GuHCl, 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.0) χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης που υπολογίζεται από το εργαλείο ProtParam, εδάφιο 5.2.1.

5.2.6 Κυκλικός Διχρωσμός

Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού συλλέχθηκαν σε φασματοπολαρίμετρο J815 (Jasco Corp.) του οικείου ιδρύματος (Γμ. Βιολογίας, Π.Κ.). Τα δείγματα της HrpG Δ 133-146 που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ήταν χαμηλής συγκέντρωσης της τάξης των 0.02 – 0.05 mg/ml. Τα δείγματα προέκυψαν είτε με αραιώση με διάλυμα 20 mM φωσφορικών pH 8.5 είτε με εκτεταμένη διαπίδυση σε διάλυμα 10 mM φωσφορικών νατρίου/καλίου pH 7.4, 50 mM KF. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα πάχους 1 mm για την καταγραφή φάσματος κυκλικού διχρωσμού στο άπω υπεριώδες. Δείγματα συγκέντρωσης 1 mg/ml σε κυψελίδα πάχους 5 mm μετρήθηκαν στο εγγύς υπεριώδες. Μελετήθηκε επίσης η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της πρωτεΐνης καταγράφοντας το σήμα του κυκλικού διχρωσμού στα 222 nm, στο εύρος θερμοκρασιών 7 – 75°C με ρυθμό μεταβολής της θερμοκρασίας 75°C/h και απόκριση κάθε 1 sec. Η ανάλυση των δεδομένων για την κάθε περίπτωση έλαβε χώρα όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.8.

5.2.7 Προστασία των σουλφυδρυλομάδων με χημική τροποποίηση

Λόγω του υψηλού αριθμού κυστεϊνών που διαθέτει η πρωτεΐνη HrpG, καθώς και η ελλειμματική πρωτεΐνη HrpG Δ 133-146, δοκιμάστηκε η χημική τροποποίηση των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια του βιομορίου για την αποτροπή σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών. Η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών με γειτονικά βιομόρια είναι σε θέση να δημιουργήσει μη ειδικά πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates) κατά την διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης. Τα συσσωματώματα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την σημαντική απώλεια πρωτεΐνης κατά την διαδικασία της δια-διύλησης ή οποιασδήποτε άλλης μεθόδου συγκέντρωσης, ενώ αποτελούν και σημαντικό ανατρεπτικό παράγοντα κατά την κρυστάλλωση. Για την τροποποίηση των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων χρησιμοποιήθηκε ιωδοξικό νάτριο. Η χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Η πρωτεΐνη αφήνεται να αντιδράσει σε διάλυμα 25 mM φωσφορικών νατρίου/καλίου pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM ιωδοξικού νατρίου για 16 h στους 4°C, ακολούθως προστίθενται επιπλέον 8 mM ιωδοξικού νατρίου και αφήνεται να αντιδράσει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα αντιδραστήρια διαχωρίζονται μέσω στήλης μοριακής διήθησης. Ο διαχωρισμός γίνεται σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού και απουσία αναγωγικού στο διάλυμα έκλουσης.

5.2.8 Πειράματα Κρυστάλλωσης

Τα πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης ακολούθησαν το βασικό πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εδάφιο 2.5.5. Τα δείγματα που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1 και προέρχονται από επτά ανεξάρτητες απομονώσεις (preparations).

Πίνακας 5.1			Διάλυμα Φύλαξης		
AA	Πρωτεΐνη	Συγκέντρωση	Ρυθμιστικό δλμ	NaCl	Πρόσθετα
1	HrpG	4.2 mg/ml	10 mM Tris/HCl pH 8.0	25 mM	5 mM DTT
2	HrpG	9 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0	200 mM	2 mM DTT
3	HrpG	3.5 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0,	200 mM	2 mM DTT
4	HrpG	3 mg/ml	10 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM	2 mM DTT
5	HT-HrpG	6 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0	150 mM	200 mM ιμιδαζόλιο, 10 mM β-μεραπτοαιθανόλης
6	HrpG	8.5 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0	200 mM	20 mM DTT, 2 mM EDTA
7	HrpG Δ 133-146	5 mg/ml	10 mM Tris/HCl pH 8.0	100 mM	5 mM DTT
8	HrpG Δ 133-146	5.8 mg/ml	10 mM HEPES/NaOH pH 7.6	100 mM	5 mM
9	HrpG Δ 133-146	8.2 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0	200 mM	20 mM DTT, 2 mM EDTA
10	HrpG Δ 133-146 -rm	5 mg/ml	20 mM Tris/HCl pH 7.4	100 mM	

Πίνακας 5.1 (προηγούμενη σελίδα). Διαφορετικά δείγματα της πρωτεΐνης HrpG και του μεταλλάγματος έλλειψης που δοκιμάστηκαν σε πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης (εδάφιο 2.5.5). Το δείγμα με αύξον αριθμό 5 φέρει το ακροφύσιο ιστιδινών (HT, His Ttag). Το δείγμα 10 έχει υποστεί αναγωγική μεθυλίωση (tm, reductive methylation). Τα δείγματα 2-5 προέρχονται από μια κοινή απομόνωση.

5.2.9 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III μέσω εγγενούς ηλεκτροφόρησης

Τα πειράματα εγγενούς (μη αποδιατακτικής) ηλεκτροφόρησης σε αγαρόζη έλαβαν χώρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kim *et al.*, 2000. Οι πρωτεΐνες που ελέχθηκαν είναι η τάξης I σαπερόνη AnrPphF ORF1, η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrcU φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών, η HrpG, η ελλειμματική μορφή HrpG Δ 133-146, η HrpO και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη HrcQB φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών. Οι πρωτεΐνες επώαζονταν ανά ζεύγη για 16 ώρες στους 4°C πριν τον διαχωρισμό τους στην πηκτή αγαρόζης. Το πρωτόκολλο καθαρισμού της HrcQB ακολούθηθηκε όπως περιγράφεται στην διδακτορική διατριβή της Δρ. Φαδούλογλου (2004) εκτός του βήματος απομάκρυνσης του ακροφυσίου ιστιδινών. Η καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrcU φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών απομονώθηκε σε μικρή κλίμακα στο εργαστήριο μέσω στήλης αινητοποιημένου μετάλλου.

5.3 Αποτελέσματα

5.3.1 Βιοϊπολογιστική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της HrpG

Διενεργώντας έρευνα Psi-BLAST (Altschul *et al.*, 1997) την 9η Φλεβάρη 2007 στην βάση NRDB, κάνοντας χρήση των προκαθορισμένων τιμών που τίθενται από την NCBI, με αλληλουχία έρευνας την αμινοξική αλληλουχία της HrpG από την *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A (κωδικός πρόσβασης AAS20451) ανιχνεύονται ως αληθή θετικά στον πρώτο κύκλο άλλες δέκα αλληλουχίες. Όλες οι αλληλουχίες ανήκουν σε πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται ως HrpG από διάφορα βακτήρια, όλα του γένους *Pseudomonas*, ενώ δεν υπάρχει καμία αλληλουχία που να ανήκει σε γνωστή πρωτεΐνη ή σε επικράτεια γνωστής πρωτεΐνης. Κατά την επανέσοδο όλης της ομάδας στον δεύτερο κύκλο δεν ανιχνεύεται πλέον καμία καινούρια αλληλουχία και η έρευνα λαμβάνει τέλος σε αυτό το σημείο. Καθώς η παραπάνω έρευνα δεν ήταν κατάλληλη να ανιχνεύσει και το ομόλογο γονίδιο της HrpG από την *E. amylovora* το οποίο είναι γνωστό (Thompson *et al.*, 1994), ακολούθησε νέα έρευνα αυτή τη φορά χρησιμοποιώντας ως αλληλουχία αρχικής έρευνας την HrpG από την *E. amylovora* (κωδικός πρόσβασης Entrez: AAB49178), (βλ. Παράρτημα 8.3). Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι προκαθορισμένες τιμές. Στον πρώτο κύκλο ανιχνεύθηκαν 9 νέες αλληλουχίες: 2 από είδη της *Erwinia*, 1 από την *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, 2 από είδη του *Pectobacterium* και 3 από είδη της *Pseudomonas*. Στον δεύτερο κύκλο ανιχνεύθηκαν 9 επιπλέον αλληλουχίες, όλες από είδη της *Pseudomonas*. Σε αυτές ήταν και η HrpG από την *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A. Στον τρίτο κύκλο ανιχνεύθηκαν επιπλέον τρεις αλληλουχίες από είδη της *Pseudomonas*, ενώ ο τέταρτος κύκλος δεν κατάφερε να ανιχνεύσει επιπλέον αλληλουχίες. Σε παλαιότερη έρευνα που είχε γίνει με τον ίδιο τρόπο κατά την έναρξη της μελέτης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (το 2004) δεν ήταν κατατεθειμένες τόσες πολλές αλληλουχίες στην βάση δεδομένων και με την χρήση των προκαθορισμένων τιμών της Psi-BLAST δεν υπήρξε τρόπος ανίχνευσης της HrpG από την *E. amylovora* θέτοντας ως αλληλουχία έρευνας την αλληλουχία της HrpG από την *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A αλλά ούτε και το αντίθετο.

Καθώς δεν παρουσιάζονται αμινοξικές ομοιότητες με αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών ώστε να προταθεί μία αρχική υπόθεση εργασίας για τον βιολογικό ρόλο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, προχωρήσαμε στην μεθοδολογία της αναγνώρισης αναδίπλωσης (εδάφιο 2.1).

Η μήτρα που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση αναδίπλωσης της HrpG (από την *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, κωδικός πρόσβασης NCBI: AAS20451) με την υψηλότερη βαθμολογία μέσω του διακομιστή 3D-PSSM / PHYRE (Kelley *et al.*, 2000) είναι η c1jyoa. Η μήτρα αυτή φέρει κατά 21% ταυτόσημα αμινοξέα, έχει μήκος 130 αμινοξέα και η τιμή-E που της δίνεται είναι 0.0891 (P-τιμή 3D-PSSM). Η μήτρα αυτή αντιστοιχεί στην σαπερόνη τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III από την *Salmonella*, SicP (Stebbins & Galan, 2001). Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγει και ο διακομιστής mGenTHREADER (McGuffin *et al.*, 2000), (Πλαίσιο 5.1).

Πλαίσιο 5.1

mGenTHREADER PREDICTION RESULTS:

- Key -----

Conf = Description of confidence level
 Score = Raw score from neural network
 E-val = Expected number of errors per query for given score
 Epair = Pairwise energy for model
 Esolv = Solvation energy for model
 AlnSc = Sequence alignment score
 Alen = Length of alignment
 Dlen = Length of PDB entry
 Tlen = Length of target sequence
 PDB_ID = PDB identifier (+ chain code + domain code in CATH format)

Confidence levels:

CERT E-value < 0.001
 HIGH E-value < 0.01
 MEDIUM E-value < 0.1
 LOW E-value < 0.5
 GUESS E-value >= 0.5

Conf	Score	E-val	Epair	Esolv	AlnSc	Alen	DLen	Tlen	PDB_ID
HIGH	0.700	0.007	-429.0	-8.0	116.0	115	130	146	1jyoA0
LOW	0.544	0.188	-342.5	-4.2	80.0	113	141	146	1k3eA0
LOW	0.531	0.246	-319.1	-6.9	80.0	101	139	146	1hqz10
LOW	0.529	0.255	-461.1	-6.7	68.0	87	116	146	1skoB0
LOW	0.502	0.454	-294.6	-1.4	89.0	142	1058	146	1c3oA0
LOW	0.500	0.472	-372.5	-9.1	70.0	101	134	146	1j3wA0

Η τιμή-P όμως είναι υψηλότερη (0.0891) σε αυτήν την περίπτωση συγκριτικά με την περίπτωση της AvrPphF ORF1. Τότε η τιμή-P ήταν 0.0462 όσο αφορούσε τον διακομιστή αναγνώρισης αναδίπλωσης 3D-PSSM (Γαζή, 2002). Έχοντας χρησιμοποιήσει τον ίδιο αλγόριθμο αναγνώρισης αναδίπλωσης και για τις δύο αλληλουχίες (HrpG και AvrPphF ORF1) και γνωρίζοντας ότι στην περίπτωση της AvrPphF ORF1 έχουμε να κάνουμε με μία αληθώς θετική⁴⁷ πρόβλεψη, παρατηρούμε ότι στην περίπτωση της HrpG η πρόβλεψη δεν φέρει τον ίδιο βαθμό εμπιστοσύνης. Επιπρόσθετα, η πρόβλεψη δεν διατηρεί τα ίδια υψηλά επίπεδα εμπιστοσύνης για όλα τα ομόλογα της πρωτεΐνης HrpG, (Πίνακας 5.2).

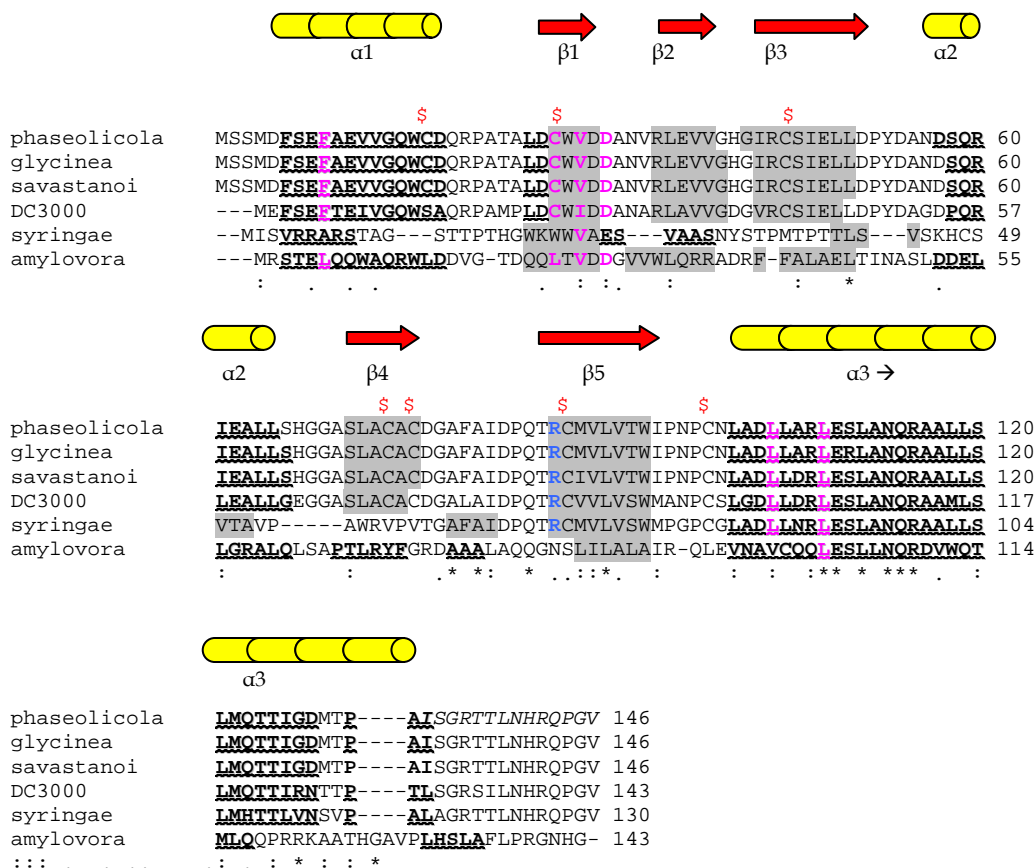
AA	Αλληλουχία	Μήτρα Αναδίπλωσης	Τιμή-E	Επίπεδα Εμπιστοσύνης
1	HrpG [<i>P. syringae</i> pv <i>phaseolicola</i>]	SicP (1jyo)	0.007	Υψηλά
2	HrpG [<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000]	SicP (1jyo)	0.009	Υψηλά
3	HrpG [<i>E. amylovora</i>]	SicP (1jyo)	0.099	Μεσαία
4	HrpG [<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>]	SicP (1jyo)	0.494	Χαμηλά

Πίνακας 5.2 Συγκριτικά επίπεδα εμπιστοσύνης κατά την αναγνώριση αναδίπλωσης (3D-PSSM) χρησιμοποιώντας ως μήτρα την σαπερόνη τάξης I από την *Salmonella* SicP (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo) διαφορετικών ομόλογων αλληλουχιών της HrpG.

⁴⁷ Η χρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή της AvrPphF ORF1 (κωδικός πρόσβασης PDB: 1s28) φέρει την γνωστή τοπολογία των τάξης I σαπερόνων, (Κεφάλαιο 4, Singer *et al.*, 2004).

Οι δύο παρατηρήσεις συντείνουν στο γεγονός ότι η HrpG δεν αποτελεί μία τυπική περίπτωση σαπερόνης τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III, φαίνεται να σχετίζεται με την οικογένεια των σαπερονών αυτών αλλά πιθανόν εξελικτικά να έχει διαφοροποιήσει τον ρόλο της ή να έχει αποκτήσει και νέες λειτουργίες σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός της σταθερής παρουσίας της στο *hrp/hrv* εκκριτικό σύστημα πολλών βακτηρίων.

Παρακάτω παρουσιάζεται η πολλαπλή στοίχιση⁴⁸ των ομολόγων της HrpG για τα είδη *P. syringae* pv *phaseolicola*, pv *syringae*, pv *glycinea*, *Pseudomonas savastanoi*, *P. syringae* pv. *tomato* str. DC3000 και *Erwinia amylovora* μέσω της CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994):



Με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα σημειώνονται οι προβλεπόμενες α-έλικες (κίτρινοι κύλινδροι) και σε γκριζα πλαίσια οι β-κλώνοι (κόκκινα βέλη). Οι προβλέψεις δευτεροταγούς δομής έχουν λάβει χώρα μέσω του προγράμματος PsiPRED. Παρατηρούμε δε, ότι η τοπολογία των τάξης I σαπερονών δεν προβλέπεται σταθερά για όλες τις ομόλογες αλληλουχίες.

Με μωβ γράμματα σημειώνονται τα αμινοξέα που εκπληρώνουν τις προϋποθέσεις των μοτίβων δέσμευσης των δραστικών πρωτεϊνών κατά Lilic *et al.*, (2006), (εδάφιο 1.4.1.2). Παρατηρούμε ότι τα μοτίβα δεν διατηρούνται πλήρως στις πρωτεΐνες HrpG από την *P. syringae* pv *syringae* και από την *E. amylovora*. Σε αυτά τα δύο είδη δεν διατηρείται επίσης σταθερή η προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή α-β-β-β-α-β-β-α που χαρακτηρίζει τις σαπερόνες τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Με μπλε γράμμα σημειώνεται η αργινίνη της θέσης 87 στην HrpG από την *P. syringae* pv *phaseolicola*. Η ύπαρξη αργινίνης στην περιοχή (αα καταλοίπων 65-82) θεωρείται χαρακτηριστική για τις τάξης I σαπερόνες από τους Schubot *et al.*, (2005).

⁴⁸ Αναλυτικότερη πολλαπλή στοίχιση παρουσιάζεται στο παράρτημα 8.3

Η υψηλά συντηρημένη περιοχή που παρατηρείται στην πολλαπλή στοίχιση στην προβλεπόμενη α3 έλικα φαίνεται να μην σχετίζεται άμεσα με τα χαρακτηριστικά των τάξης I σαπερονών και πιθανώς δηλώνει μία συντηρημένη λειτουργία μεταξύ όλων αυτών των πρωτεϊνών. Σε αντίθεση τα χαρακτηριστικά των τάξης I σαπερονών μοιάζουν αποκλίνοντα. Τα κατάλοιπα ακολούθως της προβλεπόμενης α3 έλικας έχουν απαλειφθεί στο μετάλλαγμα HrpG Δ 133-146 και παρουσιάζονται στην πολλαπλή στοίχιση με πλάγια γραμμάτα. Με «\$» σημειώνονται οι 7 κυστεΐνες που διαθέτει η HrpG.

5.3.2 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης παρουσιάζονται για την πρώτη καταγραφή τους ύστερα από 16 ώρες στον πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3 Καταγραφή αποτελεσμάτων κρυσταλλώσεων

T	Crystal Screen I				Crystal Screen II	
	18°C	±2 7°C	18°C	Cryo 18°C	18°C	18°C
	HrpG Δ 133-146	HrpG	HrpG	HrpG	HrpG Δ 133-146	HrpG
1	Black	Red	Black	Black	Black	Black
2	Black	Black	Black	Black	Black	Black
3	Red	Black	Black	Black	Black	Black
4	Black	Black	Black	Black	Black	Black
5	Black	Black	Black	Blue	Red	Black
6	Black	Black	Black	Black	Black	Black
7	Black	Black	Black	Black	Red	Black
8	Blue	Black	Black	Black	Black	Black
9	Black	Black	Black	Black	Black	Black
10	Red	Black	Black	Black	Black	Black
11	Black	Black	Black	Black	Black	Black
12	Black	Black	Black	Black	Black	Black
13	Δεν δοκιμάστηκε					
14	Black	Black	Black	Black	Black	Black
15	Red	Black	Black	Black	Black	Black
16	Black	Black	Black	Black	Black	Black
17	Black	Black	Black	Black	Black	Black
18	Black	Black	Black	Black	Black	Black
19	Black	Black	Black	Black	Black	Black
20	Red	Black	Black	Black	Black	Black
21	Black	Black	Black	Black	Black	Black
22	Black	Black	Black	Black	Black	Black
23	Black	Black	Black	Black	Black	Black
24	Red	Black	Black	Black	Black	Black
25	Black	Black	Black	Black	Black	Black
26	Black	Black	Black	Black	Black	Black
27	Black	Black	Black	Black	Black	Black
28	Black	Black	Black	Black	Black	Black
29	Black	Black	Black	Black	Black	Black
30	Red	Black	Black	Black	Black	Black
31	Black	Black	Black	Black	Black	Black
32	Black	Black	Black	Black	Black	Black
33	Black	Black	Black	Black	Black	Black

T	Crystal Screen I				Crystal Screen II	
	18°C	±2 7°C	18°C	Cryo 18°C	18°C	18°C
	HrpG-Δ133-146	HrpG	HrpG	HrpG	HrpG-Δ133-146	HrpG
34	Black	Dark Red	Black	Dark Red	Dark Red	Blue
35	Black	Orange	Black	Orange	Grey	Orange
36	Den δοκιμάστηκε				Black	Black
37	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
38	Black	Black	Dark Red	Dark Red	Dark Red	Dark Red
39	Black	Black	Black	Black	Black	Black
40	Black	Black	Black	Den δοκιμάστηκε	Black	Black
41	Black	Black	Black	Black	Dark Red	Dark Red
42	Dark Red	Black	Dark Red	Den δοκιμάστηκε	Dark Red	Black
43	Orange	Grey	Orange	Black	Black	Grey
44	Orange	Grey	Grey	Black	Black	Black
45	Purple	Orange	Purple	Orange	Dark Red	Dark Red
46	Dark Red	Black	Black	Black	Black	Black
47	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Black	Grey
48	Dark Red	Orange	Orange	Orange	Black	Black

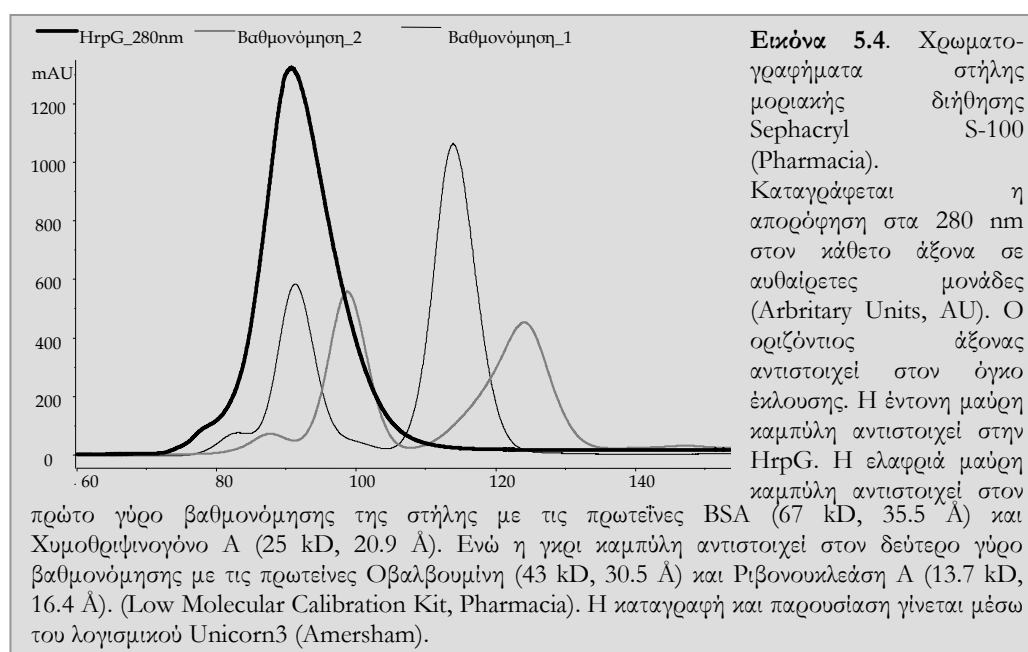
Πίνακας 5.3 Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του γκρι καταγράφονται οι συνθήκες εκείνες με διαφορετικό βαθμό κατακρίμνησης. Με μαύρο καταγράφονται τα βαριά άμορφα ιζήματα και με γκρι τα ελαφρύτερα. Με άσπρο οι σταγόνες που παρέμειναν διαυγείς. Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του μπλε καταγράφονται οι διαφορετικοί βαθμοί διαχωρισμού φάσεων. Με καφέ συμβολίζεται το ιζήμα καφέ χρώματος που παράγεται χαρακτηριστικά σε περίπτωση μετουσιωμένης πρωτεΐνης. Συνήθως από τέτοια ιζήματα δεν παράγονται κρύσταλλοι. Με ανοιχτό πορτοκαλί συμβολίζονται οι συνθήκες όπου παρουσιάζεται είδος γέλης, αυτές αποτελούν κάποια βελτίωση σε σχέση με την κατακρήμνιση, αν και συγχέονται με την ελαφριά μορφή του καφέ ιζήματος. T: θερμοκρασία.

Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα εμπορικά πακέτα συνθηκών κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν: Crystal Screen I και Crystal Screen II (Hampton Research) τα οποία έλαβαν χώρα για τα δείγματα: HrpG σε συγκέντρωση 4.2 mg/ml και διάλυμα φύλαξης 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 25 mM NaCl, 5 mM DTT και 5 mg/ml HrpG-Δ133-146 σε διάλυμα 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM DTT. Οι σαρώσεις αυτές στηρίζονται στην θεωρία του Σποραδικού Πίνακα (Sparse Matrix) (Εδάφιο 2.5.3). Οι πρώτες τέσσερις στήλες του πίνακα παρουσιάζουν τα συγκριτικά αποτελέσματα του Crystal Screen I μεταξύ της HrpG-Δ133-146 (στήλη 1) και της HrpG (στήλη 3), ενώ για την HrpG παρουσιάζονται επίσης οι συνθήκες του Crystal Screen I με την προσθήκη απαραίτητης ποσότητας γλυκερόλης ώστε το διάλυμα να μπορεί να ψυχθεί σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου άνευ σχηματισμού κρυσταλλικού πάγου αλλά άμορφου στερεού τύπου ύαλου (κρυστοπροστατευτικό, στήλη 4, εμπορικό όνομα: Crystal Screen Cryo). Επίσης για την HrpG στην στήλη 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις συνθήκες του Crystal Screen I αραιωμένες κατά το ήμισι ενώ τα πειράματα επωάζονται στους 7°C (Κρύο Δωμάτιο). Ο πίνακας είναι έντονα κατειλημμένος από το μαύρο και καφέ χρώμα που αντιστοιχεί στην ύπαρξη ιζημάτων παρόλο που τα αποτελέσματα καταγράφονται εδώ για τις πρώτες 16 ώρες. Οι σταγόνες που παρέμειναν διαυγείς ανήκουν κυρίως στο Crystal Screen 2 και περιλαμβάνουν κυρίως συνθήκες με οργανικούς διαλύτες: πολυαιθανογλυκόλες διάφορων μοριακών βαρών, ισοπροπανόλη, αιθανόλη, 1,6-εξανοδιόλη, Jeffamine M-600 σε υψηλές τιμές pH. Οι διαθέσιμες στο εργαστήριο χημικές ενώσεις δοκιμάστηκαν εκτενέστερα σύμφωνα με την προσέγγιση που παρουσιάζεται αναλυτικά στο εδάφιο 2.5.5. Οι συγκεκριμένες συνθήκες παρουσιάζονται στο παράρτημα 8.4. Το μετάλλαγμα HrpG-Δ133-146 δοκιμάστηκε επίσης και στις συνθήκες των δύο Crystal Screens αλλά χρησιμοποιώντας τα αντίστοιχα

εμπορικά Structure Screens (Molecular Dimensions)⁴⁹ και φάνηκε να παρουσιάζει αλλαγές καθώς διευρύνθηκε η διαλυτή περιοχή του και σε χαμηλότερα pH, πάντα όμως σε οργανικούς διαλύτες.

5.3.3 Υδροδυναμική ανάλυση της πρωτεΐνης HrpG και της ελλειμματικής μορφής HrpGΔ133-146.

Κατά την υποβολή δείγματος HrpG σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τη στήλη με φαινομενικό μοριακό βάρος 66.9 kD (στην θέση έκλουσης της BSA) και με υδροδυναμική ακτίνα 35.4 Å. Αυτή η πρώιμη έκλυση δηλώνει ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται σε τετραμερή⁵⁰ κατάσταση αφού το μοριακό βάρος του μονομερούς υπολογίζεται στα 16 kD. Ο υδροδυναμικός όγκος της HrpG εκτιμάται βάση της υδροδυναμικής της ακτίνας στα 185100 Å³, (Εικόνα 5.4). Το διάλυμα έκλουσης από την στήλη εμπειρείχε 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, ενώ η πρωτεΐνη βρισκόταν ήδη σε 10 mM β-μεριαπτοαιθανόλης κατά την είσοδο της στην στήλη.

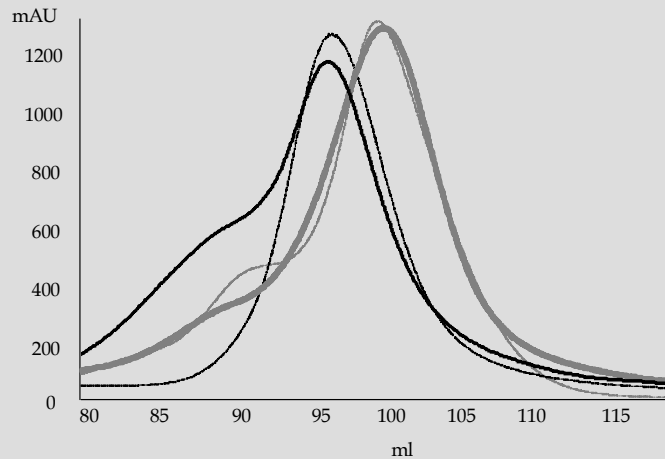


Σε αντίθεση με την πλήρους μήκους πρωτεΐνη, το μετάλλαγμα έλλειψης των 14 καρβοξυτελικών καταλοίπων εκλούεται, στις ίδιες συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την πλήρους μήκους πρωτεΐνη, από την στήλη μοριακής διήθησης με φαινομενικό μοριακό βάρος 36 kD και υδροδυναμική ακτίνα 27.5 Å. (Εικόνα 5.5). Το διάλυμα έκλουσης φαίνεται να επηρεάζει τον όγκο έκλουσης από την στήλη αφού σε πειράματα παρουσία HEPES/NaOH pH 7.6 η έκλυση έγινε σε μικρότερο φαινομενικό μοριακό βάρος (31.4 kD) με υδροδυναμική ακτίνα στα 25.8 Å από ότι σε Tris/HCl pH 8.0. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η ύπαρξη ενός ώμου πριν την κυρίως κορυφή, ο οποίος όμως δεν παρατηρείται όταν η πρωτεΐνη επωαστεί με υψηλή συγκέντρωση αναγωγικού (Εικόνα 5.5, Ισχνή Μαύρη Καμπύλη).

⁴⁹ Η διαφορά μεταξύ των ίδιων συνθηκών από τις δύο εταιρείες έγκειται στην τιτλοδότηση για την προσαρμογή του pH στο ρυθμιστικό διάλυμα Tris με οξικό οξύ αντί HCl από την Molecular Dimensions.

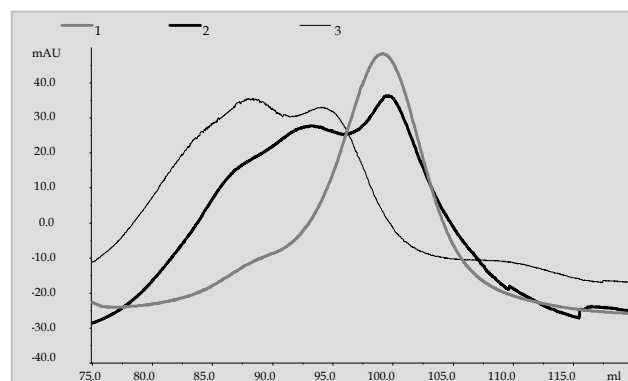
⁵⁰ Η πρωτεΐνη HrpG εκτιμάται ως τετραμερές από την στήλη μοριακής διήθησης εφόσον και μόνο εφόσον είναι σφαιρική (globular) καθώς η στήλη έχει βαθμονομηθεί με σφαιρικές πρωτεΐνες. Η σφαιρικότητα της HrpG αποδεικνύεται στην συνέχεια μέσω των πειραμάτων SAXS όπου φαίνεται ότι το διάγραμμα Kratky διαθέτει τα τυπικά χαρακτηριστικά για ένα σφαιρικό σωματίδιο (εδάφιο 6.3.5), σε αντιπαράβολή με την περίπτωση της πρωτεΐνης HrpO.

Εικόνα 5.5. Χρωματογραφήματα στήλης μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Pharmacia) του μεταλλάγματος έλλειψης. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 280 nm στον κάθετο άξονα σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, AU). Ο οριζόντιος άξονας αντιστοιχεί στον όγκο έκλουσης. Η έντονη μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στην HrpG Δ 133-146 σε διάλυμα έκλουσης 20 mM Tris pH



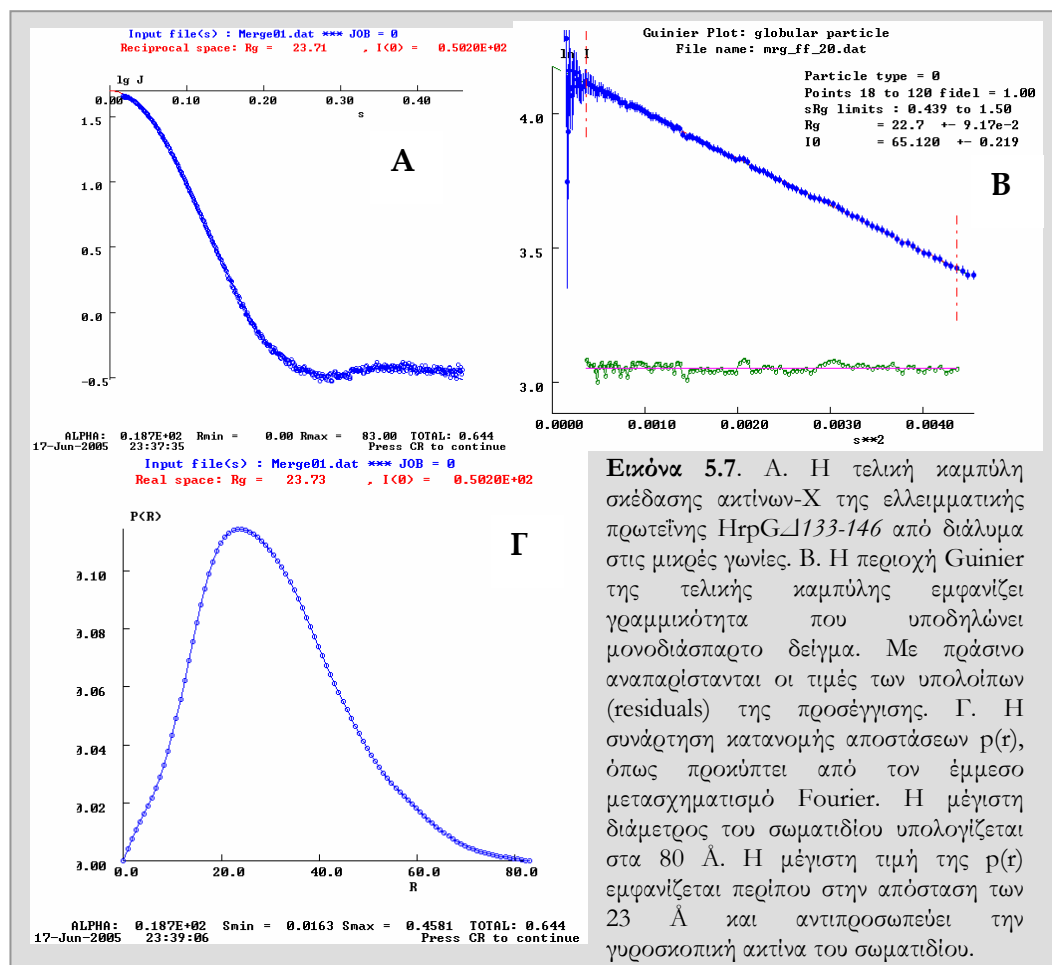
8,0, 200 mM NaCl, 2 mM DTT. Η ισχνή μαύρη καμπύλη αντιστοιχεί στην ίδια πρωτεΐνη σε διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5mM DTT, 2 mM EDTA έχοντας επωαστεί με 20 mM β-μερκαπτοαιθανόλης επιπλέον πριν την εισαγωγή του δείγματος στην στήλη. Η έντονη γκρι καμπύλη αντιστοιχεί στην ίδια πρωτεΐνη σε διάλυμα 20 mM HEPES/NaOH pH 7,6, 200 mM NaCl, 2 mM DTT και τέλος η ισχνή γκρι καμπύλη αντιστοιχεί επίσης στο μετάλλαγμα έλλειψης σε διάλυμα 10 mM HEPES/NaOH pH 7,6, 25 mM NaCl, 5mM DTT, 2mM EDTA.

Λόγω της ύπαρξης 7 καταλοίπων κυστεΐνης ανά πολυπεπτιδική αλυσίδα της HrpG (αλλά και της ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης) πειράματα μοριακής διήθησης έλαβαν χώρα παρουσία ή απουσία αναγωγικού για να καθορίσουν το μέγεθος της οξειδωσης της πρωτεΐνης *in vitro*. Στην εικόνα 5.6 φαίνονται τρία διαφορετικά πειράματα που έλαβαν χώρα διαδοχικά. Αρχικά η πρωτεΐνη διήλθε από την στήλη μοριακής διήθησης έχοντας επωαστεί προηγουμένως με 5 mM DTT ενώ το διάλυμα έκλουσης ήταν 20 mM HEPES/NaOH pH 7,6, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, στην συνέχεια τα κλάσματα συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν ενώ το DTT απομακρύνθηκε με διαδιύλιση και επαναφορτώθηκαν στην στήλη. Την δεύτερη φορά το διάλυμα έκλουσης ήταν 20 mM HEPES/NaOH pH 7,6, 200 mM NaCl άνευ αναγωγικού. Ακολούθησε άλλος ένας ίδιος κύκλος και ένα τρίτο πέρασμα από την ίδια στήλη χωρίς αναγωγικό. Παρατηρούμε την σταδιακή δημιουργία τουλάχιστον δύο νέων πληθυσμών της πρωτεΐνης υψηλότερου φαινομενικού μοριακού βάρους πλησίον των 40 kD και 50 kD με υδροδυναμικές ακτίνες 28.8 και 31.6 Å αντίστοιχα, ενώ συγχρόνως παρατηρείτε μείωση του πληθυσμού του διμερούς (χρωματογράφημα 1, εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.6. Χρωματογραφήματα στήλης μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (Pharmacia) του μεταλλάγματος έλλειψης σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 280 nm στον κάθετο άξονα σε αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, AU). Ο οριζόντιος άξονας αντιστοιχεί στον όγκο έκλουσης. 1) Η καμπύλη δείχνει την έκλυση της HrpG Δ 133-146 παρουσία αναγωγικού. 2) Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από την πρώτη εκτέλεση

αποτελέσαν είσοδο για την δεύτερη εκτέλεση της μοριακής διήθησης άνευ αναγωγικού. 3) Η τρίτη εκτέλεση άνευ αναγωγικού. Η καταγραφή και παρουσίαση γίνεται μέσω του λογισμικού Unicorn3.

5.3.4 Σκέδαση ακτίνων-X σε μικρές γωνίες για την HrpG Δ 133-146

Εικόνα 5.7. Α. Η τελική καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X της ελλειμματικής πρωτεΐνης HrpG Δ 133-146 από διάλυμα στις μικρές γωνίες. Β. Η περιοχή Guinier της τελικής καμπύλης εμφανίζει γραμμικότητα που υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο δείγμα. Με πράσινο αναπαρίστανται οι τιμές των υπολοίπων (residuals) της προσέγγισης. Γ. Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων $p(r)$, όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου υπολογίζεται στα 80 Å. Η μέγιστη τιμή της $p(r)$ εμφανίζεται περίπου στην απόσταση των 23 Å και αντιπροσωπεύει την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου.

Στην εικόνα 5.7 Α παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης του μεταλλάγματος HrpG Δ 133-146 από διάλυμα. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης της σκέδασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å]. Η τελική καμπύλη σκέδασης αποτελεί συγχώνευση των δευτερογενών⁵¹ καμπύλων από δείγματα σωματιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για τις μικρές γωνίες (μικρές τιμές s , αριστερή πλευρά διαγράμματος, γωνίες πλησίον της διεύθυνσης της πρωτογενούς ακτινοβολίας) έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές της έντασης που προέρχονται από το αραιό διάλυμα (4.5 mg/ml) της HrpG Δ 133-146. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται οι επιρροές από τη πιθανή αλληλεπίδραση των σωματιδίων μεταξύ τους λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους στο διάλυμα. Για τις ευρείες γωνίες (μεγάλες τιμές s , δεξιά πλευρά διαγράμματος) οι τιμές προέρχονται από το πιο συμπυκνωμένο δείγμα (15 mg/ml) που μετρήθηκε για την ελλειμματική πρωτεΐνη.

Στην εικόνα 5.7 Β παρουσιάζεται το διάγραμμα της προσέγγισης Guinier: $\ln I(s)$ συναρτήσει του s^2 . Οι τιμές της έντασης στη μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα εκτιμώνται αντίστοιχα στα 65.13 ± 0.22 και 22.7 ± 0.1 Å. Η μοριακή μάζα της HrpG Δ 133-146 εκτιμάται από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα (BSA) σε 29.1 kD, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη της HrpG Δ 133-146 σε διμερή μορφή. Διαφορετικά, ανεξάρτητη της συγκέντρωσης εκτίμηση του μοριακού βάρους μπορεί

⁵¹ Οι δευτερογενείς καμπύλες προέρχονται από τις πρωτογενείς καμπύλες σκέδασης του δείγματος από όπου αφαιρούνται οι επίσης πρωτογενείς καμπύλες σκέδασης του διαλύτη δίνοντας την «καθαρή» σκέδαση που οφείλεται στο σωματίδιο.

να επιτευχθεί μέσω του ένυδρου όγκου⁵² (ή όγκου Porod, Εδάφιο 2.7.3) ο οποίος υπολογίζεται για την HrpG Δ 133-146 στα 67540 Å³, που συνεπάγεται μοριακό βάρος 34.5 kD.

Η συνάρτηση Guinier (Εδάφιο 2.7.2) υπολογίστηκε για κάθε δευτερογενή καμπύλη της HrpG Δ 133-146 και ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του σωματιδίου στο διάλυμα η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας υπολογίζεται συστηματικά στα 22 Å, ένδειξη ότι δεν παρατηρείται ιδιο-σύνδεση της πρωτεΐνης.

Στην εικόνα 5.7 Γ παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, για την HrpG Δ 133-146 όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου εκτιμήθηκε στα 80.5 Å.

5.3.5 Σκέδαση ακτίνων X σε μικρές γωνίες για την HrpG

Στην εικόνα 5.8 Α παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης της πρωτεΐνης HrpG από διάλυμα. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται η μεταβολή του λογαρίθμου της έντασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης $s = (4\pi\sin 2\theta)/\lambda$ [1/Å]. Για τις μικρές γωνίες (μικρές τιμές s , αριστερή πλευρά διαγράμματος) έχουν χρησιμοποιηθεί οι τιμές της έντασης που προέρχονται από εξαγωγή των δεδομένων διαφορετικής συγκέντρωσης θεωρώντας δείγμα σε άπειρη αραιώση⁵³. Για τις ευρείες γωνίες (μεγάλες τιμές s δεξιά πλευρά διαγράμματος) οι τιμές που προέρχονται από το πιο συμπυκνωμένο δείγμα (11 mg/ml) που μελετήθηκε για την πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Για τις ενδιάμεσες τιμές του s έχουν ληφθεί υπόψη και οι δευτερογενείς καμπύλες της HrpG για τις συγκεντρώσεις 6.6, 3.3 και 1.1 mg/ml πρωτεΐνης.

Στην εικόνα 5.8 Β παρουσιάζεται το διάγραμμα της προσέγγισης Guinier: $\ln I(s)$ συναρτήσει του s^2 . Οι τιμές της έντασης στην μηδενική γωνία $I(0)$ και η γυροσκοπική ακτίνα εκτιμώνται αντίστοιχα στα 141.7 ± 0.4 και 33.1 ± 0.1 Å. Η μοριακή μάζα της HrpG εκτιμάται από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα (BSA) σε 63.2 kD, γεγονός που επιβεβαιώνει την ύπαρξη της HrpG ως τετραμερές έναντι της διμερούς μορφής του μεταλλάγματος έλλειψης. Διαφορετικά, η ανεξάρτητη της συγκέντρωσης εκτίμηση του μοριακού βάρους μέσω του ένυδρου όγκου ο οποίος υπολογίζεται για την HrpG στα 140770 Å³ (σχεδόν ο διπλάσιος του αντίστοιχου ένυδρου όγκου της HrpG Δ 133-146 : 67540 Å³) συνεπάγεται μοριακό βάρος ίσο με 70.4 kD ($MW_{HrpG\Delta 133-146} = 34.5$ kD).

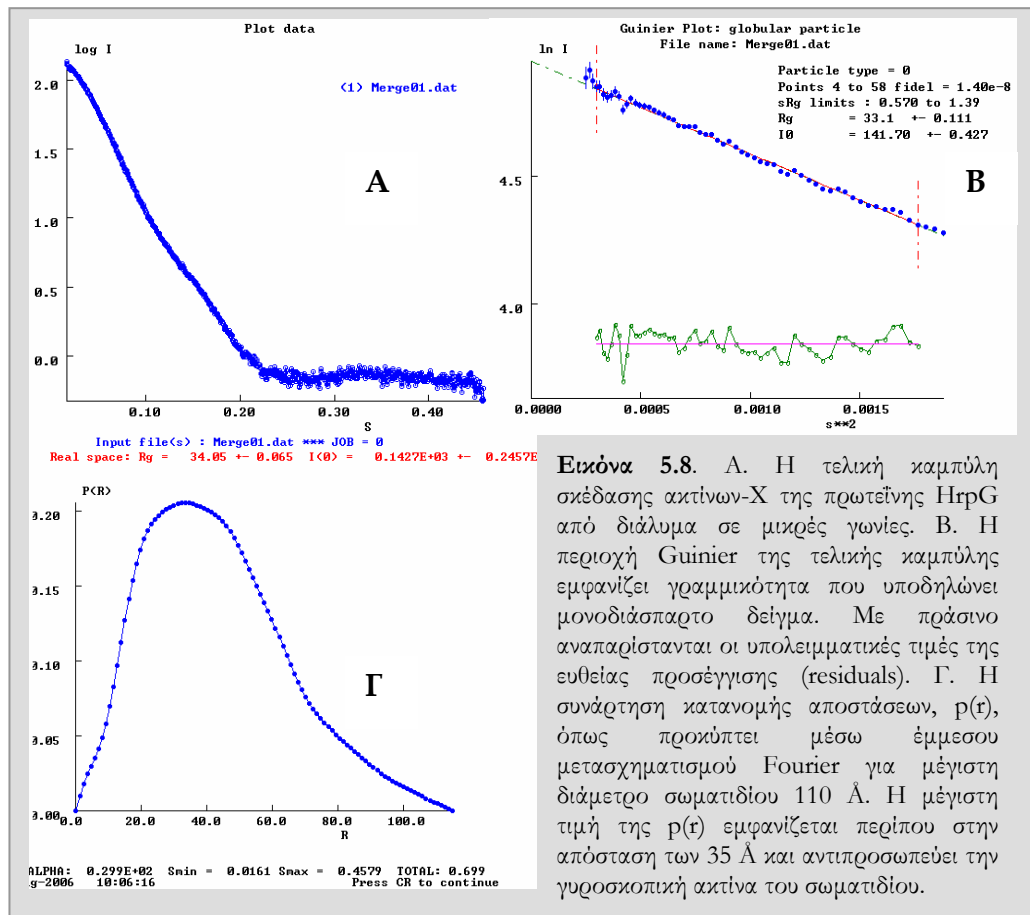
Η συνάρτηση Guinier υπολογίστηκε για κάθε δευτερογενή καμπύλη της HrpG και βρέθηκε η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του διαλύματος. Αρχίζοντας από το αραιότερο προς το πυκνότερο οι αντίστοιχες τιμές της γυροσκοπικής ακτίνας εκτιμώνται στα: 33.1, 33.5 και 35.0 Å, ένδειξη ιδιο-σύνδεσης⁵⁴ της πρωτεΐνης. Στην εικόνα 5.8 Β παρουσιάζεται η συνάρτηση Guinier για την καμπύλη που προήλθε έπειτα από εξαγωγή σε άπειρη αραιώση. Η ύπαρξη ευθείας στις χαμηλές τιμές του s υποδηλώνει ότι το δείγμα, εφόσον το σωματίδιο είναι σφαιροειδές, είναι μονοδιάσπαρτο.

Στην εικόνα 5.8 Γ παρουσιάζεται η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, για την HrpG όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier. Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου εκτιμάται στα 115 Å.

⁵² Ο ένυδρος όγκος υπολογίζεται χωρίς την ανάγκη ύπαρξης μοντέλου και επιπλέον δεν εξαρτάται από την κανονικοποίηση των δεδομένων με βάση την συγκέντρωση του δείγματος, εκτιμώντας έτσι πιο αποτελεσματικά το μοριακό βάρος του υπό μελέτη σωματιδίου παρότι η σύγκριση των τιμών $I(0)$ με μία γνωστή πρωτεΐνη μάρτυρα. Για τις σφαιρικές πρωτεΐνες το μοριακό βάρος σε kD είναι το μισό του όγκου Porod σε nm³.

⁵³ Η γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου εξαρτάται από την συγκέντρωση του στην περίπτωση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης. Παρατηρείται δηλαδή κάποιος βαθμός ιδιο-σύνδεσης της HrpG που «μεγαλώνει» τον μέσο όγκο του παρατηρούμενου σωματιδίου. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε εκτίμηση των τιμών της έντασης θεωρώντας ότι το σωματίδιο βρίσκεται σε άπειρη αραιώση με σκοπό την εξουδετέρωση αυτής της επιρροής.

⁵⁴ Το φαινόμενο αύξησης της γυροσκοπικής ακτίνας του σωματιδίου συναρτήσει της συγκέντρωσης του παρατηρήθηκε επίσης και σε μετρήσεις της πρωτεΐνης με το ακροφύσιο ιστιδινών (δεδομένα δεν παρατίθενται).

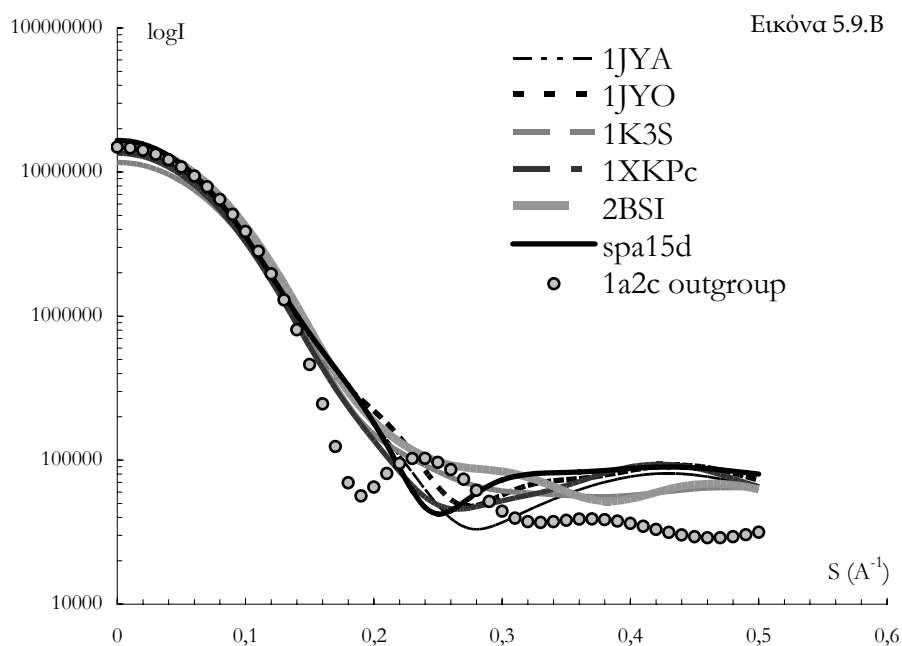
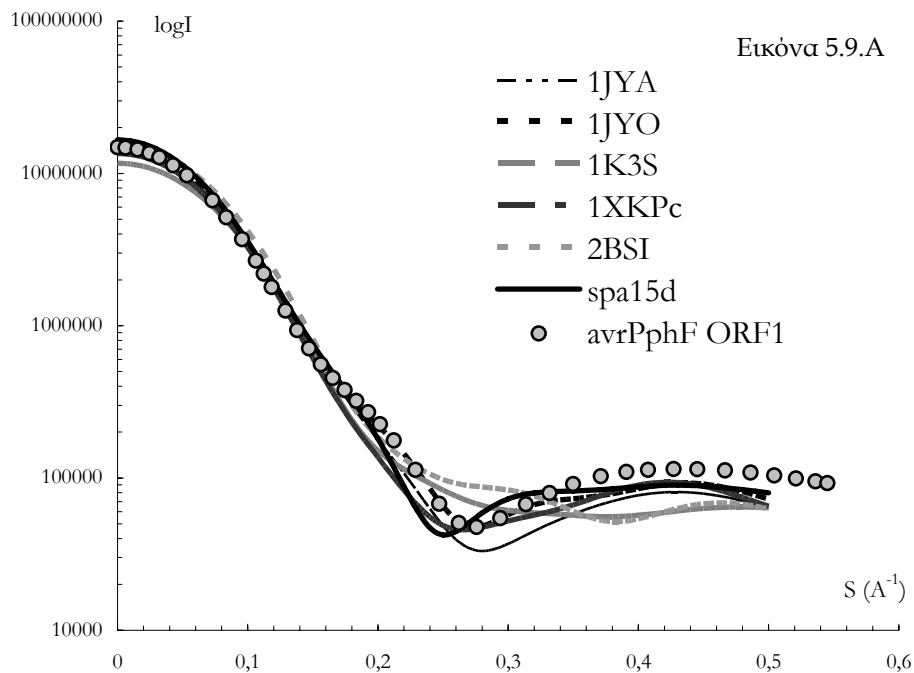


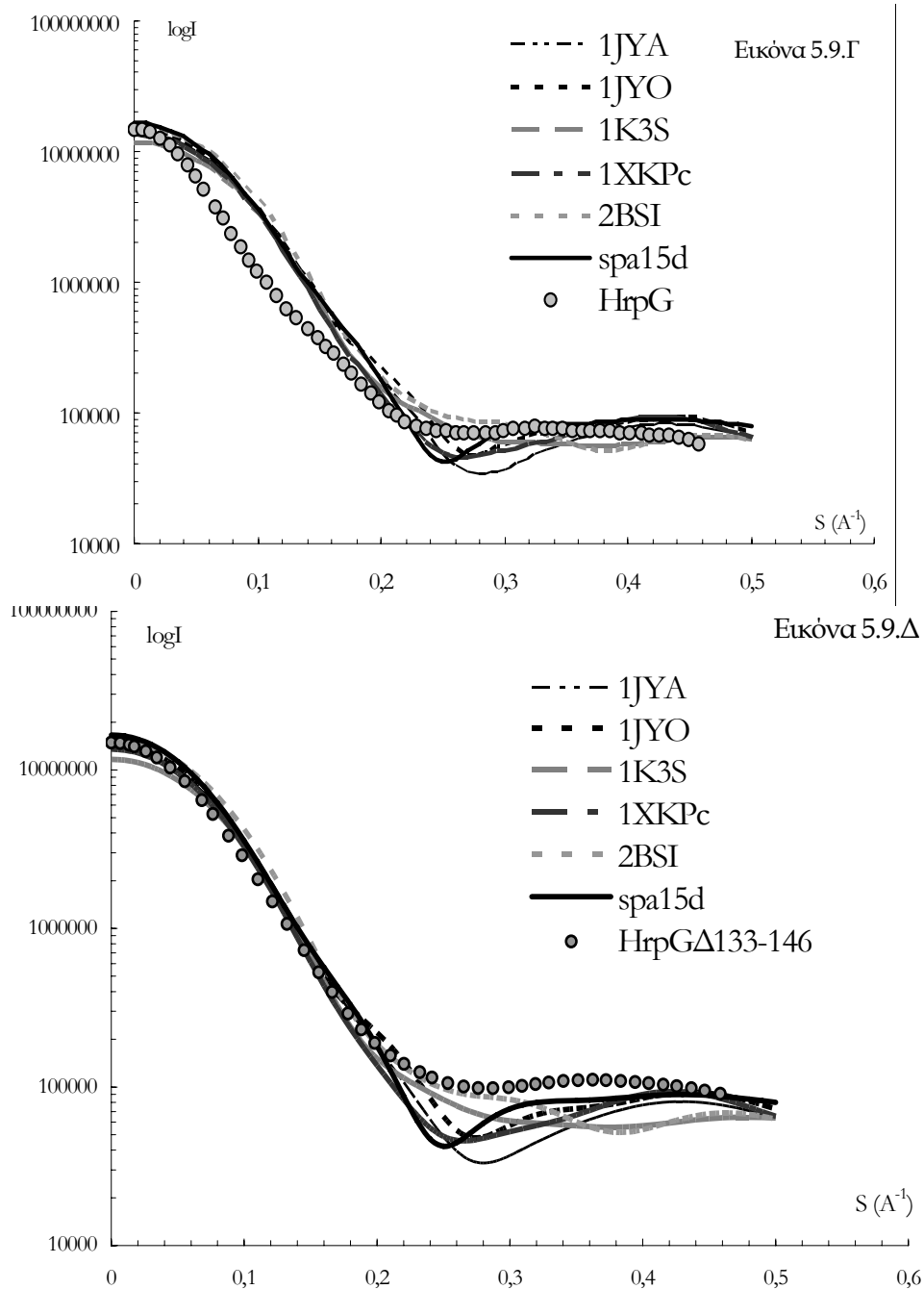
Εικόνα 5.8. Α. Η τελική καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X της πρωτεΐνης HrpG από διάλυμα σε μικρές γωνίες. Β. Η περιοχή Guinier της τελικής καμπύλης εμφανίζει γραμμικότητα που υποδηλώνει μονοδιάσπαρτο δείγμα. Με πράσινο αναπαρίστανται οι υπολειμματικές τιμές της ευθείας προσέγγισης (residuals). Γ. Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων, $\rho(r)$, όπως προκύπτει μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier για μέγιστη διάμετρο σωματιδίου 110 Å. Η μέγιστη τιμή της $\rho(r)$ εμφανίζεται περίπου στην απόσταση των 35 Å και αντιπροσωπεύει την γυροσκοπική ακτίνα του σωματιδίου.

5.3.6 Σύγκριση των πειραματικών καμπύλων σκέδασης σε μικρές γωνίες από διάλυμα της πρωτεΐνης HrpG με τις θεωρητικές καμπύλες των τάξης I σαπερονών.

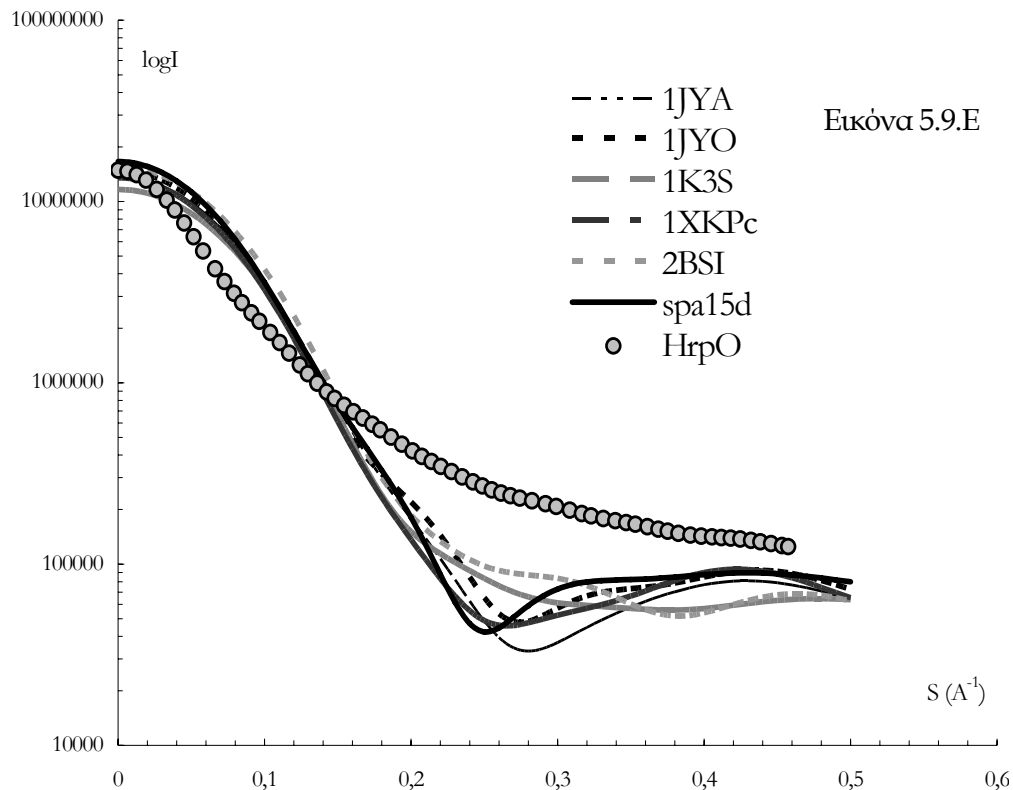
Οι τάξης I σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, με γνωστή τρισδιάστατη δομή, θεωρήθηκαν σαν πρότυπη ομάδα αναφοράς για την σύγκριση του γενικού σχήματος τους σε χαμηλή διακριτικότητα με τις υπό μελέτη πρωτεΐνες της παρούσης διατριβής. Οι SycE (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo, Birtalan & Gosh, 2001), SigE (κωδικός πρόσβασης PDB: 1k3s, Luo *et al.*, 2001) και SicP (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo, Stebbins & Galan, 2001) είναι τυπικές τάξεις I σαπερόνες φέρουσες την κοινή τοπολογία διπλωσης α - β - β - α - β - β - α . Η Spa15 (κωδικός πρόσβασης PDB: 1ry9, van Erde *et al.*, 2004) παρουσιάζει την ίδια τοπολογία αλλά με μία καταφανή διαφορά: οι $\alpha 2$ έλικες έχοντας διαφορετική κατεύθυνση, οδηγούν στον σχηματισμό διμερών στο οποίο οι υπομονάδες του έχουν περιστραφεί κατά 30° μεταξύ τους σε σχέση με τα ομοδιμερή των άλλων σαπερονών της ομάδας. Η Spa15 φαίνεται να υιοθετεί αυτήν την διεύθυνση, όχι μόνο στον κρύσταλλο, αλλά και στο διάλυμα. Από την άλλη πλευρά η SycT (κωδικός πρόσβασης PD: 2BSI, Locher *et al.*, 2005) στερείται την $\alpha 2$ έλικα, αλλά η υπόλοιπη δομή μοιάζει με αυτή των σαπερονών της ομάδας. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε επίσης και η ετεροδιμερής τάξης I σαπερόνη YscB / SycN (κωδικός πρόσβασης PDB : 1xkr, Schubot *et al.*, 2004). Οι θεωρητικές καμπύλες σκέδασης ακτίνων X από διάλυμα των παραπάνω γνωστών σαπερονών από την διμερική κρυσταλλική δομή τους υπολογίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος CRY SOL (Εδάφιο 2.7.6) χρησιμοποιώντας τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του. (Εικόνα 5.9). Η θρομβίνη επιλέχτηκε ως πρωτεΐνη εκτός της πρότυπης ομάδας των σαπερονών καθώς διαθέτει ίδια γυροσκοπική ακτίνα αλλά παρουσιάζει διαφορετικό σχήμα. Οι πειραματικές καμπύλες SAXS των πρωτεϊνών AvrPphF ORF1, HrpG, HrpG₁₃₃₋₁₄₆ και HrpO επεξεργάστηκαν με το PRIMUS και υπολογίστηκε μία ανασυνταμμένη καμπύλη μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier. Οι ανασυνταμμένες αυτές καμπύλες συγκρίθηκαν με τις θεωρητικές των γνωστών

σαπερονών για την εκτίμηση του βαθμού ομοιότητας των υπό μελέτη πρωτεϊνών με την οικογένεια των τάξης I σαπερονών του εκριτικού συστήματος τύπου III (Εικόνα 5.9). Η AvrPphF ORF1 χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας του πειράματος και η ανασυστάμενη καμπύλη της φαίνεται να συμπίπτει ικανοποιητικά ως την τιμή $s = 0.35$ ($1/\text{\AA}$) με τις θεωρητικές καμπύλες σκέδασης από διάλυμα της πρότυπης ομάδας αναφοράς των τάξης I σαπερονών (Εικόνα 5.9.A). Η καμπύλη της πλήρους μήκους HrpG όπως αναμένεται δεν φαίνεται να συμπίπτει με τις καμπύλες της πρότυπης ομάδας καθώς πρόκειται για ένα σωματίδιο διπλάσιου μοριακού βάρους. Η καμπύλη της HrpG Δ 133-146 συμπίπτει ικανοποιητικά ως την τιμή 0.25 του ανύσματος σκέδασης, από και πέρα παρατηρείται ελαφριά απόκλιση η οποία δεν παρουσιάζεται στην περίπτωση της AvrPphF ORF1 (Εικόνα 5.9.Γ). Η καμπύλη σκέδασης της θρομβίνης συμπίπτει ως τα 0.15 $1/\text{\AA}$ με τις καμπύλες αναφοράς των διμερών τάξης I σαπερονών.



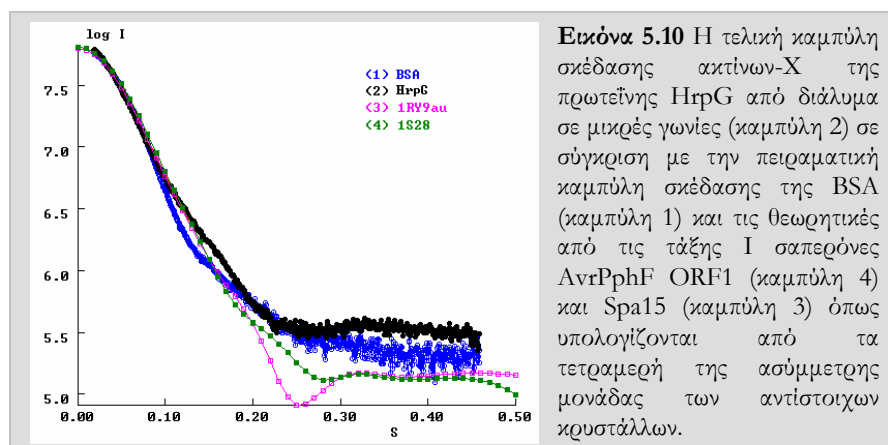


Εικόνα 5.9. Οι θεωρητικές καμπύλες σκέδασης από διάλυμα των τάξης I σαπερονών: SycE (1jya), SicP (1jyo), SigE (1k3s), της ετεροδιμερούς σαπερόνης SycN and YscB (1xkp), SycT (2bsi) και Spa15 παρήχθησαν από τις ατομικές τους συντεταγμένες με την χρήση του προγράμματος CRYSOOL και παρατίθενται εδώ σε κάθε γράφημα για σύγκριση. Στο Α η ανασκευασμένη καμπύλη SAXS από τα πειραματικά δεδομένα της AnrPphF ORF1 προσεγγίζει τις θεωρητικές καμπύλες των άλλων τάξης I σαπερονών. Στο Β η θεωρητική καμπύλη SAXS της δομής της θρομβίνης (1a2c) συγκρίνεται σαν μέλος εξωτερικής ομάδας (outgroup) με τις καμπύλες των άλλων τάξης I σαπερονών. Η θρομβίνη επιλέχθηκε λόγω του ότι διαθέτει όμοιο μέγεθος με τις σαπερόνες ($R_g = 22 \text{ \AA}$). Στο Γ η ανασυστάμενη καμπύλη της πλήρους μήκους HrpG είναι διαφορετική ακόμη και στις μικρές γωνίες λόγω του διαφορετικού μεγέθους της πρωτεΐνης ($R_g = 33.2 \text{ \AA}$). Στο Δ παρουσιάζουμε την ανασκευασμένη SAXS καμπύλη από τα πειραματικά δεδομένα της HrpG Δ 133-146. Η καμπύλη μοιάζει με τις καμπύλες των τάξης I σαπερονών αλλά δεν εμπίπτει εντός των τιμών της ομάδας στις μεγαλύτερες γωνίες όπως συμβαίνει για την AnrPphF ORF1. Τελικά, στο Ε παρουσιάζεται η ανασκευασμένη SAXS καμπύλη της HrpO από τα πειραματικά δεδομένα. Η HrpO δεν ανήκει σε αυτήν την τάξη των σαπερονών.



Εικόνα 5.9.E

Η καμπύλη σκέδασης από το τετραμερές σωματίδιο της πλήρους μήκους πρωτεΐνης αντιπαραβάλλεται στην εικόνα 5.10 με την πειραματική καμπύλη σκέδασης σε μικρές γωνίες από διάλυμα της πρωτεΐνης BSA. Οι καμπύλες συμπίπτουν στις πολύ μικρές γωνίες [ως $s = 0.1$ ($1/\text{\AA}$)] καθώς τα σωματίδια των δύο πρωτεϊνών είναι περίπου ίδιου μεγέθους (69 kD). Στην στήλη μοριακής διήθησης έχει παρατηρηθεί ότι η HrpG και η πρωτεΐνη-μάρτυρας BSA ειλούνται στον ίδιο όγκο (Εικόνα 5.4). Οι καμπύλες σκέδασης από διάλυμα των δύο πρωτεϊνών συγκρίνονται επίσης και με τις θεωρητικές καμπύλες σκέδασης που προκύπτουν από τα τετραμερή σωματίδια των τάξης I σαπερονών AvrPphF ORF1 και Spa15 όπως αυτά προκύπτουν στην ασύμμετρη μονάδα των αντίστοιχων κρυστάλλων. Παρατηρούμε ότι η καμπύλη σκέδασης της HrpG συμπίπτει με τις θεωρητικές καμπύλες των δύο τετραμερών σωματιδίων μόνο ως $s = 0.15$ ($1/\text{\AA}$). Κατά συνέπεια δεν φαίνεται να παρατηρείται κάποια σημαντική ομοιότητα στα μεταξύ τους σχήματα.



Εικόνα 5.10 Η τελική καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X της πρωτεΐνης HrpG από διάλυμα σε μικρές γωνίες (καμπύλη 2) σε σύγκριση με την πειραματική καμπύλη σκέδασης της BSA (καμπύλη 1) και τις θεωρητικές από τις τάξης I σαπερόνες AvrPphF ORF1 (καμπύλη 4) και Spa15 (καμπύλη 3) όπως υπολογίζονται από τα τετραμερή της ασύμμετρης μονάδας των αντίστοιχων κρυστάλλων.

5.3.7 *Ab initio* καθορισμός του σχήματος της HrpGΔ133-146

Ο καθορισμός του σχήματος της ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης HrpG με βάση την καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X από το μονοδιάσπαρτο διάλυμα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε αρχικά με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN, εδάφιο 2.7.5) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας. Εκτελέστηκαν 15 ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας διαμέτρου 80.5 Å. Η ακτίνα πακεταρίσματος των ψευδών ατόμων ήταν 2.1 Å. Η τιμή της μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας (MNSD) των 15 μοντέλων ήταν 0.658 ± 0.020 , υποδηλώνοντας την σταθερότητα της ανασύστασης (εδάφιο 2.7.7). Ακολούθως δοκιμάστηκαν περιορισμοί της συμμετρίας με παρουσία ενός διπλού άξονα λόγω της διμερικής κατάστασης της HrpGΔ133-146. Συνολικά παρήχθησαν επιπλέον 105 μοντέλα ψευδών ατόμων (πίνακας 5.4) για την αξιολόγηση της ανισομετρίας του σωματιδίου και την τοποθέτηση του διπλού άξονα συμμετρίας ως προς την ανισομετρία του σωματιδίου αλλά και ως προς την μεγαλύτερη διάμετρο του.

Επεξεργασία / D_{\max}	x	Αριθμός Μοντέλων	MNSD	Συμμετρία	Ανισομετρία	Θέση διπλού άξονα συμμετρίας ως προς:	
						τον πολικό άξονα	την μέγιστη διάμετρο
6-05 gnomG-.out 80.5 Å	0.8185	15	0.658±0.020	P1	Άγνωστη	-	-
	0.8188	15	0.717±0.032	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	//
	0.8270	15	0.814±0.044	P222	Άγνωστη	-	222
8-06 gnomG-.out 80.5 Å	0.8273	15	0.718±0.020	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	//
	0.8195	15	0.695±0.026	P2	Ωσειδής	⊥	⊥
	0.8101	15	0.862±0.083	P2	Πολικά συμπιεσμένο	⊥	⊥
	0.8196	15	0.699±0.021	P2	Ωσειδής	//	//
	0.8048	15	0.860±0.103	P2	Πολικά συμπιεσμένο	//	⊥
8-06 gnom.out 83.5 Å	0.8019	15	0.694±0.028	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	//
	0.7964	15	0.813±0.027	P222	Άγνωστη	-	222

Πίνακας 5.4 Συγκριτικός πίνακας των 150 μοντέλων ψευδών ατόμων που παρήχθησαν μέσω προσομοίωσης ανόπτησης είτε χρησιμοποιώντας περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας είτε όχι (πρόγραμμα DAMMIN). Οι μικρές τιμές του x δηλώνουν την μικρή ασυμφωνία που παρουσιάζεται μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μοντέλων. Οι χαμηλές τιμές της μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας (MNSD) υποστηρίζουν επίσης την σταθερή ανακατασκευή των μοντέλων σε όλες τις περιπτώσεις. ⊥ : κάθετος, //: παράλληλος. Ωσειδής (prolate), Πολικά συμπιεσμένο (oblate). Άγνωστη ανισομετρία και θέση του διπλού άξονα ως προς τον πολικό άξονα του σωματιδίου σημαίνει ότι οι δύο αυτές μεταβλητές δεν τέθηκαν ως περιορισμοί στην προσομοίωση ανόπτησης. Η θέση του διπλού άξονα συμμετρίας ως προς την μέγιστη διάμετρο είναι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στα μοντέλα που παράχθηκαν.

Παρατηρούμε ότι όταν δεν καθορίζεται η ανισομετρία του σωματιδίου το πρόγραμμα παράγει μοντέλα πλησιέστερα σε ωσειδές⁵⁵ σωματίδιο παρά σε σωματίδιο πεπλατυσμένο⁵⁶ στους πόλους. Αυτό συνεπάγεται ότι η ελλειμματική μορφή της πρωτεΐνης HrpG διαθέτει τον ένα από τους τρεις άξονες του μορίου της μεγαλύτερο σε μήκος από τους άλλους δύο, οι

⁵⁵ Ως ωσειδές (Prolate) χαρακτηρίζεται το ελλειψοειδές σωματίδιο που έχει τους δύο ισημερινούς άξονες a και b ίσους μεταξύ τους και μικρότερους σε μήκος από τον πολικό άξονα c.

⁵⁶ Ως πεπλατυσμένο στους πόλους (Oblate) χαρακτηρίζεται το ελλειψοειδές σωματίδιο που έχει τους δύο ισημερινούς άξονες a και b ίσους μεταξύ τους και μεγαλύτερους σε μήκος από τον πολικό άξονα c.

οποίοι πιθανών να είναι ίσου ή σχεδόν ίσου μεγέθους. Επίσης κατά την χρήση περιορισμού ανισομετρίας σωματιδίου πεπλατυσμένου στους πόλους οι τιμές της ασυμφωνίας του μοντέλου (x) με την πειραματική καμπύλη ήταν εξίσου μικρές με τις άλλες περιπτώσεις αλλά οι τιμές MNSD έφταναν την τιμή 0.8. Όταν ζητείται επιπρόσθετος περιορισμός συμμετρίας όπως η παρουσία ενός διπλού άξονα συμμετρίας στο σωματίδιο (συμμετρία σημείου P2) χωρίς να καθοριστεί η θέση του διπλού άξονα, τα παραγόμενα μοντέλα έχουν το διπλό άξονα κατά μήκος της μεγαλύτερης διαμέτρου τους. Η τάση αυτή που παρατηρήθηκε στις ανασυστάσεις ψευδών ατόμων δεν διατηρήθηκε και στις ανασυστάσεις ψευδών καταλοίπων, απεναντίας στις ανασυστάσεις ψευδών καταλοίπων ο διπλός άξονας συμμετρίας ήταν πάντοτε κάθετος στην μεγαλύτερη διάμετρο του σωματιδίου (Πίνακας 5.5), και στις δύο περιπτώσεις όμως διατηρήθηκε η τάση παραγωγής ωσειδών μοντέλων.

Δοκιμάστηκε επιπρόσθετα η σημειακή ομάδα 222, αν και το σωματίδιο της ελλειμματικής πρωτεΐνης HrpG Δ 133-146 είναι διμερές. Η προσομοίωση ανόπτησης παρήγαγε και σε αυτή την περίπτωση επίσης ωσειδή μοντέλα αλλά οι τιμές MNSD έφταναν την τιμή 0.8.

Επεξεργασία /D _{max}	x	Αριθμός Μοντέλων	Συμμετρία	Ανισομετρία	Θέση διπλού άξονα συμμετρίας ως προς:	
					τον πολικό άξονα	την μέγιστη διάμετρο
8-06 gnomG-.out 80.5 Å	0.7342, 0.8650, 0.8103	3	P2	Πολικά συμπίεσμένο	//	⊥
	0.8382, 0.7739, 0.7774	3	P2	Πολικά συμπίεσμένο	⊥	⊥
	0.7974	1	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥
1-06 gnomG-.out 80.5 Å	0.9070, 0.8066, 0.9167	3	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥
7-05 gnomG-.out	0.9306, 0.9304	2	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥
	0.8842, 0.8932	2	P2	Ωσειδής	⊥	⊥
	0.7878	1	P2	Ωσειδής	//	//
1-05 gnomG-.out 80.5	0.8935, 0.7854, 0.7502	3	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥

Πίνακας 5.5 Συγκεντρωτικός πίνακας των 18 μοντέλων ψευδών καταλοίπων που παρήχθησαν μέσω προσομοίωσης ανόπτησης χρησιμοποιώντας περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας (πρόγραμμα GASBOR). Οι μικρές τιμές του x δηλώνουν την μικρή ασυμφωνία που παρουσιάζεται μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μοντέλων. ⊥ : κάθετος, //: παράλληλος. Ωσειδής (prolate), Πολικά συμπίεσμένο (oblate). Άγνωστη ανισομετρία και θέση του διπλού άξονα ως προς τον πολικό άξονα του σωματιδίου σημαίνει ότι οι δύο αυτές μεταβλητές δεν τέθηκαν ως περιορισμοί στην προσομοίωση ανόπτησης. Η θέση του διπλού άξονα συμμετρίας ως προς την μέγιστη διάμετρο είναι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στα μοντέλα που παράχθηκαν.

Στην εικόνα 5.9 παρουσιάζονται δύο μοντέλα ψευδών καταλοίπων με σημειακή συμμετρία P2. Το πρώτο θεωρείται ωσειδές και το δεύτερο πεπλατυσμένο στους πόλους. Τα μοντέλα παρουσιάζονται έτσι ώστε ο διπλός άξονας συμμετρίας τους να είναι ευθυγραμμισμένος σε όλες τις απόψεις παρατήρησης.

Το μοντέλο 'C2' ψευδών καταλοίπων της HrpG Δ 133-146 που παρουσιάζεται για την περίπτωση σωματιδίων πεπλατυσμένων στους πόλους (Εικόνα 5.11) είναι εκείνο που οι υπολογιζόμενες παράμετροι του (υδροδυναμική και γυροσκοπική ακτίνα, μέγιστη διάσταση και όγκος) είναι πλησιέστερες στις πειραματικές τιμές (μοντέλο C2, Πίνακας 5.6). Οι υδροδυναμικές παράμετροι του μοντέλου που προέκυψε για ωσειδές σωματίδιο παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 5.6 (Μοντέλο 'gas3'). Το μοντέλο αυτό κατά την δοκιμή του στην κατασκευή του τετραμερούς μοντέλου για την πλήρους μήκους πρωτεΐνη έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με το μοντέλο 'C2'. Πλήρωσε ορθότερα τον χώρο όταν δόθηκε σαν είσοδος στο πρόγραμμα CREDO μαζί με την πειραματική καμπύλη της πλήρους μήκους πρωτεΐνης. Στο πρόγραμμα CREDO ζητήθηκε να επιτευχθεί η πλήρωση του υπόλοιπου χώρου για την εύρεση του δεύτερου διμερούς. Η κατανομή των επιπρόσθετων

αυτών ψευδών καταλοίπων (Εικόνα 5.13, μπλε τμήμα) προσέγγιζε περισσότερο, κατέχοντας κατάλληλο σχήμα και όγκο, τα πειραματικά δεδομένα της HrpG Δ 133-146. (Πίνακας 5.10, Μπλε μοντέλο).

	Ωσειδές	Πεπλατισμένο στους πόλους	
<p>Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου είναι παράλληλη με τον πολικό άξονα c.</p>			<p>Η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου είναι κάθετη στον πολικό άξονα c.</p>

Εικόνα 5.11 Τα μοντέλα ψευδών καταλοίπων gas3 και C2 (Πίνακας 5.1) με διπλό άξονα συμμετρίας κατά μήκος του άξονα b και κάθετα στον πολικό άξονα c του σωματιδίου. Κάθε μοντέλο διαθέτει 134 αμινοξέα στο ασύμμετρο μέρος, $x=0.89$ και 0.77 αντίστοιχα. Ο διπλός άξονας συμμετρίας (b) είναι ευθυγραμμισμένος σε όλες τις απόψεις παρατήρησης μεταξύ των μοντέλων ενώ οι άξονες είναι ορισμένοι ως προς την μέγιστη διάμετρο των ωσειδών και πεπλατισμένων στους πόλους ελλειψοειδών. Στα μοντέλα εμφανίζονται οι εικονικές συνδέσεις μεταξύ των ψευδών καταλοίπων. Η απεικόνιση έγινε μέσω του προγράμματος γραφικών PyMOL (DeLano Sc.)

Πίνακας 5.6 Υδροδυναμικές Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα καθώς και υπολογιζόμενα από τα μοντέλα των DAMMIN και GASBOR για την HrpG Δ 133-146.

Παράμετροι	Πειραματικές τιμές	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο P1)	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο P2)	GASBOR (C1: Oblate P2 across c)	GASBOR (C2: Oblate P2 across c)	GASBOR (C3: Oblate P2 across c)	GASBOR (gas3: Prolate P2 across c)
R_g (Å) *	22.6						
R_g (Å) #	23.7	22.5	21.8	21.8	22.3	21.6	22.2
R_h (Å)	27.4	27.3	26.0	24.9	25.5	25.5	25.4
D_{max} (Å) #	80.5	83.8	83.2	73.7	76.2	74.7	78.53
V (Å ³)	67539	59700	47070	28030	29750	27410	23160

*Η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.

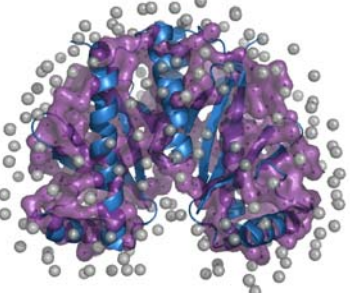
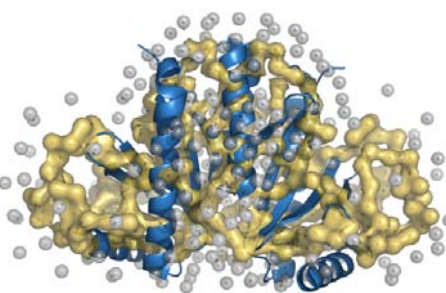
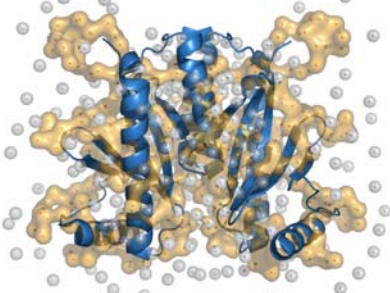
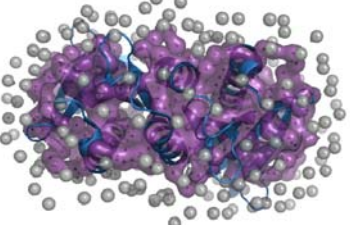
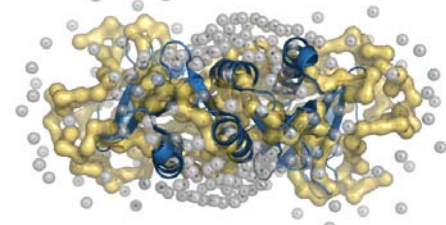
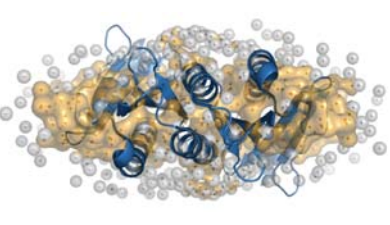
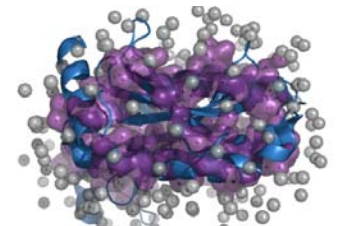
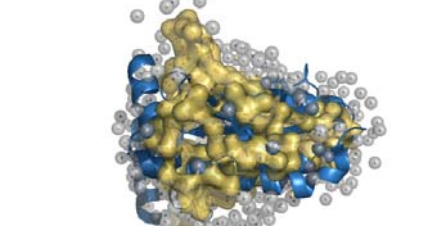
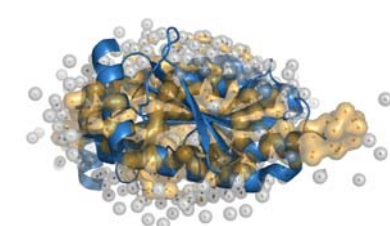
Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $\rho(r)$ μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier.

R_h είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διάθλιξης.

Οι τιμές των R_g , R_h , D_{max} και V από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).

5.3.8 Σύγκριση των *ab initio* ανασυστάσεων της πρωτεΐνης HrpG Δ 133-146 με την κρυσταλλογραφική δομή της τάξης I σαπερόνης SicP.

Το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της ομοδιμερούς τάξης I σαπερόνης SicP (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo) του εκκριτικού συστήματος τύπου III επιλέχθηκε να παρουσιαστεί σε σύγκριση με τα μοντέλα που παρήχθησαν από τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα για την ελλειμματική μορφή της πρωτεΐνης HrpG. Η επιλογή αυτή στηρίζεται στην διαδικασία αναγνώρισης αναδίπλωσης για την υπό μελέτη πρωτεΐνη (εδάφιο 5.3.1) κατά την οποία η σαπερόνη SicP παρουσίασε τα υψηλότερα επίπεδα εμπιστοσύνης και κρίθηκε η καταλληλότερη μήτρα αναδίπλωσης από τις μέχρι τώρα γνωστές δομές στην βάση δεδομένων. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την περίπτωση της τάξης I σαπερόνης AvrPphF ORF1. Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν από την μελέτη της πρωτεΐνης μέσω σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες (εδάφιο 4.3.3) χρησιμοποιήθηκαν για τον *ab initio* υπολογισμό μοντέλων της τυπικής αυτής τάξης I σαπερόνης και εν συνεχεία συγκρίθηκαν επίσης με την κρυσταλλογραφική δομή της SicP. Ας σημειωθεί εδώ ότι η θεωρητική καμπύλη σκέδασης της SicP είναι αυτή που ταιριάζει καλύτερα στην πειραματική καμπύλη σκέδασης της AvrPphF ORF1 ακόμα και σε σύγκριση με την θεωρητική από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της ίδιας πρωτεΐνης (εικόνα 5.9 Α).

Μοντέλο χαμηλής διακριτικότητας της AvrPphF ORF1	Ωσοειδές μοντέλο χαμηλής διακριτικότητας «gas3» της HrpG Δ 133-146	Πεπλατυσμένο στους πόλους μοντέλο χαμηλής διακριτικότητας «C2» της HrpG Δ 133-146
		
		
		

Εικόνα 5.12 Τα μοντέλα ψευδών καταλοίπων των πρωτεϊνών AvrPphF ORF1 (μωβ) και HrpG Δ 133-146 (κίτρινα, «gas3» και «C2» όπως έχουν ήδη παρουσιαστεί στην εικόνα 5.11 με διπλό άξονα συμμετρίας κατά μήκος του άξονα b και κάθετα στον πολικό άξονα c του σωματιδίου. Ο διπλός άξονας συμμετρίας (b) είναι ευθυγραμμισμένος σε όλες τις απόψεις παρατήρησης μεταξύ των μοντέλων. Οι απόψεις παρατήρησης όπως παρουσιάζονται και στην εικόνα 5.11. Τα μοντέλα ψευδών καταλοίπων αντιπαραβάλλονται με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο της τάξης I σαπερόνης SicP (PDB 1jyo), μπλε κορδέλα, για σύγκριση. Κάθε κίτρινη ή μωβ σφαίρα αναπαριστά ένα ψευδές κατάλοιπο (εδώ σε παρουσίαση επιφανείας). Με μικρότερου μεγέθους λευκές σφαίρες παρουσιάζονται τα ψευδή μόρια νερού. Το SUPCOMB χρησιμοποιήθηκε για την υπέρθεση της κρυσταλλογραφικής δομής με τα μοντέλα σκέδασης από διάλυμα. Η απεικόνιση έγινε μέσω του προγράμματος γραφικών PyMOL (DeLano Sc.)

Η HrpG Δ 133-146 παρουσιάζει μεγαλύτερη διάμετρο του σωματιδίου της όπως φαίνεται από τα μοντέλα ψευδών ατόμων σε σύγκριση με την κρυσταλλογραφική δομή της τάξης I σαπερόνης SicP αλλά και σε σύγκριση με τον *ab initio* καθορισμό του σχήματος του σωματιδίου της τυπικής τάξης I σαπερόνης AnrPphF ORF1. Η διαφορά αυτή είναι επίσης διακριτή μεταξύ των τιμών της μεγαλύτερης διαμέτρου του σωματιδίου (D_{max}) όπως εκτιμάται από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier σε σύγκριση με τις τιμές των τυπικών τάξης I σαπερόνων όπως αυτές προκύπτουν από την ατομική δομή τους ή την πειραματική τιμή για τα δεδομένα της AnrPphF ORF1 (Εδάφιο 4.3.4, Πίνακας 4.4).

5.3.9 *Ab initio* καθορισμός του σχήματος της HrpG.

Ο καθορισμός του σχήματος της πρωτεΐνης HrpG με βάση την καμπύλη σκέδασης ακτίνων-X από το μονοδιάσπαρτο διάλυμα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε αρχικά με την μέθοδο των ψευδών ατόμων μέσω προσομοίωσης ανόπτησης (πρόγραμμα DAMMIN, εδάφιο 2.7.5) χωρίς περιορισμούς συμμετρίας (P1) και ανισομετρίας. Εκτελέστηκαν 15 ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας διαμέτρου 110 Å. Τα 15 μοντέλα παρουσίασαν 0.743 ± 0.137 τιμή μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας όταν ελέγχθηκαν ανά ζεύγη. Καθώς η πλήρους μήκους πρωτεΐνη βρίσκεται ως τετραμερές σωματίδιο στο διάλυμα ελέγχθηκαν οι υψηλότερες σημειακές συμμετρίες P222⁵⁷ και P4 μέσω προσομοίωσης ανόπτησης. Το πρόγραμμα δεν κατάφερε να συμπληρώσει τον αριθμό των 15 μοντέλων σε αυτές τις περιπτώσεις ενώ οι τιμές MNSD βρέθηκαν αρκετά υψηλότερες (Πίνακας 5.7) γεγονός που υποδηλώνει την αστάθεια των ανασυστάσεων. Κατά συνέπεια το τετραμερές σωματίδιο της πρωτεΐνης HrpG δεν φαίνεται να φέρει συμμετρία που να περιγράφει και τις τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες στο χώρο.

Ελέγχθηκε επίσης η σημειακή συμμετρία P2. Αν και οι τιμές της ασυμφωνίας με την πειραματική καμπύλη ήταν στα ίδια επίπεδα με την περίπτωση ασυμμετρίας (P1), εντούτοις η τιμή MNSD αυξήθηκε στα 0.862.

Πίνακας 5.7

Επεξεργασία / D_{max}	x	Αριθμός Μοντέλων	MNSD	Συμμετρία	Ανισομετρία	Θέση άξονα συμμετρίας ως προς:	
						τον πολικό άξονα	την μέγιστη διάμετρο
6-05 gnom.out 110 Å	1.285	15	0.743±0.137	P1	Άγνωστη	-	-
	1.288	15	0.862±0.035	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥
	1.294	4	1.048± 0.215	P222	Άγνωστη	-	222
	1.291	5	0.999± 0.164	P4	Άγνωστη	Άγνωστη	//
gnomG.out 115 Å	1.521	15	0.776±0.020	P1	Άγνωστη	-	-

Πίνακας 5.7 Συγκεντρωτικός πίνακας των 54 μοντέλων ψευδών ατόμων που παρήχθησαν μέσω προσομοίωσης ανόπτησης είτε χρησιμοποιώντας περιορισμούς συμμετρίας είτε όχι (πρόγραμμα DAMMIN). Οι τιμές του x δηλώνουν την ασυμφωνία που παρουσιάζεται μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μοντέλων. Οι χαμηλές τιμές της μέσης κανονικοποιημένης χωρικής ασυμφωνίας (MNSD) υποστηρίζουν επίσης την σταθερή ανακατασκευή των μοντέλων στην περίπτωση που η ανασύσταση δεν υπόκειται σε περιορισμούς συμμετρίας. ⊥ : κάθετος, //: παράλληλος. Άγνωστη ανισομετρία και θέση του διπλού ή τετραπλού άξονα ως προς τον πολικό άξονα του σωματιδίου σημαίνει ότι οι δύο αυτές μεταβλητές δεν τέθηκαν ως περιορισμοί στην προσομοίωση ανόπτησης. Η θέση του διπλού και του τετραπλού άξονα συμμετρίας ως προς την μέγιστη διάμετρο είναι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στα μοντέλα που παράχθηκαν.

Ανασυστάσεις ψευδών καταλοίπων έλαβαν χώρα επίσης και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.8

⁵⁷ Ονοματολογία σημειακών ομάδων σύμφωνα με Hermann-Mauguin. Η σημειακή ομάδα P2 φέρει ένα διπλό άξονα συμμετρίας ταυτίζοντας δύο σημεία μεταξύ τους, η σημειακή ομάδα P4 φέρει έναν τετραπλό άξονα συμμετρίας ταυτίζοντας 4 σημεία και η P222 τρεις διπλούς άξονες συμμετρίας κάθετους μεταξύ τους. Η αντίστοιχη ονοματολογία κατά Schöflies είναι C₂, C₄ και D₂.

Πίνακας 5.8					Θέση διπλού άξονα συμμετρίας ως προς:	
Επεξεργασία /D _{max}	x	Αριθμός Μοντέλων	Συμμετρία	Ανισομετρία	τον πολικό άξονα	την μέγιστη διάμετρο
gnom.out 110 Å	1.366	1	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	
	1.523, 1.427, 1.564	3	P22	Άγνωστη	Άγνωστη	222
gnomG.out 115 Å	1.671, 1.664, 1.586, 1.591, 1.657	5	P1	Άγνωστη	-	-
	1.578, 1.608	2	P2	Άγνωστη	Άγνωστη	⊥
	1.697	1	P2	Ωοειδές	Άγνωστη	⊥
	1.711	1	P2	Πολικά πεπλατυσμένο	Άγνωστη	//

Πίνακας 5.8 Συγκεντρωτικός πίνακας των 13 μοντέλων ψευδών καταλοίπων που παρήχθησαν μέσω προσομοίωσης απόπτωσης είτε χρησιμοποιώντας περιορισμούς συμμετρίας και ανισομετρίας (πρόγραμμα GASBOR) είτε όχι. Οι τιμές του x δηλώνουν την ασυμφωνία που παρουσιάζεται μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μοντέλων. ⊥ : κάθετος, //: παράλληλος. Ωοειδής (prolate), Πολικά πεπλατυσμένο (oblate). Άγνωστη ανισομετρία και θέση του διπλού άξονα ως προς τον πολικό άξονα του σωματιδίου σημαίνει ότι οι δύο αυτές μεταβλητές δεν τέθηκαν ως περιορισμοί στην προσομοίωση απόπτωσης. Η θέση του διπλού άξονα συμμετρίας ως προς την μέγιστη διάμετρο είναι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε στα μοντέλα που παράχθηκαν.

Ως επιπλέον περιορισμός για τον *ab initio* καθορισμό του σχήματος του τετραμερούς της HrpG χρησιμοποιήθηκε το διμερές της ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης όπως καθορίστηκε από τα αντίστοιχα πειράματα σιέδασης σε μικρές γωνίες (εδάφιο 5.3.7). Τα μοντέλα "gas3" και "C2" (Εικόνα 5.11) χρησιμοποιήθηκαν για να πληρώσουν τον χώρο που καταλαμβάνει το σωματίδιο της πλήρους μήκους πρωτεΐνης και μέσω προσομοίωσης απόπτωσης να υπολογιστεί ο εναπομείνων χώρος που αντιστοιχεί στο δεύτερο διμερές και στα καρβοξυτελικά αμονοξέα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης.

Επεξεργασία /D _{max}	Μοντέλο HrpG_1133-146	Συμμετρία	Συνολικά ψευδή κατάλοιπα	x
gnomG.out 115 Å	Ωοειδές	P1	592	1.692
	Ωοειδές (gas3)	P1	592	1.792
	(C2)	P1	588	3.549
		P1	588	3.756
		P1	588	3.493
		P1	588	4.301
		P1	588	3.445
		P1	588	3.449

Πίνακας 5.9 Συγκεντρωτικός πίνακας των 8 μοντέλων ψευδών καταλοίπων που παρήχθησαν μέσω προσομοίωσης απόπτωσης (πρόγραμμα CREDO) χρησιμοποιώντας ως περιορισμό τις *ab initio* ανασυστάσεις της ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης. Οι τιμές του x δηλώνουν την ασυμφωνία που παρουσιάζεται μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των μοντέλων. Ωοειδής (prolate), Πεπλατυσμένο στους πόλους (oblate). Τα συνολικά ψευδή κατάλοιπα αντιστοιχούν στα ψευδή κατάλοιπα του μοντέλου της HrpG_1133-146 που χρησιμοποιήθηκε συν την προσθήκη 320 [(2 x 134) + (4 x 14)] ακόμα ψευδών καταλοίπων για την εύρεση του δεύτερου διμερούς, [(2 x 134 κατάλοιπα) συνυπολογίζοντας τα 4 x 14 κατάλοιπα που ελλείπουν από το μετάλλαγμα έλλειψης].

Οι τιμές ασυμφωνίας με τα πειραματικά δεδομένα παραμένουν χαμηλές στην περίπτωση χρήσης ωοειδών σωματιδίων (πίνακας 5.9) ενώ ανεβαίνουν στην περίπτωση χρήσης μοντέλων πεπλατυσμένων στους πόλους.

Το μοντέλο 'gas3' πλήρωσε ικανοποιητικά το μισό όγκο του τετραμερούς και άφησε χώρο ώστε να προβλεφθούν τα επιπρόσθετα 320 ψευδή κατάλοιπα (Εικόνα 5.13). Ο επιπλέον χώρος που υπολογίστηκε προσεγγίζει το σχήμα του σωματιδίου 'gas3' και την πειραματική καμπύλη της ελλειμματικής πρωτεΐνης κατά συνέπεια ορθότερα από την περίπτωση του επιπλέον μοντέλου στην περίπτωση χρήσης του μοντέλου 'C2'.

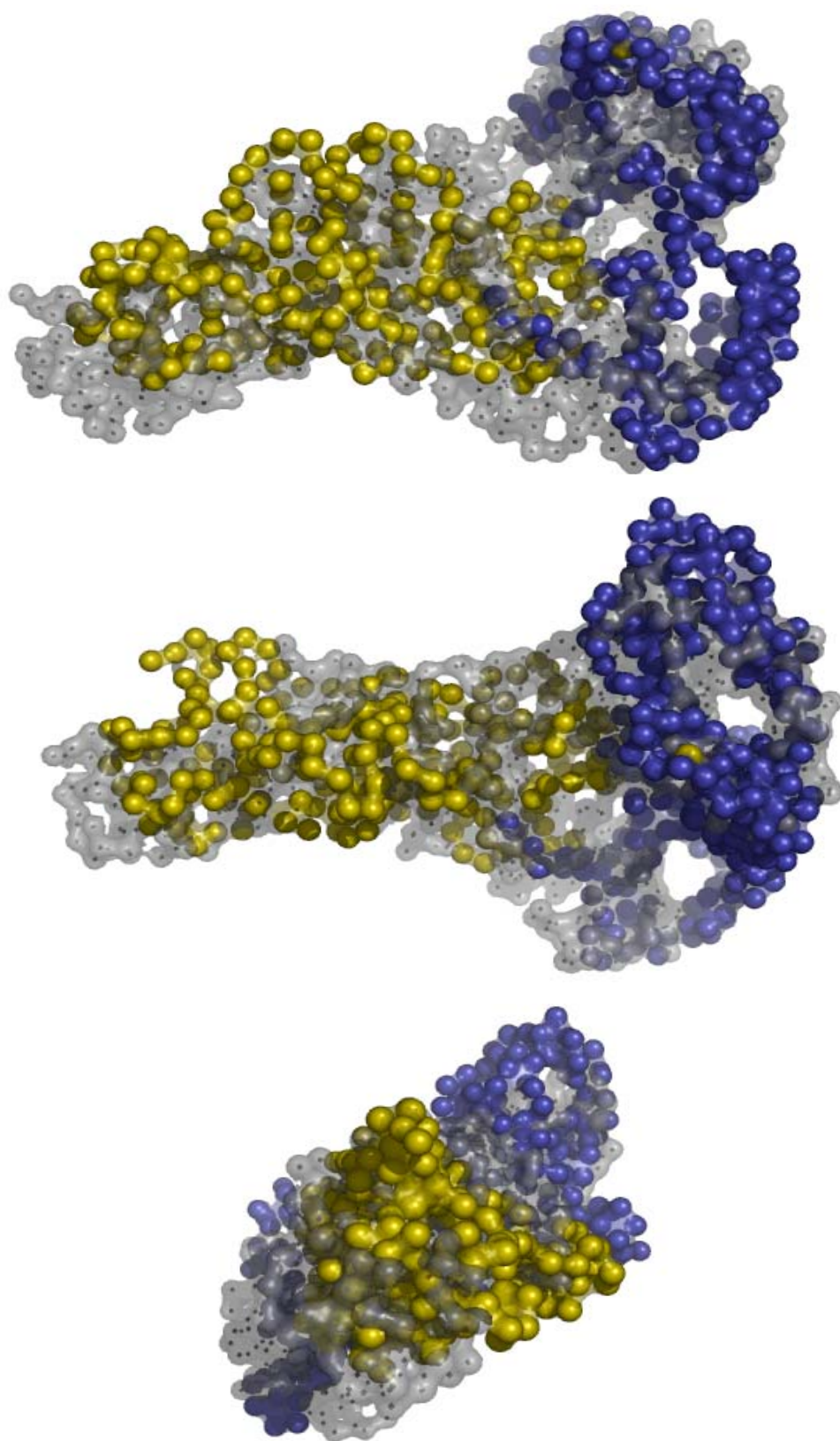
Τα μοντέλα που παρήχθησαν με την μέθοδο προσομοίωσης ανόπτωσης μέσω των προγραμμάτων DAMMIN, GASBOR και CREDO εξετάστηκαν με το πρόγραμμα HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) για να εκτιμηθούν από αυτά οι τιμές της υδροσκοπικής και γυροσκοπικής τους ακτίνας, ο όγκος που καταλαμβάνουν και η μέγιστη διάμετρος τους (εδάφιο 2.4). Στον πίνακα 5.10 παρατίθενται συνολικά οι υπολογιζόμενοι παράμετροι από όλα τα μοντέλα που παρουσιάζονται για σύγκριση με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές.

Πίνακας 5.10 Υδροδυναμικές Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα καθώς και υπολογιζόμενα από τα μοντέλα των DAMMIN GASBOR, CREDO για την HrpG και το μετάλλαγμα έλλειψης.

Παράμετροι	Πειραματικές τιμές (HrpGΔ133-146)	GASBOR (gas3: Ωοειδές P2 κάθετα στον c)	CREDO (Μπλε μοντέλο)	Πειραματικές τιμές (HrpG)	GASBOR (P1, Γκρι μοντέλο)	CREDO (gas3 + Μπλε Μοντέλο)	DAMMIN (P1)
R_g (Å) *	22.6			31.7			
R_g (Å) #	23.7	22.2	24.4	33.9	29.9	33.7	31.1
R_h (Å)	27.4	25.4	26.8	35.5	35.5	34.9	33.3
D_{max} (Å) #	80.5	78.53	84.5	115	114.4	105.7	117.8
V (Å ³)	67539	23160	25500	139760	39140	39270	55560

*Η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.
 # Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $\rho(r)$ μέσω του προγράμματος GNOM
 R_h (Stoke's Radius) είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διάθλισης.
 Οι τιμές των R_g , R_h , D_{max} και V (όγκος πλήρωσεως χώρου) από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).
 Στον πειραματικό όγκο καταγράφεται ο ένυδρος όγκος του σωματιδίου ή όγκος Porod.

Εικόνα 5.13 (επόμενη σελίδα). Δύο μοντέλα σκέδασης από διάλυμα της πλήρους μήκους HrpG, αντιπαραβαλλόμενα, σε τρεις κάθετες μεταξύ τους απόψεις. Τα μοντέλα παρήχθησαν με την μέθοδο των ψευδών καταλοίπων μέσω προσομοίωση ανόπτωσης. Το διαφανές γκριζο μοντέλο παρήχθησε από το πρόγραμμα GASBOR χωρίς περιορισμούς συμμετρίας και με τις προεπιλεγμένες τιμές του προγράμματος, αναζητώντας 584 ψευδή κατάλοιπα (το τετραμερές της HrpG) σε σφαιρικό χώρο έρευνας διαμέτρου ίσης της μεγίστης διαμέτρου του σωματιδίου, όπως εκτιμάται η μέγιστη διάμετρος μέσω του έμμεσου μετασχηματισμού Fourier. Η ασυμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα ήταν $x = 1.3$. Το μπλε/κίτρινο μοντέλο παρήχθησε σε δύο βήματα. Αρχικά το κίτρινο μέρος παρήχθησε από το πρόγραμμα GASBOR για τα δεδομένα σκέδασης της ελλειμματικής πρωτεΐνης HrpGΔ133-146, όπως παρουσιάζεται επίσης στην εικόνα 5.10. Ακολούθως αυτό το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε στην είσοδο του προγράμματος CREDO μαζί με την πειραματική καμπύλη σκέδασης από διάλυμα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης HrpG. Ο αλγόριθμος του προγράμματος CREDO (Εδάφιο 2.7.8, σελ.63) τοποθετεί στο χώρο το εναπομένον τμήμα του τετραμερούς ψάχνοντας για τις θέσεις 320 επιπλέον ψευδών καταλοίπων. Τα 320 ψευδή κατάλοιπα αντιπροσωπεύουν το δεύτερο διμερές της HrpGΔ133-146 και τα καρβοξυτελικά αμινοξέα που έχουν απαλειφθεί στο μετάλλαγμα. Αυτό το μοντέλο παρουσιάζει ασυμφωνία $x = 1.7$ με την πειραματική καμπύλη. Το πρόγραμμα SUPCOMP13 χρησιμοποιήθηκε για την υπέρθεση των δύο μοντέλων και υπολογίστηκε η μέση κανονικοποιημένη χωρική ασυμφωνία με τιμή MNSD = 1.3. Η μεσαία εικόνα έχει περιστραφεί σε σχέση με την πρώτη κατά 90° αντίθετα στη φορά των δεικτών του ρολογιού κατά τον οριζόντιο άξονα. Η τελευταία εικόνα έχει περιστραφεί σε σχέση με την μεσαία 90° κατά την φορά των δεικτών του ρολογιού γύρω από τον κάθετο άξονα. Το πρόγραμμα PyMOL χρησιμοποιήθηκε για την γραφική αναπαράσταση. Ψευδή μόρια νερού έχουν συμπεριληφθεί στους υπολογισμούς και των δύο μοντέλων από τα προγράμματα GASBOR και CREDO, αλλά δεν παρουσιάζονται εδώ για λόγους ευκρίνειας.



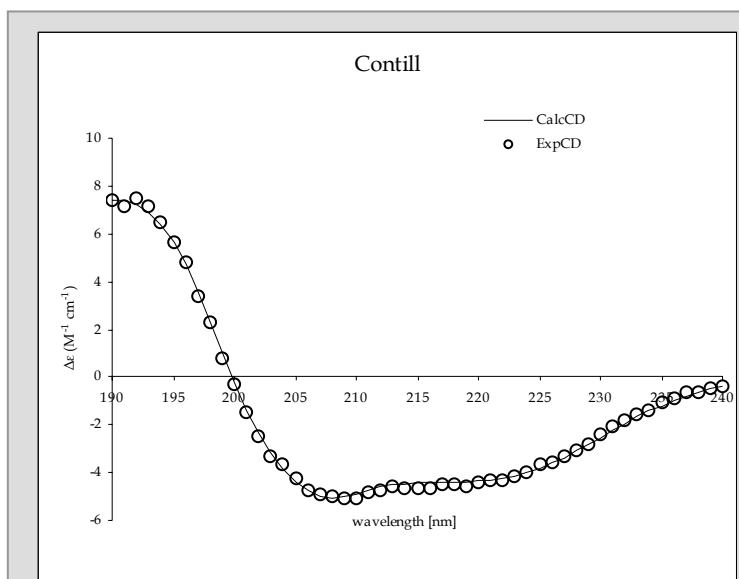
Εικόνα 5.13

5.3.10 Εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής της HrpGΔ133-146

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο των υλικών και μεθόδων του παρόντος κεφαλαίου. Τα φάσματα της HrpGΔ133-146

παρουσιάζουν τα τυπικά ελάχιστα που απαντώνται σε περιπτώσεις δομών που φέρουν α -έλικες, στα 207 και 222 nm. Τα ποσοστά της δευτεροταγούς δομής εκτιμήθηκαν με τα προγράμματα SELCON3, CDSSTR και CONTILL μέσω του CDPRO. Η HrpGΔ133-146 εκτιμάται ότι διαθέτει 38 - 41 % α -έλικα, 13 - 16 % β -πτυχές, 15 - 19.5 % στροφή και 28 - 29 % τυχαίο σπείραμα. Για την ανάλυση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής της HrpGΔ133-146

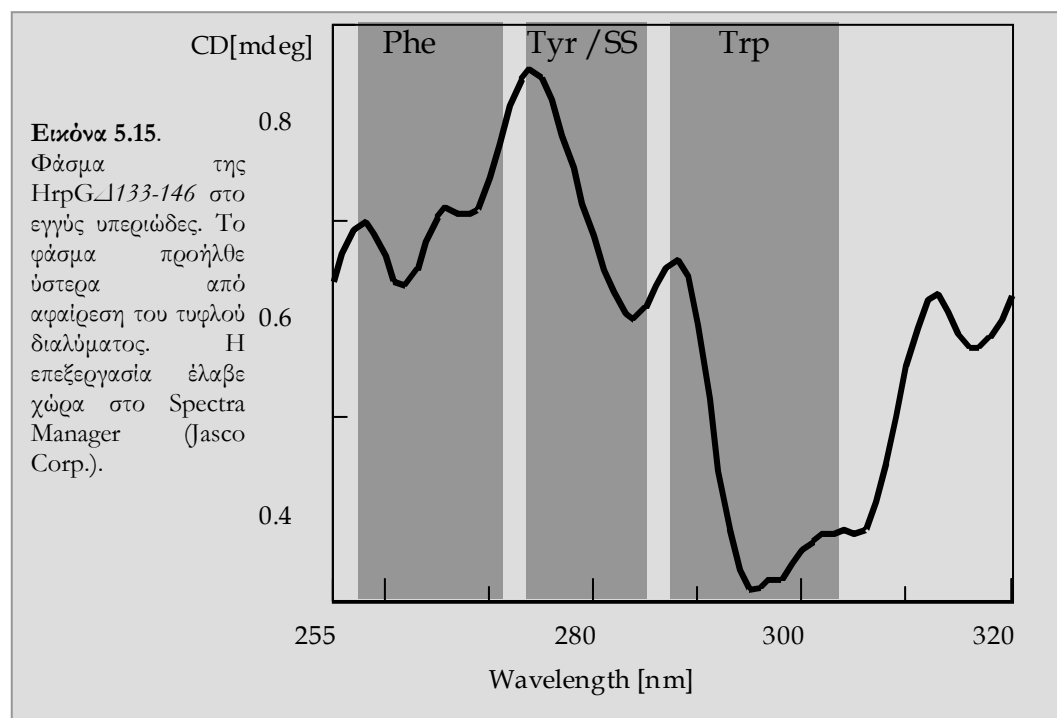
χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο σύνολο αναφοράς 43 διαλυτών πρωτεϊνών SP43 (Sreerama & Woody, 2004) το οποίο διατίθεται από το CDPRO. Το χρησιμοποιούμενο εύρος του μήκους κύματος ήταν από 190 ως τα 240 nm. Στην εικόνα 5.12 παρουσιάζεται το ανασυστάμενο φάσμα όπως υπολογίστηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση από το CONTILL (RMSD = 0.126).



Εικόνα 5.14. Τυπικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της HrpGΔ133-146 στο άπω υπεριώδες. Με κύκλο καταγράφονται οι πειραματικές μετρήσεις. Το υπολογισμένο φάσμα όπως παρήχθη από το πρόγραμμα CONTILL για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται οι τιμές $\Delta\epsilon$ ($M^{-1} cm^{-1}$). Οι τιμές κατά την συλλογή καταγράφηκαν ανά 1 nm ενώ η ταχύτητα σάρωσης ήταν 50nm/min και η απόκριση του ανιχνευτή κάθε 0.5 δευτερόλεπτο.

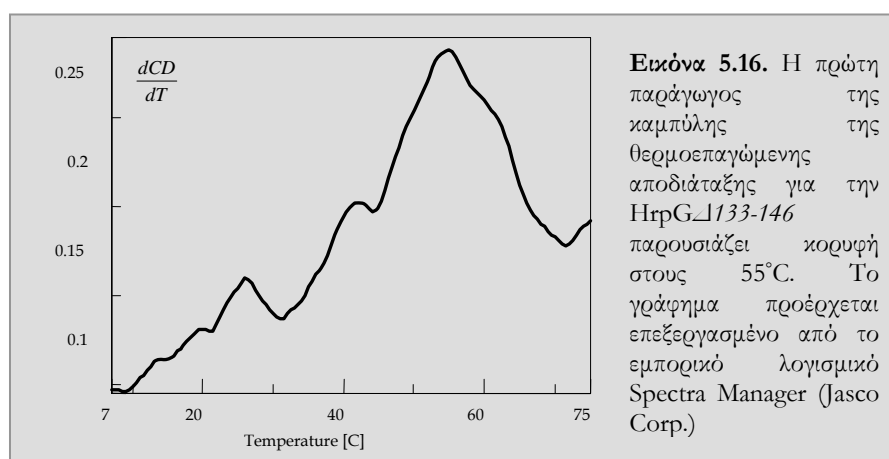
5.3.11 Φάσματα κυκλικού Διχρωισμού στο Εγγύς Υπεριώδες

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο των υλικών και μεθόδων του παρόντος κεφαλαίου. Η HrpGΔ133-146 διαθέτει μία τυροσίνη (Y53), τρεις τρυπτοφάνες (W16, W28 και W94) και τρεις φαινυλαλανίνες (F6, F9 και F80). Έντονο σήμα κυκλικού διχρωισμού παρατηρήθηκε στο εγγύς υπεριώδες και παρουσιάζεται στο φάσμα της εικόνας 5.13. Η τρυπτοφάνη δίνει κορυφή κοντά στα 290 nm, η τυροσίνη δίνει κορυφή κοντά στα 275 nm, ενώ η φαινυλαλανίνη δίνει πιο ασθενές αλλά καθαρές ζώνες μεταξύ των 255 και 270 nm. Λόγω του ότι η HrpGΔ133-146 διαθέτει μία τυροσίνη (Y53) θα μπορούσαμε να προτείνουμε ίσως από το φάσμα στο εγγύς υπεριώδες ότι αυτή διαθέτει σταθερό περιβάλλον και δεν είναι ευκίνητη. Παρόλα αυτά, φάσματα στο εγγύς υπεριώδες δεν καταγράφηκαν για ανηγμένη πρωτεΐνη με συνέπεια να μην μπορέσουμε να αποδώσουμε με υψηλή εμπιστοσύνη το σήμα του κυκλικού διχρωισμού στην μοναδική τυροσίνη του μορίου. Η HrpGΔ133-146 λόγω των 7 κυστεϊνών που διαθέτει φαίνεται να σχηματίζει πληθυσμούς μεγαλύτερους του διμερούς σε οξειδωτικές συνθήκες όπως έχει φανεί με πειράματα μοριακής διήθησης (εδάφιο 5.3.3) και συνεπώς δεν μπορούμε να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα για την Y53.



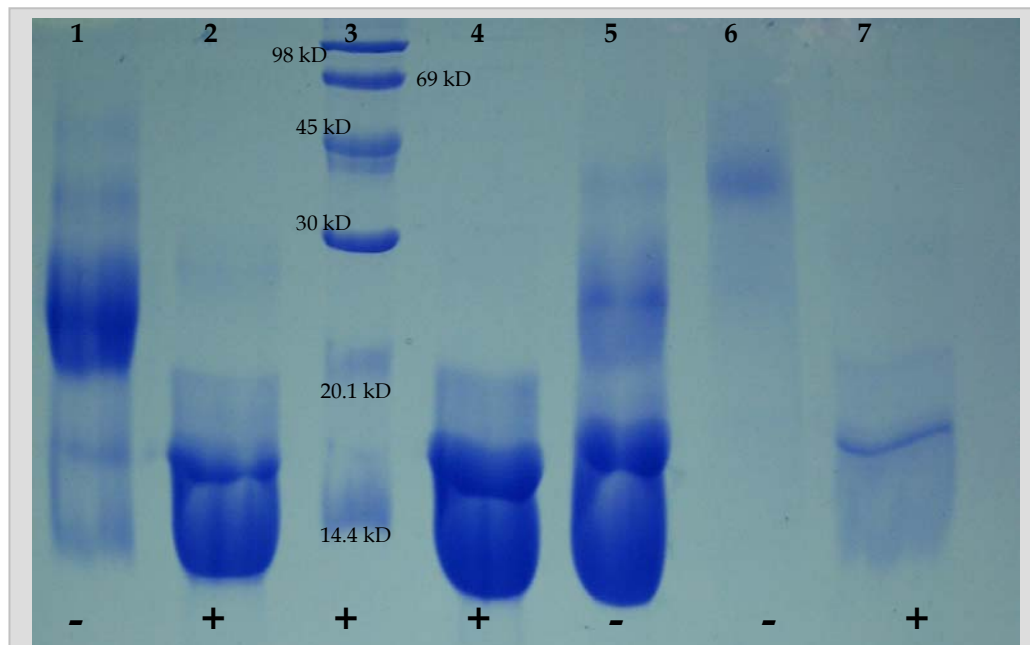
5.3.12 Θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpG Δ 133-146

Η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpG Δ 133-146 καταγράφηκε μέσω του σήματος του κυκλικού διχρωισμού σε μήκος κύματος 222 nm για το εύρος θερμοκρασιών 7 – 75°C. Η ταχύτητα μεταβολής της θερμοκρασίας ήταν 75°C/h. Η πρώτη παράγωγος της καμπύλης ως προς την θερμοκρασία, για τον έλεγχο του ρυθμού μεταβολής του σήματος του κυκλικού διχρωισμού, παρουσιάζεται στην εικόνα 5.14. Παρατηρούμε την κύρια κορυφή σε θερμοκρασία 55°C. Η θερμοκρασία μετάπτωσης της AvrPphF ORF1 (δεδομένα δεν παρουσιάζονται) είχε βρεθεί πλησίον των 80°C. Η HrpG Δ 133-146 φαίνεται να διαθέτει αρκετά χαμηλότερη θερμοκρασία μετάπτωσης.



5.3.13 Προσπάθειες αποτροπής σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεΐνη HrpG Δ 133-146

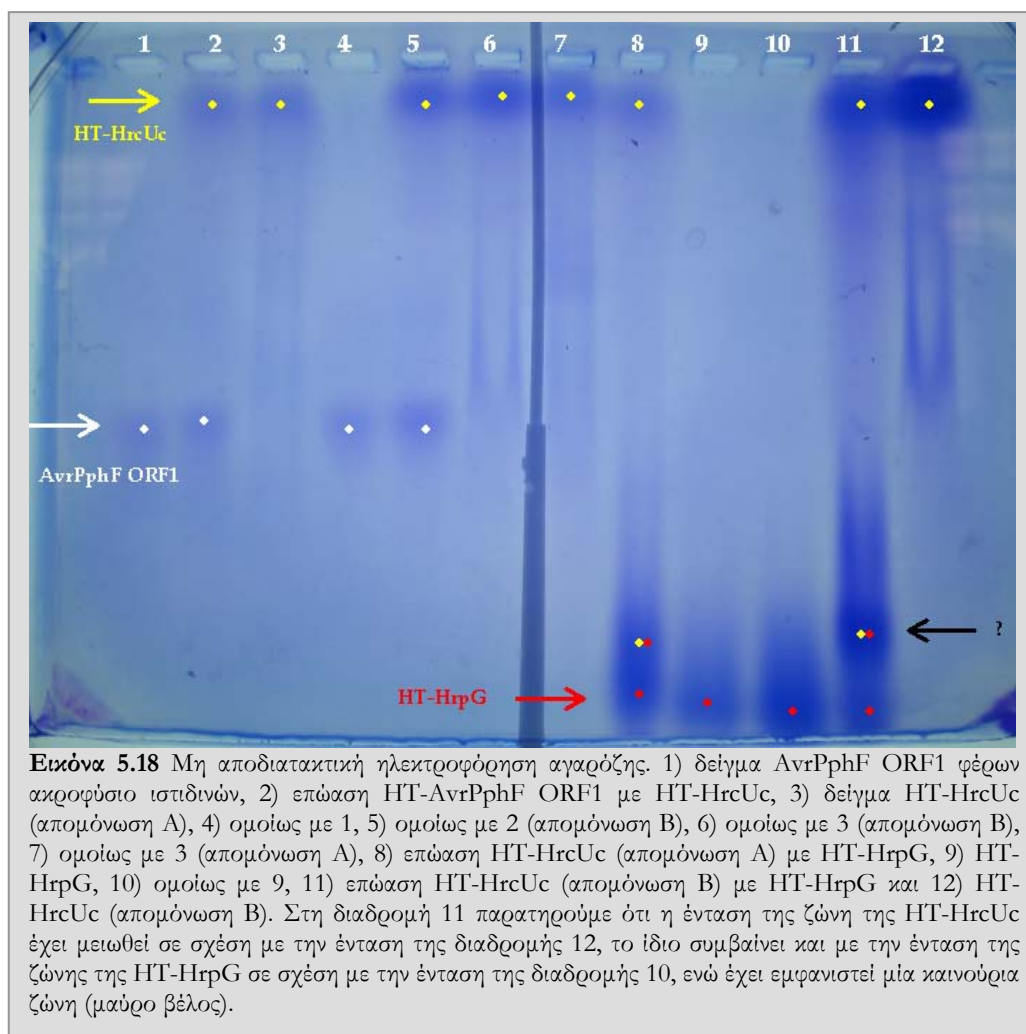
Επλώσεις της HrpG Δ 133-146 έλαβαν χώρα με ιωδοοξικό νάτριο (εδάφιο 5.2.7). Στην εικόνα 5.17 παρουσιάζεται η ανάλυση σε SDS-PAGE τριών διαφορετικών πληθυσμών όπως εκλούστηκαν από την στήλη μοριακής διήθησης έπειτα από την επεξεργασία της HrpG Δ 133-146 με ιωδοοξικό νάτριο και την συγκέντρωση των δειγμάτων μέσω δια-διύλησης. Το διάλυμα εκλούσης από την στήλη δεν εμπειριεί αναγωγικό, παρόλα αυτά ο πληθυσμός του διμερούς εμφανίστηκε (Διαδρομές 4, 5. Εικόνα 5.17). Παρατηρούμε ότι είτε παρουσία είτε απουσία αναγωγικού κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης έχει αποτραπεί ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών κάτι που δεν συμβαίνει με τους μεγαλύτερους πληθυσμούς που εκλούνται από την στήλη (διαδρομές 1 & 2 και 6 με 7). Δυστυχώς με την πάροδο του χρόνου η πρωτεΐνη συνεχίζει να οξειδώνεται (το ίδιο δείγμα, Εικόνα 5.17, διαδρομές 4 και 5) και να εμφανίζονται οι μεγαλύτεροι πλυθισμοί στο διάλυμα (που παρουσιάζονται στις διαδρομές 1 και 6).

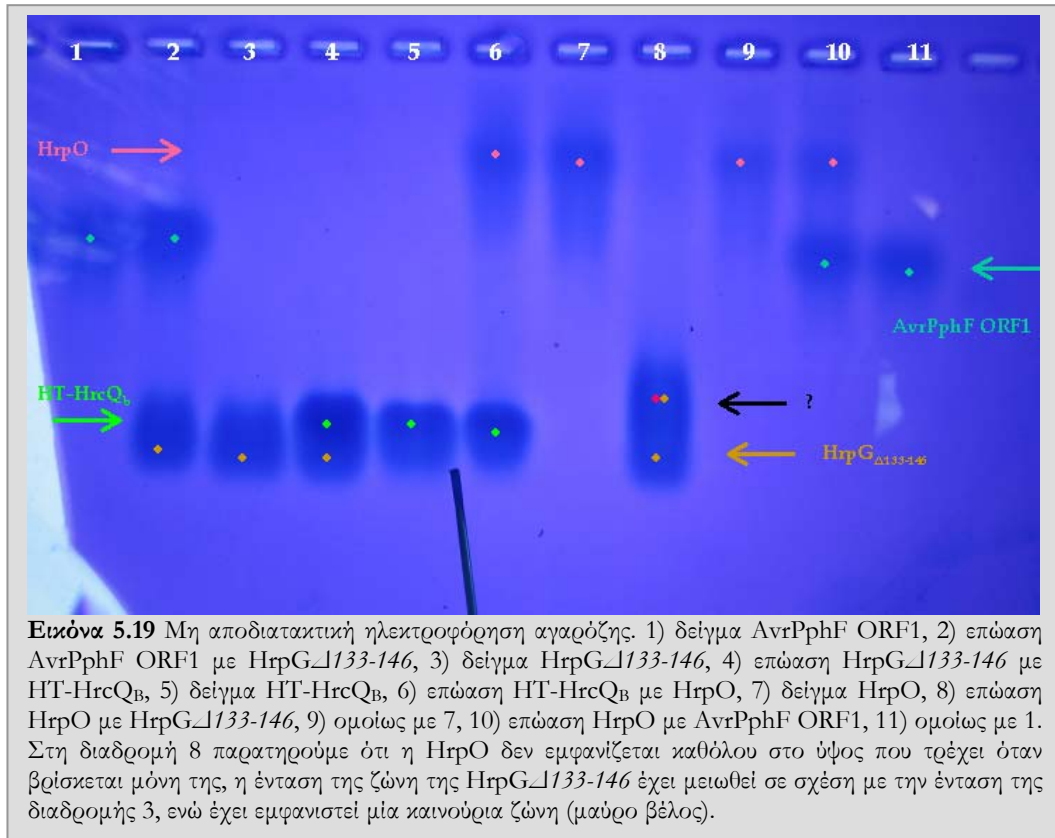


Εικόνα 5.17. Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμίδης (SDS-PAGE) όπου ηλεκτροφορούνται διαφορετικά κλάσματα της στήλης μοριακής διήθησης μετά την επεξεργασία της HrpG Δ 133-146 με ιωδοοξικό νάτριο. 1) Κλάσμα 23 (φαινομενικό μοριακό βάρος στη στήλη μοριακής διήθησης 46.1 kD) χωρίς την προσθήκη αναγωγικού κατά τον βρασμό των δειγμάτων. 2) Το ίδιο δείγμα παρουσία αναγωγικού κατά τον βρασμό. 3) Ο μάρτυρας μοριακών βάρων (LMW, Pharmacia). 4) Κλάσματα 25 & 26 (φαινομενικό μοριακό βάρος 29.5 kD) με προσθήκη αναγωγικού κατά τον βρασμό. 5) το ίδιο δείγμα με την διαδρομή 4 άνευ αναγωγικού κατά τον βρασμό. 6) κλάσμα 21 (ένος ώμος που παρατηρείται πριν τον πλυθισμό των 46.1 kD στην στήλη μοριακής διήθησης) άνευ αναγωγικού κατά τον βρασμό. 7) το ίδιο δείγμα με την διαδρομή 6 παρουσία αναγωγικού κατά τον βρασμό.

5.3.14 Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και επώσεις της HrpG με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III

Η πρωτεΐνη HrpG επώσθη με άλλες απομονωμένες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III ανά ζεύγη. Οι πρωτεΐνες αυτές ήταν η HrpO, η AvrPphF ORF1, η HrcQ_B πλήρους μήκους και το καρβοξυτελικό άκρο της HrcU. Στην εικόνα 5.18 φαίνεται να αλλάζει το πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας της κατά την συν-ηλεκτροφόρηση της με την καρβοξυτελική επικράτεια της πρωτεΐνης HrcU, ενώ στην εικόνα 5.19 φαίνεται να αλλάζει το πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας της κατά την συν-ηλεκτροφόρηση της με την πρωτεΐνη HrpO.





5.4 Συμπεράσματα

Από την ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της HrpG (§ 5.3.1) η αρχική υπόθεση εργασίας ότι πρόκειται για μία σαπερόνη τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III τέθηκε υπό έλεγχο βάση πειραμάτων που θα σύγκριναν την δομική της ομολογία με άλλες σαπερόνες της ίδιας τάξης ήδη δομικά χαρακτηρισμένες. Η συμπεριφορά της τυπικής σαπερόνη τάξης I, AvrPphF ORF1, καταγράφηκε επίσης σε όλα τα πειράματα που έλαβαν χώρα για την πρωτεΐνη HrpG. Παρακάτω συγκρίνονται και αξιολογούνται τα δεδομένα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία.

5.4.1 Η HrpG αποτελεί ένα διαλυτό συστατικό του εκκριτικού συστήματος τύπου III

Η πρωτεΐνη HrpG δεν είχε μελετηθεί προγενέστερα στο εργαστήριο και η συμπεριφορά της ήταν τελείως άγνωστη. Το γεγονός ότι α) παρατηρήθηκε η ετερόλογη υπερέκφραση της, και β) σημαντικό κλάσμα της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης βρέθηκε σε διαλυτή μορφή μας επιτρέπει να εξαγάγουμε τα πρώτα συμπεράσματα. Σύμφωνα με αυτά η πρωτεΐνη φαίνεται να αποτελεί ένα διαλυτό συστατικό του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος το οποίο πιθανώς συνδέεται ή λειτουργεί περιφερειακά με αυτό, και δεν αποτελεί το δομικό πυρήνα της εκκριτικής μηχανής. Οι παρατηρήσεις αυτές αποτέλεσαν και το ενθαρρυντικότερο δεδομένο για την συνέχεια της μελέτης της πρωτεΐνης, ενώ δεν ήταν σε θέση να απορρίψουν την υπόθεση της τάξης I σαπερόνης.

Σύμφωνα με την υπόθεση των τάξης I σαπερονών και γνωρίζοντας τις φυσιολογικές τους ιδιότητες όλες έχουν βρεθεί σε ευδιάλυτη κατάσταση. Η μοναδική περίπτωση εξαίρεση ήταν η ετεροδιμερής σαπερόνη YscB/SycN. Κατά την ανεξάρτητη ετερόλογη έκφραση των δύο πρωτεϊνών καμία δεν είχε βρεθεί διαλυτή και πιθανώς κατέληγαν σε έγγλειστα σωμάτια (inclusion bodies). Μόνο κατά την συνένκφραση και των δύο πρωτεϊνών η σαπερόνη

YscB/SycN ήταν σε θέση να δομηθεί και κατά συνέπεια να παρουσιάσει τις αντίστοιχες φυσικοχημικές ιδιότητες με τις άλλες σαπερόνες της οικογένειας (Schubot *et al.*, 2005). Η πρωτεΐνη YscB από το Ysc εκκριτικό σύστημα της *Yersinia* κωδικοποιείται από γονίδιο σε αντίστοιχη θέση με το γονίδιο *hrpG* στο *hrp/hrc* εκκριτικό σύστημα της *P. syringae* pv *phaseolicola*, (Εδάφιο 5.1). Σε αντίθεση όμως με την περίπτωση της σαπερόνης YscB/SycN κανένα γονίδιο που να κωδικοποιεί για προϊόν με χαρακτηριστικά τάξης I σαπερόνης δεν υπάρχει στην αντίστοιχη θέση του γονιδίου *sycN* στο *hrp/hrc* εκκριτικό σύστημα. Μάλιστα φαίνεται να υπάρχει ένα μεγάλο τμήμα έλλειψης στη νησίδα παθογένειας της *P. syringae* pv *phaseolicola* που εντοπίζεται μεταξύ των γονιδίων *hrpJ* και *hrcV* που στο Ysc εκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει τα γονίδια *sycN*, *sycX* και *sycY* (κωδικός πρόσβασης NCBI: AL117189). Δεδομένου ότι η HrpG βρέθηκε διαλυτή και λαμβάνοντας υπόψη την έλλειψη του αντίστοιχου γονιδίου *sycN* στο *hrp/hrc* εκκριτικό σύστημα στραφήκαμε προς την θεώρηση μιας ομοδιμερούς σαπερόνης τάξης I.

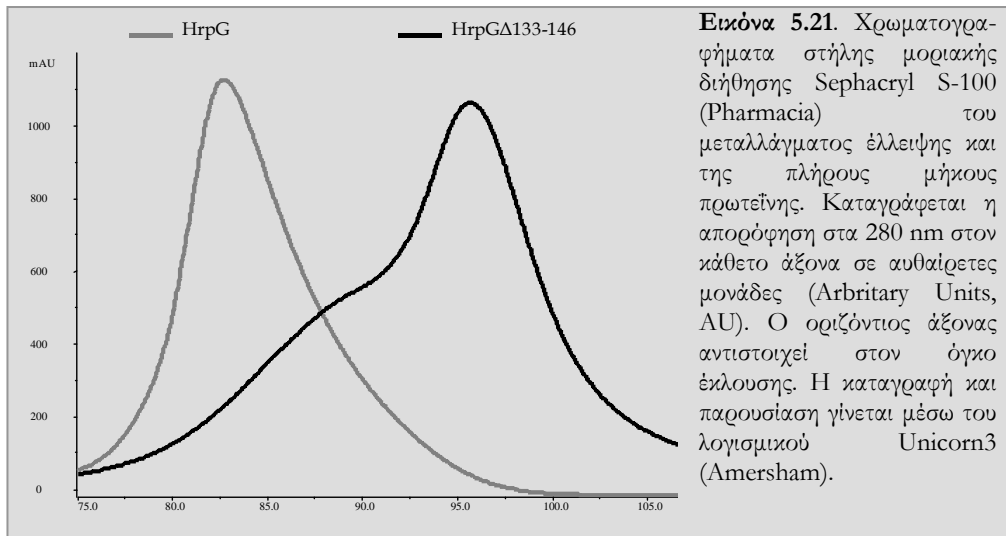
5.4.2 Η HrpG βρίσκεται σε τετραμερή μορφή στο διάλυμα. Υπεύθυνο για τον διμερισμό των διμερών της είναι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, ενώ το τετραμερές σωματίδιο φαίνεται να έχει μικρότερη συμμετρία από την αναμενόμενη.

Ένα από τα πρώτα αρνητικά δεδομένα για την θεώρηση της ομοδιμερούς σαπερόνης ήταν ο παρατηρούμενος τετραμερισμός της πρωτεΐνης HrpG *in vitro*. Κατά την διέλευση δείγματος απομονωμένης πρωτεΐνης από στήλη μοριακής διήθησης υπό αναγωγικές συνθήκες η πρώιμη έλλουση της HrpG οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα τετραμερές σωματίδιο (φαινομενικό MW = 67 kD). Κάτι ανάλογο όμως δεν παρατηρήθηκε πειραματικά στην περίπτωση της τυπικής τάξης I σαπερόνης AvrPphF ORF1 (φαινομενικό MW = 32 kD). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μέσω πειραμάτων σιέδασης από διάλυμα σε μικρές γωνίες.

Από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα που κυρίως αφορούν την αλληλεπίδραση των τάξης I σαπερόνων με τις δραστικές πρωτεΐνες καθώς και η περίπτωση των πρωτεϊνών AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 φαίνεται ότι οι τάξης I σαπερόνες είναι ομοδιμερείς (εδάφιο 1.4.1). Στη βιβλιογραφία όμως έχει παρουσιαστεί και η περίπτωση της τάξης I σαπερόνης SycH. Αυτή η σαπερόνη βρέθηκε ως τετραμερές στο διάλυμα από τους Neumayer και συνεργάτες (2004). Η προσδιορισμένη όμως δομή της πρωτεΐνης σε σύμπλοκο με την επικράτεια δέσμευσης της σαπερόνης (CBD) του αρνητικού ρυθμιστή YscM1 φαίνεται να είναι διμερής (Phan *et al.*, 2004). Οι συγγραφείς δεν αναφέρονται καθόλου στα ευρήματα της στήλης μοριακής διήθησης στην δεύτερη περίπτωση. Η μόνη διαφορά μεταξύ των δύο ερευνητικών ομάδων ήταν η παρουσία των επιπλέον 18 καρβοξυτελικών καταλοίπων της SycH στην περίπτωση του Neumayer και των συνεργατών του. Το επιπλέον αυτό καρβοξυτελικό άκρο έχει βρεθεί να παίζει σημαντικό ρόλο και στην περίπτωση της SycE (Εδάφιο 1.4.1.2) καθώς φαίνεται ότι έχει την δυνατότητα πρόσδεσης σε ειδική θέση της πρωτεΐνης. Ο ειδικός αυτός τρόπος πρόσδεσης μπορεί να συμβεί και μεταξύ του ενός διμερούς των σαπερόνων τάξης I με ένα άλλο διμερές (αντιμετάθεση επικρατειών, domain swap). Η περίπτωση αυτή έχει δειχθεί για την κρυσταλλική δομή της SycE από την ομάδα των Trame και McKay (2003). Επίσης η διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ της AvrPphF ORF1 και της HrpG σε επίπεδο αναγνώρισης αναδίπλωσης είναι ότι η προβλεπόμενη α3 καρβοξυτελική έλικα της AvrPphF ORF1 δεν αφήνει επιπρόσθετα καρβοξυτελικά κατάλοιπα. Αυτό είναι συμβατό με την πειραματικά προσδιορισμένη δομή της. Στην περίπτωση της HrpG όμως υπάρχουν επιπρόσθετα κατάλοιπα στο καρβοξυτελικό άκρο πέραν της προβλεπόμενης α3 έλικας (εδάφιο 5.3.1). Για αυτούς τους λόγους εξετάστηκε περαιτέρω αν ο τετραμερισμός της HrpG θα μπορούσε να οφείλεται στο καρβοξυτελικό της άκρο λόγω ιδιο-σύνδεσης της πρωτεΐνης *in vitro* με την κατασκευή του μεταλλάγματος έλλειψης HrpG Δ 133-146.

Όταν η ελλειμματική πρωτεΐνη ελέγχθηκε στην ίδια στήλη μοριακής διήθησης και υπό τις ίδιες συνθήκες στις οποίες είχε υποβληθεί και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη παρατηρήθηκε η καθυστερημένη έλλουση της (Εικόνα 5.18) σε σχέση με την αγρίου τύπου HrpG και η σύγχρονη έλλουση της με την τυπική σαπερόνη τάξης I AvrPphF ORF1 (Εικόνα 5.21). Σωματίδιο επίσης σημαντικά μικρότερου μοριακού βάρους και όγκου σε σύγκριση με το σωματίδιο που αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη περιγράφεται και από τα

πειράματα σιέδασης σε μικρές γωνίες τα οποία ακολούθησαν χρονικά, που καταδεικνύουν την διμερική κατάσταση της πρωτεΐνης. Έτσι τα καρβοξυτελικά αμινοξέα ISGRITLNLHRQPGV της HrpG φαίνεται να ευθύνονται για τον τετραμερισμό της πρωτεΐνης που παρατηρείται *in vitro*.

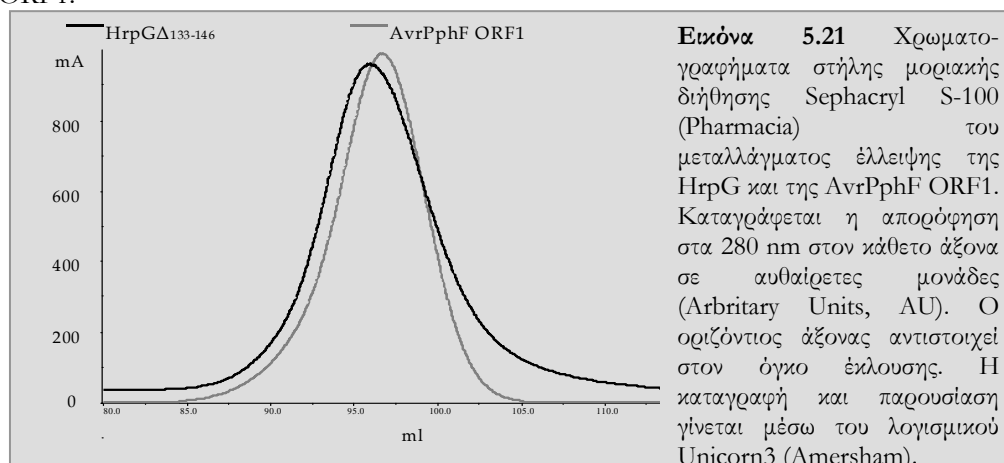


Επιπλέον τα πειράματα σιέδασης ακτίνων X από διάλυμα κατέδειξαν ότι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης είναι σε θέση να συμμετάσχει στον σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων/συσσωματωμάτων στο διάλυμα καθώς εμφανίζεται εξάρτηση της γυροσκοπικής ακτίνας και του όγκου του παρατηρούμενου σωματιδίου σε σχέση με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης για το πλήρους μήκους μόριο, κάτι που δεν παρατηρείται στην περίπτωση του μεταλλάγματος. Σημειώτων ότι και το μετάλλαγμα έλλειψης και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη διαθέτουν τον ίδιο αριθμό κυστεϊνών (7 ανά πολυπεπτιδική αλυσίδα) και ότι τα πειράματα σιέδασης έλαβαν χώρα σε ισχυρά αναγωγικές συνθήκες (20 mM DTT). Κατά συνέπεια η εμφανιζόμενη ιδιο-σύνδεση της φυσικής πρωτεΐνης σε αυτά τα πειράματα δεν οφείλεται σε οξείδωση των κυστεϊνών αλλά αποκλειστικά στα 14 καρβοξυτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης.

Κατά την εξέταση του τετραμερούς σωματιδίου της HrpG με πειράματα σιέδασης ακτίνων-X από διάλυμα και τον *ab initio* καθορισμό του σχήματος της πρωτεΐνης οι συμμετρίες P22 και P4 παρουσιάζονται απαγορευτικές για την ανασύσταση του σωματιδίου (Πίνακας 5.7, εδάφιο 5.3.9). Η συμμετρία του τετραμερούς σωματιδίου φαίνεται να είναι είτε η P2, είτε να μην υπάρχει καθόλου (P1). Όταν χρησιμοποιήθηκε το ωσειδές μοντέλο "gas3" από τις ανασυστάσεις της διμερούς ελλειμματικής μορφής (Εικόνα 5.13, Πίνακας 5.9, εδάφιο 5.3.9) τότε ο εναπομείνων χώρος του τετραμερούς σωματιδίου της HrpG (μπλε τμήμα του μοντέλου, εικόνα 5.13) φαίνεται να γεμίζει με ψευδή κατάλοιπα που το γενικό τους σχήμα πλησιάζει το σχήμα και μέγεθος του μοντέλου "gas3". Η σχετική διευθέτηση όμως των δύο τμημάτων του τετραμερούς μοντέλου δεν φαίνεται να είναι συμμετρική, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πλέον συμμετρία στο τετραμερές σωματίδιο (P1). Η ύπαρξη ασυμμετρίας σε ένα σωματίδιο που αποτελείται από όμοια μέρη δημιουργεί "ανοιχτά" ολιγομερή σύμπλοκα που μπορούν να προσαρτήσουν περισσότερες υπομονάδες. Κατά συνέπεια η HrpG είτε σχηματίζει μία μεγαλύτερη δομή *in vivo*, είτε ο *in vitro* τετραμερισμός της δεν έχει βιολογική σημασία αλλά είναι αποτέλεσμα αντιμετάθεσης επικρατειών (domain swap) και ιδιοσύνδεσης της πρωτεΐνης καθώς υψηλός αριθμός μορίων της πρωτεΐνης βρίσκονται σε διάλυμα. Ίσως το γεγονός ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνη εμφανίζει φαινόμενα ιδιο-σύνδεσης ενώ το μετάλλαγμα όχι έχει να κάνει ακριβώς με αυτήν την περίπτωση.

5.4.3 Η HrpG Δ 133-146 προσεγγίζει το γενικό σχήμα μιας σαπερόνης τάξης I αλλά διαθέτει κατά 20 Å μακρύτερη την μεγαλύτερη διάμετρο της

Συγκρίνοντας την συμπεριφορά της ελλειμματικής πρωτεΐνης HrpG Δ 133-146 στην στήλη μοριακής διήθησης με την συμπεριφορά της AvrPphF ORF1 στην ίδια στήλη και σε ίδιες συνθήκες παρατηρούμε ότι η δύο πρωτεΐνες εκλύονται περίπου στον ίδιο όγκο (Εικόνα 5.21). Παρόλο που η AvrPphF ORF1 διαθέτει μόνο 2 παραπάνω αμινοξέα (σύνολο καταλοίπων πολυπεπτιδικής αλυσίδας = 136) από το μετάλλαγμα έλλειψης της HrpG (σύνολο καταλοίπων = 134) το μετάλλαγμα προηγήθηκε ελάχιστα στην έκλυση του από την στήλη. Ίσως η HrpG Δ 133-146 να έχει ένα ελαφρά πιο «ανοιχτό» σχήμα σε σχέση με την AvrPphF ORF1.



Η HrpG Δ 133-146 φαίνεται να αποτελείται από ένα διμερές σωματίδιο με P2 συμμετρία καθώς ο *ab initio* καθορισμός του σχήματος της δίνει ικανοποιητικές τιμές ασυμφωνίας με τα πειραματικά δεδομένα ενώ η τιμή MNSD κατά την υπέρθεση των μοντέλων ανά ζεύγη μαρτυρά την σταθερότητα των ανασυστάσεων (Πίνακας 5.4, εδάφιο 5.3.7). Όλα τα μοντέλα φαίνεται να μπορούν να προσεγγιστούν καλύτερα από ένα ωοειδές σωματίδιο παρά από ένα σωματίδιο πεπλατυσμένο στους πόλους. Αυτό συμβαίνει γιατί οι δύο από τους τρεις άξονες του σωματιδίου (άξονες a και b, εικόνα 5.11, ωοειδές μοντέλο) φαίνεται να είναι ίσοι ή σχεδόν ίσοι, ενώ ο τρίτος είναι μεγαλύτερος από τους άλλους δύο (c, ο πολικός άξονας του ελλειψοειδούς). Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρείται όμως στις σαπερόνες τάξης I όπως τα πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από την σκέδαση σε μικρές γωνίες για την AvrPphF ORF1 όπου ο μεγαλύτερος άξονας του σωματιδίου (ο άξονας a για τα πεπλατυσμένα στους πόλους ελλειψοειδή σωματίδια) προσεγγίζει σε μέγεθος τον δεύτερο, ενώ ο τρίτος είναι μικρότερος (c, ο πολικός άξονας του ελλειψοειδούς) και από τους δύο (βλ. εικόνα 5.12 με σύστημα αξόνων ab και c για πεπλατυσμένα στους πόλους ελλειψοειδή όπως παρουσιάζονται στην εικόνα 5.11). Η πειραματική καμπύλη σκέδασης της HrpG Δ 133-146 φαίνεται να ταυτίζεται ικανοποιητικά με τις θεωρητικές καμπύλες σκέδασης όπως υπολογίστηκαν από τις κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές άλλων διμερών σωματιδίων των τάξης I σαπερονών (Εικόνα 5.9 Δ, εδάφιο 5.3.6) στις μικρές γωνίες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι δύο από τους τρεις άξονες του σωματιδίου της HrpG Δ 133-146 συμπίπτουν σε μέγεθος με τους δύο άξονες των σωματιδίων των σαπερονών τάξης I. Ο τρίτος άξονας όμως κατά μήκος της μεγαλύτερης διαμέτρου του σωματιδίου στην περίπτωση της HrpG Δ 133-146 εκτιμάται στα 80 Å σε αντίθεση με την μεγαλύτερη διάμετρο των σωματιδίων των σαπερονών τάξης I η οποία κυμαίνεται στα 60-65 Å.

5.4.4 Η HrpG Δ 133-146 διαθέτει υψηλότερα ποσοστά α -έλικας σε σύγκριση με τις σαπερόνες τάξης I

Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα ποσοστά δευτεροταγούς δομής της HrpG Δ 133-146 και τα αντίστοιχα ποσοστά για την AvrPphF ORF1 όπως υπολογίζονται από τα φάσματα

κυκλικού διχρωισμού στο άπω-υπεριώδες (SELCON3, CDSSTR και CONTILL, εδάφιο 2.9.2.1, σελ. 76). Παρουσιάζονται επίσης, τα ποσοστά α -ελίκων και β -κλώνων που υπολογίστηκαν από το πρόγραμμα DSSP (Kabsch & Sander, 1983) για τις σαπερόνες τάξης I με γνωστή ατομική δομή. Η SicP (1jyo) φαίνεται να παρουσιάζει τα υψηλότερα ποσοστά α -έλικας.

Τα ποσοστά των εκτιμώμενων β -πτυχών της HrpG Δ 133-146 θεωρείται ότι ανήκουν κυρίως σε αντιπαράλληλους β -κλώνους (13.74% \pm 0.08) και σε παράλληλους μόνο το 5.39 % \pm 0.08 (VARSELEC, Hennessey & Johnson, 1981). Το πρόγραμμα VARSELEC δίνει επίσης χαμηλότερα ποσοστά α -έλικας (32.52 % \pm 0.08) για την HrpG Δ 133-146. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τα πειραματικά φάσματα της AvrPphF ORF1 είναι 17.91% \pm 0.07 α -έλικα, 9.45% \pm 0.13 αντιπαράλληλοι β -κλώνοι, 3.62 % \pm 0.08 παράλληλοι β -κλώνοι ενώ στις μέχρι τώρα προσδιορισμένες δομές των τάξης I σαπερονών συμπεριλαμβανομένης και της AvrPphF ORF1 (PDB: 1s28) υπάρχουν μόνο αντιπαράλληλοι β -κλώνοι.

Φαίνεται λοιπόν ότι η ελλειμματική πρωτεΐνη HrpG Δ 133-146 διαθέτει υψηλότερα ποσοστά α -ελίκων και χαμηλότερα ποσοστά β -κλώνων από ότι η ομάδα των χαρακτηρισμένων ως τώρα τάξης I σαπερονών. Ας σημειωθεί εδώ ότι στις HrpG αμινοξικές αλληλουχίες από την *P. syringae* pv *syringae* και την *E. amylovora* (Εδάφιο 5.3.1), οι οποίες παρουσιάζουν και την μεγαλύτερη απόκλιση όσο αφορά τα χαρακτηριστικά των τάξης I σαπερονών, προβλέπονται περισσότερες α -έλικες διασπώντας την τοπολογία: α - β - β - α - β - β - α των τάξης I σαπερονών. Η εκτίμηση για τα υψηλότερα ποσοστά α -έλικας δεν φαίνεται να είναι αποτέλεσμα εισαγωγής πειραματικού σφάλματος καθώς τα αντίστοιχα ποσοστά δευτεροταγούς δομής που υπολογίζονται για την AvrPphF ORF1 συμπίπτουν με τα αντίστοιχα ποσοστά που προκύπτουν από την προσδιορισμένη μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ δομής της ίδιας πρωτεΐνης. Αν και τα ποσοστά β -κλώνων της AvrPphF ORF1 φαίνεται να υποεκτιμούνται μέσω του κυκλικού διχρωισμού εντούτοις τα αντίστοιχα ποσοστά για την HrpG Δ 133-146 είναι σαφώς μικρότερα.

	α -έλικες	β -πτυχές	στροφή	τυχαίο σπείραμα	RMSD
HrpGΔ133-146					
SELCON3	40.8%	15.6%	17.9%	27.7%	1.188
CDSSTR	45.0%	13.3%	15.0%	27.6%	0.298
CONTILL	37.7%	14.1%	19.5%	28.7%	0.126
AvrPphF ORF1					
SELCON3	29.4%	18.5%	21.4%	30.6%	0.727
CDSSTR	38.0%	20.9%	17.8%	23.3%	0.225
CONTILL	30.7%	17.9%	21.9%	29.5%	0.424
DSSP					
1s28	30.2%	23.1%			
2bsh	27.1%	25.0%			
1k3e	31.6%	19.6%			
1jyo	37.1%	20.0%			
1k3s	33.0%	22.8%			
1iva	23.9%	21.4%			

Πίνακας 5.6. Τα ποσοστά δευτεροταγούς δομής όπως προκύπτουν από την ανάλυση των προγραμμάτων SELCON3, CDSSTR και CONTILL μέσω του CDPRO για την HrpG Δ 133-146 και για την AvrPphF ORF1. Με το πρόγραμμα DSSP υπολογίστηκαν τα ποσοστά των α -ελίκων και των β -κλώνων από τις κρυσταλλογραφικές δομές των τάξης I σαπερονών, με κωδικούς πρόσβασης PDB: 1s28 (AvrPphF ORF1), 2bsh (SycT), 1k3e (CesT), 1jyo (SicP), 1k3s (SigE) και 1jya (SycE) RMSD: Μέση Τετραγωνική Ρίζα Απόκλισης των ανασυστάμενων φασμάτων από τα πειραματικά (εδάφιο 2.9.2.1).

5.4.5 Ενδείξεις αλληλεπίδρασης της HrpG με την HrpO και το καρβοξυτελικό τμήμα της HrcU.

Κατά την διάρκεια της μη αποδιατακτικής συν-ηλεκτροφόρησης της πρωτεΐνης HrpG με τις πρωτεΐνες HrpO και HrcU ανά ζεύγη φαίνεται να εμφανίζεται μία επιπλέον ζώνη.

Η περίπτωση της πρωτεΐνης HrpO θα αναλυθεί διεξοδικά στο επόμενο κεφάλαιο (Εδάφιο 6.4.4). Όσο αφορά το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης HrcU αυτό έχει μελετηθεί στο εργαστήριο (Χαρόβα, 2004) και φαίνεται να ακολουθεί την πρωτεολυτική συμπεριφορά της ομόλογης πρωτεΐνης YscU από την *Yersinia* καθώς και της ομόλογης πρωτεΐνης του μαστιγίου, FlhB. Αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου και διαθέτουν μία μεγάλη καρβοξυτελική επικράτεια που προεκβάλλει στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Οι Lavander *et al.*, (2002) έδειξαν ότι απαιτούνται χαμηλά επίπεδα της YscU για την λειτουργική έκκριση των Yop, ενώ υψηλότερα επίπεδα της ίδιας πρωτεΐνης μείωσαν και την έκκριση αλλά και την έκφραση των μολυσματικών πρωτεϊνών. Όπως και στην περίπτωση της FlhB, η YscU φαίνεται να πρωτεολύεται σε ένα αμινοτελικό θραύσμα 30 kD και σε ένα καρβοξυτελικό θραύσμα 10 kD. Η έκφραση του τελευταίου θραύσματος σε ένα στέλεχος αγρίου τύπου είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη έκκριση των Yop. Η θέση πρωτεόλυσης βρίσκεται σε ένα κατάλοιπο προλίνης εντός της αυστηρά συντηρημένης θέσης NPTH σε όλες τις ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας. Μέσω μεταλλάξεων στην συγκεκριμένη θέση οι Lavander *et al.*, (2002) κατέληξαν ότι η πρωτεόλυση της YscU δεν είναι απαραίτητη για την έκκριση των δραστικών πρωτεϊνών αλλά αναγκαία για τη βακτηριακή επιβίωση. Η ίδια ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η YscU μαζί με την YscP ελέγχουν την έξοδο των υποστρωμάτων έκκρισης (Edqvist *et al.*, 2003) κατ' αναλογία με τις πρωτεΐνες FlhB και FliK του μαστιγίου (Minamino & MacNab, 2000).

Ιδιαίτερα για την FlhB έχειδειχθεί ότι παρά την πρωτεόλυση στην προλίνη της θέσης NPTH τα επιμέρους θραύσματα της πρωτεΐνης διατηρούν την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν, (Minamino & MacNab, 2000). Η αλληλεπίδραση των θραυσμάτων μεταξύ τους έχει φανεί και στην περίπτωση της πρωτεΐνης HrcU (Χαρόβα, 2004).

Η EscU από την εντεροπαθογόνο *E. coli* φάνηκε να αλληλεπιδρά με τις δομικές πρωτεΐνες rOrf8 και EscR, καθώς και με την πρωτεΐνη διάνοιξης/μεταφοράς EspD με το σύστημα δύο υβριδίων της ζύμης (Creasey *et al.*, 2003). Έχει δειχθεί επίσης η άμεση αλληλεπίδραση των δύο θραυσμάτων της FlhB και κυρίως του καρβοξυτελικού με τα υποστρώματα έκκρισης FlgD και FliC (Minamino & MacNab, 2000). Επίσης η πρωτεΐνη HrcU από την *X. campestris* pv. vesicatoria φάνηκε ότι αλληλεπιδρά με την εκκρινόμενη πρωτεΐνη HrpB2 (Alegria *et al.*, 2004). Παρόλες όμως τις γνωστές αλληλεπιδράσεις αυτής της οικογένειας των πρωτεϊνών με υποστρώματα έκκρισης δεν έχει φανεί ως τώρα στην βιβλιογραφία αλληλεπίδραση της καρβοξυτελικής επικράτειας τους με σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, είτε πρόκειται για τάξης I είτε για τάξης II. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε αλλαγή κατά την συν-ηλεκτροφόρηση της AnrPphF ORF1 και του καρβοξυτελικού τμήματος της HrcU. Η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ HrpG και του καρβοξυτελικού άκρου της HrcU ίσως αποκαλύψει περισσότερο για το λειτουργικό ρόλο της πρωτεΐνης HrpG καθώς η δεύτερη δεν αποτελεί υπόστρωμα του εκκριτικού συστήματος και η παρατηρηθήσα συμπεριφορά στην μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

5.5 Αναφορές

- Alegria M.C., Docena C., Khater L., Ramos C.H.I., da Silva A.C.R. & Farah C.S., 2004. New Protein-Protein Interactions Identified for the Regulatory and Structural Components and Substrates of the Type III Secretion System of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*. *J. Bacteriol.* 186, 6186.
- Birtalan S.C., Phillips R.M. & Ghosh P., 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell*, 9, 971.
- Buttner, C.R., Cornelis, G.R., Heinz, D.W. & Niemann, H.H., 2005. Crystal Structure of *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion Chaperone SycT. *Protein Sci.* v14 pp.1993.
- Cambrone E.D., Sorg J.A. & Schneewind O., 2004. Binding of SycH chaperone to YscM1 and YscM2 activates effector yop expression in *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 186, 829.

- Creasey E.A., Delahay R.M., Daniell S.J. & Frankel G., 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 149, 2093.
- Edqvist P.J., Olsson J., Lavander M., Sundberg L., Forsberg Å., Wolf-Watz H., & Lloyd S.C., 2003. YscP and YscU Regulate Substrate Specificity of the *Yersinia* Type III Secretion System. *J. Bacteriol.* 185, 2259.
- Evdokimov A.G., Tropea J. E., Routzahn K. M. & Waugh D.S., 2002. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Cryst.* D58, 398.
- Garcia de la Torre J., Huertas M.L. & B. Carrasco B., 2000. "Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Baird H.A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Editor: Walker J.M., *The proteomics protocols handbook*, Humana Press pp571-607.
- Hennessey J.P. & Johnson W.C., 1981. Information Content in the Circular Dichroism of Proteins *Biochem.* 20, 1085.
- Hueck C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Mol. Biol. Rev.* 62, 379.
- Kabsch W. & Sander C., 1983. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577.
- Kelley L. A., MacCallum R. M. & Sternberg M. J. E., 2000. Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299, 499.
- Lavander M., Sundberg L., Edqvist P.J., Lloyd S.A., Wolf-Watz H. & Forsberg Å., 2002. Proteolytic Cleavage of the FlhB Homologue YscU of *Yersinia pseudotuberculosis* Is Essential for Bacterial Survival but Not for Type III Secretion. *J. Bacteriol.* 184, 4500.
- 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.
- Locher M., Lehnert B., Krauss K., Heesemann J., Groll M. & Wilharm G., 2005. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J.Biol.Chem.* 280, 31149.
- Luo Y., Bertero M.G., Frey E.A., Pfuetzner R.A., Wenk M.R., Creagh L., et al., 2001. Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nature Struct.* 8, 1031.
- McCaw M.L., Lykken G.L., Singh P.K. & Yahr T.L., 2002. ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol* 46, 1123.
- McGuffin L.J. & Jones D.T., 2003. Improvement of the GenTHREADER method for genomic fold recognition. *Bioinformatics* 19, 874.
- Minamino T. & Macnab R.M., 2000. Domain Structure of *Salmonella* FlhB, a Flagellar Export Component Responsible for Substrate Specificity Switching. *J. Bacteriol.* 182, 4906.
- Neumayer W., Groll M., Lehmann V., Antonenka U., Kähler S., Heesemann J. & Wilharm G., 2004. *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycH. Recombinant expression, purification, characterisation, and crystallisation. *Protein Expr. Purif.* 35, 237.
- Neumayer W., 2005. Charakterisierung der Virulenzproteine YscM1 und YscM2 in ihrer Funktion als Modulatoren des Stoffwechsels in *Yersinia enterocolitica*. Dissertation. Gutachter: Professor Dr. Dr. J. Heesemann & Professor Dr. A. Pfeifer.
- Phan J., Tropea J.E. & Waugh D.S., 2004. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Cryst.* D60, 1591.
- 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.
- Singer A.U., Desveaux D., Betts L., Chang J. H., Nimchuk Z., Grant S. R., Dangel J.L. & Sodnek J., 2004. Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure*, 12, 1669.
- Sreerama N. & Woody R.W., 2004. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci.* 13, 100.
- Stebbins C. E. & Galan J.E., 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature*, 414, 77.
- Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 22, 4673.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103,14941.

- Trame C.B. & McKay, 2003. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. Acta Cryst D59, 389.
- vanEerde A., Hamiaux C., Perez J., Parsot C. & Dijkstra B.W., 2004. Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. EMBO rep. 5,477.
- 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, 520.
- Γαζή Α.Δ., 2002. ΑνιPphB, ΑνιPphF: Μελέτες δύο μολυσματικών παραγόντων από την *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Επιβλέπων καθηγητής: Ν.Ι. Πανόπουλος. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Φαδούλογλου Β.Ε., 2004. Δομικές μελέτες της πρωτεΐνης HrcQ_B από το τύπου III εκκριτικό σύστημα της *Pseudomonas syringae*, Επιβλέπων Καθηγητής: Μ. Κοκκινίδης. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Χαρόβα Σ., 2004. Καθαρισμός και μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών που δομούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III σε παθογόνα βακτήρια. Επιβλέπων Καθηγητής: Ν.Ι. Πανόπουλος. Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Προσδιορισμός των δομικών χαρακτηριστικών της πρωτεΐνης HrpO

“...the giant step Unfolds
with guidance from the curving Path...”

Led Zeppelin

Η πρωτεΐνη HrpO βρέθηκε να είναι εξαιρετικά διαλυτή κατά την υπερέκφραση της από ετερόλογο σύστημα *E. coli*. Το υψηλό φορτίο της σε σύγκριση με τον περιορισμένο αριθμό υδρόφοβων καταλοίπων την ταξινομούν δυνητικά στην ομάδα των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεΐνων (intrinsically unfolded protein, IUP). Πειράματα σκέδασης ακτίνων X στις μικρές γωνίες κατέδειξαν την ύπαρξη μη σφαιροειδούς σωματιδίου. Από την καταγραφή φασμάτων κυκλικού διχρωισμού εκτιμούνται όμως υψηλά ποσοστά δευτεροταγούς δομής. Σε πειράματα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης και μέσω ανάλυσης ιδαζουσών τιμών των φασμάτων φάνηκε ότι η πρωτεΐνη μεταπίπτει σε μία ακόμα πιο «ανοιχτή» μορφή απουσία ενδιάμεσης κατάστασης γύρω στους 20°C.

Σε πειράματα κρυστάλλωσης η HrpO κατακρημνίζεται εύκολα παρουσία οργανικών διαλυτών, ενώ φαίνεται να παραμένει διαλυτή τις πρώτες ώρες σε διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύος και στην συνέχεια παρουσιάζει έντονο διαχωρισμό φάσεων.

Η *in silico* ανάλυση της αλληλουχίας της HrpO την συσχετίζει με τις πρωτεΐνες YscO και FliJ καταδεικνύοντας ένα πιθανό ανάλογο ρόλο παρόλη την απουσία ομοιότητας στις μεταξύ τους αλληλουχίες. Η ανάλογη υδροδυναμική συμπεριφορά μεταξύ της HrpO και της FliJ καταδεικνύεται και πειραματικά μέσω χρωματογραφίας μοριακής διήθησης όπου ο υδροδυναμικός όγκος έκλυσης τους συμπίπτει ενώ παρουσιάζουν και οι δύο πρωτεΐνες μία ασυνήθιστα ασύμμετρη κορυφή.

6.1 Εισαγωγή

Το γονίδιο *hrpO* εδράζει εντός της νησίδας παθογένειας του εκκριτικού συστήματος τύπου III της *P. syringae* pv *phaseolicola*, στο οπερόνιο *hrpJ*. Είναι δε το τελευταίο γονίδιο του οπερόνιου, έπειτα από το γονίδιο της ΑΤΡάσης, *hrpN*. Η θέση αυτή καταλαμβάνεται αντίστοιχα από το γονίδιο *yscO* στα είδη της *Yersinia*, το *spa13* στην *S. flexneri*, το *imlI* στη νησίδα παθογένειας I της *Salmonella*, το *ssaO* στη νησίδα παθογένειας II της *Salmonella*, το *hrpO* στην *E. amylovora*, το ORF7 στα είδη του *Rhizobium*, ενώ η αντίστοιχη θέση ακολουθώς του γονιδίου της ΑΤΡάσης στο μαστίγιο καταλαμβάνεται από το γονίδιο *fliJ* (Hueck, 1998). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών παρόλο που δεν παρουσιάζουν ομοιότητα στην αμινοξική

αλληλουχία τους με συνέπεια τον δύσκολο καθορισμό του βαθμού συγγένειας τους μέσω PsiBLAST (Altschul & Koonin, 1998) εν τούτοις αποτελούνται περίπου από 145-155 κατάλοιπα με ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό φορτισμένων αμινοξέων.

Οι Payne & Straley (1998) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη YscO ήταν απαραίτητη για την υψηλού βαθμού έκφραση και έκκριση υποστρωμάτων του Ysc εκκριτικού συστήματος στη *Yersinia*. Έδειξαν επίσης ότι η YscO σε πειράματα ανοσοκατακρήμινσης ανιχνευόταν στο διαλυτό και στο μεμβρανικό κλάσμα του βακτηρίου, ενώ σε απουσία ιόντων ασβεστίου ανιχνευόταν και στο θρεπτικό μέσο.

Η πρωτεΐνη FliJ βρέθηκε να παρεμποδίζει το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων των FliE και FlgG κατά την συνέκφραση τους ενώ είναι απαραίτητη και για την έκκριση της φλαγγελίνης (Minamino *et al.*, 2000). Για αυτούς τους λόγους χαρακτηρίστηκε από τους συγγραφείς ως σαπερόνη γενικής χρήσης. Σε πειράματα μοριακής διήθησης βρέθηκε να κατέχει ένα φαινομενικό μοριακό βάρος 50 kD ενώ σε πειράματα σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες (multi-angle light scattering) φάνηκε να έχει μοριακό βάρος ίσο με 20 kD, πλησίον του μοριακού βάρους που αντιστοιχεί στο μονομερές της. Η αναλυτική υπερφυγοκέντρωση καταδεικνύει την ασθενή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον εαυτό της σχηματίζοντας τριμερή ή ίσως τετραμερή. Η FliJ φαίνεται να αλληλεπιδρά με την αμινοτελική περιοχή της FliH⁵⁸, του αρνητικού ρυθμιστή της ΑΤΡάσης, καθώς και με την διαλυτή κυτταροπλασματική επικράτεια της FlhA (Fraser *et al.*, 2003).

Οι αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης HrpO με άλλες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από την νησίδα παθογένειας της *P. syringae* έχουν μελετηθεί με το σύστημα δύο υβριδίων της ζύμης στο εργαστήριο (κ. Μπαστάκη). Είναι αξιοσημείωτο ότι σε αυτά τα πειράματα η πρωτεΐνη HrpO φαίνεται να ακολουθεί το πρότυπο αλληλεπιδράσεων της FliJ (Μπαστάκη & Πανόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται η βιοπολογιστική ανάλυση της αλληλουχίας της HrpO και συγκρίνεται με τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τις αναλύσεις των πρωτεϊνών YscO και FliJ, παρουσιάζονται τα πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης, περιγράφεται ένα μοντέλο χαμηλής διακριτικότητας βασισμένο στη σκέδαση από μονοδιάσπαρτο διάλυμα της πρωτεΐνης, εκτιμώνται τα ποσοστά δευτεροταγούς δομής που διαθέτει η πρωτεΐνη, μελετάται η θερμοκή της αποδιάταξη και η παρουσία ή όχι ενδιάμεσων μορφών, ενώ τέλος συζητείται η μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση για την εύρεση πιθανών αλληλεπιδράσεων με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τη νησίδα παθογένειας της *P. syringae*.

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

6.2.1 Βιοπολογιστικές Μέθοδοι

Οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών HrpO (κωδικός πρόσβασης Entrez: AAC25065), YscO (κ. π. Entrez: AAB72198) και FliJ (κ. π. Entrez: Q8ZF90 και P52613) υποβλήθηκαν σε ανάλυση αλληλουχικής σύγκρισης, προβλέψεις δευτεροταγούς δομής και σφαιρικότητας σύμφωνα με την μεθοδολογία που παρουσιάζεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2, (Εδάφιο 2.1). Επιπλέον η αμινοξική αλληλουχία της HrpO υποβλήθηκε σε *ab initio* προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής της (Εικόνα 2.1) και σε προβλέψεις μετάπτωσης των πιθανών α-ελίκων αυτής σύμφωνα με το εδάφιο 2.1. Επιπρόσθετα, οι παράμετροι πρωτοταγούς δομής της HrpO υπολογίστηκαν από το εργαλείο ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) που διατίθεται μέσω του δικτυακού τόπου ExPASy (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>). Για την εύρεση επαναλήψεων εντός αμινοξικής αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο RADAR επίσης από την ExPASy.

⁵⁸ Οι πρωτεΐνες της οικογένειας FliH/YscL έχουν αναγνωρισθεί μέσω PsiBLAST από τους Pallen και συνεργάτες (2006) ως ομόλογες πρωτεΐνες της υπομονάδα E της νΑΤΡάσης και των υπομονάδων b και δ της F₀F₁ ΑΤΡάσης (Εδάφιο 1.4.3).

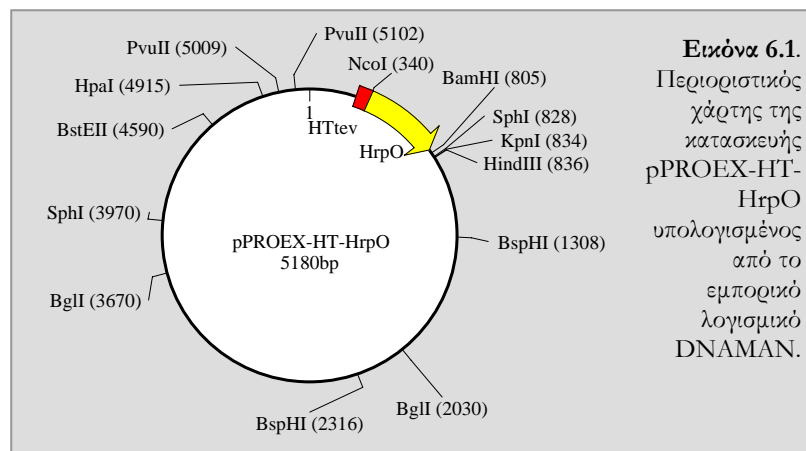
6.2.2 Κλωνοποίηση του γονιδίου *hrpO* σε φορέα έκφρασης

Το γονίδιο *hrpO* ενισχύθηκε μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιώντας σαν μήτρα την κατασκευή pET16b/HrpO της Δρ. Ταμπακάκη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

5' CGAAGGTCGTCCCATGGAAGACAC – 3',

5'- TTGTTAGCAGCCGGATCCGTG – 3'

Με έντονα γράμματα σημειώνεται η παλίνδρομη θέση που αναγνωρίζεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση NcoI. Ο δεύτερος εκκινητής σχεδιάστηκε επίσης με περιοριστική θέση BamHI αλλά τελικά δεν χρησιμοποιήθηκε καθώς οι θέσεις NcoI /BamHI στο φορέα είναι πολύ κοντά. Τα προϊόντα της αντίδρασης κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις NcoI και XhoI του pPROEX-HT φορέα έκφρασης (Life Technologies, Inc.). Η θέση XhoI του φορέα είχε υποστεί πέψη με ειδική εξονουκλεάση για την παραγωγή τυφλού άκρου. Οι κλώνοι ελέγχθηκαν για την παραγωγή της πρωτεΐνης και επικυρώθηκαν με αλληλούχιση.



6.2.3 Επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης HrpO

Ολονύχτια υγρή προ-καλλιέργεια (60 ml LB + 100μg/ml αμπικιλίνης) κορεσμένη σε κύτταρα *E. coli* DH5α μετασηματισμένα με την κατασκευή pPROEX-HT-HrpO, χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 2 λίτρων LB + 100μg/ml αμπικιλίνης. Ακολουθεί επώαση στους 37°C μέχρι η απορρόφηση της νέας καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει την τιμή 0.5. Σε αυτό το σημείο προστίθεται 1 mM IPTG και η καλλιέργεια μεταφέρεται στους 28°C. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση μετά από 5 ώρες και 30 λεπτά. Η κυτταρική πάστα φυλάγεται στους -20°C.

6.2.4 Απομόνωση της πρωτεΐνης HrpO

6.2.4.1 Στάδιο χαμηλού καθαρισμού

Η κυτταρική πάστα του προηγούμενου βήματος επαναδιαλύεται σε 200 ml διαλύματος Lysis (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM Ιμιδαζόλιο). Ακολουθώς προστίθενται αναστολείς πρωτεασών (Παράγραφος 3.2.2.1, σελίδα 84-85).

Τα κύτταρα λύνονται με υπερηχοβόληση (sonication) για 9 λεπτά συνολικά με διαλείματα ενός λεπτού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 18000 g στους 6°C.

6.2.4.2 Στάδιο υψηλού καθαρισμού

6.2.4.2.1 Χρωματογραφία Στήλης Συγγενείας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου

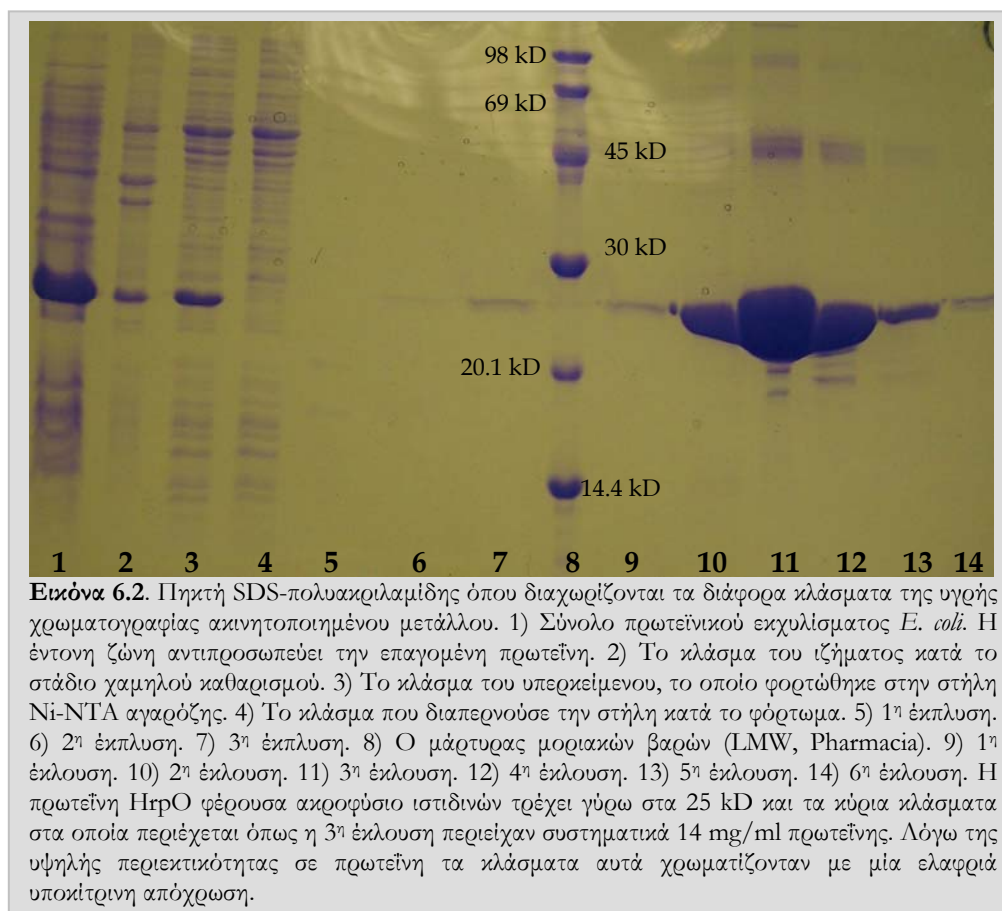
Το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο φορτώνεται σε εξισορροπημένη στήλη 5 ml Ni-NTA αραρόζης (QIAGEN). Η έκπλυση της στήλης γίνεται μέσω αυξανόμενης συγκέντρωσης

ιμιδαζολίου σε βήματα των 20 mM, 30 mM και 40 mM (Πίνακας 6.1). Ο συνολικός όγκος του διαλύματος έκπλυσης είναι 50 x του όγκου της στήλης (όγκος στρώματος, bed volume).

Πίνακας 6.1 Διαλύματα στήλης ακινητοποιημένου μετάλλου

Διάλυμα	Όγκος διαλύματος	Ρυθμιστικό διάλυμα	[NaCl]	[Ιμιδαζόλιο]	Πρόσθετα
Λύση	200 ml	20 mM Tris/HCl pH 8.0	150 mM	10 mM	5 mM β- μερκαπτοαι θανόλης
Έκπλυση 1	100 ml		250 mM	20 mM	
Έκπλυση 2			350 mM	30 mM	
Έκπλυση 3	50 ml		250 mM	40 mM	
Έκλυση 1	5 ml		150 mM	80 mM	
Έκλυση 2				100 mM	
Έκλυση 3		150 mM			
Έκλυση 4		200 mM			
Έκλυση 5		250 mM			
Έκλυση 6		300 mM			

Ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης από την στήλη με αυξημένη ποσότητα ιμιδαζολίου (Πίνακας 6.1). Τα κλάσματα της στήλης συλλέγονται ξεχωριστά και αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) (Εικόνα 6.2). Η ποσότητα της πρωτεΐνης στα κλάσματα έκλυσης εκτιμάται με τη μέθοδο Bradford.



6.2.4.2.2 Ενζυμική απομάκρυνση του ακροφυσίου ιστιδινών

Από την εικόνα των δειγμάτων που παρουσιάζεται στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση επιλέγονται τα κατάλληλα κλάσματα που φέρουν πρωτεΐνη και υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 2 lt διαλύματος αντίδρασης rTEV: 50 mM Tris/HCl 8.0, 50 mM NaCl, 0.25 mM EDTA, 5 mM β-μερκαπτοαιθανόλης. Ακολουθεί εκτίμηση της ποσότητας της πρωτεΐνης με

τη μέθοδο Bradford και στο δείγμα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα της πρωτεάσης rTEV σε αναλογία μαζών 1 προς 10. Η αντίδραση πρωτεόλυσης επωάζεται στους 30°C για 3 ώρες. Ακολούθως στο δείγμα προστίθεται ιμιδαζόλιο ως τελική τιμή 10 mM και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 1500 g για 30 min. Τα κλάσματα που προκύπτουν από την φυγοκέντρηση φυλάγονται ξεχωριστά.

6.2.4.3.2 Απομάκρυνση των ελεύθερων ακροφυσίων ιστιδίνης & της πρωτεάσης rTEV από το δείγμα

Το υπερκείμενο από το προηγούμενο βήμα φορτώνεται σε δεύτερη εξισσοροπημένη στήλη Ni-NTA αραρόζης (QIAGEN) (όγκου στρώματος 5 ml) για την προσρόφηση της rTEV⁵⁹ και των ακροφυσίων ιστιδίνης. Η HrpO άνευ του ακροφυσίου ιστιδινών παραλαμβάνεται απευθείας από την έξοδο της κολώνας κατά την φόρτωση (κλάσμα FlowThrough). Η στήλη εκπλένεται με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Ιμιδαζόλιο, συνολικού όγκου 45 ml το οποίο συλλέγεται σε τρία διαφορετικά κλάσματα των 15 ml για την περίπτωση που μέρος της πρωτεΐνης δεν έχει απελευθερωθεί απευθείας από την στήλη στο προηγούμενο βήμα. Τα κλάσματα αναλύονται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης και υπόκεινται σε διαπίδυση έναντι κατάλληλου διαλύματος.

6.2.4.2.2 Στήλη Μοριακής Διήθησης

Στη συνέχεια το δείγμα συγκεντρώνεται μέσω διαδιύλησης με AMICON Ultra ως τα 3 ml. Δεν υπάρχουν σημαντικές απώλειες πρωτεΐνης κατά τη συγκέντρωση σε διάλυμα που φέρει 200 mM NaCl και 2 mM β-μερικαπτοαιθανόλης σε υψηλά pH. Το δείγμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και το υπερκείμενο φορτώνεται σε στήλη Sephacryl S-100 (Εδάφιο 2.4). Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη συλλέγονται και συγκεντρώνονται μέσω διαδιύλησης (Amicon Ultra). Ακολουθεί ακαριαίο πάγωμα του τελικού δείγματος σε υγρό άζωτο και φύλαξη του στους -80°C. Στην εικόνα 6.3 παρουσιάζεται σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης το τελικό δείγμα της HrpO.



Εικόνα 6.3 SDS PAGE. Αριστερά ο μάρτυρας μοριακών βαρών LMW (Pharmacia). Δεξιά το τελικό δείγμα της HrpO.

6.2.5 Σκέδαση ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες

Τα δεδομένα σκέδασης από διάλυμα συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2 (Εδάφιο 2.7.8). Στην πρώτη συλλογή μετρήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις⁶⁰ της HrpO: 7, 4.2 και 2.1 mg/ml και σε διάλυμα 20 mM BisTrisPro/HCl pH 9.5, 200 mM NaCl, 2 mM DTT. Κατά τη δεύτερη συλλογή μετρήθηκαν δείγματα της πρωτεΐνης σε 4 διαφορετικά pH: 9.5, 8.5, 7.5 και 6.5 σε δύο διαφορετικές πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις.

6.2.6 Κυκλικός Διχρωσμός

Τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού καταγράφηκαν για δείγματα της HrpO χαμηλής συγκέντρωσης 0.05 – 0.1 mg/ml, είτε αραιωμένα με διάλυμα 20 mM φωσφορικών pH 8.5 είτε υποκείμενα σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris/Βορικού pH 8.3., σε κυψελίδα πάχους 1 mm για την καταγραφή φάσματος κυκλικού διχρωσμού στο άπω υπεριώδες. Καταγράφηκαν επίσης φάσματα σε διαφορετικά pH. Φάσματα στο εγγύς υπεριώδες καταγράφηκαν για δείγματα της πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 1 mg/ml και κυψελίδα πάχους 5 mm.

Η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpO καταγράφηκε αρχικά μέσω του σήματος κυκλικού διχρωσμού σε μήκος κύματος 222 nm στο εύρος θερμοκρασιών 2 – 65°C. Η ταχύτητα

⁵⁹ Η rTEV παράγεται με ακροφύσιο ιστιδινών

⁶⁰ Σύμφωνα με εκτίμηση μέσω της απορρόφησης των δειγμάτων στα 280 nm σε αποδιατακτικές συνθήκες, κάνοντας χρήση του θεωρητικού συντελεστή απόσβεσης (ProtParam)

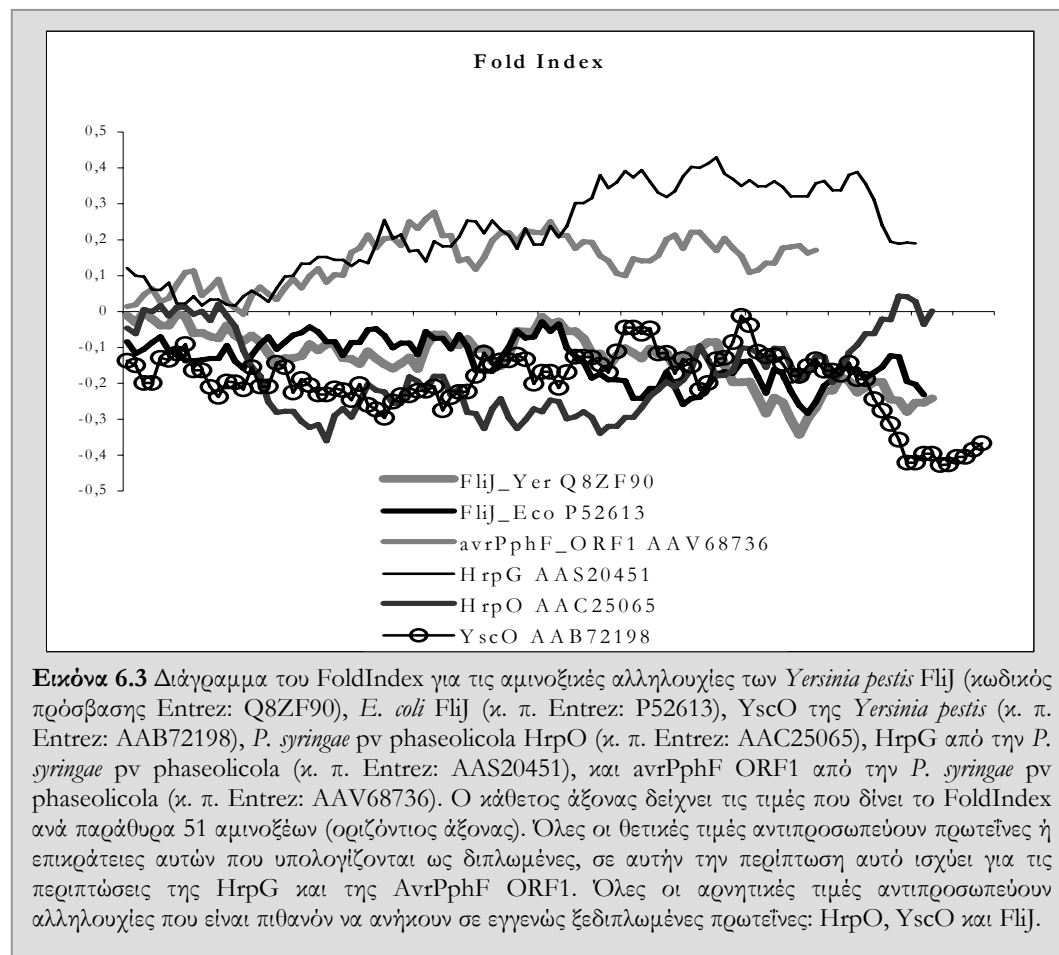
μεταβολής της θερμοκρασίας ήταν 80 °C/h. Στην συνέχεια ακολούθησε καταγραφή φασμάτων στο άπω υπεριώδες ανά 4°C στο εύρος 4 – 64°C. Η ανάλυση των δεδομένων για την κάθε περίπτωση έλαβε χώρα όπως περιγράφεται στο εδάφιο 2.9.2.

6.2.7 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης

Η στρατηγική των πειραμάτων κρυστάλλωσης αναλύεται διεξοδικά στο εδάφιο 2.5.5. Δοκιμάστηκαν δείγματα της πρωτεΐνης σε διάφορες συγκεντρώσεις από 2.8 ως 21 mg/ml καθώς και διαφορετικά διαλύματα φύλαξης: α) 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, β) 10 mM HEPES/NaOH pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, γ) 20 mM BisTrisPro/HCl pH 9.5, 200 mM NaCl, 2 mM DTT.

6.3 Αποτελέσματα

6.3.1 Ανάλυση αλληλουχίας



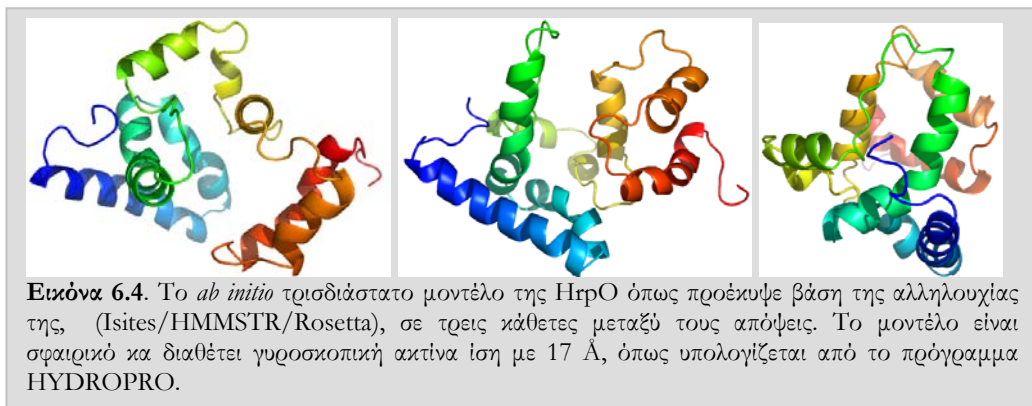
Η πρωτεΐνη HrpO αποτελείται από 148 κατάλοιπα (μοριακό βάρος 17.4 kD) και χαρακτηρίζεται από θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο⁶¹ 6.25. Έχει δε υψηλό ποσοστό αμινοξέων (58,9%) που έχουν συσχετιστεί με την αταξία: A, R, G, Q, S, P, E, K (Romero *et*

⁶¹ Το θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή όπου η πρωτεΐνη φέρει μηδενικό καθαρό ηλεκτρικό φορτίο αν βρισκόταν σε αδιάλυτη μορφή στο διάλυμα. Η πραγματική τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου εξαρτάται από την διπλώση της πρωτεΐνης και αφορά την εξωτερική της επιφάνεια η οποία έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη, συνήθως εκτιμάται σε πειράματα ισοηλεκτρικού εστιασμού.

al., 2001), ενώ παρουσιάζει μόνο κατά 23,8% αμινοξέα που προάγουν την τάξη: W, C, F, I, Y, V, L, N. Το πρόγραμμα FoldIndex (Prilusky *et al.*, 2005) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σφαιρικότητας της πρωτεΐνης. Απέδωσε αρνητική τιμή στην αλληλουχία της HrpO, που συνεπάγεται πρόβλεψη για εγγενώς αδίπλωτη πρωτεΐνη. Το ίδιο συνέβει και για τις αλληλουχίες των YscO και FliJ που ελέγχθηκαν στη συνέχεια. Για τον έλεγχο του προγράμματος υποβλήθηκαν και οι αμινοξικές αλληλουχίες των HrpG και AvrPphF ORF1, οι οποίες ορθώς προβλέφθηκαν ως σφαιρικές με την απόδοση θετικής τιμής, (Εικόνα 6.3)

Οι αλληλουχίες των πρωτεϊνών HrpO, YscO και FliJ βρέθηκαν να έχουν υψηλή πιθανότητα για την δημιουργία α -ελίκων με το ίδιο πρότυπο. Περισσότερο από το 85% των καταλοίπων προβλέπεται να συμμετέχουν σε χωροδιάταξη α -έλικας και στις τρεις αλληλουχίες (Psi-PRED, εδάφιο 2.1). Η προβλεπόμενη τοπολογία των τάξης I σαπερονών του εκκριτικού συστήματος τύπου III (α - β - β - α - β - β - α) εκτιμήθηκε ορθά στην περίπτωση της αλληλουχίας της AvrPphF ORF1 όταν υποβλήθηκε στον ίδιο αλγόριθμο σαν αλληλουχία ελέγχου (κωδικός πρόσβασης PDB: 1s28).

Με βάση την πρωτοταγή δομή της πρωτεΐνης κατασκευάστηκε τρισδιάστατο μοντέλο της HrpO (Isites/HMMSTR/Rosetta, Εικόνα 2.1). Το μοντέλο που προέκυψε είχε 8 α -έλικες με μέσο όρο αμινοξέων στην καθεμία εξ'αυτών 10.8 καταλοίπων ενώ δεν εμφανίζει καθόλου β -κλώνους (Εικόνα 6.4).



Η HrpO προβλέπεται ότι διαθέτει 13.48% των καταλοίπων της σε διαμόρφωση α -έλικας, όταν βρίσκεται σε pH 7.0, θερμοκρασία 20°C και ιοντική ισχύ 0.100, (AGADIR, εδάφιο 2.1). Διατηρώντας σταθερά το pH και την ιοντική ισχύ αλλά αυξάνοντας την θερμοκρασία στους 20°C το προβλεπόμενο ποσοστό των καταλοίπων σε διαμόρφωση α -έλικας έχει μειωθεί στο 5.07%. Τα ποσοστά αμινοξέων σε διαμόρφωση α -έλικας προβλέπεται ότι εξαρτώνται και από το pH καθώς και από την ιοντική ισχύ. Τα υψηλότερα ποσοστά (16.62%) απαντούνται σε βασικό pH (12.0), σε θερμοκρασία 4°C και στην χαμηλότερη ιοντική ισχύ που ελέγχθηκε (0.100), (AGADIR, εδάφιο 2.1).

Επίσης για την HrpO προβλέπονται δύο επαναλήψεις στην αλληλουχία της (RADAR, εδάφιο 2.1), οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:

No. of Repeats	Total Score	Length	Diagonal	BW-From	BW-To	Level
2	152.30	46	47	31	77	1

31- 77 (72.59/37.92)

SAERAHRRHAQVEIKSMLDHLISKIFASLDQERDNHKRRREGLSQEHLI

81- 126 (79.71/38.59)

SPNDIDRWHEKE.KHMLDRLACIFQDVQQQQLRVAAEQQALLEQKRLQ

Δύο επαναλήψεις προβλέπονται και στην περίπτωση της YscO. Η έκταση αυτών των επαναλήψεων είναι όμως μόνο 17 αμινοξέων συγκριτικά με την έκταση των 46 αμινοξέων στην HrpO. Επαναλήψεις δεν προβλέπονται καθόλου στην περίπτωση της FliJ.

6.3.2 Πειράματα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης

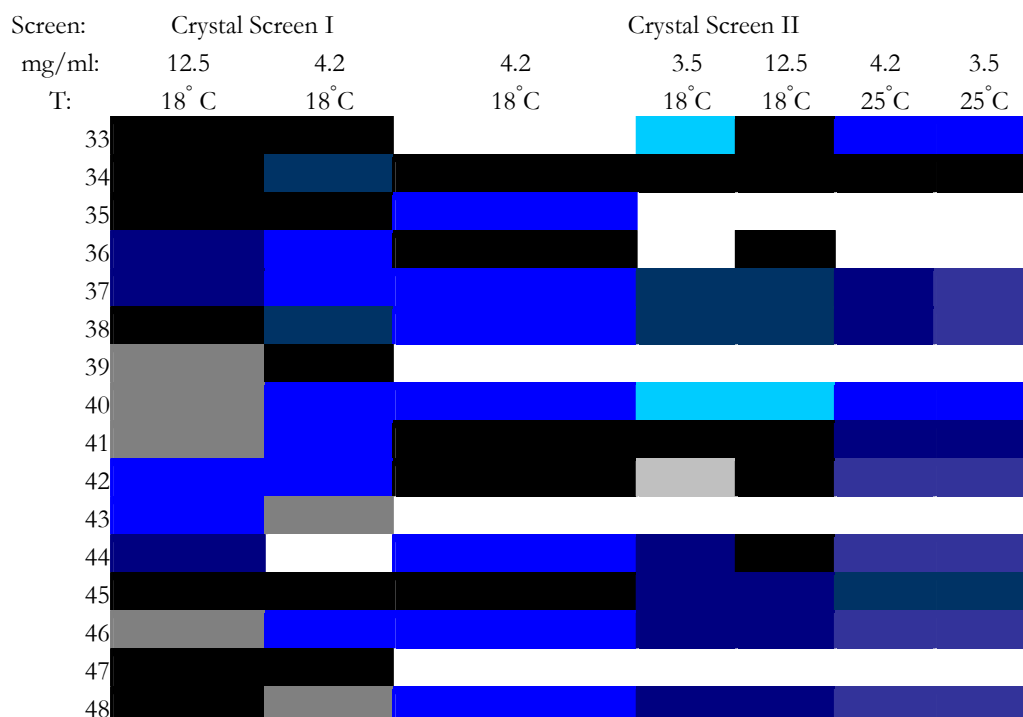
Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης όπως καταγράφηκαν μετά την πάροδο 16 h. Η HrpO παρουσιάζει εξαιρετικά καλή διαλυτότητα κατά την συγκέντρωση της σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει πρωτοταγείς αμίνες όπως το Tris και το BisTrisPro ενώ κατακρημνίζεται σε ρυθμιστικά διαλύματα ιντριικών και HEPES. Ύστερα από την κατακρήμιση της HrpO ακολουθεί φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Σε όλες τις περιπτώσεις το ίζημα της πρωτεΐνης επαναδιαλύεται παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος Tris. Η πρωτεΐνη φαίνεται να επανακτά την φυσική της στεροδιαμόρφωση καθώς τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω-υπεριώδες της επαναδιαλυόμενης πρωτεΐνης είναι ίδια με τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης όταν δεν έχει υποστεί κατακρήμιση.

Πίνακας 6.2 Καταγραφή αποτελεσμάτων κρυστάλλωσης

Screen:	Crystal Screen I			Crystal Screen II			
mg/ml:	12.5	4.2	4.2	3.5	12.5	4.2	3.5
T:	18°C	18°C	18°C	18°C	18°C	25°C	25°C
1	Black	Blue		Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue
2	Dark Blue	Blue			Light Blue		
3	Grey	Blue			Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
4		Black		Dark Blue	Black	Grey	Dark Blue
5	Grey			Black	Black	Grey	Grey
6	Dark Blue	Blue					
7	Grey	Blue		Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
8	Grey				Dark Blue		
9	Dark Blue	Blue		Grey	Black	Grey	Grey
10		Grey		Dark Blue	Black		
11	Dark Blue	Blue		Black	Black	Black	
12	Grey						
13	Dark Blue	Dark Blue				Grey	Grey
14	Black	Blue		Dark Blue	Black	Dark Blue	Dark Blue
15	Dark Blue	Blue		Dark Blue	Black	Dark Blue	Dark Blue
16	Grey			Grey	Black	Grey	Grey
17	Dark Blue	Dark Blue			Grey		
18		Blue		Dark Blue	Black	Dark Blue	Dark Blue
19	Grey						
20	Dark Blue	Grey			Black	Dark Blue	Dark Blue
21	Dark Blue	Blue		Dark Blue	Black	Dark Blue	Dark Blue
22	Grey			Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
23		Blue				Light Blue	Light Blue
24	Black	Blue		Dark Blue	Black	Light Blue	Light Blue
25	Grey				Black	Black	Black
26	Black	Blue		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
27		Grey		Grey	Black	Dark Blue	Dark Blue
28	Dark Blue	Grey		Grey	Black	Black	Black
29	Dark Blue	Blue					
30	Black	Blue		Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
31		Black			Grey	Light Blue	
32	Black	Blue		Dark Blue	Black	Blue	Blue

Δεν ελέγχθησαν

Δεν ελέγχθει



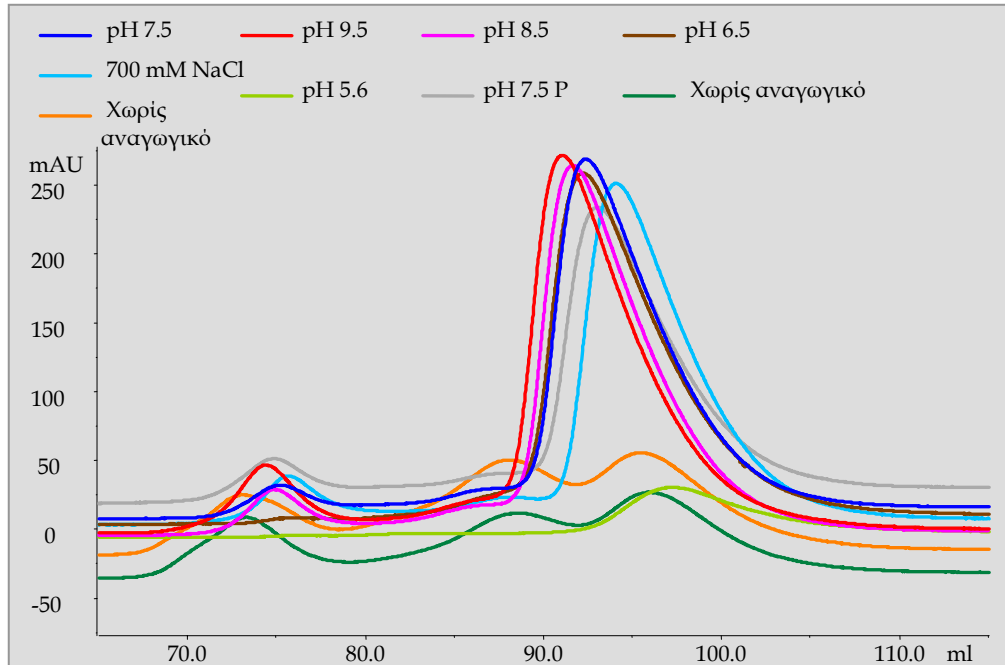
Πίνακας 6.2 Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του γκρι παρουσιάζονται οι συνθήκες εκείνες που έδωσαν ίζημα. Με μαύρο καταγράφονται τα βαριά άμορφα ιζήματα και με γκρι τα ελαφρύτερα. Με άσπρο οι σταγόνες που παρέμειναν διαυγείς. Με τους διαφορετικούς τόνους στην κλίμακα του μπλε παρουσιάζονται οι διαφορετικοί βαθμοί διαχωρισμοί φάσεως που εμφανίστηκαν στις αντίστοιχες συνθήκες. Τα σκούρα μπλε δηλώνουν παρουσία διαχωρισμού φάσεως μαζί με ίζημα ενώ τα ανοικτά μπλε δηλώνουν την παρουσία γέλης.

Στον πίνακα 6.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την σάρωση εμπορικών συνθηκών για δοκιμές κρυστάλλωσης: Crystal Screen I και Crystal Screen II (Hampton Research) για διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης καθώς και για δύο θερμοκρασίες. Οι σαρώσεις αυτές στηρίζονται στην θεωρία του Σποραδικού Πίνακα, (Εδάφιο 2.5.5). Παρατηρούμε ότι ο πίνακας είναι έντονα κατειλημμένος από το μπλε χρώμα που αντιστοιχεί στην ύπαρξη δύο ξεχωριστών φάσεων μέσα στην σταγόνα κρυστάλλωσης (Παράρτημα 8.5, εδάφιο 8.5.3). Οι σταγόνες που παρέμειναν διαυγείς τις πρώτες 16 ώρες ανήκουν στις συνθήκες 6, 19, 29, 39, 43 και 47 από το Crystal Screen II. Οι συνθήκες αυτές διαθέτουν συνδυασμούς MPD με αλάτι ή 1.6-εξανοδιόλης με αλάτι. Η συνθήκη 6 αποτελείται από 1 M ιμιδαζολίου pH 7.0 και η 47 από 2 M χλωριούχου μαγνησίου σε ρυθμιστικό διάλυμα bicine pH 9.0. Ενώ το κοινό που έχουν οι συνθήκες 9 ως 14 που κατακρημνίζουν την HrpO χωρίς διαχωρισμούς φάσης είναι το χαμηλού pH ρυθμιστικό τους διάλυμα στα 4.6.

6.3.3 Χρωματογραφία Μοριακής Διήθησης

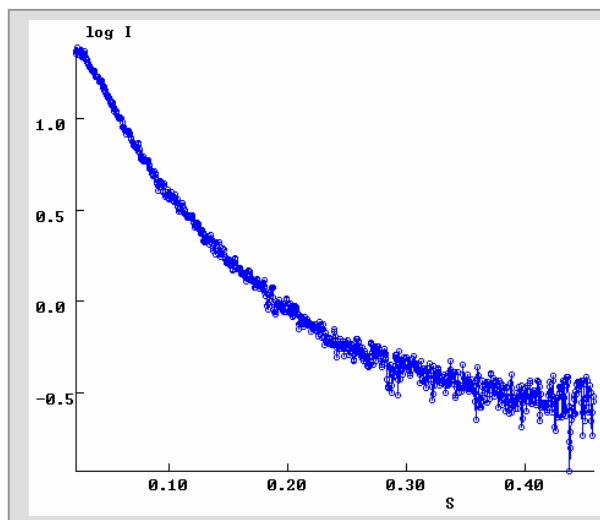
Κατά την υποβολή της HrpO σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης η πρωτεΐνη εκλούστηκε από τη στήλη παρουσιάζοντας μία ασύμμετρη κορυφή, η οποία αντιστοιχεί σε σωματίδιο φαινομενικού μοριακού βάρους 52 kD και σε υδροδυναμική ακτίνα $31.7 \text{ \AA} \pm 1.8$. Ασύμμετρες κορυφές δεν παρατηρήθηκαν κατά την διέλευση από την ίδια στήλη άλλων σφαιροειδών πρωτεϊνών όπως των πρωτεϊνών-μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την βαθμονόμηση της στήλης και των πρωτεϊνών AnrPphF ORF1, HrpG και HT-HrcQb. Επιπλέον η ορθότητα του πακεταρίσματος της στήλης είχε ελεγχθεί εξαρχής με την διέλευση 10 mg/ml ακετόνης. Η πρώιμη έκλυση της HrpO από την στήλη δηλώνει είτε την παρουσία της πρωτεΐνης ως ολιγομερές στο διάλυμα είτε μία σημαντικά εκτεταμένη διαμόρφωση της. Δεδομένου ότι τα πειράματα SAXS στη συνέχεια (Εδάφιο 6.3.5) μας καταδεικνύουν την ύπαρξη ενός μη σφαιροειδούς σωματιδίου στο διάλυμα η στήλη μοριακής διήθησης καταδεικνύει την εκτεταμένη διαμόρφωση της HrpO. Ο υδροδυναμικός όγκος της HrpO

εκτιμάται βάση της υδροδυναμικής της ακτίνας στα 137190 \AA^3 . Σύμφωνα με τις εξισώσεις του Uversky (2002) (Εδάφιο 2.4) για την εκτίμηση των διαφορετικών σταδίων δίπλωσης μιας πρωτεΐνης η HrpO κατατάσσεται στις εγγενείς προ-εύπλαστες σφαίρες (Pre-Molten Globules), (Εικόνα 6.17, εδάφιο 6.4.2).



Εικόνα 6.5 Αντιπροβαλλόμενα χρωματογραφήματα της πρωτεΐνης HrpO από την ίδια στήλη μοριακής διήθησης. Παρουσιάζεται η καταγραφή της απορρόφησης στα 280 nm. 9 διαφορετικά πειράματα σε διαφορετικά διαλύματα έκλυσης. Η HrpO παρουσιάζει μία κύρια ασύμμετρη κορυφή, ενώ σε περιπτώσεις απουσίας αναγωγικού ή διαλυτότητα της είναι μικρή και στην στήλη εμφανίζονται δύο κορυφές αντί για μία (πορτοκαλί και πράσινη καμπύλη). Το διάλυμα έκλυσης είναι 20 mM BisTrisPro pH 6.5 - 9.5, 200 mM NaCl, 1 mM DTT στις περιπτώσεις που παρουσιάζονται με μπλε, κόκκινο, ροζ και καφέ καμπύλη, τα 200 mM έχουν αντικατασταθεί από 700 mM στην γαλάζια καμπύλη, το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM BisTrisPro έχει αντικατασταθεί από 20 mM ιντρικών pH 5.6 για την ανοικτή πράσινη καμπύλη, ενώ έχει αντικατασταθεί από 20 mM φωσφορικών pH 7.5 στην περίπτωση της γκρι καμπύλης.

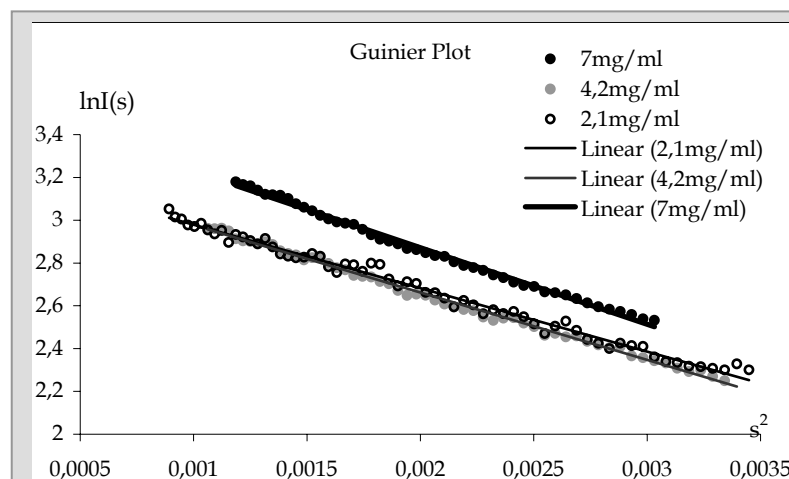
6.3.4 Παράμετροι σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες



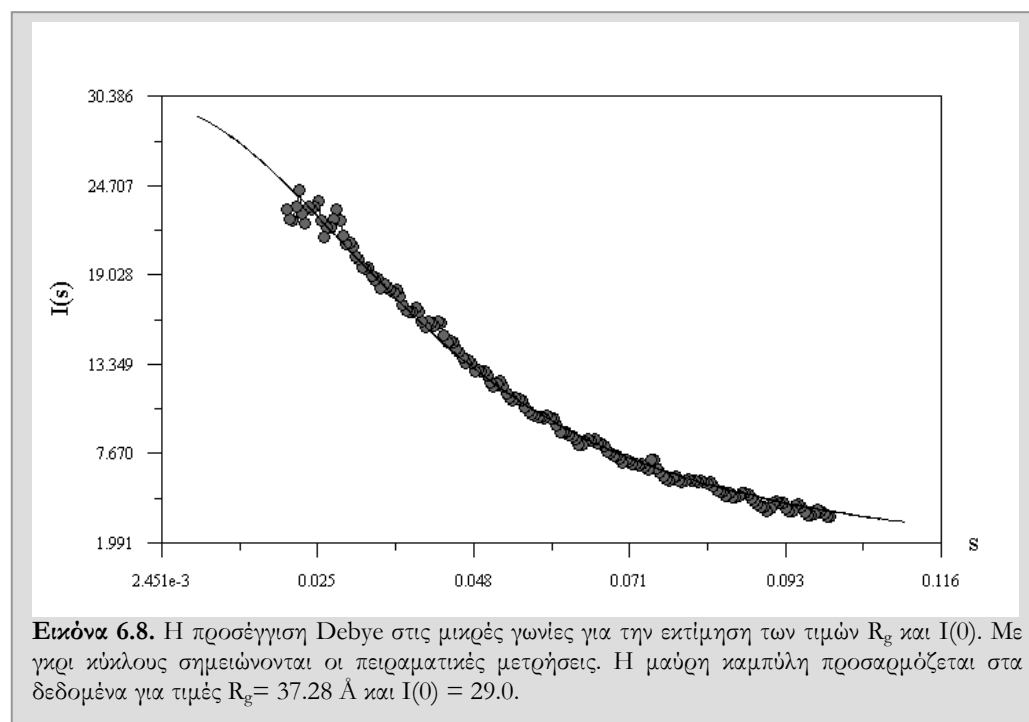
Εικόνα 6.6. Η τελική καμπύλη σκέδασης της HrpO από διάλυμα. Ο κάθετος άξονας αντιστοιχεί στον λογάριθμο των εντάσεων ενώ ο οριζόντιος στο άνωμα σκέδασης $s = (4\pi \sin 2\theta) / \lambda$ [$1/\text{\AA}$]. Η καμπύλη αποτελεί συγχώνευση διαφορετικών δειγμάτων συγκέντρωσης ως εξής: Για τις μικρές γωνίες (μικρές τιμές s , αριστερή πλευρά διαγράμματος) έχει χρησιμοποιηθεί η καμπύλη που προήλθε έπειτα από αναγωγή των δεδομένων σε άπειρη αραιώση και για τις ευρείες γωνίες (μεγάλες τιμές s δεξιά πλευρά διαγράμματος) το πιο συμπυκνωμένο δείγμα (7mg/ml) της HrpO

Η τελική καμπύλη σκέδασης της HrpO παρουσιάζεται στην εικόνα 6.6. Το κύριο χαρακτηριστικό της καμπύλης είναι η απουσία έντονων στοιχείων όπως παρατηρήθηκαν στις περιπτώσεις των άλλων πρωτεϊνών.

Η ένταση της σκέδασης στην μηδενική γωνία, $I(0)$, είναι ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας της μοριακής μάζας του μακρομορίου σε συγκεκριμένη τιμή της συγκέντρωσης του. Η γυροσκοπική ακτίνα, R_g , καθώς και η τιμή $I(0)$ μπορούν να προσδιοριστούν από την προσέγγιση Guinier: $\ln I(s)$ έναντι του s^2 (σελίδα 52). Η εικόνα 6.7 παρουσιάζει την προσέγγιση Guinier για διαφορετικές συγκεντρώσεις της HrpO. Παρατηρείται δε ότι υπάρχει μία εξάρτηση των τιμών της γυροσκοπικής ακτίνας από την συγκέντρωση του δείγματος και το ίδιο συμβαίνει και για τις τιμές $I(0)$. Η θετική κλίση στο διάγραμμα των τιμών της R_g έναντι των τιμών συγκέντρωσης είναι μία ένδειξη πιθανού ολιγομερισμού που εξαρτάται από την συγκέντρωση του δείγματος ή του σχηματισμού μη ειδικών συσσωματωμάτων της πρωτεΐνης. Η ένταση της σκέδασης από το διάλυμα είναι ευαίσθητη ακόμα και στην παρουσία ίχνους μεγάλων ολιγομερών ή συσσωματωμάτων. Μετά από εξαγωγή σε άπειρη αρραίωση (extrapolation to infinite dilution), η τελική τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας εκτιμάται στα 29.4 Å από την προσέγγιση Guinier. Η μοριακή μάζα της HrpO εκτιμάται από την τιμή της $I(0)$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή πρωτεΐνης μάρτυρα (BSA) σε 15 kD, κοντά στο μοριακό βάρος του μονομερούς. Η προσέγγιση Guinier ισχύει και στην περίπτωση μίας εκτεταμένης αλυσίδας αλλά το εύρος ισχύος της περιορίζεται σε ακόμα μικρότερες γωνίες όπου και περιορίζεται η πειραματική καταγραφή. Από την άλλη, η γυροσκοπική ακτίνα όταν εκτιμάται από την συνάρτηση κατανομής αποστάσεων συμπίπτει θεωρητικά με την πραγματική τιμή. Για την επεξεργασμένη καμπύλη της HrpO η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας όπως εκτιμάται από την συνάρτηση κατανομής αποστάσεων είναι 33 Å σημαντικά μεγαλύτερη από την τιμή που δίνει η προσέγγιση Guinier. Οι Pérez και συνεργάτες (2001) έδειξαν ότι σε περιπτώσεις έναρξης της μετάπτωσης από την διπλωμένη στην αδίπλωτη μορφή του σωματιδίου δεν μπορεί να εκτιμηθεί σωστά η R_g συναρτήση της $P(r)$. Ειδικά για την περίπτωση της HrpO χρησιμοποιήθηκε επιπλέον ο τύπος του Debye (Εδάφιο 2.7.2). Στην εικόνα 6.8 παρουσιάζεται η προσέγγιση των πειραματικών μετρήσεων με την εξίσωση του Debye. Η R_g εκτιμάται στα 37.28 Å και η τιμή του $I(0)$ στα 29.0.



Εικόνα 6.7 Η προσέγγιση Guinier για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της HrpO. Σε περιπτώσεις μονοδιάσπαρτων διαλυμάτων στις μικρές γωνίες πρέπει να εμφανίζεται ευθεία όταν χρησιμοποιείται η προσέγγιση Guinier. Το σημείο όπου οι ευθείες τέμνουν τον y άξονα αντιστοιχεί στην τιμή της $I(0)$ ενώ η κλίση της ευθείας αντιστοιχεί στην γυροσκοπική ακτίνα. Συγκεκριμένα το δείγμα 7 mg/ml φαίνεται να έχει γυροσκοπική ακτίνα 34.2 ± 0.143 Å και $I(0) = 38.133 \pm 0.216$. Το δείγμα 4.2 mg/ml έχει $R_g = 30.9 \pm 0.3$ Å και $I(0) = 27.011 \pm 0.3$. Τέλος το αραιό δείγμα 2.1mg/ml έχει $R_g = 29.5 \pm 0.4$ Å και $I(0) = 26.135 \pm 0.5$.



Σε όλες τις περιπτώσεις η γυροσκοπική ακτίνα είναι αρκετά μεγάλη για μία συμπαγή σφαιρική μονομερή πρωτεΐνη 150 αμινοξέων με αναμενόμενη ακτίνα γύρω στα 17 \AA , [Όπως υπολογίστηκε για το μοντέλο της HrpO από την ROSETTA (Εικόνα 2.4)]. Μία τελείως αδίπλωτη πρωτεΐνη 150 αμινοξέων θα είχε γυροσκοπική ακτίνα της τάξης των 41 \AA (Pérez *et al.*, 2001) κάτι που δεν ισχύει για την HrpO. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η HrpO βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση σε διάλυμα 20 mM BisTrisPro/HCl pH (6.5 ως 9.5), 200 mM NaCl, 2 mM DTT στους 13°C , αλλά διαθέτει κάποια υπολειμματική δομή. Επιπλέον χρησιμοποιώντας την προσέγγιση Guinier για ραβδοειδές σωματίδιο η γυροσκοπική ακτίνα της εγκάρσιας διατομής του σωματιδίου (R_{gCS}) υπολογίζεται στα $12.9 \text{ \AA} \pm 0.12$ και όχι στα 4, το οποίο και αντιστοιχεί στη μέση διάσταση των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, ενισχύοντας την παραπάνω παρατήρηση.

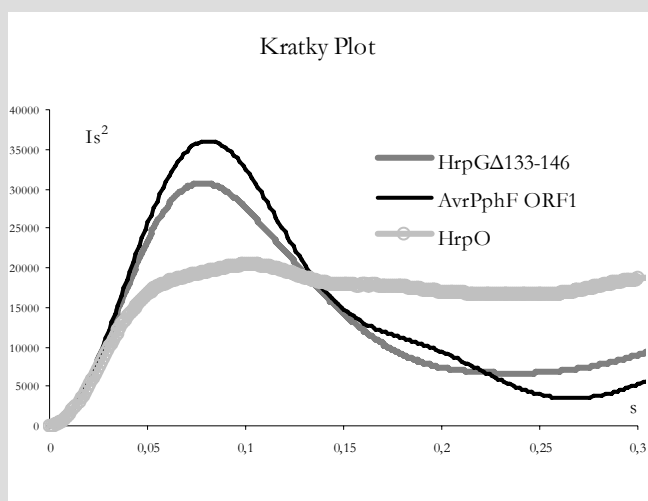
6.3.5 Διάγραμμα Kratky

Πληροφορία σχετικά με την σφαιρικότητα του σωματιδίου μπορεί να εξαχθεί άμεσα με την απλή παρατήρηση του διαγράμματος Kratky, σχεδιάζοντας την συνάρτηση $I(s)s^2$ έναντι του s . Διαφορετικοί τύποι σωματιδίου μπορούν να ταυτοποιηθούν εύκολα με αυτού του είδους την αναπαράσταση των δεδομένων σκέδασης από διάλυμα. Στις υψηλές γωνίες η ένταση της σκέδασης από ένα σφαιρικό σωματίδιο συμπεριφέρεται περίπου ανάλογα του $1/s^4$ (Porod, 1951) παράγοντας μία κωδωνοειδή καμπύλη φέρουσα καλά καθορισμένη κορυφή. Στην περίπτωση μίας αλυσίδας όμως το διάγραμμα Kratky μοιάζει να φτάνει σε ένα πλατό καθώς η $I(s)$ μεταβάλλεται ανάλογα του $1/s^2$ (τύπος Debye, εδάφιο 2.7.2). Τέλος στην περίπτωση μίας Kratky-Porod τύπου αλυσίδας χωρίς πάχος, το διάγραμμα Kratky διαθέτει επίσης πλατό (μεταβολή της έντασης ανάλογα του $1/s^2$) αλλά η περιοχή των μεγάλων γωνιών καταλαμβάνεται από μία μονοτονικά αυξανόμενη καμπύλη χαρακτηριστική της σκέδασης από σωματίδιο σχήματος ράβδου, (Kirste & Oberthur, 1982).

Στο διάγραμμα Kratky για τα δεδομένα σκέδασης της HrpO, η καμπύλη φτάνει σε ένα πλατό το οποίο εξακολουθεί και διατηρείται στις μεγαλύτερες τιμές του ανύσματος της σκέδασης. Η απουσία κωδωνοειδούς καμπύλης καταδεικνύει και την απουσία σφαιρικότητας για το υπό μελέτη σωματίδιο της HrpO στο διάλυμα. Η διατήρηση του πλατό και στις μεγαλύτερες τιμές του s συνεπάγεται την παρουσία υπολειμματικής δομής στο σωματίδιο καθώς δεν μπορεί να θεωρηθεί ως αλυσίδα τύπου Kratky-Porod.

Εικόνα 6.7. Διάγραμμα Kratky.

Παρουσιάζονται οι πειραματικές επεξεργασμένες καμπύλες σκέδασης από διάλυμα των πρωτεϊνών HrpGΔ133-146, AvrPphF ORF1 και HrpO. Στις πρωτεΐνες HrpGΔ133-146 και AvrPphF ORF1 παρατηρούμε καλά καθορισμένες κορυφές που καταδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι σφαιρικές ενώ η καμπύλη της HrpO παρουσιάζει πλατό. Παρόλα αυτά αν και όχι σφαιροειδής η HrpO φαίνεται να διαθέτει κάποια υπολειμματική δομή αφού δεν παρουσιάζει μονοτονικά αυξανόμενη καμπύλη.

**6.3.6 Ab initio καθορισμός του σχήματος της HrpO στους 13°C**

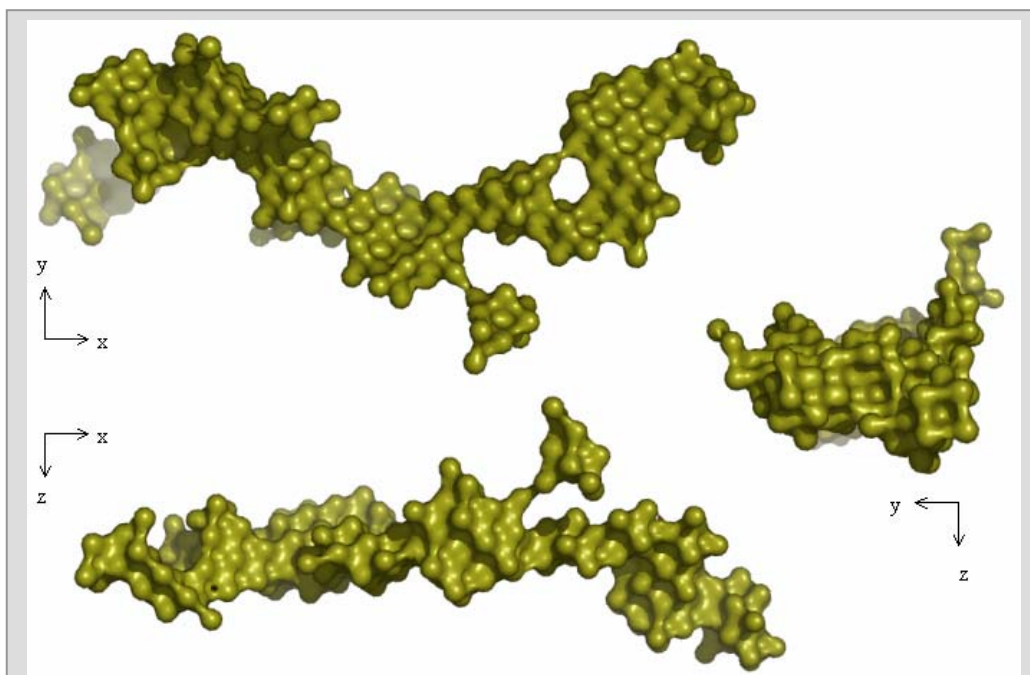
Κατά τις προσπάθειες καθορισμού του γενικού σχήματος της HrpO μέσω προσομοίωσης απόπτωσης (simulation annealing) οι ανά ζεύγη υπερθέσεις των παραγόμενων μοντέλων έδωσαν υψηλές τιμές MNSD, μαρτυρώντας ασταθείς ανασυστάσεις. Στον πίνακα 6.3 παρουσιάζονται οι διάφορες προσπάθειες από διαφορετικές επεξεργασίες των δεδομένων και διαφορετικούς υπολογισμούς της συνάρτησης $p(r)$.

Πίνακας 6.3

Επεξεργασία / D_{max}	x	Αριθμός Μοντέλων	MNSD	Συμμετρία	Ανισομετρία
6-05, gnom.out, 105 Å	0.7696	13	1.132 ± 0.046	P1	Άγνωστη
7-06, gnom109.out 109 Å	1.333	10	1.023 ± 0.023	P1	Άγνωστη
	1.328	12	1.328 ± 0.440	P1	Ωοειδές
7-05, gnom110.out 110 Å	0.7794	6	1.348 ± 0.018	P1	Άγνωστη
	0.7789	9	1.173 ± 0.054	P1	Άγνωστη
6-05, gnom.out 110 Å	1.285	15	0.834 ± 0.025	P1	Άγνωστη
	1.285	15	0.785 ± 0.015	P1	Ωοειδές

Πίνακας 6.3 Διαφορετική επεξεργασία δεδομένων που οδήγησε σε διαφορετικά μοντέλα με αρκετά υψηλές τιμές MNSD.

Ο καθορισμός του γενικού σχήματος της HrpO σε καθεμία από τις περιπτώσεις του πίνακα 6.3 πραγματοποιήθηκε μέσω ψευδών ατόμων (DAMMIN, εδάφια 2.7.5 και 2.7.8). Εκτελέστηκαν ανεξάρτητες ανασυστάσεις εντός σφαιρικού όγκου έρευνας με διάμετρο 105-110 Å. Η μέγιστη διάμετρος του μακρομορίου εκτιμήθηκε μέσω του έμμεσου μετασχηματισμού Fourier (εδάφιο 2.7.4) για τον υπολογισμό της συνάρτησης κατανομής απόστασης. Το πιθανότερο μοντέλο που υπολογίζεται από την σύγκριση 10 μοντέλων ψευδών ατόμων για την περίπτωση μέγιστης διαμέτρου 109 Å, έχοντας αναγάγει τα δευτερογενή δεδομένα ώστε να εξαχθούν οι αναμενόμενες τιμές σε συνθήκες άπειρης διάλυσης (extrapolation to zero concentration) της πρωτεΐνης (περίπτωση 2^{ης} σειρά, πίνακα 6.3) παρουσιάζεται στην εικόνα 6.8.



Εικόνα 6.8. Τρεις κάθετες μεταξύ τους απόψεις του πιθανότερου μοντέλου της HrpO όπως υπολογίζεται από 10 ανεξάρτητες ανακατασκευές του DAMMIN, σύγκριση των μοντέλων στο SUPCOMB, παραγωγή του συνολικού όγκου κάλυψης από το DAMAVER και φιλτράρισμα για την εύρεση του πιο πιθανού μοντέλου από το DAMFILT (εδάφια 2.7.5 και 2.7.8). Στα αρχικά μοντέλα δεν δόθηκαν περιορισμοί συμμετρίας. Η απεικόνιση έγινε μέσω του προγράμματος γραφικών PyMOL (DeLano Sc.) για χωροπληρωτικό μοντέλο.

Τα μοντέλα που παρήχθησαν με την μέθοδο προσομοίωσης ανόπτησης (simulation annealing) εξετάστηκαν επίσης με το πρόγραμμα HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) για να εκτιμηθούν από αυτά οι τιμές της υδροδυναμικής και γυροσκοπικής τους ακτίνας, ο όγκος που καταλαμβάνουν και η μέγιστη διάμετρος τους. Στον πίνακα 6.4 οι τιμές αυτές παρουσιάζονται συνολικά μαζί με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές είτε από τα δεδομένα της σκέδασης σε μικρές γωνίες είτε από τη συμπεριφορά της πρωτεΐνης στη στήλη μοριακής διήθησης.

Πίνακας 6.4 Υδροδυναμικές Παράμετροι και Παράμετροι Σκέδασης Μικρών Γωνιών από πειραματικά δεδομένα καθώς και υπολογιζόμενα από τα μοντέλα των DAMMIN και GASBOR για την πρωτεΐνη HrpO.

Παράμετροι	Πειραματικές τιμές	DAMMIN (πιθανότερο μοντέλο)	DAMMIN από DAMSTART	GASBOR (gasE4)
R_g (Å) Guinier*	29.4			
R_g (Å) **	33	31.1	31.9	31.1
D_{max} (Å) **	109	110	113	98.2
R_h (Å)	31.7 ± 1.7	27.9	30.3	27.5
V (Å ³)	22564	22560	24690	14400

*Η τιμή της γυροσκοπικής ακτίνας (R_g) προερχόμενη από την προσέγγιση Guinier.

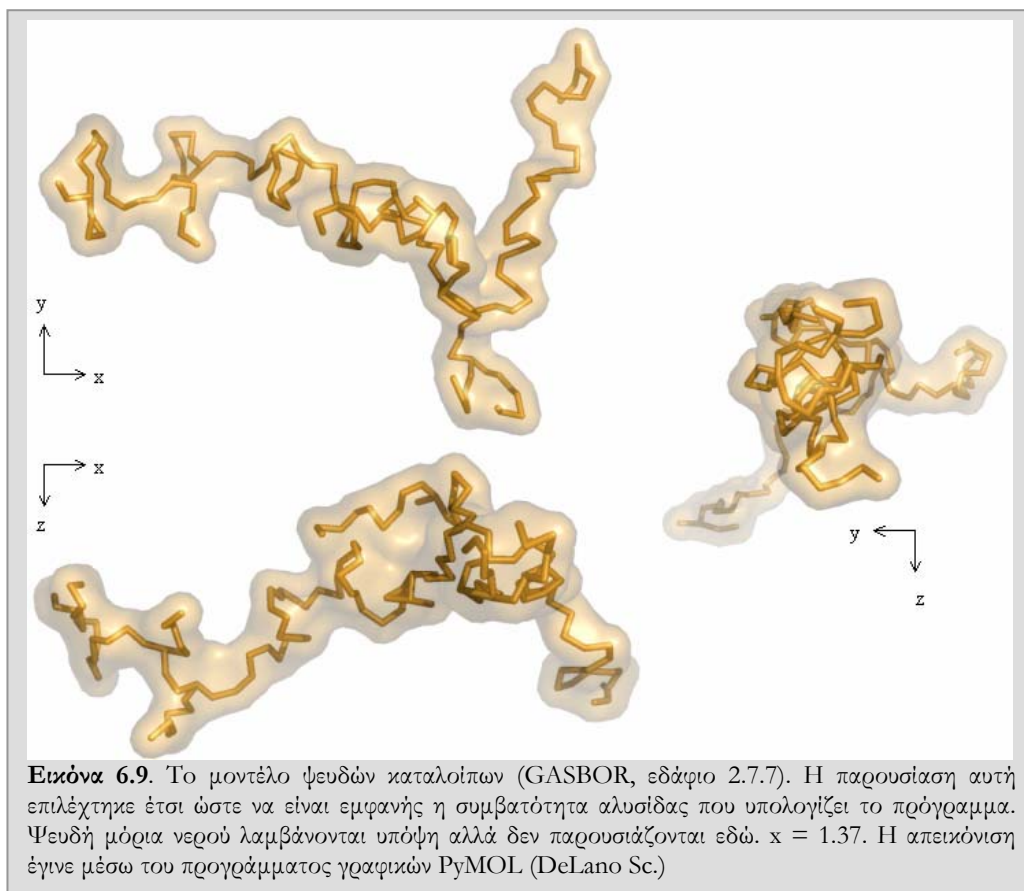
** Οι τιμές της R_g και μέγιστης διαμέτρου (D_{max}) εκτιμώμενες από την συνάρτηση κατανομής $\rho(r)$ μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier

R_h είναι η υδροδυναμική ακτίνα εκτιμώμενη πειραματικά από την στήλη μοριακής διήθησης.

Οι τιμές των R_g , R_h , D_{max} και V από τα μοντέλα εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).

Μοντέλα του σωματιδίου της HrpO κατασκευάστηκαν επίσης και με χρήση ψευδών καταλοίπων (GASBOR, εδάφιο 2.7.8). Παρήχθησαν συνολικά δέκα μοντέλα και ακολούθησε η ανά ζεύγη υπέρθεση τους για τον καθορισμό της τιμής της μέσης κανονικοποιημένης

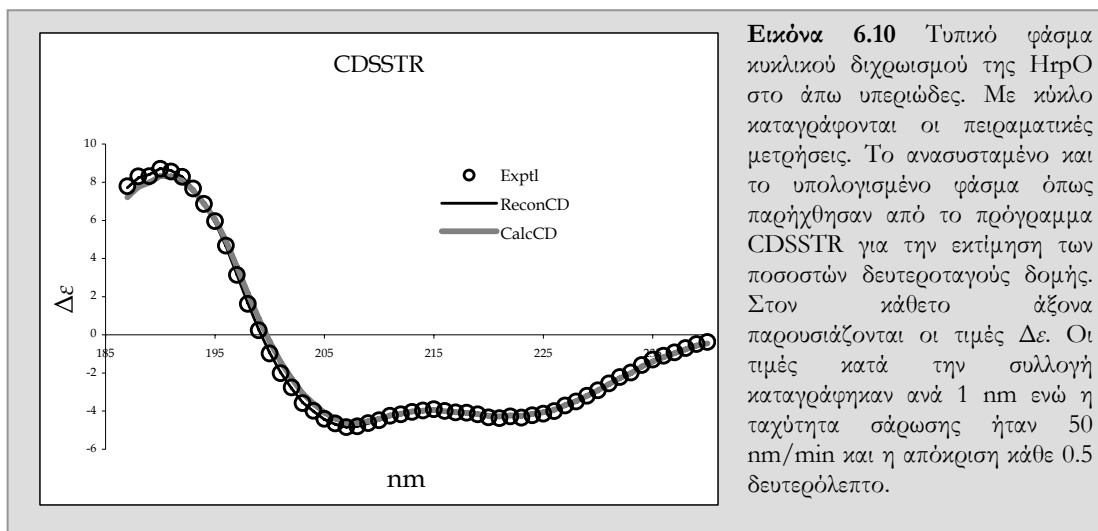
χωρικής ασυμφωνίας. Η τιμή MNSD βρέθηκε να ισούται με 1.6, επίσης εξαιρετικά υψηλή, γεγονός που δηλώνει την αστάθεια των παραγόμενων μοντέλων. Το μοντέλο με την μικρότερη ασυμφωνία από τα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζεται στην εικόνα 6.9.



6.3.7 Εκτίμηση ποσοστών δευτεροταγούς δομής

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο των υλικών και μεθόδων του παρόντος κεφαλαίου. Τα φάσματα παρουσιάζουν τα τυπικά ελάχιστα που απαντούνται σε περιπτώσεις δομών που φέρουν α -έλικες, στα 207 και 222 nm. Τα ποσοστά της δευτεροταγούς δομής εκτιμήθηκαν με τα προγράμματα SELCON3, CDSSTR και CONTILL μέσω του CDPPO για όλες τις περιπτώσεις των διαφορετικών συλλογών (εδάφιο 2.9.2.1). Στον πίνακα 6.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για δύο διαφορετικές συλλογές. Στην συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σαν σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς το SMP50 μέσω του CDPPO που περιλαμβάνει 37 διαλυτές πρωτεΐνες και 13 μεμβρανικές (Sreerama & Woody, 2004). Το χρήσιμο εύρος μήκους κύματος ήταν από 185 ως τα 240 nm. Στην πρώτη συλλογή φάσματος, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 6.4, στο άπω υπεριώδες το πείραμα έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου ενώ το αρχικό δείγμα της HrpO αραιώθηκε με διάλυμα 20 mM φωσφορικών pH 7.5 ως τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.05 mg/ml. Στην δεύτερη συλλογή ελέγχθηκε η θερμοκρασία με την χρήση του οργάνου Peltier και τα φάσματα συλλέχθηκαν στους 12°C ενώ το δείγμα της HrpO είχε εκτεταμένα υποστεί διαπύδιση σε διάλυμα 20 mM Tris/Βορικό pH 8.3. Παρότι στα δύο αυτά ανεξάρτητα πειράματα εμπλέκονται διαφορετικά διαλύματα, στα οποία θα μπορούσε να αποδοθεί η διαφορά που παρουσιάζεται στα ποσοστά δευτεροταγούς δομής, τελικά αποδείχθηκε ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο συλλογών αντικατόπτριζαν την διαφορετική θερμοκρασία συλλογής των φασμάτων (εδάφιο 6.3.9). Στην εικόνα 6.10 παρουσιάζεται το τυπικό φάσμα της HrpO για την περίπτωση της πρώτης συλλογής και η ανασύσταση του από

το πρόγραμμα CDSSTR για 47.5 % α -έλικια, 12.7 % β -κλώνο 15.8 % στροφή και 24.2 % τυχαίο σπείραμα (πίνακας 6.4, 3^η σειρά).



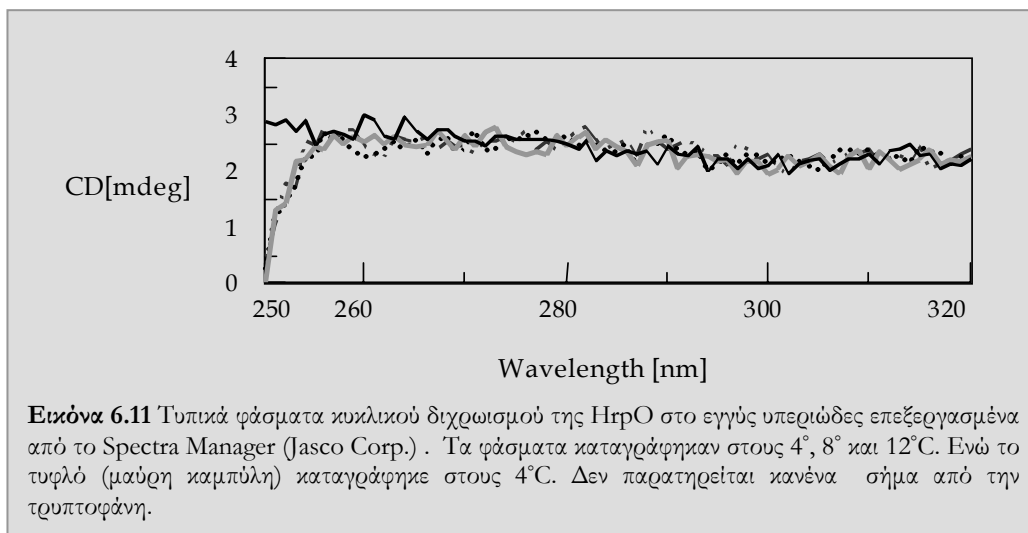
Εικόνα 6.10 Τυπικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού της HrpO στο άπω υπεριώδες. Με κύκλο καταγράφονται οι πειραματικές μετρήσεις. Το ανασυσταμένο και το υπολογισμένο φάσμα όπως παρήχθησαν από το πρόγραμμα CDSSTR για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής. Στον κάθετο άξονα παρουσιάζονται οι τιμές $\Delta\epsilon$. Οι τιμές κατά την συλλογή καταγράφηκαν ανά 1 nm ενώ η ταχύτητα σάρωσης ήταν 50 nm/min και η απόκριση κάθε 0.5 δευτερόλεπτο.

	H(r)	H(d)	S(r)	S(d)	T	U	RMSD
SELCON3	23.8%	17.6%	6.5%	5.9%	18.6%	27.8%	1.395
CDSSTR	28.6%	18.9%	6.3%	6.4%	15.8%	24.2%	0.262
CONTILL	28.4%	19.6%	0.0%	4.7%	17.4%	30.0%	0.059
SELCON3	44.8%	20.5%	2.3%	2.4%	11.3%	21.1%	2.498
CDSSTR	44.0%	23.9%	2.8%	3.2%	5.8%	18.9%	0.444
CONTILL	36.7%	21.6%	0.2%	3.4%	12.0%	26.1%	0.24

Πίνακας 6.5 Δύο διαφορετικές συλλογές φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες και τα ποσοστά δευτεροταγούς δομής όπως προκύπτουν από την ανάλυση διαφορετικών προγραμμάτων SELCON3, CDSSTR και CONTILL. H(r): Τακτική α -έλικια, H(d): Παραμορφωμένη α -έλικια, S(r): Τακτικός β -κλώνος, S(d): Παραμορφωμένος β -κλώνος, T: Στροφή, U: τυχαίο σπείραμα. RMSD: Μέση Τετραγωνική Ρίζα Απόκλισης του ανασυσταμένου φάσματος από το πειραματικό (εδάφιο 2.9.2.1.)

6.3.8 Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της HrpO στο Εγγύς Υπεριώδες

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται στην παράγραφο των υλικών και μεθόδων του παρόντος κεφαλαίου. Η HrpO διαθέτει μόνο μία τρυπτοφάνη στην υπ' αριθμό 88 θέση της αλληλουχίας της, ενώ δεν διαθέτει καθόλου κατάλοιπα φαινυλαλανίνης ή τυροσίνης. Η καταγραφή του φάσματος στο εγγύς υπεριώδες θα μας έδειχνε αν αυτή η τρυπτοφάνη διαθέτει οργανωμένο περιβάλλον (εμφάνιση ζώνης πλησίον της περιοχής των 290 nm) ή είναι εκτεθειμένη στο διάλυμα. Στα φάσματα που συλλέχθηκαν όμως στο εγγύς υπεριώδες για την HrpO δεν διαφαίνεται οποιοδήποτε σήμα και τα φάσματα της πρωτεΐνης μοιάζουν με αυτό που προκύπτει από σκέτο διάλυμα (τυφλό δείγμα), (Εικόνα 6.11). Έτσι συμπεραίνουμε ότι η W88 βρίσκεται εκτεθειμένη στο διάλυμα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται σε θερμοκρασία 4 -12°C.

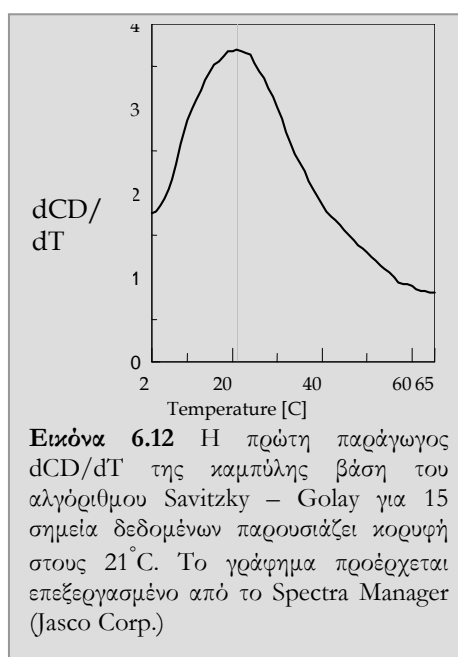


6.3.9 Θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpO

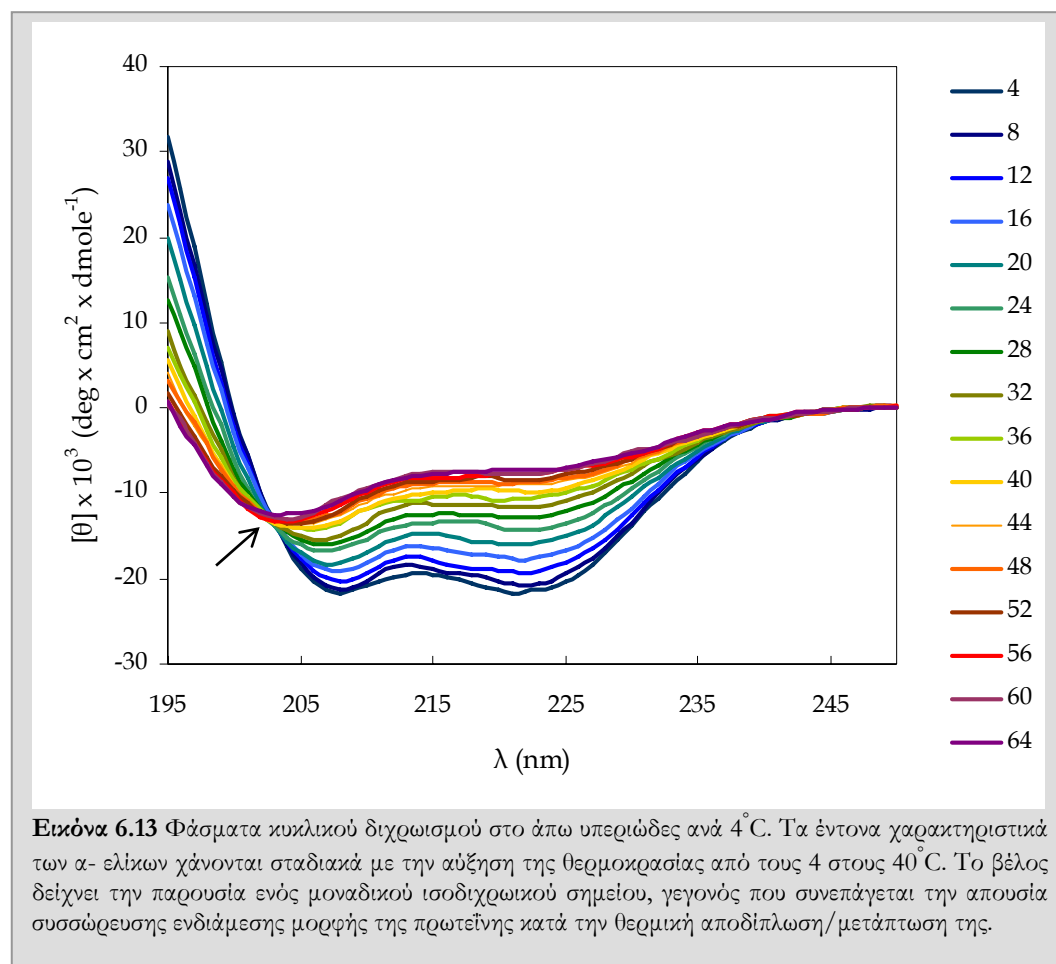
Η θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpO καταγράφηκε μέσω κυκλικού διχρωισμού σε μήκος κύματος 222 nm για το εύρος θερμοκρασιών 2 – 65°C. Η ανάλυση και η προσέγγιση της πειραματικής καμπύλης έγινε με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (Denature Protein Analysis Program, Jasco Corp.). Η εκτίμηση της θερμοκρασίας μετάπτωσης βάσει της παραπάνω προσέγγισης ήταν $(T_m) = 16.15^\circ\text{C} \pm 0.44$.

Εκτός από την προσέγγιση των πειραματικών δεδομένων για τον υπολογισμό των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών εξετάστηκε και η πρώτη παράγωγος της καμπύλης σε σχέση με την θερμοκρασία για τον έλεγχο του ρυθμού μεταβολής και τον ανεξάρτητο προσδιορισμό της θερμοκρασίας μετάπτωσης (Εικόνα 6.12). Σε όλα τα πειράματα που έλαβαν χώρα, σε διαφορετικά διαλύματα και εύρη pH από 6.5 ως 9.5 καθώς και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις η HrpO φαίνεται να παρουσιάζει την ίδια χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης.

Για την περαιτέρω μελέτη της αποδιάταξης καταγράφηκαν φάσματα στο άπω υπεριώδες ανά 4°C με σκοπό την εφαρμογή της Ανάλυσης Ιδιαζουσών Τιμών. Η τελευταία εκτιμά τον αριθμό διαφορετικών συστατικών/καταστάσεων της πρωτεΐνης κατά την μετάπτωση. Συνολικά καταγράφηκαν 16 φάσματα ενώ για το κάθε φάσμα καταγραφόταν η πειραματική τιμή του κυκλικού διχρωισμού ανά μήκος κύματος (συνολικά 56 διαφορετικά μήκη κύματος ανά φάσμα). Στην εικόνα 6.13 παρουσιάζονται τα φάσματα αυτά στις διαφορετικές θερμοκρασίες. Η παρουσία ενός μόνο ισοδιχρωικού σημείου δηλώνει την μετάπτωση της HrpO από την μία μορφή στην άλλη χωρίς την συσσώρευση ενδιάμεσου πληθυσμού (εδάφιο 2.9.2.3.1). Ακολούθως ορίστηκε ο πίνακας A με στοιχεία 56 x 16. Κάθε στήλη του πίνακα αποτελείται από 56 τιμές που αντιστοιχούν στις πειραματικές τιμές κυκλικού διχρωισμού ανά nm για το εύρος μήκους κύματος 195 – 250 nm σε δεδομένη θερμοκρασία. Κάθε γραμμή του πίνακα αποτελείται από 16 τιμές που αντιστοιχούν στις πειραματικές τιμές κυκλικού



διχρωισμού ανά 4°C για το εύρος θερμοκρασιών 4 - 64°C σε δεδομένο μήκος κύματος. Έτσι το στοιχείο α_{ij} του πίνακα A αντιστοιχεί στην τιμή του σήματος κυκλικού διχρωισμού σε $\lambda = (194+i)$ nm και $T = (4 \times j)$ °C. Η Ανάλυση Ιδιαζουσών Τιμών έλαβε χώρα θεωρώντας αρχικά 16 κύριες συνιστώσες (όσες και οι στήλες του πίνακα A) και αναλύοντας τον πίνακα A στους πίνακες UWVT, (Εδάφιο 2.9.2.3.2). Στον πίνακα 6.5 παρατίθενται οι ιδιάζουσες τιμές και οι ιδιοτιμές για τις 16 κύριες συνιστώσες. Οι Ιδιάζουσες τιμές είναι οι θετικές μη μηδενικές τιμές του διαγώνιου πίνακα W (Εδάφιο 2.9.2.3.2). Από τον πίνακα παρατηρούμε ότι μόνο οι δύο πρώτες τιμές είναι σημαντικές.

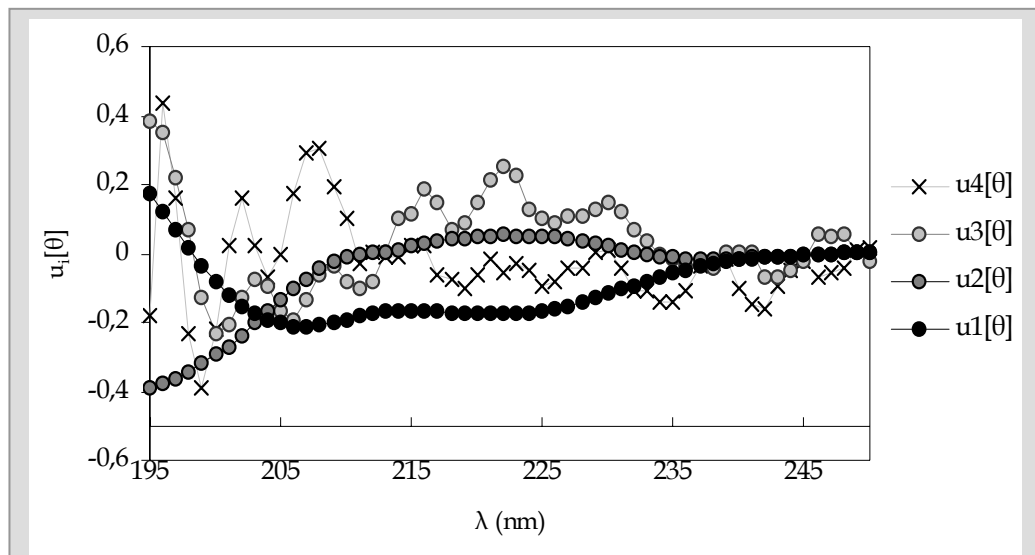


Ιδιάζουσες τιμές	Ιδιοτιμές	Ιδιοτιμές Αθροιστικά
304.1302	92495.16	0.948876
70.44711	4962.795	0.999788
2.32321	5.397304	0.999843
1.991168	3.964751	0.999884
1.602897	2.569279	0.99991
1.404579	1.972842	0.999931
1.251376	1.565942	0.999947
1.198614	1.436676	0.999961
1.00784	1.015742	0.999972
0.882127	0.778149	0.99998
0.738457	0.545319	0.999985
0.622413	0.387398	0.999989
0.612958	0.375718	0.999993
0.559968	0.313564	0.999996
0.457355	0.209174	0.999999
0.368707	0.135945	1

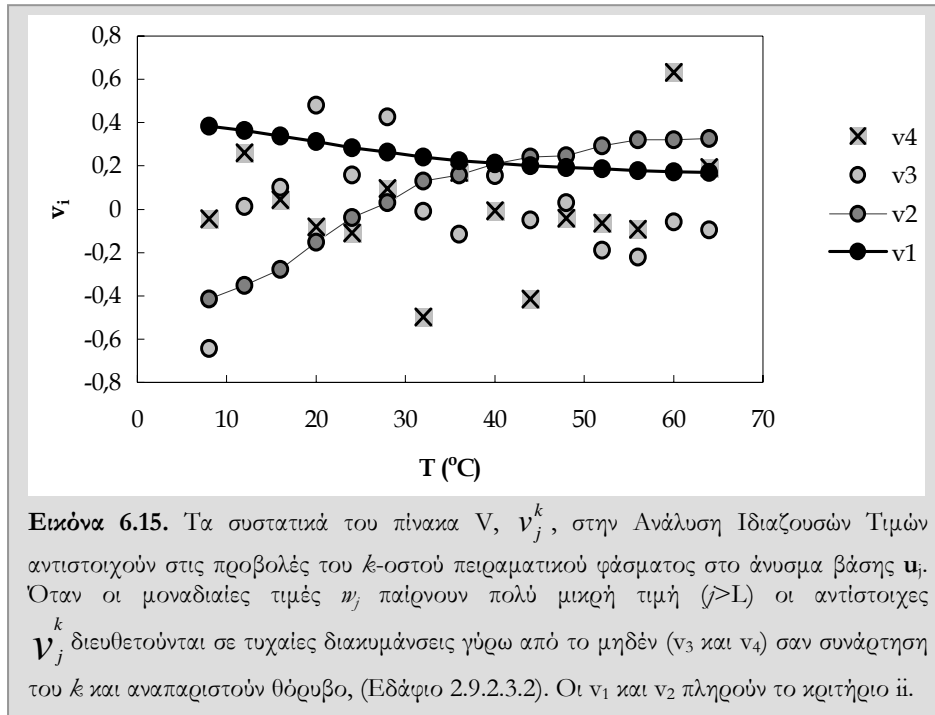
Πίνακας 6.5 Ιδιάζουσες τιμές και Ιδιοτιμές της Ανάλυσης Ιδιαζουσών τιμών / SVD για τα δεδομένα θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης της H_γO. Από τις 16 συνιστώσες που χρησιμοποιήθηκαν για την Ανάλυση Ιδιαζουσών Τιμών μόνο οι δύο εξ αυτών συμμετέχουν σημαντικά στην αναδόμηση των φασμάτων, καθώς οι υπόλοιπες φαίνεται να χαρακτηρίζονται από αμελητέες Ιδιάζουσες τιμές και Ιδιοτιμές και να αναπαριστούν θόρυβο. Οι Ιδιάζουσες τιμές αποτελούν την θετική τετραγωνική ρίζα των ιδιοτιμών. Η ανασύσταση του πίνακα A και άρα των πειραματικών φασμάτων μπορεί να επιτευχθεί πλήρως (κατά 99.9788 %) με την χρήση μόνο δύο κύριων συνιστωσών.

Εν συνεχεία αξιολογούνται ποιοτικά για επιβεβαίωση τα φάσματα βάσης. Τα φάσματα βάσης είναι οι στήλες του πίνακα U. Στην εικόνα 6.14 παρατίθενται τα φάσματα βάσης u_1 έως u_4 στα οποία αντιστοιχούν οι τέσσερις μεγαλύτερες Ιδιάζουσες τιμές του πίνακα W. Είναι φανερό ότι μόνο τα u_1 και u_2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναδόμηση των πειραματικών φασμάτων ενώ τα u_3 και u_4 πιθανώς αναπαριστούν θόρυβο.

Τα συστατικά του πίνακα V, v_j^k , που αντιστοιχούν στις προβολές του k -οστού πειραματικού φάσματος στο άνυσμα βάσης u_j , παρουσιάζονται επίσης στην εικόνα 6.15.

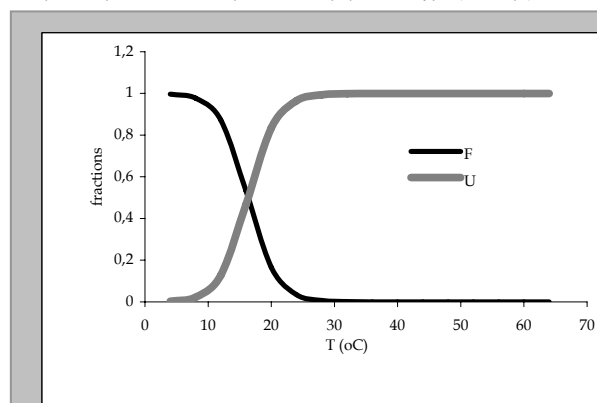


Εικόνα 6.14. Τα φάσματα βάσης της Ανάλυσης Ιδιαζουσών Τιμών, u_1 έως u_4 , που έλαβε χώρα για την θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της H_γO. Τα u_1 και u_2 εμφανίζουν «λογική» εικόνα αν και δεν αποτελούν πραγματικά φάσματα. Ιδιαίτερα το u_1 παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά ελάχιστα των α-ελίκων πλησίον των τιμών 207 και 222 nm. Τα u_3 και u_4 δεν παρουσιάζουν κάποιο χαρακτηριστικό πρότυπο και φαίνεται οι τιμές τους να κατανέμονται σχεδόν τυχαία γύρω από το μηδέν. Αυτά τα φάσματα βάσης απορρίπτονται (κριτήριο iii, εδάφιο 2.9.2.3.1), και κατά συνέπεια οι διαφορετικές συνιστώσες της ανάλυσης είναι μόνο 2.



Η Ανάλυση Ιδιαζουσών Τιμών καταδεικνύει την ύπαρξη δύο μορφών κατά την θερμοεπαγόμενη αποδιάταξη της HrpO. Κατά συνέπεια δεν συσσωρεύεται ενδιάμεση μορφή κατά την μετάπτωση της πρωτεΐνης από την μία κατάσταση στην άλλη. Η αρχική προσέγγιση της καμπύλης μετάπτωσης μέσω του προγράμματος Denatured Protein Analysis (Jasco Corp.), η οποία στηρίζεται σε μοντέλο μετάπτωσης δύο καταστάσεων, περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως έχει για τον υπολογισμό των ποσοστών 'αποδιατεταγμένης' (U) και 'διπλωμένης' (F) μορφής της HrpO σε κάθε θερμοκρασία. Εικόνα 6.16.

Η εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής για την HrpO στους 4°C (CDPro) είναι 53.9 - 59.9% α -έλικια, 4.5 - 9.0% β -κλώνος, 10.7 - 15.2% β -στροφή και 20.6 - 26.7% τυχαίο σπείραμα. Η ίδια ανάλυση ενός καταγεγραμμένου φάσματος στους 64°C δίνει 15.9 - 18.4% α - έλικια, 26.6 - 27.9% β -κλώνο, 21.5 - 23% β -στροφή και 32 - 34.6% τυχαίο σπείραμα. Γενικά παρατηρείται η μείωση των ποσοστών των α -ελίκων ενώ αυξάνουν όλες οι άλλες μορφές. Η μείωση του ποσοστού α -ελίκων είναι ορατή άμεσα με την σταδιακή απαλειφή των χαρακτηριστικών ελαχίστων στα 207 και 222 nm του φάσματος (εικόνα 6.13). Μία ελάχιστη κορυφή που φαίνεται να διατηρείται ως και τους 90°C εμφανίζεται στα 202 nm και όχι κάτω από τα 200 nm γεγονός που ερμηνεύεται από τα προγράμματα ανάλυσης δευτεροταγούς δομής σαν β -κλώνος. Παρόλα αυτά αν χρησιμοποιηθεί άλλο σύνολο πρωτεϊνών αναφοράς από το CDPro, όπως το σύνολο SP22X (Johnson, 1999) που περιλαμβάνει 22 διαλυτές πρωτεΐνες και χρησιμοποιεί τους προσδιορισμούς δευτεροταγών στοιχείων από το XTLSSTR πρόγραμμα (King & Johnson, 1999), δίνοντας διαφορετικές εκχωρήσεις δευτεροταγούς δομής



Εικόνα 6.16. Ποσοστά παρουσίας αποδιπλωμένης (U) και διπλωμένης (F) μορφής της HrpO στις διάφορες θερμοκρασίες. Τα κλάσματα υπολογίστηκαν βάση της σταθεράς αποδιπλώσης K . Στην θερμοκρασία μετάπτωσης ισχύει η παρουσία ισοδύναμου ποσοστού αποδιπλωμένης και διπλωμένης πρωτεΐνης καθώς και ότι $\ln K=0$.

παρατηρούμε τα εξής: όσο αφορά τα φάσματα στους 4°C τα ποσοστά α-έλικας είναι 50.6 - 54.3% σε συμφωνία με την ανάλυση βάση των άλλων πρωτεϊνικών συνόλων αναφοράς αλλά οι β-κλώνοι είναι 0.1 - 6.6% ενώ 8.9 - 11.2% παρουσιάζονται τα ποσοστά 3-10 έλικας, 6.3 - 9.5% β-στροφής, 2.7 - 7.6% έλικας τύπου πολυ-προλίνης II και 19.4 - 22.9% τα ποσοστά τυχαίου σπειράματος. Στην περίπτωση των 64°C τα ποσοστά α-έλικας είναι 7.9 - 15.1%, λίγο χαμηλότερα από ότι υπολογίζονται με βάση τα άλλα πρωτεϊνικά σύνολα αναφοράς, ενώ οι β-κλώνοι έχουν αυξημένα ποσοστά σε σχέση με αυτά στους 4°C (10.2 - 15.7%) αλλά δεν φτάνουν τα ποσοστά β-κλώνων που δίνονται με βάση τα άλλα σύνολα αναφοράς. Αυξημένες σε σχέση με τους 4°C παρουσιάζονται οι β-στροφές, οι έλικες τύπου πολυ-προλίνης II και τα ποσοστά τυχαίου σπειράματος, ενώ εκτός από τα ποσοστά α-ελίκων έχουν μειωθεί και τα ποσοστά που αποδίδονται στις 3-10 έλικες.

6.4 Συμπεράσματα

6.4.1 Η HrpO παρουσιάζει αναλογίες με τις πρωτεΐνες YscO και FliJ

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την αλληλουχία της HrpO αφορούν κυρίως την κατάσταση δίπλωσης της και όχι με την κατάδειξη στενών σχέσεων με άλλες γνωστές πρωτεΐνες μέσω αμινοξικής ομοιότητας. Τα υψηλά ποσοστά φορτισμένων αμινοξέων και τα χαμηλά ποσοστά υδρόφοβων που την χαρακτηρίζουν φαίνεται να αποτελούν γνώρισμα και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια εντοπιζόμενα ύστερα από το γονίδιο της ATPάσης σε άλλα εκκριτικά συστήματα τύπου III καθώς και στην περίπτωση του μαστιγίου (Πίνακας 6.6). Το πρόγραμμα FoldIndex αποδίδει σημαντικά αρνητικές τιμές στις αλληλουχίες των HrpO, YscO και FliJ (Πίνακας 6.6). Οι αρνητικές αυτές τιμές δεν εμπίπτουν στα όρια ήδη χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών ως εγγενή προ-εύπλαστες σφαίρες, παρά φαίνεται να εμπίπτουν στο μεγαλύτερο σύνολο των εγγενώς τυχαίων σπειραμάτων (coils), (Uversky, 2002). Συνήθως σε τέτοιες περιπτώσεις η εξέταση της αλληλουχίας για προβλεπόμενα χαρακτηριστικά δευτεροταγούς δομής ξεκαθαρίζει αν πρόκειται για εγγενώς αδίπλωτο μόριο ή προ-εύπλαστη σφαίρα. Στην πρώτη περίπτωση δεν αναμένεται να προβλεφθούν δευτεροταγή στοιχεία ενώ στην δεύτερη περίπτωση προβλέπεται ένας μικρός αριθμός. Κατά τον έλεγχο των αλληλουχιών των πρωτεϊνών HrpO, YscO και FliJ προβλέφθηκε χαρακτηριστικά ότι το 85% των καταλοίπων και των τριών αλληλουχιών βρίσκονται σε διαμόρφωση α-έλικας. Τα ποσοστά της πρόβλεψης είναι σημαντικά για να δεχθούμε την κατάσταση εγγενών αδίπλωτων πρωτεϊνών με την μορφή τυχαίου σπειράματος όπως καθορίζεται από τις τιμές του εργαλείου FoldIndex. Ίσως δε, αρκετά υψηλά για να αντιμετωπίσουμε με σκεπτικισμό ακόμα και την κατάσταση προ-εύπλαστη σφαίρα για τις υπό μελέτη αλληλουχίες. Η πρόβλεψη υψηλών ποσοστών δευτεροταγούς δομής για τις πρωτεΐνες αυτές ίσως οφείλεται στα υψηλά ποσοστά καταλοίπων λευκίνης που διαθέτουν οι υπό εξέταση αλληλουχίες, {10.8 % κατάλοιπα λευκίνης στην περίπτωση της HrpO, 11 % στην YscO και 10.9 (αλληλουχία με κωδικό πρόσβασης Entrez: P52613) με 11.9 % (κ.π. Entrez: Q8ZF90) στην περίπτωση της FliJ}, σε σύγκριση με τα χαμηλότερα ποσοστά που συναντούνται στην περίπτωση των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών (5.44 %), (Tompa, 2002). Ο μέσος όρος παρουσίας καταλοίπων λευκίνης στις σφαιρικές πρωτεΐνες είναι 9 % (Creighton, 1993), ενώ η πρωτεΐνη ROP, που έχει εκτεταμένα μελετηθεί στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας του Πανεπιστημίου Κρήτης αποτελώντας ένα πρότυπο 4-α-ελικοειδές δερμάτιο, διαθέτει 15.9 % κατάλοιπα λευκίνης.

Πειραματικά, η ασύμμετρη κορυφή που παρουσιάζεται σε φαινομενικό μοριακό βάρος 50 kD κατά την έκλυση από τη στήλη μοριακής διήθησης της HrpO (Εικόνα 6.5) έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση της πρωτεΐνης FliJ (Fraser *et al.*, 2003). Η FliJ επίσης εκλύεται σε φαινομενικό μοριακό βάρος 50 kD εμφανίζοντας ασύμμετρη κορυφή. Οι παρατηρήσεις αυτές δηλώνουν την ανάλογη συμπεριφορά των δύο πρωτεϊνών στο διάλυμα. Επίσης η ίδια ερευνητική ομάδα σε πειράματα αναλυτικής υπερφυγοκέντρησης θεώρησε τον πιθανό ολιγομερισμό της πρωτεΐνης σε μικρό ποσοστό και απέδωσε την ασύμμετρη κορυφή

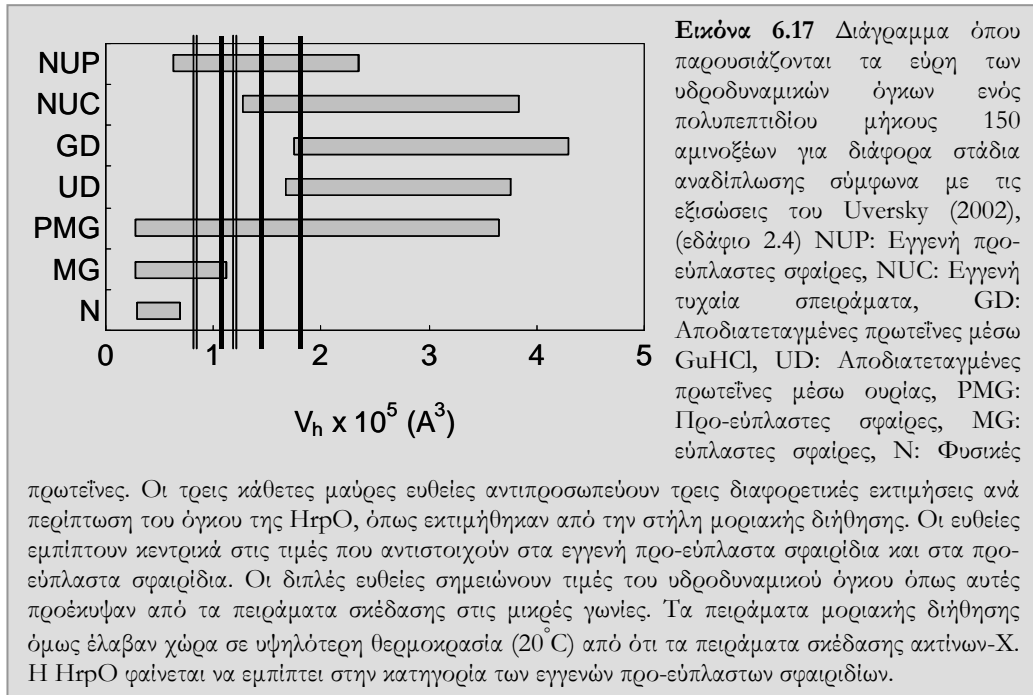
στην στήλη μοριακής διήθησης στη μη μονοδιάσπαρτη κατάσταση της πρωτεΐνης (Εδάφιο 6.1). Σε πειράματα σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες η FliJ φάνηκε να έχει το μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στο μονομερές της (πλησίον των 20 kD). Η HrpO φαίνεται επίσης ως μονομερής πρωτεΐνη στα πειράματα σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα σε μικρές γωνίες ενώ παρατηρείται κάποιος βαθμός ιδιο-σύνδεσης της πρωτεΐνης που εξαρτάται από την συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Πρωτεΐνη	Κωδικός NCBI	Περιοχές αποδιάταξης	Μήκος Περιοχών	Δείκτης $\langle \Delta H \rangle$
HrpO	AAC25065	[1]-[26] [37-117]	(26) (81)	-0.05±0.01 -0.21±0.09
YscO	AAB7272198	[1]-[154]	(154)	-0.20±0.09
FliJ_Ecoli	P52613	[1]-[147]	(147)	-0.14±0.06
FliJ_Ter	Q8ZF90	[1]-[148]	(148)	-0.13±0.08

Πίνακας 6.6 Πίνακας τιμών με τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του εργαλείου FoldIndex. Οι τιμές $\langle \Delta H \rangle$ για τις αποδιατεταγμένες περιοχές των αλληλουχιών εμπίπτουν κυρίως εντός των ορίων που έχουν καθοριστεί για τις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες (τυχαίο σπείραμα) $\langle \Delta H \rangle = -0.089 \pm 0.086$ αλλά εκτός των ορίων για τις εγγενώς προ-εύπλαστες σφαίρες: $\langle \Delta H \rangle = -0.037 \pm 0.03$.

6.4.2 Η HrpO βρίσκεται σε μερικώς διπλωμένη μορφή υπό φυσιολογικές συνθήκες

Οι εξισώσεις συσχέτισης του υδροδυναμικού όγκου της πρωτεΐνης (υπό φυσιολογικές συνθήκες) και των διαφορετικών κατηγοριών/σταδίων αναδίπλωσης (εδάφιο 2.4, Uversky 2002) χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση της HrpO. Σύμφωνα με αυτές τις εξισώσεις, δεδομένου του υδροδυναμικού όγκου της πρωτεΐνης όπως εκτιμάται από την στήλη μοριακής διήθησης, η HrpO φαίνεται να ομαδοποιείται μαζί με τα εγγενή προ-εύπλαστα σφαιρίδια (εικόνα 6.17). Η ανάλογη διαπίστωση προκύπτει και από τα πειράματα σκέδασης ακτίνων X σε μικρές γωνίες ενώ επιβεβαιώνεται ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται ως μονομερές στο διάλυμα. Στο διάγραμμα Kratky δεν εμφανίζεται καλά καθορισμένη κορυφή αλλά η καμπύλη φθάνει σε ένα πλατό και σταθεροποιείται σε αυτό. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την ύπαρξη μόνο κάποιας υπολειμματικής δομής στην πρωτεΐνη αποικλιόντας την σφαιρικότητα της. Στην περίπτωση επιμηκυσμένων σωματιδίων η περιοχή ισχύος της εξίσωσης Guinier περιορίζεται ακόμα περισσότερο και παύει να είναι αρκετά ακριβής για τον υπολογισμό της γυροσκοπικής ακτίνας. Χρησιμοποιήθηκε γι' αυτό το λόγο συμπληρωματικά και η προσέγγιση κατά Debye ενώ δόθηκε βαρύτητα και στον υπολογισμό της γυροσκοπικής ακτίνας από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως η υπολογιζόμενη γυροσκοπική ακτίνα είναι αρκετά μεγάλη για να ανήκει σε ένα σφαιροειδές σωματίδιο 150 αμινοξέων και αρκετά μικρή για να ανήκει σε μία αποδιπλωμένη αλυσίδα 150 καταλοίπων. Επίσης ο κατ' επανάληψη *ab initio* καθορισμός του σχήματος του σωματιδίου με μεθόδους προσομοίωσης ανόπτησης (simulation annealing) οδήγησε σε ένα αρκετά εκτεταμένο σωματίδιο χωρίς την παρουσία κάποιου δομικού πυρήνα. Καθώς οι πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως εύπλαστες σφαίρες παρουσιάζουν σφαιρικότητα παρά την διαφορά τους από την τελικώς διπλωμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, το μοντέλο χαμηλής διακριτικότητας που προκύπτει από τα πειράματα σκέδασης στο διάλυμα καθώς και το διάγραμμα Kratky καθ' εαυτό συμφωνούν για τον χαρακτηρισμό της HrpO ως προ-εύπλαστη σφαίρα.

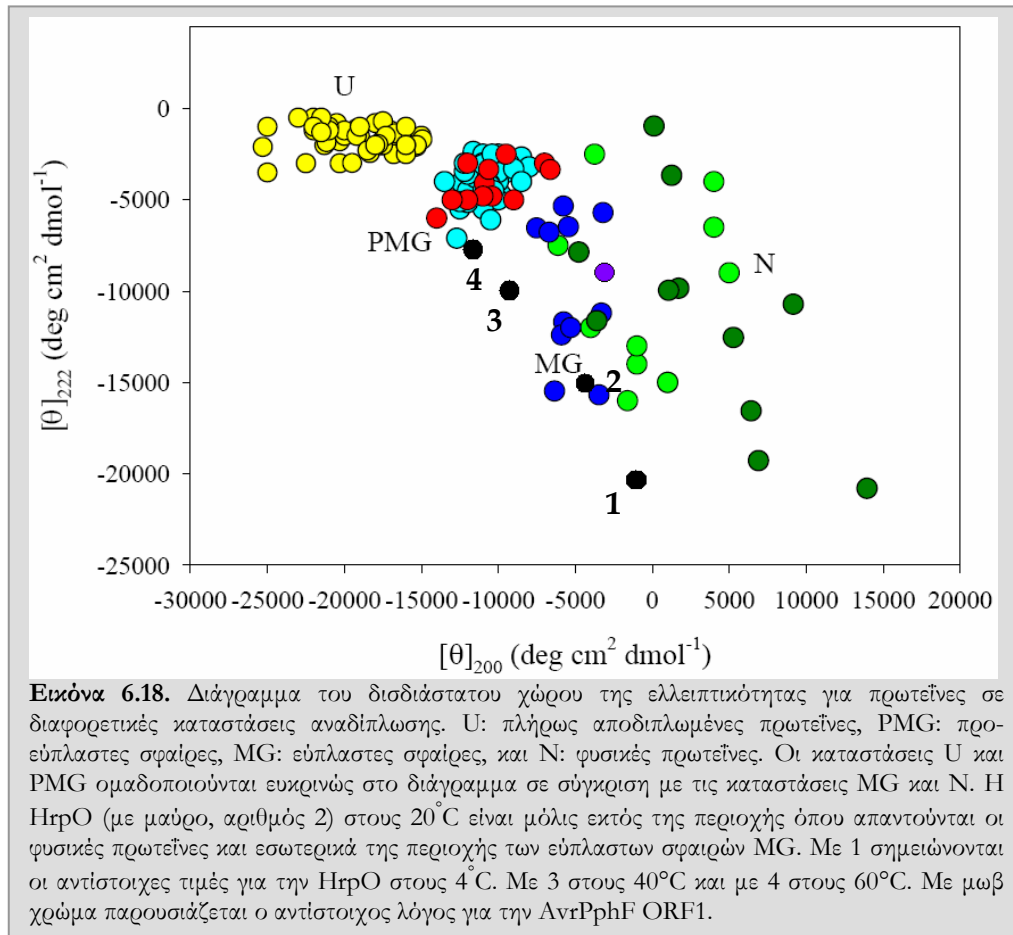


Από την άλλη τα πειράματα κυκλικού διχρωισμού καταδεικνύουν σημαντικά ποσοστά δευτεροταγούς δομής και κυρίως α -ελίκων σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η τιμή της ελλειπτικότητας είναι αρκετά υψηλή (στους $16\text{-}20^\circ\text{C}$) ώστε με βάση ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες να μην επιτρέπει την κατάταξη της HrpO στις οικογένειες των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών ή εγγενώς προ-εύπλαστων σφαιρών. Συγκεκριμένα ο λόγος $[\theta]_{222}/[\theta]_{200}$ παρουσιάζει χαρακτηριστικά και διακριτά εύρη κυρίως για τις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες και προ-εύπλαστες σφαίρες ενώ φαίνεται να ομαδοποιούνται λιγότερο διακριτά οι εύπλαστες σφαίρες και οι φυσιικές πρωτεΐνες (Uversky 2002). Στην περίπτωση της HrpO ο αντιστοιχος λόγος δεν εμπίπτει σε καμία από τις δύο ευδιάκριτες κατηγορίες των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών και η πρωτεΐνη φαίνεται να βρίσκεται σε κατάσταση εύπλαστης σφαιράς (Εικόνα 6.18).

Οι διαφορές που εμφανίζονται στα παραπάνω αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν τον διαφορετικό τρόπο προσέγγισης και ανάλυσης του προβλήματος από τις διαφορετικές μεθοδολογίες και πιθανόν το διαφορετικό περιβάλλον στο οποίο χρειάζεται να βρίσκεται η υπό μελέτη πρωτεΐνη. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης και τα πειράματα σκέδασης ακτίνων X εξετάζουν το συνολικό μέγεθος του σωματιδίου, ενώ η εκτέλεση των αντιστοιχων πειραμάτων λαμβάνει χώρα σε συγκεντρωμένα δείγματα πρωτεΐνης (άνω του 1 mg/ml) και συνήθως στα ίδια ρυθμιστικά διαλύματα, υπό αναγωγικές συνθήκες και μέτρια αλατότητα. Σε αντίθεση, στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω υπεριώδες μελετούνται τα χαρακτηριστικά της δευτεροταγούς δομής και απαιτείται χαμηλή συγκέντρωση δείγματος (κάτω του 0.1 mg/ml) ενώ χρησιμοποιείται χαμηλότερη αλατότητα και απουσία αναγωγικού μέσου.

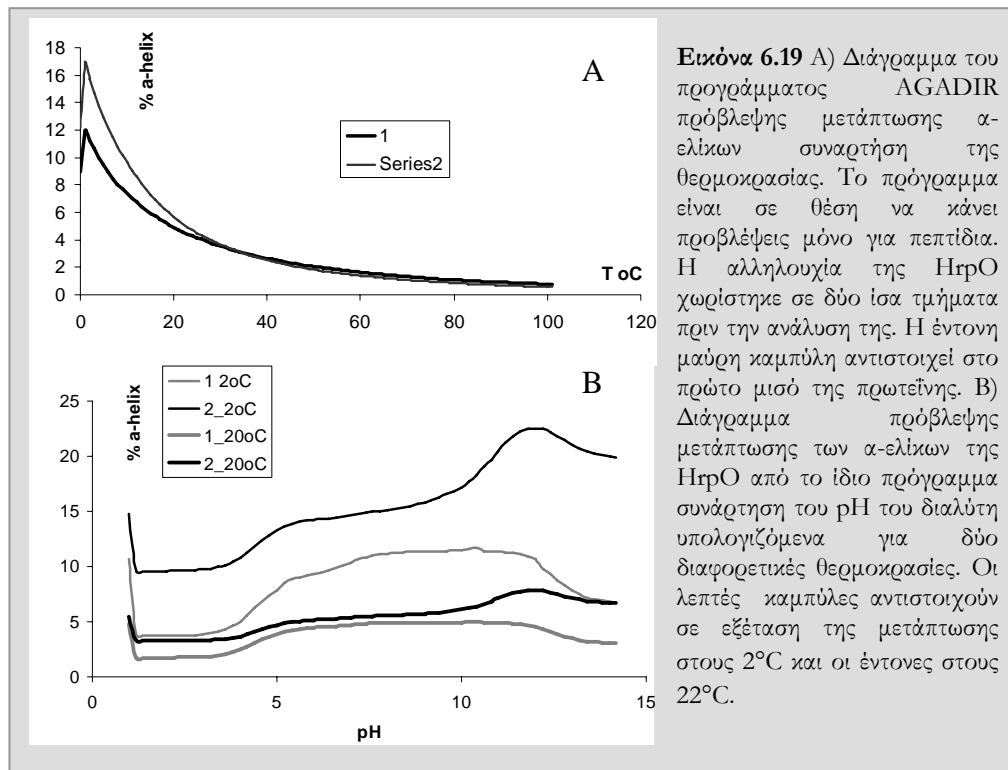
Η διαφοροποίηση λοιπόν που παρατηρείται μεταξύ των πειραμάτων σκέδασης σε μικρές γωνίες και του κυκλικού διχρωισμού στην περίπτωση της HrpO ίσως να οφείλεται εν μέρη στην διαφορετική ιοντική ισχύ του διαλύματος ανά περίπτωση πειράματος. Για την περίπτωση της σκέδασης απαιτούνται ικανοποιητικές ποσότητες πρωτεΐνης. Για την παραμονή της HrpO όμως στην διαλυτή φάση και την αποφυγή της κατακρημνίσεως της η ιοντική ισχύς καθώς επίσης και η παρουσία αναγωγικού μέσου είναι κρίσιμοι παράγοντες. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε το ανώτερο επιτρεπτό όριο των 200 mM NaCl για τα πειράματα σκέδασης και με αυτό το ποσοστό άλατος έλαβαν χώρα επίσης τα πειράματα μοριακής διήθησης. Στην περίπτωση όμως του κυκλικού διχρωισμού οι παρεμβολές στο σήμα από βαρύτερα άτομα είναι σημαντικές στο άπω-υπεριώδες ($<190\text{ nm}$) με αποτέλεσμα να έχει γίνει χρήση μόνο ρυθμιστικού διαλύματος και όχι επιπλέον άλατος στο διάλυμα μέτρησης. Τα φάσματα συγκεκριμένα στο άπω-υπεριώδες καταγράφηκαν για την HrpO είτε αραιώνοντας το αρχικό

δείγμα της πρωτεΐνης (1/50) με 20 mM φωσφορικών pH 8.5 είτε αφού υπεβλήθησαν σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM Tris/Βορικού pH 8.3. Καθώς επίσης παρουσιάζονται παρεμβολές στο σήμα του κυκλικού διχρωσισμού (<190 nm) εξαιτίας του φαινομένου απορρόφησης χρησιμοποιείται κατά την μέτρηση η λεπτότερη δυνατή κυψελίδα και αρκετά χαμηλή συγκέντρωση της πρωτεΐνης (≈ 0.02 mg/ml). Σε χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης δεν παρουσιάζονται προβλήματα λόγω απουσίας άλατος και αναγωγικού στην διαλυτότητα της πρωτεΐνης.



Η πειραματικά προσδιορισμένη εξάρτηση των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης από την θερμοκρασία, όπως ανέδειξε η μελέτη της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης της HrpO, συμπίπτει με τις προβλέψεις (Εικόνα 6.19)

Προβλέπονται επίσης υψηλότερα ποσοστά α -ελίκων σε αλκαλικό pH (pH 10 και υψηλότερο). Αν και δεν εκτελέστηκαν πειράματα σε τόσο ακραία pH διαπιστώθηκε μία εξάρτηση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης από το pH του διαλύματος κατά τις σαρώσεις για την ανεύρεση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος στην διαδιύληση (δεδομένα δεν παρατίθενται). Σε αυτές τις σαρώσεις η μέγιστη τιμή pH που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM γλυκίνης pH 10.5. Στα ίδια πειράματα διαπιστώθηκε και κάποια εξάρτηση από την ιοντική ισχύ του διαλύματος, ενώ προβλέπονται υψηλότερα ποσοστά α -έλικας απουσία σημαντικής ιοντικής ισχύος παρά παρουσίας αυτής (AGADIR, εδάφιο 2.1).



6.4.3 Η χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης της HrpO εμπλέκεται στα πειράματα σιέδασης και εμποδίζει την κρυστάλλωση της πρωτεΐνης

Η πρωτεΐνη HrpO παρουσιάζει χαμηλό σημείο μετάπτωσης πλησίον των 16-20°C όπως παρατηρείται κατά τις μελέτες θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης (Εδάφιο 6.3.9). Η πρωτεΐνη περνά από την μία κατάσταση στην άλλη χωρίς την συσσώρευση ενδιάμεσου μετασταθερού πληθυσμού, όπως κρίνεται από την παρουσία ενός κοινού ισοδιχρωικού σημείου κατά την υπέρθεση των φασμάτων στο άπω-υπεριώδες (εικόνα 6.13) και από την Ανάλυση Ιδιαζουσών Τιμών (Εδάφιο 6.3.9). Κατά την μετάπτωση απαιείφρονται σταδιακά τα χαρακτηριστικά ελάχιστα των α-ελίκων και εμφανίζεται ένα ελάχιστο στα 202 nm. Τα προγράμματα εκτίμησης δευτεροταγούς δομής υπολογίζουν με συνέπεια στις διαφορετικές εκτελέσεις τους τα ποσοστά α-έλικας αλλά δεν παρουσιάζουν την ίδια συστηματική απόδοση με τα ποσοστά των β-κλώνων. Φαίνεται μάλιστα για τις μορφές πριν και μετά την μετάπτωση ότι ενώ τα ποσοστά των α-ελίκων μειώνονται, τα ποσοστά των β-κλώνων αυξάνονται. Όταν όμως χρησιμοποιούνται διαφορετικές πρωτεΐνες αναφοράς τα ποσοστά α-ελίκων συνεχίζουν να εκτιμούνται σταθερά ενώ των β-κλώνων εμφανίζονται μικρότερα παρόλο που αυξάνουν στην μορφή της HrpO μετά την μετάπτωση σε όλες τις περιπτώσεις. Ο προσδιορισμός διαφορετικών στοιχείων δευτεροταγούς δομής κάνοντας χρήση διαφορετικών πρωτεϊνικών συνόλων αναφοράς, υπολογίζει και ποσοστά έλικας τύπου II πολυ-προλίνης. Τα ποσοστά αυτά φαίνεται δε να αυξάνονται με την θερμοκρασία. Παρά το ότι, το εκτεταμένο αυτό δομικό μοτίβο εμπλέκεται συχνά στην μοριακή αναγνώριση και φαίνεται να βρίσκεται σε μικρά ποσοστά στις εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες (Tompa, 2006), η HrpO δεν παρουσιάζει το χαρακτηριστικά υψηλό ποσοστό προλινών (12%) που παρουσιάζουν οι εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες.

Τα πειράματα σιέδασης από διάλυμα της HrpO έλαβαν χώρα στους 12-13°C όπως συνέβει για όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα που εξετάστηκαν με αυτήν την μέθοδο. Η σχετικά αυτή χαμηλή θερμοκρασία χρησιμοποιείται συνήθως σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει προγενέστερη γνώση για την πρωτεΐνη. Με βάση τα νέα δεδομένα όμως, της χαμηλής θερμοκρασίας μετάπτωσης της HrpO, όπως καταγράφηκε στα πειράματα κυκλικού

διχρωισμού είναι πιθανό ότι στην θερμοκρασία των 12-13°C υπάρχει εναπομείνων πληθυσμός της 'αποδιατεταγμένης' U μορφής (εικόνα 6. 19) που δύναται να εμπλέκεται στο πρότυπο της σκέδασης.

Οι συνθήκες κρυστάλλωσης που ελέγχθηκαν για την περίπτωση της HrpO επώαστηκαν στους 18°C και παρουσίασαν κυρίως διαχωρισμούς φάσης στις περιπτώσεις όπου ο κύριος κατακρημνιστής ήταν αλάτι ενώ παρουσίασαν ίζημα στην περίπτωση οργανικών διαλυτών. Η θερμοκρασία επώασης επιλέχθηκε ως μέση θερμοκρασία στην οποία έχουν σημειωθεί επιτυχείς κρυστάλλωσεις με άλλες πρωτεΐνες στη βιβλιογραφία, ενώ τα πειράματα εκτελέστηκαν προγενέστερα των πειραμάτων θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης. Καθώς η θερμοκρασία επώασης των πειραμάτων κρυστάλλωσης είναι πολύ κοντά στην θερμοκρασία μετάπτωσης της πρωτεΐνης είναι πιθανή η σχεδόν ισομοριακή παρουσία και των δύο διαφορετικών μορφών της πρωτεΐνης στην σταγόνα κρυστάλλωσης. Πιθανή είναι επίσης η αλληλομετατροπή της πρωτεΐνης από την μία μορφή στην άλλη όσο αυτή επηρεάζεται από τις διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης στις οποίες δοκιμάστηκε η πρωτεΐνη. Οι διαφορετικές συνθήκες θα μπορούσαν επίσης να ευνοήσουν την ύπαρξη μίας εκ των δύο μορφών της πρωτεΐνης. Ο βαθμός ετερογένειας του δείγματος της HrpO είναι αρκετά υψηλός και απαγορευτικός για την επιτυχή εξέλιξη των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Συγκεκριμένα όσο αφορά τις θερμοκρασίες μεταπτώσεων διαφόρων πρωτεϊνών που αναφέρονται στην βιβλιογραφία, παρατηρείται συνήθως μία υψηλή θερμοσταθερότητα των πρωτεϊνών με επιτυχή κρυστάλλωση. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η θερμοκρασία μετάπτωσης της AnrPphF ORF1 πλησίον των 82°C (δεδομένα δεν παραθέτονται). Οι ίδιες συνθήκες θα έπρεπε να δοκιμαστούν εκ νέου σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4°C).

6.4.4 Η HrpO αλληλεπιδρά με την HrpG

Η αρκετά υψηλή πλαστικότητα/ευελιξία της HrpO λόγο του χαμηλού σημείου μετάπτωσης της και η ισχυρή εξάρτηση της διαλυτότητας της από το εκάστοτε ρυθμιστικό διάλυμα καταδεικνύουν ίσως έναν πιθανό ρόλο δέσμευσης σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών στόχων για αυτήν την πρωτεΐνη. Σε αρχικές σαρώσεις αλληλεπιδράσεων μέσω μη-αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (Εδάφιο 5.3.12, Εικόνα 5.17) για την εύρεση πιθανών στόχων μεταξύ των διαλυτών πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος τύπου III η HrpO βρέθηκε να παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο ηλεκτροφορητικής κινητικότητας κατά την συν-επώαση και συν-ηλεκτροφόρηση της είτε με την πλήρους μήκους HrpG είτε με το καρβοξυτελικό μετάλλαγμα έλλειψης αυτής. Η αλληλεπίδραση δεν επιβεβαιώθηκε επαρκώς μέσω μοριακής διήθησης (δεδομένα δεν παρατίθενται). Συν-έκφραση των δύο πρωτεϊνών έλαβε χώρα με την κλωνοποίηση της HrpO είτε σε συμβατό φορέα έκφρασης με τον pPROEX-HT, από όπου εκφράζεται η HrpG, είτε με κλωνοποίηση και των δύο γονιδίων σε δικιστρονικό φορέα έκφρασης, (Χαρόβα & Πανόπουλος, αδημοσίευστα αποτελέσματα). Η HrpO έτσι παράγεται χωρίς ακροφύσιο ιστιδινών ενώ η HrpG φέρει το δικό της ακροφύσιο. Τα πειράματα συν-καθαρισμού είναι θετικά και βρίσκονται υπό αξιολόγηση. Αρχικά πειράματα σκέδασης στις μικρές γωνίες ανιχνεύουν για μίγμα δείγματος HrpO και HrpG σωματίδιο μεγαλύτερου μεγέθους από ότι η κάθε μία πρωτεΐνη μόνη της (δεδομένα δεν παρατίθενται).

Οι Evans *et al.*, (2006) έδειξαν την άμεση αλληλεπίδραση της Flj με τις τάξεις III σαπερόνες του μαστιγιακού εκκριτικού συστήματος τύπου III και πρότειναν ένα μηχανισμό συνοδείας των σαπερονών και ανακύκλωσης τους στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, καθιστώντας δυνατή την υπόθεση ότι σε ένα τέτοιο μηχανισμό δύναται να εμπλέκονται και οι μη μαστιγιακές πρωτεΐνες της οικογένειας YscO. Υπό το πρίσμα αυτό η ανακύκλωση των σαπερονών πιθανών να εκτείνεται και στις τάξεις I και II των σαπερονών του μολυσματικού εκκριτικού συστήματος τύπου III, δικαιολογώντας την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ της HrpO και της υποψήφιας σαπερόνης τάξης I HrpG.

6.5 Αναφορές

- Altschul S.F. & Koonin E.V., 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST – a tool for discovery in protein databases. *TIBS* 23, 444.
- Creighton T.E., 1993. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. New York, USA: Freeman
- Dunker A.K., Brown C.J., Lawson J.D., Iakoucheva L.M. & Obradovic Z., 2002. Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochem.* 41, 6573.
- Evans L.D., Stafford G.P., Ahmed S., Fraser G.M. & Hughes S., 2006. An escort mechanism for cycling of export chaperones during flagellum assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 17474.
- Fraser G.M., Gonzalez-Pedrajo B. & Tame J.R.H., 2003. Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* 185, 5546.
- Garcia de la Torre J., Huertas M.L. & Carrasco B., 2000. "Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 78, 719.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D. & Bairoch H.A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Editor: Walker J.M., *The proteomics protocols handbook*, Humana Press pp571-607.
- Hueck C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Mol. Biol. Rev.* 62, 379.
- Johnson W. C., 1999. Analysing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins.* 35, 307.
- King S.M. & Johnson W.C. Jr., 1999. Assigning secondary structure from protein coordinate data. *proteins Struct. Func. Genet.* 35, 313.
- Kirste R. G. & Oberthur R.C., (1982) in *Small Angle X-Ray Scattering*, eds. Glatter, O.&Kratky, O. (Academic, London), pp.387–432.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Minamino T., Chu R., Yamaguchi S. & Macnab R.M., 2000. Role of FliJ in Flagellar Protein Export in Salmonella. *J. Bacteriol.* 182, 4207.
- Pallen M.J., Bailey C.M. & Beatson S.A., 2006. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci* 15,935.
- Payne P.L. & Straley S.C., 1998. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J. Bacteriol.* 180, 3882.
- Perez J., Vachette P., Russo D., Desmadril M. & Durand D., 2001. Heat-induced unfolding of neocarzinostatin, a small all-protein investigated by small-angle x-ray scattering. *J Mol Biol* 308, 721.
- Porod G., 1951. *Kolloid-Z.* 124, 83.
- Prilusky J., Felder C.E., Zeen-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 unfoled. *Bioinformatics.* 21, 3435.
- Romero P., Obradovic Z., Li X., Garner E.C., Brown C.J. & Dunker A.K., 2001. Sequence Complexity of Disordered Protein. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* 42,38–48
- Sreerama N. & Woody R.W., 2004. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci* 13, 100.
- Tompa P., 2002. Intrinsically unstructured proteins. *TRENDS Biochem. Sci.* 27, 527.
- Tompa P., 2006. Proteins that defy the structure – function paradigm. *BTi* 18, 16.
- Uversky V.N., 2002. Natively Unfolded Proteins: A point where biology waits for physics. *Prot. Science* 11, 739.

Συζήτηση & Προοπτικές

*“I would rather discover a single fact,
even a small one, than debate
the great issues at length
without discovering anything at all”*
Galileo Galilei

Τα προϊόντα των γονιδίων του οπερονίου *avrPphF* μελετήθηκαν εκτενώς με πρωταρχικό στόχο τον προσδιορισμό της δομής του προϊόντος του πρώτου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, ORF1, αλλά και του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2.

Η βιοχημική και δομική μελέτη του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 κατέδειξε την αναμενόμενη συμπεριφορά για ένα τυπικό ζεύγος σαπερόνης/ δραστηκής πρωτεΐνης. Το σύμπλοκο φαίνεται να αποτελείται από μία διμερή σαπερόνη και από την μονομερή δραστηκή πρωτεΐνη (Εικόνες 3.5 και 3.10) ενώ το γενικό του σχήμα (Εικόνες 3.9 και 3.10) φαίνεται να περιγράφει την ύπαρξη δύο πρωτεϊνικών επικρατειών. Επιπροσθέτως η σταθερότητα της δραστηκής πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 φαίνεται να επηρεάζεται διαφορετικά ανάλογα την δέσμευση της ή όχι στην σαπερόνη (εδάφιο 3.4.3) μαρτυρώντας την πιθανή αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης της κατά την δέσμευση. Η πολυδιασπορά που εμφανίζεται στα πειράματα SAXS του συμπλόκου δεν δύναται να ερμηνευθεί με την διάσπαση του συμπλόκου στα συστατικά του (εδάφιο 3.3.4). Η πιθανή πολυδιασπορά ίσως να οφείλεται σε διαφορετικές διαμορφώσεις του συμπλόκου που προέρχονται από την διαφορετική διεύθυνση των δύο επικρατειών μεταξύ τους. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν ως τώρα μόνο δύο περιπτώσεις προσδιορισμένων δομών σε ατομική διακριτικότητα (κωδικοί πρόσβασης PDB: 2fm8 και 1xkr, Εικόνα 1.5) οι οποίες διαθέτουν μεγάλο τμήμα της δραστηκής πρωτεΐνης και όχι μόνο το τμήμα δέσμευσης της σαπερόνης CBD. Στη πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένη περίπτωση της τάξης IB σαπερόνης InvB και της δραστηκής πρωτεΐνης SipA, η SipA φαίνεται να προσδένεται μόνο στο ένα μονομερές της σαπερόνης και όχι και στα δύο όπως είχε παρατηρηθεί προγενέστερα αλλά και στην περίπτωση προσδιορισμένων συμπλόκων σαπερονών με το τμήμα δέσμευσης σαπερόνης CBD της δραστηκής πρωτεΐνης (εδάφιο 1.4.1.2). Παρά όμως την διαφορετική διεύθυνση των δύο επικρατειών μεταξύ τους στα δύο σύμπλοκα και την διαφορά στην δομή των δύο μολυσματικών πρωτεϊνών οι θεωρητικές καμπύλες σκέδασης των δύο σωματιδίων συμπίπτουν αρκετά στις μικρές γωνίες (Εικόνα 3.12) καθιστώντας δύσκολο τον διαχωρισμό μεταξύ τους και μη επιτρέποντας τον επιπλέον χαρακτηρισμό του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2. Το κατά πόσο τα ήδη χαρακτηρισμένα σύμπλοκα (YscB/SycN/YopN και InvB/SipA, εδάφιο 1.4.1.2, εικόνα 1.5) διατηρούν την ίδια διεύθυνση των υπομονάδων τους στο διάλυμα δεν είναι γνωστό καθώς δεν έχουν λάβει χώρα αντίστοιχα πειράματα. Η πιθανή πολυδιασπορά που εμφανίζεται στο σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 εμπλέκεται και αποτρέπει την κρυστάλλωση του

συμπλόκου. Η παρασκευή μονοδιάσπαρτου δείγματος του συμπλόκου μέσω σχεδιασμού μεταλλαγμάτων έλλειψης για την δραστική πρωτεΐνη έχει λάβει χώρα από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών (κ. Μπαστάκη) και βρίσκεται υπό εξέλιξη.

Η πρωτεΐνη AvrPphF ORF1 κρυστάλλωσε μετά την απομάκρυνση του ακροφισίου ιστιδινών με το οποίο παραγόταν σε χημειοκίνητη μορφή. Η δομή της τελικά προσδιορίστηκε σε διακριτικότητα 3 Å από τους Singer και συνεργάτες (2004) και φανέρωσε την δομική της ομολογία με άλλες προσδιορισμένες δομές σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III από ζωοπαθογόνα βακτήρια. Αποδείχτηκε έτσι η χρήση των τάξης I σαπερονών και από τα φυτοπαθογόνα κατά Gram αρνητικά βακτήρια.

Η μέθοδος σκέδασης από διάλυμα παρέχει την ικανότητα δομικής μελέτης μίας πρωτεΐνης σε φυσιολογικές συνθήκες καθώς δεν λαμβάνει χώρα χρήση υψηλών συγκεντρώσεων χημικών ουσιών όπως απαιτείται στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά για την επικύρωση της ατομικής δομής μιας πρωτεΐνης. Στα πειράματα σκέδασης ακτίνων – X από διάλυμα σε μικρές γωνίες η AvrPphF ORF1 φαίνεται να παρουσιάζει ένα ελαφρώς διαφορετικό σχήμα σε σύγκριση με το κρυσταλλογραφικό μοντέλο 1s28 (pdb id, Singer *et al.*, 2004), οι αποκλίσεις δε εμφανίζονται κυρίως στις ευρύτερες γωνίες. Πειράματα σκέδασης της πρωτεΐνης σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα λαμβάνοντας επίσης υπόψη την ιοντική ισχύ και το pH του διαλύτη θα είναι σε θέση να ξεκαθαρίσουν την ασυμφωνία ή όχι μεταξύ των δύο μεθοδολογιών. Ενδιαφέρον θα ήταν επίσης για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη να λάβουν χώρα και πειράματα σκέδασης στις ευρείες γωνίες (WAXS : Wide Angles X-ray Scattering) που παρέχουν πληροφορία ως και 5 Å σε ιδανικές συνθήκες πειράματος.

Υπήρχε όμως μία βασική διαφοροποίηση μεταξύ του σωματιδίου της AvrPphF ORF1 που μελετήσαμε στην παρούσα εργασία και της πρωτεΐνης που χειρίστηκαν οι Singer *et al.*, (2004). Κατά την κλωνοποίηση του γονιδίου *avrPphF ORF1* οι Singer *et al.*, εισήγαγαν μία επιπλέον αδενίνη λίγο πριν το τέλος του γονιδίου. Η αδενίνη αυτή άλλαξε το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και προσέδωσε 5 διαφορετικά καρβοξυτελικά κατάλοιπα (TFGFV) έναντι των 9 (RLDLSSESV) που είναι επισήμως κατατεθειμένα στην NCBI. Αν και η ερευνητική ομάδα ισχυρίστηκε ότι παρατηρούσαν την επιπλέον αδενίνη συστηματικά κατά την αλληλούχιση των κλώνων τους οι δικοί μας κλώνοι δεν εμπεριέχουν την επιπλέον αυτή αδενίνη στο γονίδιο *avrPphF ORF1*. Από τα αμινοξέα TFGFV μόνο τα δύο πρώτα είναι «ορατά» στην κρυσταλλογραφική δομή της πρωτεΐνης. Τα καρβοξυτελικά αυτά αμινοξέα δεν αποτελούν σημαντικά κατάλοιπα κατά την κρυσταλλογραφική ανάλυση της AvrPphF ORF1, καθώς και η δικιά μας πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη του Singer και των συνεργατών του κρυστάλλωσε δίνοντας ισόμορφους κρυστάλλους. Στη μέθοδο όμως της σκέδασης από διάλυμα η συνεισφορά των ευκίνητων καταλοίπων είναι εξίσου σημαντική. Κατά την σύγκριση λοιπόν που έλαβε χώρα στο εδάφιο 4.4.2 (εικόνα 4.12) η συνεισφορά από τα 9 επιπρόσθετα «ευκίνητα» κατάλοιπα του διμερούς στην σκέδαση σε μικρές γωνίες ίσως να είναι σημαντική και ένας από τους λόγους που παρατηρούμε απόκλιση από το κρυσταλλογραφικό μοντέλο 1s28 της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1.

Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής θα ήταν σε θέση επίσης να παρέχουν πληροφορία για την σταθερότητα της πρωτεΐνης και την αποκάλυψη ευκίνητων τμημάτων που θα μπορούσαν να εμπλέκονται στον βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν το μοτίβο δέσμευσης της δραστικής πρωτεΐνης κατά Lilić *et al.*, (2006) δεν είναι πλήρως εκτεθειμένα στην επιφάνεια της AvrPphF ORF1 γεγονός που υποδηλώνει την τοπική αλλαγή της διαμόρφωσης του για την αλληλεπίδραση με την δραστική πρωτεΐνη. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται επιπλέον από την πειραματική καμπύλη σκέδασης της AvrPphF ORF1 από το διάλυμα η οποία φαίνεται να προσεγγίζεται καλύτερα από την θεωρητική καμπύλη που προκύπτει από το ατομικό μοντέλο της τάξης I σαπερόνης SicP (κωδικός πρόσβασης PDB: 1jyo). Η δομή της σαπερόνης αυτής προσδιορίστηκε σε σύμπλοκη μορφή με το αντίστοιχο τμήμα δέσμευσης της δραστικής πρωτεΐνης με αποτέλεσμα στο κρυσταλλογραφικό μοντέλο η σαπερόνη SicP να διαθέτει την κατάλληλη διαμόρφωση.

Τέλος η χρήση της πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 σε πειράματα σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες και σε πειράματα κυκλικού διχρωισμού μας παρείχε την δυνατότητα καταγραφής πειραματικών τιμών από μία τυπική τάξης I σαπερόνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την αξιολόγηση των υποψήφιων σαπερονών HrpG και HrpO. Στην

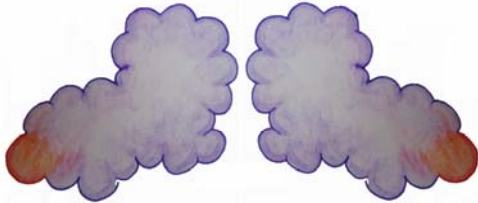
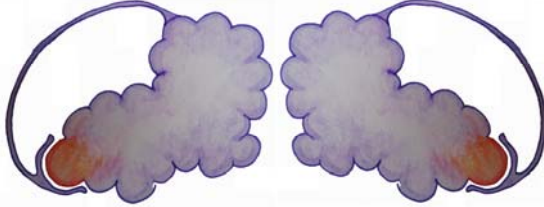
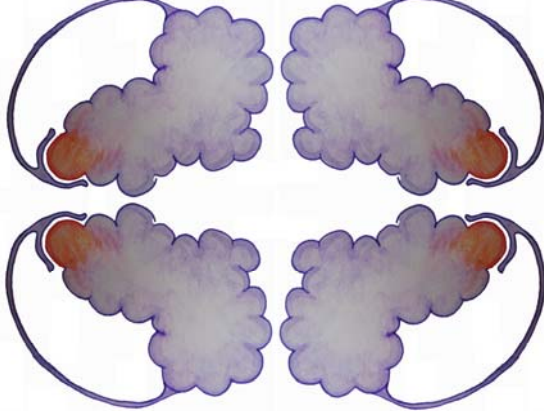
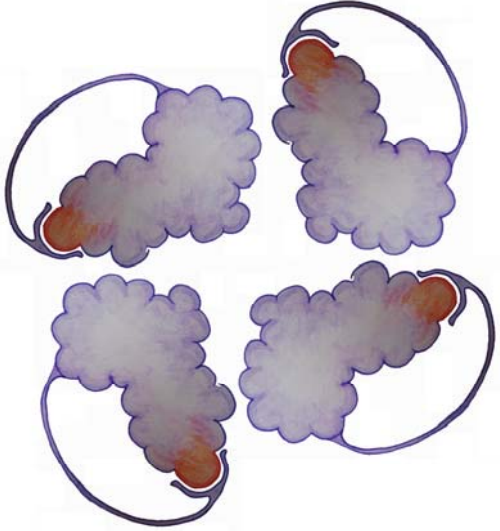
περίπτωση της HrpG Δ 133-146 (Εικόνες 5.20 και 5.22, Πίνακας 5.6) η χρήση θετικού μάρτυρα κατέδειξε πως οι αποκλίσεις που παρουσιάζει η πρωτεΐνη από την ομάδα των τάξης I σαπερονών δεν είναι αποτέλεσμα εισαγωγής πειραματικών σφαλμάτων ή άλλων αδυναμιών των μεθοδολογιών που ακολουθήθηκαν αλλά πραγματικές διαφοροποιήσεις της πρωτεΐνης.

Η νησίδα παθογένειας του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος τύπου III της *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* ελέγχθηκε για την ύπαρξη γονιδίων που θα μπορούσαν να κωδικοποιούν για υποθετικές σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Οι σαπερόνες αποτελούνται κατά βάση από μικρές, όζινες πρωτεΐνες με μοριακό βάρος (μονομερές) πλησίον των 15 kD, με αλληλουχία πλούσια σε λευκίνες. Όσες ανήκουν στην τάξη I φέρουν α -έλικες και αντιπαράλληλες β -πτυχές σχηματίζοντας ένα β -φύλο με τις έλικες εκατέρωθεν (κωδικός πρόσβασης CATH 3.30.1460.10 τάξη: άλφα βήτα, αρχιτεκτονική: σάντουιτς 2 στρωμάτων (2 layer sandwich)). Οι σαπερόνες τάξης II από την άλλη φαίνεται να αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από α -έλικες και διαθέτουν επαναλήψεις τύπου τετρατρικοπεπτιδίου σε σειρά (tandem tetratricopeptide-like repeats) (Pallen *et al.*, 2003). Τέλος οι σαπερόνες τάξης III είναι μονομερές πρωτεΐνες αποτελούμενες από α -έλικες με τάση να σχηματίζουν 4- α ελικοειδή δεμάτια. Από την ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος μόνο τα προϊόντα των γονιδίων *hrpG* και *hrpO* παρουσίαζαν τα βασικά γνωρίσματα των σαπερονών: μέγεθος, όζινο θεωρητικών pI, παρουσία υψηλού ποσοστού λευκινών.

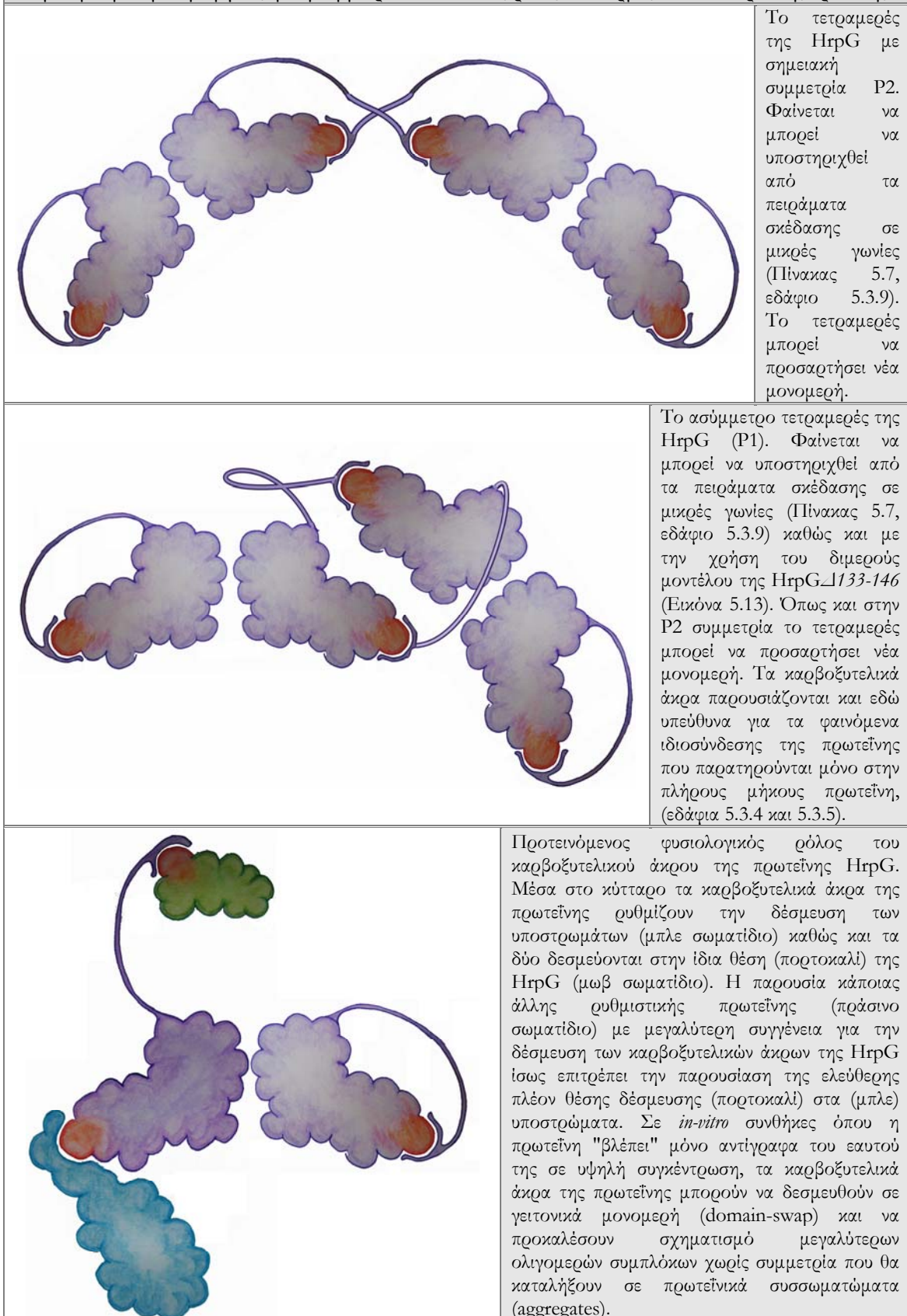
Το προϊόν του γονιδίου *hrpG* αναγνωρίστηκε στην συνέχεια σαν υποθετική τάξης I σαπερόνη του εκκριτικού συστήματος τύπου III λόγω της προβλεπόμενης δευτεροταγούς δομής της που φαίνεται να ακολουθεί την γνωστή τοπολογία των σαπερονών τάξης I του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Η υπερέκφραση και η διαλυτή κατάσταση της πρωτεΐνης ήταν η πρώτη και απαραίτητη προϋπόθεση για την υποστήριξη της παραπάνω πρόβλεψης.

Η θέση του γονιδίου *hrpG* εμπροσθεν του γονιδίου *hrcC* συσχετίζει επίσης την HrpG με την YscB. Η YscB είναι η μία υπομονάδα της ετεροδιμερούς σαπερόνης YscB/SycN και κατά την ετερόλογη έκφραση της από κύτταρα *E. coli* η YscB βρίσκεται στο αδιάλυτο κλάσμα (Schubot & Waugh, 2004) ενώ όταν συνεκφράζεται με την SycN παρατηρείται η διαλυτοποίηση και των δύο πρωτεϊνών (Εδάφιο 5.4.1). Θα μπορούσαμε άρα να υποθέσουμε ότι η HrpG είναι μία ομοδιμερές σαπερόνη; Η HrpG υπό αναγωγικές συνθήκες βρέθηκε σε τετραμερή μορφή (εδάφιο 5.4.2). Ενώ η βιολογική μονάδα των σαπερονών φαίνεται να είναι η διμερή τους μορφή εν τούτοις έχει παρατηρηθεί πειραματικά ο τετραμερισμός της SycH από τους Neumayer *et al.* (2004) μέσω στήλης μοριακής διήθησης παρόλο που η βιολογική μονάδα θεωρείται το διμερές από την κρυσταλλογραφική δομή (Phan *et al.*, 2004). Η διαφορά αυτή έγκειται στην παρουσία ή όχι των καρβοξυτελικών καταλοίπων της πρωτεΐνης.

Επιπρόσθετα καρβοξυτελικά κατάλοιπα υπάρχουν και στην SycE. Φαίνεται δε αυτά να δεσμεύονται από τον β 1 κλώνο είτε της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Evdokimov *et al.*, 2001) είτε γειτονικής (Frame & McKay, 2003) παίζοντας ρόλο στις κρυσταλλικές επαφές. Η δέσμευση στον β 1 κλώνο δεν φαίνεται να είναι τυχαία αφού σε αυτή δεσμεύεται ο δραστικός παράγοντας (Birtalan *et al.*, 2002) που μεταφέρει η SycE, YopE. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως *in vitro* τα επιπρόσθετα αυτά αμινοξέα είναι υπεύθυνα για φαινόμενα ιδιοσύνδεσης (self-association), τα οποία θα μπορούσαν να εξηγήσουν τον τετραμερισμό στο διάλυμα της SycH. Λαμβάνοντας υπόψη τις ανωτέρω παρατηρήσεις σχετικά με την παρουσία ή όχι των καρβοξυτελικών καταλοίπων των τάξης I σαπερονών, την υψηλή ευκινησία τους, την έλλειψη σταθερής παρουσίας τους σε όλες τις τάξεις I σαπερόνες καθώς επίσης ότι στην περίπτωση της HrpG μετά το πέρας της προβλεπόμενης α - β - β - α - β - β - α τοπολογίας παραμένουν επιπρόσθετα κατάλοιπα σχεδιάστηκε μετάλλαγμα έλλειψης στο οποίο απαλείφθηκαν τα 14 καρβοξυτελικά αμινοξέα της HrpG. Υπο αναγωγικές συνθήκες στη στήλη μοριακής διήθησης και στα πειράματα σκέδασης από διάλυμα η ελλειμματική πρωτεΐνη βρέθηκε σε διμερή μορφή.

<p>Εικόνα 7.1 Θεωρητικά σχηματικά μοντέλα του τετραμερούς σωματιδίου της πρωτεΐνης HrpG με την αναμενόμενη και με την εμφανιζόμενη συμμετρία και ο πιθανός ρόλος του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης.</p>	
	<p>Το διμερές της HrpG_{Δ133-146} με σημειακή συμμετρία P2. Παρουσία ενός διπλού άξονα περιστροφής κάθετου στην μεγαλύτερη διάμετρο του σωματιδίου όπως προτείνεται από τις <i>ab initio</i> ανασυστάσεις του σχήματος της διμερούς ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης (εδάφιο 5.3.7).</p>
	<p>Το διμερές της HrpG με σημειακή συμμετρία P2, δεν παρατηρήθηκε ποτέ στα πειράματα που διεξαχθήκαν. Το καρβοξυτελικό άκρο παρουσιάζεται εδώ να εκφύεται από ένα σημείο του μονομερούς και να δεσμεύεται σε ένα απομακρυσμένο σημείο του ίδιου μονομερούς.</p>
	<p>Το τετραμερές της HrpG με σημειακή συμμετρία P22. Παρουσία δύο κάθετων διπλών αξόνων περιστροφής, (στον τριδιάστατο χώρο θα υπήρχε ακόμα ένας τρίτος διπλός άξονας συμμετρίας κάθετος στους δύο προηγούμενους). Τετραμερές σωματιδίο με σημειακή συμμετρία P22 δεν φαίνεται να μπορεί να υποστηριχθεί από τα πειράματα σκέδασης σε μικρές γωνίες (Πίνακας 5.7, εδάφιο 5.3.9). Το θεωρητικό αυτό τετραμερές αποτελεί ένα κλειστό ολιγομερές σύμπλοκο που δεν μπορεί να προσαρτηθεί επιπλέον μονομερή. Οι ταυτόσημες επιφάνειες των μονομερών βρίσκονται σε συμμετρικές θέσεις και ίδια περιβάλλοντα.</p>
	<p>Το τετραμερές της HrpG με σημειακή συμμετρία P4. Παρουσία ενός τετραπλού άξονα περιστροφής. Τετραμερές σωματιδίο με σημειακή συμμετρία P4 δεν φαίνεται να μπορεί να υποστηριχθεί από τα πειράματα σκέδασης σε μικρές γωνίες (Πίνακας 5.7, εδάφιο 5.3.9). Το θεωρητικό αυτό τετραμερές αποτελεί ένα κλειστό ολιγομερές σύμπλοκο που δεν μπορεί να προσαρτηθεί επιπλέον μονομερή. Οι ταυτόσημες επιφάνειες των μονομερών βρίσκονται σε συμμετρικές θέσεις και ίδια περιβάλλοντα. Η σημειακή συμμετρία P4 δεν υποστηρίζει πλέον την δημιουργία διμερών που παρατηρείται στην ελλειμματική μορφή της πρωτεΐνης. Η εξέλιξη ολιγομερών συμπλόκων ευνοεί τον σχηματισμό διμερών από τον σχηματισμό σωματιδίων με μεγαλύτερη κυκλική συμμετρία (P4, P5, P6 κ.ο.κ.), (Goodsell & Olson, 2000).</p>

Εικόνα 7.1 Θεωρητικά σχηματικά μοντέλα του τετραμερούς σωματιδίου της πρωτεΐνης HrpG με την αναμενόμενη και με την εμφανιζόμενη συμμετρία και ο πιθανός ρόλος του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης.



Η παρουσία υψηλού ποσοστού κυστεϊνών (5%) δεν επέτρεψε τον εύκολο χειρισμό της πρωτεΐνης και τον έλεγχο της οξειδωτικής της κατάστασης. Η πρωτεΐνη απαντάται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα ενός Gram αρνητικού βακτηρίου και ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών δεν συνεισφέρει στην δίπλωση της πρωτεΐνης. Τυχαία δημιουργία τέτοιων δεσμών όμως ύστερα από την λύση των κυττάρων και τον μετέπειτα χειρισμό του δείγματος οδηγεί στον σχηματισμό μη ειδικών συσσωματωμάτων, τα οποία αναστέλλουν την κρυστάλλωση. Σε υψηλές ποσότητες αναγωγικού μέσου στο διάλυμα της πρωτεΐνης η καμπύλη σκέδασης του σωματιδίου HrpG Δ 133-146 φαίνεται να συμφωνεί με το γενικό σχήμα των σαπερονών τάξης I (εδάφιο 5.4.2). Εν τούτοις το σωματίδιο φαίνεται να έχει ένα πιο επίμηκες σχήμα σε σύγκριση με την πρότυπη ομάδα αναφοράς των τάξης I σαπερονών αφού η μέγιστη διάμετρος του φτάνει τα 80 Å ενώ αντίστοιχα τα πειραματικά δεδομένα της AvrPphF ORF1 της δίνουν μία μέγιστη διάμετρο στα 60 - 65 Å. Επίσης η εκτίμηση της δευτεροταγούς δομής της HrpG Δ 133-146 δεν εμπίπτει μέσα στα όρια των τάξης I σαπερονών.

Η πρότυπη τοπολογία α - β - β - α - β - β - α δεν προβλέπεται σταθερά για όλες τις ομόλογες αλληλουχίες της HrpG και η αντίστοιχη πρωτεΐνη από τα είδη της *Erwinia* προβλέπεται να φέρει την εξής ακολουθία δευτεροταγών στοιχείων: α - β - β - β - α - α - β - α . Οι δομικές μελέτες που έλαβαν χώρα δεν είναι σε θέση να ανατρέψουν την υπόθεση της σαπερόνης τάξης I για την HrpG αλλά όλα τα δεδομένα συνηγορούν ότι πιθανώς πρόκειται για ένα αποκλιών μέλος της ομάδας. Η συστηματική παρουσία του γονιδίου στο *hrp/hrc* εκκριτικό σύστημα πιθανώς σημαίνει ότι η πρωτεΐνη διαθέτει επιπρόσθετες λειτουργίες που έχουν να κάνουν με το γενικότερο «νοικοκυριό» της έκκρισης τύπου III. Τα συντηρημένα κατάλοιπα που χαρακτηρίζουν την ομάδα των HrpG πρωτεϊνών δεν φαίνεται να συσχετίζονται με κάποιο τρόπο άμεσα με τις σαπερόνες τάξης I (Παράρτημα 8.3).

Πειράματα αλληλεπίδρασης με άλλες διαλυτές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III έδειξαν επίσης την πιθανή αλληλεπίδραση της με τις πρωτεΐνες HrpO και HrcU, ικανότητες που δεν διαθέτει η πρότυπη σαπερόνη τάξης I AvrPphF ORF1. Πειράματα συνέκφρασης της HrpG με άλλες πρωτεΐνες του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος, μέσω δημιουργίας δικιστρονικών φορέων, εκτελούνται στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών (κ. Χαρόβα). Η HrcU ενσωματώνεται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου με το αμινοτελικό της τμήμα ενώ το καρβοξυτελικό της βρίσκεται εντός του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. Ομόλογες πρωτεΐνες της HrcU, είναι η YscU από το πρότυπο εκκριτικό σύστημα της *Yersinia* και η FlhB από το μαστιγιακό εκκριτικό σύστημα τύπου III. Και οι δύο αυτές ομόλογες πρωτεΐνες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με προς εξαγωγή υποστρώματα αλλά δεν έχει φανεί να συσχετίζονται άμεσα με τις τάξης I σαπερόνες (εδάφιο 5.4.5).

Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη HrpO παρόλο που φαίνεται να διαθέτει τα βασικά χαρακτηριστικά μιας σαπερόνης του εκκριτικού συστήματος τύπου III όπως το μικρό μέγεθος (17kD) και το όξινο ισοηλεκτρικό σημείο, εντούτοις δεν φαίνεται να ανήκει σε καμία από τις γνωστές τάξης σαπερονών. Ο λόγος που επιλέχθηκε να μελετηθεί εκτενέστερα στην συνέχεια ήταν η ύποπτα υψηλή διαλυτότητα της παρόλο που φαίνεται να αποτελεί επίσης σημαντικά συντηρημένο κομμάτι του εκκριτικού μηχανισμού. Φαίνεται να υποκαθιστά τον ρόλο της FljJ στα μολυσματικά εκκριτικά συστήματα τύπου III αφού παρουσιάζει κοινή υδροδυναμική συμπεριφορά κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης, ενώ οι αναλύσεις των αλληλουχιών των πρωτεϊνών HrpO, YscO και FljJ παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά όπως τα υψηλά ποσοστά φορτισμένων καταλοίπων και τα χαμηλά ποσοστά υδρόφοβων, την πιθανή έλλειψη σφαιρικότητας και την τάση για δημιουργία α -έλικας. Κοινό πρότυπο αλληλεπιδράσεων μεταξύ της HrpO και της FljJ έχει ήδη παρατηρηθεί (Μπαστάκη & Πανόπουλος, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Με βάση αυτά τα χαρακτηριστικά παρόλο που η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα προς έκκριση υποστρώματα του συστήματος δεν έχει μελετηθεί ακόμα και βασισμένη στην αναλογία της με την FljJ, η HrpO μπορεί να θεωρηθεί ως πιθανή γενικής χρήσης σαπερόνη του *hrp/hrc* εκκριτικού συστήματος.

Η ασύμμετρη κορυφή που παρατηρείται στην στήλη μοριακής διήθησης για τις πρωτεΐνες HrpO και FljJ εμφανίζεται και σε άλλες περιπτώσεις πρωτεϊνών που έχουν χαρακτηριστεί στην βιβλιογραφία ως εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες. Για παράδειγμα εμφάνιση ασύμμετρης κορυφής διαπιστώθηκε στην περίπτωση της πρωτεΐνης σεκουρίνης (Sanchez-Puig *et al.*, 2005).

Η σεκουρίνη, που ονομάζεται επίσης και PTTG1 (pituitary tumor transforming gene 1 product), είναι το προϊόν ενός ογκογονιδίου που ρυθμίζεται μέσω οιστρογόνων με πολλαπλές λειτουργίες. Οι συγγραφείς του άρθρου εικάζουν την πιθανότητα πρωτεόλυσης κατά την διάρκεια του πειράματος για να δικαιολογήσουν την καθυστερημένη απόσβεση του σήματος της απορρόφησης που δημιουργεί την ασυμμετρία στην καμπύλη. Παρά τον ισχυρισμό αυτό κατά την χρήση εξαιρετικά συγκεντρωμένου δείγματος σεκουρίνης ουδέποτε παρατηρήθηκαν ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους κατά την εκτέλεση αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης. Η σαπερόνη πρωτεϊνών, α -συνουκλεΐνη, βρέθηκε επίσης να διαθέτει ασύμμετρη κορυφή στην στήλη μοριακής διήθησης (Kim *et al.*, 2000) αλλά η μορφολογία της έμεινε ασχολίαστη από τους συγγραφείς. Οι Fraser *et al.*, (2003) τέλος προτάσσουν το φαινόμενο πολυδιάσπαρτου δείγματος για την περίπτωση της FliJ ως επεξήγηση της ασύμμετρης κορυφής.

Παρόλο που η πρωτεΐνη δεν ήταν δυνατό να κρυσταλλωθεί, εξετάστηκε δομικά με την μέθοδο σκέδασης ακτίνων-X από διάλυμα και με κυκλικό διχρωισμό. Παρατηρήθηκε ότι βρίσκεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση χωρίς να σχηματίζεται δομικός πυρήνας. Παρόλα αυτά φαίνεται να διαθέτει σημαντικά ποσοστά α -ελίκων τουλάχιστον μέχρι την θερμοκρασία μετάπτωσης της στους 16 – 20°C. Τα ποσοστά αυτά σε υψηλότερη θερμοκρασία χάνονται και αντικαθίστανται από τυχαίο σπείραμα και ανάλογα το σύνολο των πρωτεϊνών αναφοράς από β -κλώνους ή έλικες πολυ-προλίνης τύπου II. Φαίνεται όμως ότι η πρωτεΐνη δεν χάνει ακόμα και στους 90°C αυτές τις υπολειμματικές δομές της. Παρόλο που η πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστικά προ-εύπλαστης σφαίρας εξεταζόμενη από τις μεθόδους μοριακής διήθησης και την σκέδαση από το διάλυμα, η παρουσία έντονης δευτεροταγούς δομής κάτω από την θερμοκρασία των 16°C παραμένει ένα ερώτημα και αποκλείει πλέον αυτή την ομαδοποίηση.

Σε σύγκριση με γνωστές εγγενώς αδίπλωτες πρωτεΐνες (Tompa, 2006) τα ποσοστά προλίνης είναι ιδιαίτερα χαμηλά για να ερμηνεύουν σχηματισμούς έλικας τύπου II πολυπρολίνης. Σε αντίθεση η HrpO διαθέτει υψηλά ποσοστά λευκίνης (12.2 %) σε σύγκριση με τα ποσοστά των σφαιροειδών πρωτεϊνών (8.37%) (Tompa, 2002) και τα ακόμα χαμηλότερα ποσοστά των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών (5.44%). Οι παρούσες ασυμφωνίες με την οικογένεια των εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών ίσως αντικατοπτρίζει το βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης και την θέση της στο σύστημα το οποίο εξυπηρετεί. Ένα χαρακτηριστικό που επισημάνθηκε αρχικά για τις σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III ήταν και τα υψηλά ποσοστά τους σε λευκίνη (Bonas, 2006).

Η χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις εγγενώς αδίπλωτων πρωτεϊνών αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Η α -συνουκλεΐνη ενώ παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό φάσμα τυχαίου σπειράματος σε χαμηλή θερμοκρασία μόλις ξεπεράσει το σημείο μετάπτωσης της φαίνεται να αποκτά κάποια υπολειμματική δομή, (Uversky, 2002).

Συγχρόνως αν και δεν έχουν γίνει πειράματα έκκρισης της HrpO αυτή η εκτεταμένη διαμόρφωση της θα ήταν ικανή να της επιτρέψει την διέλευση της μέσω του σωλήνα του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Κάτι που έχει παρατηρηθεί ήδη για την YscO (Payne & Straley, 1998).

Τέλος σημαντική πληροφορία θα προσέδιδε στην μελέτη της θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης της HrpO η καταγραφή της σκέδασης ακτίνων-X της πρωτεΐνης σε μικρές γωνίες. Είναι ενδιαφέρον να καταγραφεί η ένταση της σκέδασης στους 4°C και να φανεί αν το σωματίδιο σε αυτή τη θερμοκρασία διαθέτει σφαιρικότητα ή όχι, δεδομένου ότι στα πειράματα κυκλικού διχρωισμού στην ίδια θερμοκρασία σύμφωνα με τον λόγο $\theta_{222}/\theta_{200}$ η δευτεροταγή δομή της φαίνεται να προσεγγίζει περισσότερο στις εύπλαστες σφαίρες και στον χώρο των φυσικών πρωτεϊνών (Εικόνα 6.18).

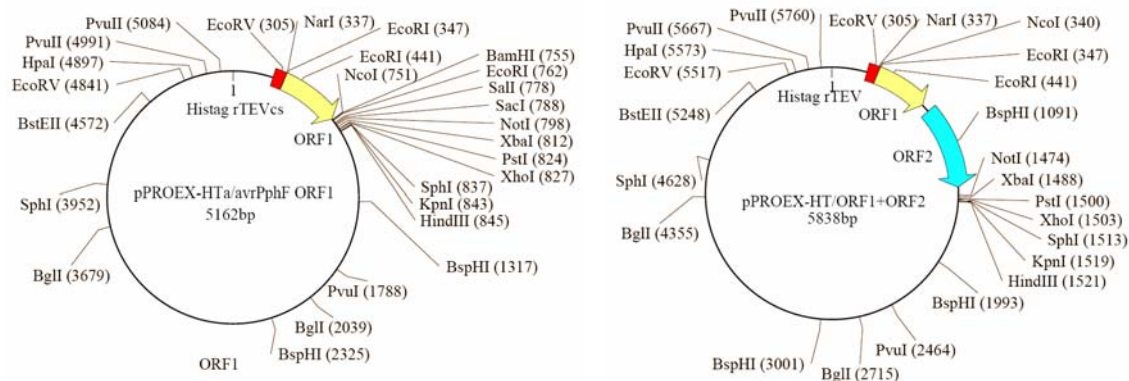
7.1 Αναφορές

- Bhattacharyya J. & Das K.P., 1999. Molecular chaperone like properties of an unfolded protein, α (s)-casein. *J. Biol.Chem.* 274, 15505.
- Dunker A.K., Brown C.J., Lawson J.D., Iakoucheva L.M. & Obramovic Z., 2002. Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochem.* 41, 6573.
- Dyson H.J. & Wright P.E., 2005. Intrinsically Unstructured Proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 197.

- Fraser G.M., Gonzalez-Pedrajo B. & Tame J.R.H., 2003. Interactions of FliJ with the Salmonella type III flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* 185, 5546.
- Minamino T., Chu R., Yamaguchi S. & Macnab R.M., 2000. Role of FliJ in Flagellar Protein Export in Salmonella. *J. Bacteriol.* 182, 4207.
- Park S.M., jung H.Y., Kim T.D., Park J.H., Yang C.H & Kim J., 2002. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochem.* 41, 13789.
- Tompa P., 2002. Intrinsically Unstructured Proteins. *TiBS.* 27, 527.
- Tompa P. & Csermely P., 2004. The role of structural disordered in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J.* 18, 1169.
- Tompa P., 2006. Proteins that defy the structure – function paradigm. *BTi.* 18, 16.
- Uversky V.N., 2002. Review: Natively Unfolded Proteins: A point where biology waits for physics. *Prot. Science* 11, 739.
- Sanchez-Puig N., Veprintsev D.B. & Fersht A.R., 2005. Human full-length Securin is a natively unfolded protein. *Prot. Science* 14, 1410.
- Kim T.D., Paik S.R., Yang C.H. & Kim J., 2000. Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Prot. Science* 9, 2489.
- Uversky V.N., 2002. What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* 269, 2.

8.1 Παλαιότερες κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών AvrPphF ORF1 αλλά και του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 είχαν προετοιμαστεί στα πλαίσια της μεταπτυχιακής διατριβής (Γαζή, 2002).



8.2 Πειράματα ηλεκτροφόρησης των υπό μελέτη πρωτεϊνών που δεν εμφανίστηκαν στο κυρίως κείμενο

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται εντός ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου διά την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του.

Στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συμπολιμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N μεθυλενο-δις-ακρυλαμιδίου. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά και δεν αλληλεπιδρούν ακόμα και αναμιγμένα αλλά πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N, - τετραμεθυλοαιθυλενο διαμινη) πετυχαίνει την διάδοση ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού (Kingsbury & Masters, 1970).

Κατά την ασυνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές πηκτές. Τα δείγματα εισάγονται στην άνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτή συσσώρευσης, stacking gel). Το ρυθμιστικό διάλυμα του συστήματος ηλεκτροφόρησης περιέχει γλυκίνη και είναι ρυθμισμένο σε pH 8.3. Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της πηκτής συσσώρευσης σε pH 6.8. Ως αποτέλεσμα, οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται μπροστά τους. Ακολούθως εισερχόμενες στην δεύτερη πηκτή (πηκτή διαχωρισμού) με pH 8.8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάση του φορτίου τους και του μεγέθους τους.

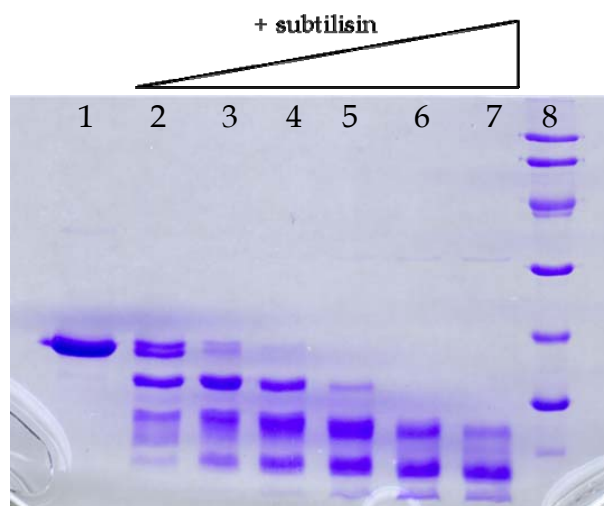
Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli έχουμε πολυμερισμό της πηκτής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτή συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (Laemmli, 1970).

Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκευάσμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών, ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειικό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών ακολουθεί η διαδικασία χρώσης με Coomassie.

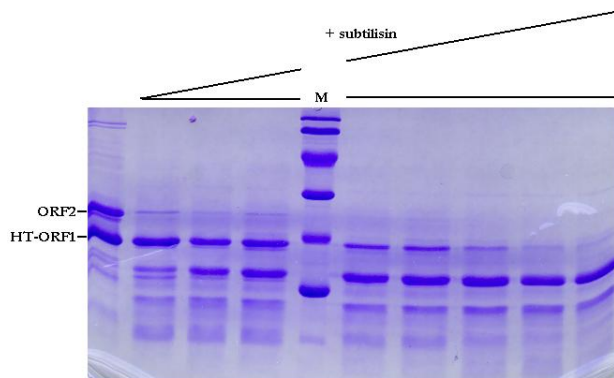
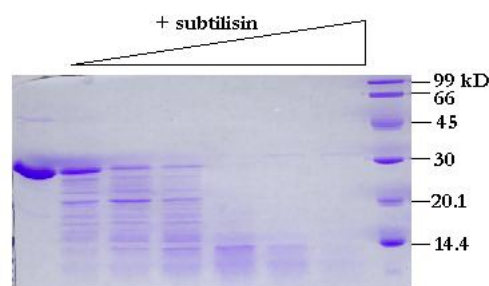
8.2.1 Πρωτεολυτικά πρότυπα του συμπλόκου AvrPphF ORF1/ORF2 κατά την περιορισμένη πρωτεόλυση.

Η πρωτεάση σαμπτιλυσίνη (subtilisin, Carlsberg) είναι μία πρωτεάση σερίνης που υδρολύει οποιοδήποτε πεπτιδικό δεσμό (Kamal *et al.*, 2004). Η σαμπτιλυσίνη χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα περιορισμένης πρωτεόλυσης για να ανιχνεύσει χαρακτηριστικά της διαμόρφωσης των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Έχειδειχθεί ότι η μέθοδος της περιορισμένης πρωτεόλυσης είναι σε θέση να φανερώσει τα ευκίνητα τμήματα της πρωτεΐνης, καθώς και αυτόνομες πρωτεϊνικές επικράτειες. Ενώ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση και στον χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών τμημάτων που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις (Fontana *et al.*, 2004, Stebbins & Galan, 2001).



Α) Η πρωτεΐνη **AvrPphF ORF1** φέρουσα αμινοτελικό ακροφύσιο ιστιδινών (1^η διαδρομή) σε περιορισμένη πρωτεόλυση (διαδρομές 2-7) με αυξανόμενες ποσότητες σαμπτιλυσίνης. SDS – PAGE 14% πηκτή πολυακρυλαμίδης. Στη διαδρομή 8 βρίσκεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών. Η ζώνη της AvrPphF HT-ORF1 τρέχει λίγο γρηγορότερα από την ζώνη 20 kD του μάρτυρα.

Β) SDS – PAGE. 14% πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η δραστική πρωτεΐνη **AvrPphF ORF2** φέρουσα αμινοτελικό ακροφύσιο ιστιδινών σε περιορισμένη πρωτεόλυση με σαμπτιλυσίνη. Η δραστική πρωτεΐνη προέρχεται από κύτταρα που την υπερεκφράζαν απουσία της τάξης I σαπερόνης AvrPphF ORF1. Η πρωτεάση φαίνεται να έχει άμεση πρόσβαση στους περισσότερους από τους πεπτιδικούς δεσμούς. Αριστερά βρίσκεται το απομονωμένο δείγμα της HT-ORF2 και στις επόμενες θέσεις δείγματα που έχουν υποστεί πέψη με σταδιακά αυξανόμενη ποσότητα πρωτεάσης.



Γ) SDS – PAGE 14% πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η πρωτεάση σαμπτιλυσίνη πρωτεολύει γρήγορα την δραστική πρωτεΐνη ORF2 στο σύμπλοκο AvrPphF ORF1/ORF2 ενώ η HT-ORF1 παρουσιάζεται σταθερότερη. Η δραστική πρωτεΐνη φαίνεται να είναι προσβάσιμη από την πρωτεάση. Μ: Μάρτυρας μοριακών βαρών. Η ζώνη που αντιστοιχεί στην AvrPphF ORF1 βρίσκεται πλησίον της ζώνης των 20 kD του μάρτυρα.

8.2.2 Πρωτεολυτικά πρότυπα της πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 στην σύμπλοξη και στην μεμονωμένη μορφή της κατά την παραμονή των δειγμάτων στους 4°C.

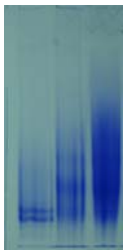


Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης. 1^η διαδρομή: Το δείγμα AvrPphF ORF2 έπειτα από 3 εβδομάδες στο ψυγείο παρουσιάζει μία ζώνη ύψους \approx 20 kD σε σύγκριση με τον πρωτεϊνικό μάρτυρα (2^η διαδρομή: LMW (Pharmacia)). Το δείγμα της δραστηκής πρωτεΐνης προέρχεται από συνέκφραση της με την τάξης I σαπερόνη AvrPphF ORF1 σε *E. coli* και ο διαχωρισμός των δύο πρωτεϊνών έχει επιτευχθεί σε στήλη μοριακής διήθησης.

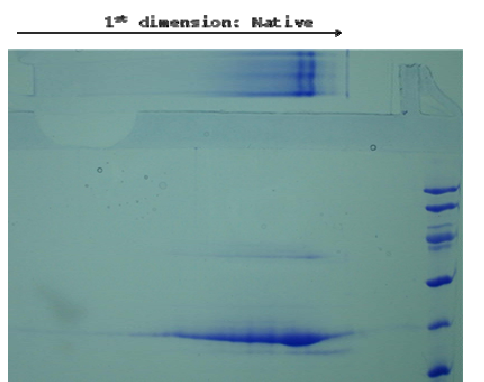
Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). 1^η διαδρομή: Μάρτυρας μοριακών βαρών LMW (Pharmacia) από πάνω προς τα κάτω: 98, 69, 45, 30, 20.1 και 14.4 kD, 2^η, 3^η, 4^η και 5^η διαδρομή: διαφορετικά δείγματα του συμπλόκου AvrPphF ORF1 και AvrPphF ORF2 ύστερα από 3 εβδομάδες στους 4°C. Δεν παρατηρείται ίχνος της ζώνης που αντιστοιχεί στην δραστηκή πρωτεΐνη AvrPphF ORF2 ενώ η ζώνη που αντιστοιχεί στην σαπερόνη AvrPphF ORF1 παραμένει ακέραιη. Εικόνα 3.4 για αντιπαράβολή.



8.2.3 Εγγενής ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών



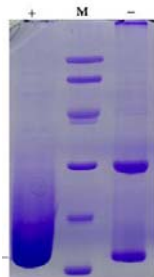
Εγγενής ηλεκτροφόρηση-PAGE της πρωτεΐνης HrpG. Στην 1^η διαδρομή η HrpG φέρει το ακροφύσιο ιστιδινών. Στον 2^ο και 3^ο διάδρομο η πρωτεΐνη σε διαφορετικές ποσότητες έπειτα από την απομάκρυνση του ακροφυσίου.



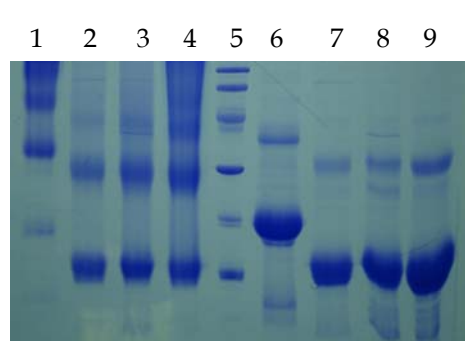
Ηλεκτροφόρηση σε δύο διαστάσεις. Η 1^η διάσταση περιλαμβάνει την εγγενή ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης HrpG φέρουσα ακροφύσιο ιστιδινών, ενώ η δεύτερη διάσταση περιλαμβάνει την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

8.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών άνευ αναγωγικού

Για την μελέτη της δημιουργίας ή όχι δισουλφιδικών δεσμών κατά την προετοιμασία και φύλαξη των πρωτεϊνικών δειγμάτων, ελέγχθηκαν τα ηλεκτροφορητικά πρότυπα των πρωτεϊνών σε SDS-PAGE απουσία αναγωγικού.



Στην (+) διαδρομή η AnrRphF ORF1 επώαστηκε με αναγωγικό στο διάλυμα φόρτωσης, ενώ στην (-) διαδρομή όχι. Το ίδιο δείγμα άνευ αναγωγικού στο διάλυμα φόρτωσης. M) Μάρτυρας μοριακών βαρών LMW (Pharmacia). Παρατηρείται ο σχηματισμός ζώνης σε διπλάσιο μοριακό βάρος.

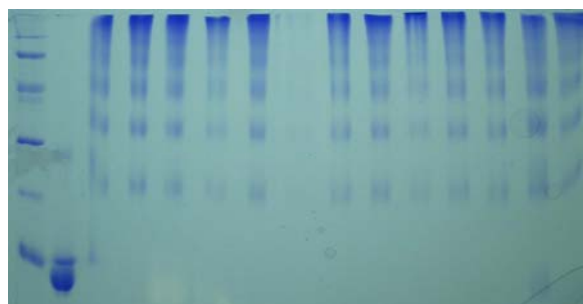


Ηλεκτροφόρηση διαφορετικών δειγμάτων της πρωτεΐνης HrpG. Δεξιά του μάρτυρα μοριακών βαρών (5^η διαδρομή) τρέχουν δείγματα της πρωτεΐνης παρουσία αναγωγικού και αριστερά τα ίδια δείγματα απουσία αναγωγικού παράγοντα. Παρατηρείται η δημιουργία μεγαλύτερων πληθυσμών. Στον 1^ο και 6^ο διάδρομο η πρωτεΐνη φέρει ακροφύσιο ιστιδινών. Στις διαδρομές έξι έως εννέα εμφανίζεται ένας πληθυσμός σχεδόν σε διπλάσιο μοριακό βάρος. Η ζώνη αυτή ανήκει επίσης στην πρωτεΐνη HrpG όπως έδειξε η φασματοσκοπία μάζας, παρόλο που η ηλεκτροφόρηση είναι

αποδιατακτική. Το ότι η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στην ίδια την πρωτεΐνη μαρτυρά και το γεγονός ότι η ζώνη εμφανίζεται σε υψηλότερα μοριακά βάρη παρουσία του ακροφυσίου ιστιδινών σε σύγκριση με το πρότυπο ηλεκτροφόρησης όταν έχει απομακρυνθεί το ακροφύσιο.

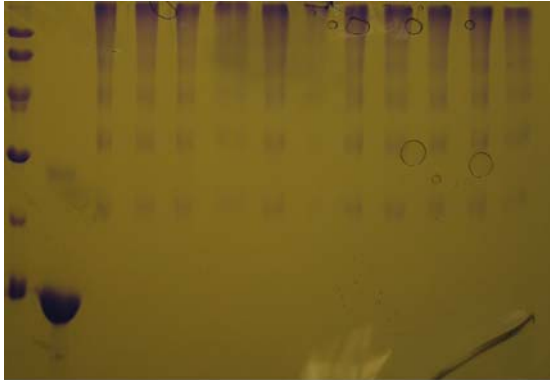
8.2.5 Γρήγορος προκαταρκτικός έλεγχος της δημιουργίας συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών HrpG και HrpO μέσω ψεύδο-εγγενούς ηλεκτροφόρησης.

Γρήγορες σαρώσεις για την εύρεση κατάλληλων πρόσθετων (additives) για τις πρωτεΐνες HrpG και HrpO με σκοπό την βελτιστοποίηση των διαλυμάτων φύλαξης τους πραγματοποιήθηκαν με την επώαση 1 μl δείγματος πρωτεΐνης και 1 μl από διάφορες χημικές ουσίες για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στα δείγματα ακολούθως προστέθηκε 2x διάλυμα φόρτισης για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, το οποίο όμως δεν περιείχε ούτε αναγωγικό, ούτε SDS. Επίσης τα δείγματα δεν έβρασαν πριν την φόρτωση τους στην πηκτή, ενώ τα υπόλοιπα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν σύμφωνα με την διαδικασία αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE (Recent Advances in Macromolecular Crystallization Meetings Tips).



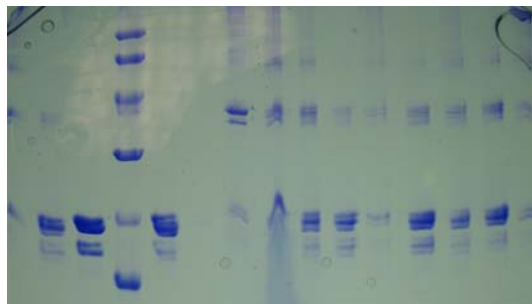
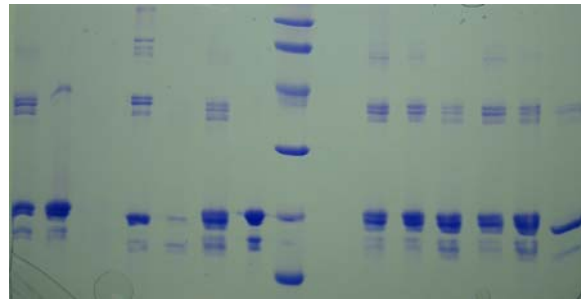
Η πρωτεΐνη HrpGΔ133-146 επωασμένη με διάφορες χημικές ουσίες. 1^η διαδρομή: Μάρτυρας Μοριακών Βαρών (LMW, Pharmacia), 2^η διαδρομή η πρωτεΐνη σε κανονικές συνθήκες SDS-PAGE. 3^η – 15^η διαδρομή: η πρωτεΐνη επωασμένη με ηpH₂O, 15% w/v 1.6-Hexandiol, 50 mM trimethylamine HCl, 500 mM Guanidine HCl, 10% w/v benzimidine HCl, 15% w/v D(+)-glucose, 50 mM spermidine, 50 mM spermine tetra-HCl, 15% w/v 6-aminocaproic acid, 500 mM glycine, 50 mM L-cysteine, 1.5 M

NDSB-195. Η μόνη ουσία που φαίνεται να διαφοροποιεί το πρότυπο συσσωμάτωσης της πρωτεΐνης HrpGΔ133-146 είναι η L-cysteine, καθώς μόνο στην διαδρομή 14 εμφανίζεται και η χαμηλότερη ζώνη των 14 kD.



Η πρωτεΐνη HrpGΔ133-146 επωασμένη με διάφορες χημικές ουσίες. 1^η διαδρομή: Μάρτυρας Μοριακών Βαρών (LMW, Pharmacia), 2^η διαδρομή η πρωτεΐνη σε κανονικές συνθήκες SDS-PAGE. 3^η – 13^η διαδρομή: η πρωτεΐνη επωασμένη με 7.5% 1.2.3-heptanetriol, 50 mM EDTA, 15 % w/v xylitol, 15% w/v 1.5-diaminopentane di-HCl, 150 mM glycyl-glycyl-glycine, 50 mM hexamine cobalt (III) chloride, 50 mM taurine, 2.5% w/v polyvinylpyrrolidone K15, 50 mM phenol, 15 % DMSO, 4 mM CHAPS.

Η πρωτεΐνη HrpO επωασμένη με διάφορες χημικές ουσίες. 1^η -6^η διαδρομή: 50 mM Barium Chloride, 50 mM Cadmium Chloride, 50 mM Cobaltous Chloride, 50 mM Cupric Chloride, 50 mM Manganese (II) Chloride, 50 mM Strontium Chloride, 7^η διαδρομή: η πρωτεΐνη σε κανονικές συνθήκες SDS-PAGE, 8^η διαδρομή: Μάρτυρας μοριακών βαρών LMW (Pharmacia), 9^η – 15^η διαδρομή: επώαση με, 50 mM Yttrium Chloride, 15 % ethylene glycol, 15% MPD, 15% trimethylamine N-oxide, 500 mM Guanidine HCl, 50 mM Urea, 10% benzamidine



Η πρωτεΐνη HrpO επωασμένη με διάφορες χημικές ουσίες. 1^η -2^η διαδρομή: 15% iso-propanol, 50 mM EDTA, 3^η διαδρομή: η πρωτεΐνη σε κανονικές συνθήκες SDS-PAGE, 4^η διαδρομή: Μάρτυρας μοριακών βαρών LMW (Pharmacia), 5^η – 15^η διαδρομή: 50 mM NAD, 50 mM ATP, 50 mM spermidine, 50 mM spermine tetraHCl, 15% 6-aminocaproic acid, 500 mM glycine, 50 mM hexaminocobalt trichloride, 50 mM taurine, 2.5 % polyvinylpyrrolidone K15, 50 mM phenol, επώαση με ηρH₂O ως έλεγχος του πειράματος.

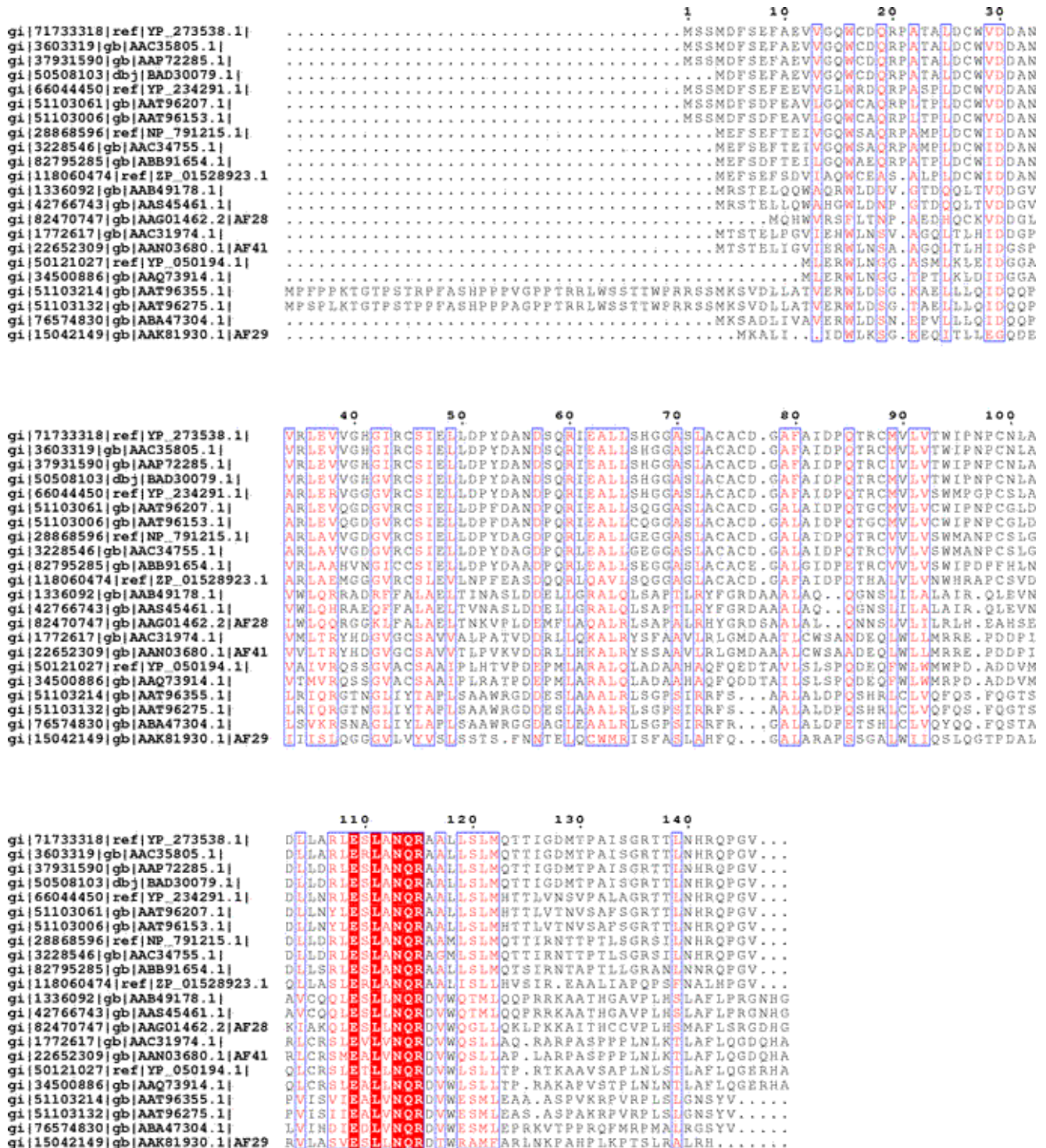
8.3 Αποτελέσματα PSI-BLAST για την περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG

Πίνακας αποτελεσμάτων Psi-BLAST 9/2/2007 θέτοντας ως αλληλουχία έρευνας την αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpG από την *Erwinia amylovora* (κωδικός πρόσβασης NCBI AAB49178):

1 ^{ος} κύκλος		
AAB49178	HrpG [<i>Erwinia amylovora</i>]	Βαθμολογία = 251 bits (640), Τιμή-E = 9e-66, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 143/143 (100%), Θετικά = 143/143 (100%), Κενά = 0/143 (0%)
AAS45461, ABA39799	HrpG [<i>Erwinia pyrifoliae</i>]	Βαθμολογία = 240 bits (612), Τιμή-E = 2e-62, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 134/143 (93%), Θετικά = 138/143 (96%), Κενά = 0/143 (0%)
AF282857	HrpG [<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>]	Βαθμολογία = 146 bits (368), Τιμή-E = 4e-34, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 75/138 (54%), Θετικά

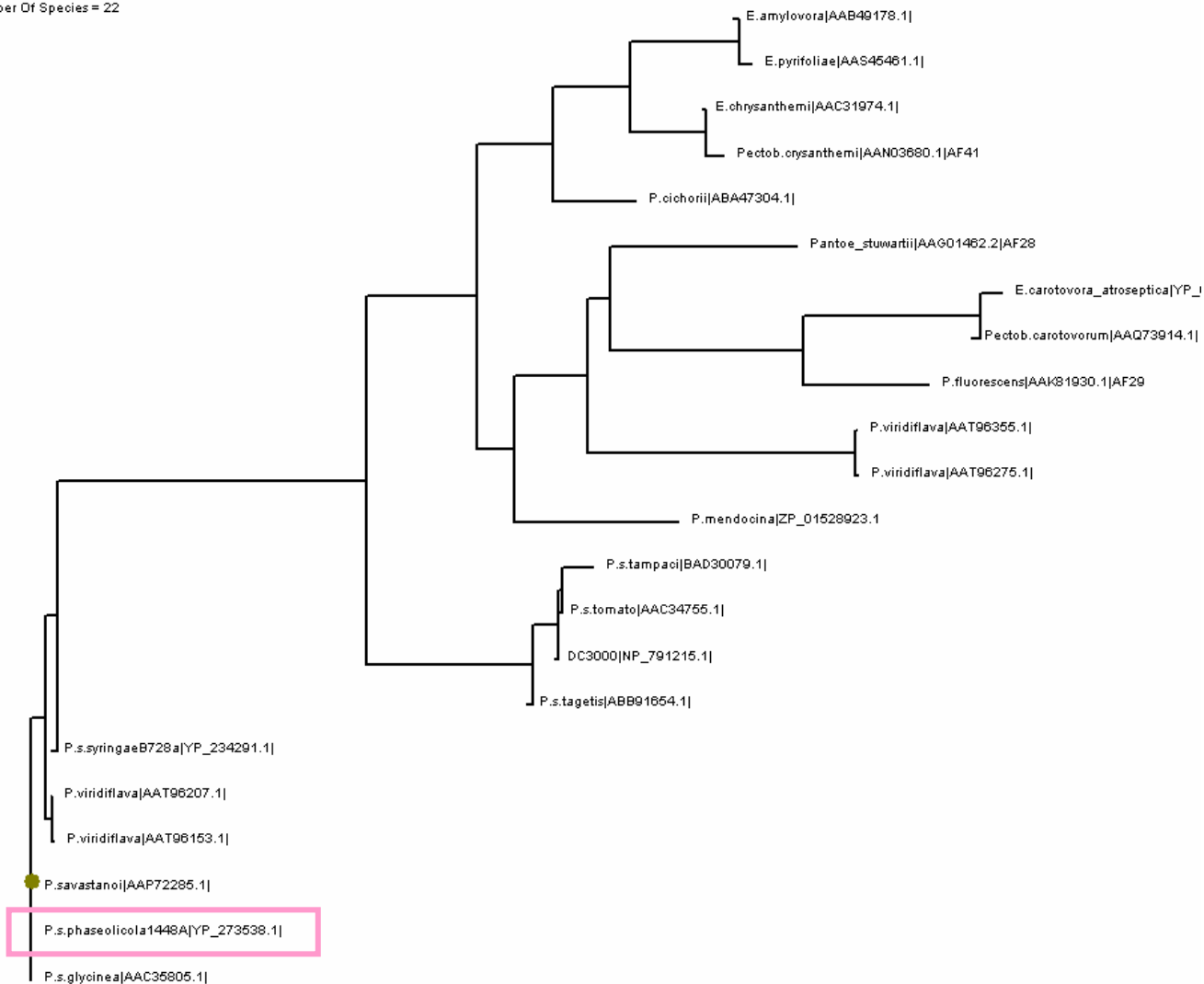
		= 99/138 (71%), Κενά = 0/138 (0%)
AAC31974	HrpG [<i>Erwinia chrysanthemi</i>]	Βαθμολογία = 76.3 bits (186), Τιμή-E = 5e-13, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 55/145 (37%), Θετικά = 77/145 (53%), Κενά = 3/145 (2%)
AF411590	putative secretion protein HrpG [<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>]	Βαθμολογία = 69.3 bits (168), Τιμή-E = 5e-11, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 51/145 (35%), Θετικά = 75/145 (51%), Κενά = 3/145 (2%)
YP_050194, AAS20365, CAG75001	type III secretion protein [<i>Erwinia carotovora</i> subsp. atroseptica SCRI1043], HrpG [<i>Pectobacterium atrosepticum</i>]	Βαθμολογία = 62.8 bits (151), Τιμή-E = 5e-09, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 46/135 (34%), Θετικά = 71/135 (52%), Κενά = 3/135 (2%)
AAQ73914	HrpG [<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. carotovorum]	Βαθμολογία = 62.4 bits (150), Τιμή-E = 6e-09, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 46/135 (34%), Θετικά = 71/135 (52%), Κενά = 3/135 (2%)
AAT96355	HrpG [<i>Pseudomonas viridiflava</i>]	Βαθμολογία = 60.5 bits (145), Τιμή-E = 2e-08, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 41/117 (35%), Θετικά = 61/117 (52%), Κενά = 1/117 (0%)
AAT96275, AAT96316	HrpG [<i>Pseudomonas viridiflava</i>]	Βαθμολογία = 60.1 bits (144), Τιμή-E = 3e-08, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 41/117 (35%), Θετικά = 61/117 (52%), Κενά = 1/117 (0%)
ABA47304	HrpG [<i>Pseudomonas cichorii</i>]	Βαθμολογία = 51.2 bits (121), Τιμή-E = 1e-05, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 41/121 (33%), Θετικά = 61/121 (50%), Κενά = 2/121 (1%)
2ος κύκλος		
AF292566	RspG [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	Βαθμολογία = 59.4 bits (143), Τιμή-E = 6e-08, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 27/123 (21%), Θετικά = 49/123 (39%), Κενά = 3/123 (2%)
ZP_01528923, EAV20048	type III secretion protein HrpG [<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp]	Βαθμολογία = 53.3 bits (127), Τιμή-E = 3e-06, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 28/132 (21%), Θετικά = 43/132 (32%), Κενά = 2/132 (1%)
ABB91654	type III secretion protein HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>]	Βαθμολογία = 47.5 bits (112), Τιμή-E = 2e-04, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 28/121 (23%), Θετικά = 43/121 (35%), Κενά = 5/121 (4%)
YP_234291, AAY36253	type III secretion protein HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a]	Βαθμολογία = 45.9 bits (108), Τιμή-E = 6e-04, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 25/121 (20%), Θετικά = 43/121 (35%), Κενά = 3/121 (2%)
BAD30079	HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>]	Βαθμολογία = 45.9 bits (108), Τιμή-E = 6e-04, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 27/121 (22%), Θετικά = 44/121 (36%), Κενά = 3/121 (2%)
AAP72285	HrpG [<i>Pseudomonas savastanoi</i>]	Βαθμολογία = 45.2 bits (106), Τιμή-E = 0.001, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 27/121 (22%), Θετικά = 44/121 (36%), Κενά = 3/121 (2%)
YP_273538, AAS20451, AAZ33082	type III secretion component protein HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A]	Βαθμολογία = 45.2 bits (106), Τιμή-E = 0.001, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 27/121 (22%), Θετικά = 44/121 (36%), Κενά = 3/121 (2%)
AAT96207	HrpG [<i>Pseudomonas viridiflava</i>]	Βαθμολογία = 43.6 bits (102), Τιμή-E = 0.003, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 24/121 (19%), Θετικά = 42/121 (34%), Κενά = 3/121 (2%)
NP_791215, AAO54910	type III secretion protein HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> str. DC3000]	Βαθμολογία = 43.2 bits (101), Τιμή-E = 0.004, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 25/121 (20%), Θετικά = 40/121 (33%), Κενά = 3/121 (2%)
3ος κύκλος		
AAC35805, AAR98525	HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>], HrpF [<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>]	Βαθμολογία = 159 bits (404), Τιμή-E = 3e-38, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 26/123 (21%), Θετικά = 43/123 (34%), Κενά = 3/123 (2%)
AAT96153	HrpG [<i>Pseudomonas viridiflava</i>]	Βαθμολογία = 42.9 bits (100), Τιμή-E = 0.005, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 24/121 (19%), Θετικά = 42/121 (34%), Κενά = 3/121 (2%)
AAC34755	HrpG [<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>]	Βαθμολογία = 42.5 bits (99), Τιμή-E = 0.007, Μέθοδος: Composition-based stats. Ταυτοσημίες = 25/121 (20%), Θετικά = 40/121 (33%), Κενά = 3/121 (2%)

Πολλαπλή στοίχιση των παραπάνω αλληλουχιών μέσω της CLUSTAL_W (EBI). Η παρουσίαση γίνεται από το ESpript:



Φυλογενετικό δέντρο των παραπάνω αλληλουχιών όπως προέκυψε από την CLUSTAL_W. Η παρουσίαση γίνεται από το πρόγραμμα PhyloDraw. Σε πλαίσιο παρουσιάζεται η πρωτεΐνη που μελετήθηκε βιοχημικά στην παρούσα διατριβή, HspG (*P. syringae* pv phaseolicola):

C:\Documents and Settings\Administrator\My Documents\AGA2\BIOcomputing\testttt.ph
 Number Of Species = 22



8.4 Επιπρόσθετες συνθήκες σάρωσης πειραμάτων κρυστάλλωσης

Πίνακες συνθηκών κρυστάλλωσης που δοκιμάστηκαν επιπρόσθετα των εμπορικών συνθηκών σάρωσης. Οι συνθήκες δημιουργήθηκαν με το πρόγραμμα CRYSTOOL (Εδάφιο 2.5.5, σελίδα 50) και στηρίζονται σε ατελή παραγοντική (incomplete factorial) έρευνα του πολυπαραμετρικού χώρου. Τα επιτρεπτά όρια κάθε παράγοντα επιλέγονται βάση της συμπεριφοράς της υπό μελέτη πρωτεΐνης στα αρχικά screen σποραδικού πίνακα και τύπου ίχνους περιορίζοντας τον πολυπαραμετρικό χώρο σε ένα υποσύνολο όπου ενοείτε η μη βίαια κατακρήμνιση της πρωτεΐνης.

Για την περίπτωση της πρωτεΐνης HrpG ελέγχθηκαν οι επιπλέον συνθήκες:

A) Basic screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
1	57.15%MPD	0.10M HEPES	7.0	1.00%2-Butanol	2.03%Glycerol
2	24.16%PEG 200 or 400	0.10M HEPES	7.5	0.95%1 or 2 propanol	
3	10.86%PEG1000 or 1500	0.10M Glycine	9.5	3.64%PEG200	
4	3.03%PEG20000	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.15M Am-Nitrate	
5	11.37%Am-Sulfate	0.10M Na-Acetate	4.0	0.56%dioxane	0.08%triton-X100
6	21.55%PEG600	0.10M Glycine	9.5	4.05%Ethanol	

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
7	8.72% CsCl	0.10M Glycine	9.5	0.09M Li-Chloride	
8	38.32% Na or K-Acetate	0.10M Na-Citrate	4.0	6.68% PEG400	6.22% Glycerol
9	25.28% dioxane	0.10M MES	6.5	1.21% Ethanol	
10	27.52% CuCl ₂ -CuSO ₄	0.10M BisTriPro	9.0	0.04M Ca-Chloride	
11	23.96% Na Citrate	0.10M Na-Acetate	4.0	0.01M Na-Acetate	0.08% triton-X100
12	10.18% Ethanol or Methanol	0.10M Glycine	9.5	0.10M glycine	
13	30.23% Mg-Acetate	0.10M MES	5.5	0.08M Am-Sulfate	0.05% triton-X100
14	12.06% PEG1000 or 1500	0.10M MES	6.5	4.08% Methanol	
15	37.57% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.5		
16	25.31% Am-Phosphate	0.10M MES	6.5		
17	15.04% Ethanol or Methanol	0.10M Na-Acetate	4.0		
18	13.95% PEG1000 or 1500	0.10M TRIS-HCl	8.0	9.90% PEG600	
19	7.96% Na Citrate	0.10M HEPES	7.0	4.39% PEG200	0.07% triton-X100
20	16.84% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M MES	6.5	0.02M glycine	
21	34.99% Am-Sulfate	0.10M MES	6.5	0.07M Na-Citrate	0.04% tween20
22	9.51% Am-Chloride	0.10M MES	5.5	3.47% PEG400	
23	27.05% Ethanol or Methanol	0.10M Glycine	9.5	0.03M Na-Citrate	3.13% Glycerol
24	41.20% MPD	0.10M HEPES	7.5		6.89% Glycerol
25	3.35% PEG20000	0.10M Na-Citrate	4.0	4.33% PEG400	0.04% triton-X100
26	14.99% ethylene glycol	0.10M MES	5.5	0.06M Na-Citrate	6.75% Glycerol
27	19.64% PEG 200 or 400	0.10M HEPES	7.5	2.50% dioxane	0.04% triton-X100
28	33.14% Na-Formate	0.10M HEPES	7.5		
29	7.19% Am-Sulfate	0.10M MES	5.5	3.05% Ethanol	
30	24.59% PEG1000 or 1500	0.10M MES	6.5	6.62% diethyleneglycol	
31	25.77% KNO ₃	0.10M MES	5.5		0.05% triton-X100
32	38.06% CsCl	0.10M MES	5.5		
33	42.48% Mg-Acetate	0.10M Glycine	9.5	0.04M Na ₂ -H-Phosphate	
34	26.34% 2- or 1-butanol	0.10M Na-Citrate	4.0	0.06M Na-K-Tartrate	0.01% tween20
35	5.06% ethylene glycol	0.10M MES	6.5	6.45% PEG200	0.04% triton-X100
36	57.83% Ethanol or Methanol	0.10M HEPES	7.5		
37	3.31% PEG20000	0.10M MES	6.5	0.42% Ethanol	
38	18.72% Na-Formate	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.09M urea	0.01% tween20
39	16.08% PEG1000 or 1500	0.10M BisTriPro	9.0	1.96% PEG600	
40	28.99% Am-Sulfate	0.10M MES	5.5		
41	25.70% 1 or 2-propanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	5.44% 1 or 2 propanol	
42	10.58% Mg or Li -Chloride	0.10M HEPES	7.5		0.04% tween20
43	3.38% PEG20000	0.10M HEPES	7.5	0.04M glycine	6.58% Glycerol
44	9.25% CsCl	0.10M MES	6.5	0.10M Li-Chloride	
45	16.87% MPD	0.10M BisTriPro	9.0	0.08M Li-Sulfate	0.08% triton-X100
46	16.75% Ethanol or Methanol	0.10M Glycine	9.5	0.07M glycine	
47	34.20% Na-K-Tartrate	0.10M HEPES	7.5	0.95% PEG600	
48	37.80% 2- or 1-butanol	0.10M Glycine	9.5	0.05M Na-K-Tartrate	
49	12.17% MPD	0.10M Glycine	9.5		
50	10.25% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.08M urea	5.44% Glycerol
51	10.40% PEG600	0.10M HEPES	7.5	9.48% 1 or 2 propanol	
52	31.59% Am-Chloride	0.10M Glycine	9.5	0.04M glycine	
53	36.78% Am-Sulfate	0.10M TRIS-HCl	8.5		
54	24.31% Zn-Acetate or SO ₄	0.10M MES	6.5	0.02M Ba-Chloride	
55	20.71% Na-Formate	0.10M MES	5.5	3.01% 1 or 2 propanol	0.07% triton-X100
56	11.67% MPD	0.10M BisTriPro	9.0		
57	38.50% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.0		
58	12.61% ethylene glycol	0.10M BisTriPro	9.0	0.04M Ba-Chloride	
59	41.72% Mg or Li -Chloride	0.10M HEPES	7.0	5.94% MPD	
60	20.28% Na-Formate	0.10M Glycine	9.5	4.07% Ethanol	
61	24.08% PEG600	0.10M MES	6.5	0.05M Cs-Chloride	9.74% Glycerol
62	14.18% 1 or 2-propanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.19M Am-Nitrate	0.02% triton-X100
63	28.75% Na-K-Phosphate	0.10M Glycine	9.5		0.07% tween20
64	12.10% 2- or 1-butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.02M Na-K-Tartrate	9.04% Glycerol
65	34.31% KNO ₃	0.10M MES	5.5	9.91% Methanol	7.83% Glycerol
66	7.83% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M Glycine	9.5	7.45% diethyleneglycol	

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
67	26.47% Am-Nitrate	0.10M MES	5.5	7.35% 1 or 2 propanol	
68	4.90% PEG20000	0.10M TRIS-HCl	8.5	7.25% MPD	5.64% Glycerol
69	27.61% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.11M imidazole	4.05% Glycerol
70	22.84% 1 or 2-propanol	0.10M Glycine	9.5	8.31% Ethanol	0.09% triton-X100
71	30.26% Na-Formate	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.05M Ba-Chloride	
72	55.42% MPD	0.10M Na-Acetate	4.0		
73	26.65% CsCl	0.10M Na-Acetate	4.0	0.04M Na-Citrate	0.02% triton-X100
74	9.41% Na Citrate	0.10M TRIS-HCl	8.0	5.77% ethylene glycol	2.52% Glycerol
75	4.46% ethylene glycol	0.10M MES	6.5		
76	4.15% PEG20000	0.10M MES	6.5	2.73% PEG600	5.87% Glycerol
77	29.50% Mg-Acetate	0.10M HEPES	7.5	4.97% 2-Butanol	4.00% Glycerol
78	24.67% dioxane	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.07M Mg-Chloride	
79	2.16% PEG20000	0.10M Glycine	9.5	8.18% Ethanol	4.71% Glycerol
80	29.24% Li or Na-Sulfate	0.10M Glycine	9.5	1.80% PEG600	0.05% tween20
81	23.23% PEG 200 or 400	0.10M BisTriPro	9.0	0.03M urea	0.08% triton-X100
82	25.37% Mg-Acetate	0.10M Glycine	9.5	0.02M Li-Sulfate	
83	16.70% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.0	4.87% 2-Butanol	5.77% Glycerol
84	33.62% Na-Citrate	0.10M MES	5.5	0.02M glycine	3.29% Glycerol
85	20.95% dioxane	0.10M BisTriPro	9.0	5.06% Ethanol	
86	13.23% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.0		
87	23.19% Am-Sulfate	0.10M Glycine	9.5		
88	19.23% Na-K-Phosphate	0.10M TRIS-HCl	8.0		
89	33.52% KNO3	0.10M MES	6.5	4.81% 1 or 2 propanol	6.88% Glycerol
90	26.39% Mg or Li -Chloride	0.10M Na-Citrate	4.0		
91	13.91% PEG 200 or 400	0.10M HEPES	7.0	0.14M imidazole	0.09% triton-X100
92	24.37% KNO3	0.10M Glycine	9.5		1.22% Glycerol
93	44.87% Mg-Acetate	0.10M HEPES	7.0		2.69% Glycerol
94	3.12% PEG20000	0.10M TRIS-HCl	8.0	3.25% MPD	1.07% Glycerol
95	6.96% ethylene glycol	0.10M MES	5.5	0.05M urea	2.79% Glycerol
96	16.57% Na or K-Acetate	0.10M MES	6.5	0.02M Cs-Chloride	0.02% tween20
97	48.14% 1 or 2-propanol	0.10M Glycine	9.5	0.06M Ca-Chloride	
98	33.91% Na-K-Phosphate	0.10M BisTriPro	9.0	9.51% PEG200	
99	15.68% MPD	0.10M HEPES	7.0	5.38% PEG400	3.98% Glycerol
100	14.52% Na Citrate	0.10M Glycine	9.5	4.14% diethyleneglycol	7.18% Glycerol
101	22.07% Na or K -Chloride	0.10M Na-Citrate	4.0	4.90% MPD	5.23% Glycerol
102	16.09% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.11M Am-Phosphate	
103	4.59% PEG20000	0.10M MES	6.5		3.87% Glycerol
104	36.43% Ethanol or Methanol	0.10M Glycine	9.5	0.04M Am-Sulfate	0NONE
105	33.53% KNO3	0.10M Glycine	9.5		0.06% triton-X100
106	7.13% dioxane	0.10M HEPES	7.5	3.46% Methanol	
107	13.88% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M MES	6.5	8.61% 1 or 2 propanol	
108	17.94% Na-K-Phosphate	0.10M BisTriPro	9.0		
109	13.71% Na-Formate	0.10M Na-Acetate	4.0	0.02M Ba-Chloride	
110	13.10% dioxane	0.10M MES	6.5	0.03M glycine	
111	16.86% PEG600	0.10M MES	6.5	0.05M Na2-H-Phosphate	
112	52.81% MPD	0.10M TRIS-HCl	8.0	7.80% PEG400	
113	16.13% Li or Na-Sulfate	0.10M BisTriPro	9.0	3.47% ethylene glycol	
114	12.88% Na-Formate	0.10M Glycine	9.5	1.46% PEG600	
115	28.91% Zn-Acetate or SO4	0.10M Glycine	9.5	0.05M imidazole	2.55% Glycerol
116	23.43% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.5	7.21% diethyleneglycol	
117	37.76% Na-K-Phosphate	0.10M Glycine	9.5	1.86% Methanol	
118	2.94% PEG20000	0.10M BisTriPro	9.0	0.10M glycine	
119	18.01% PEG600	0.10M Glycine	9.5		
120	29.88% CsCl	0.10M TRIS-HCl	8.0	2.78% MPD	0.06% triton-X100
121	32.39% Na or K-Acetate	0.10M MES	6.5	0.02M Na2-H-Phosphate	0.03% tween20
122	24.27% MPD	0.10M MES	5.5		0.05% tween20
123	18.89% PEG 200 or 400	0.10M TRIS-HCl	8.5		9.70% Glycerol
124	58.36% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.10M glycine	
125	44.22% Na or K-Formate	0.10M TRIS-HCl	8.5	8.67% PEG600	1.07% Glycerol
126	14.07% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.04M Na-Acetate	

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
127	3.06% PEG20000	0.10M Glycine	9.5	0.09M Na-Citrate	
128	42.81% Na Citrate	0.10M HEPES	7.0	1.31% 2-Butanol	8.90% Glycerol
129	2.76% PEG20000	0.10M MES	5.5	9.58% diethyleneglycol	
130	16.61% Na-Formate	0.10M MES	6.5	4.51% PEG200	0.10% tween20
131	23.77% dioxane	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.02M Ba-Chloride	
132	17.72% PEG1000 or 1500	0.10M HEPES	7.5	8.31% dioxane	
133	22.72% MPD	0.10M Na-Acetate	4.0	0.03M Na-Acetate	7.30% Glycerol
134	43.65% Am-Sulfate	0.10M TRIS-HCl	8.0	1.54% MPD	
135	15.29% Na-K-Phosphate	0.10M HEPES	7.0	0.04M Na-K-Tartrate	
136	17.93% PEG1000 or 1500	0.10M Na-Citrate	4.0	8.30% diethyleneglycol	3.18% Glycerol
137	21.25% dioxane	0.10M Glycine	9.5		
138	19.77% MPD	0.10M Glycine	9.5		
139	22.21% MPD	0.10M Glycine	9.5		
140	9.37% KNO3	0.10M Glycine	9.5	0.05M Na-K-Tartrate	0.09% triton-X100
141	32.29% Ethanol or Methanol	0.10M BisTriPro	9.0	6.77% 1 or 2 propanol	
142	22.56% PEG 200 or 400	0.10M MES	6.5	1.18% PEG200	
143	13.67% ethylene glycol %28d%	0.10M Na-Acetate	4.0	5.46% 2-Butanol	0.09% triton-X100
144	42.30% Na or K-Formate	0.10M MES	6.5	0.06M Li-Chloride	
145	5.87% ethylene glycol %28d%	0.10M BisTriPro	9.0	8.20% Methanol	0.09% triton-X100
146	23.82% 1 or 2-propanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	4.87% PEG200	
147	3.15% PEG20000	0.10M Na-Acetate	4.0	0.09M Am-Nitrate	
148	19.80% MPD	0.10M MES	5.5	1.25% Ethanol	0.07% tween20
149	36.66% Na-Citrate	0.10M HEPES	7.0	0.03M glycine	0.06% triton-X100
150	16.63% Am-Phosphate	0.10M HEPES	7.0	8.09% PEG600	
151	2.45% PEG20000	0.10M MES	5.5		
152	3.23% PEG20000	0.10M Na-Acetate	4.0	0.07M Am-Phosphate	5.73% Glycerol
153	25.92% Mg-Acetate	0.10M MES	6.5	0.08M glycine	
154	35.42% 2-Butanol or 1-butano%	0.10M Na-Acetate	4.0	0.08M Li-Chloride	8.82% Glycerol
155	32.02% Na-K-Tartrate	0.10M MES	5.5	0.03M Na2-H-Phosphate	
156	18.27% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.0	9.02% Methanol	
157	16.14% PEG1000 or 1500	0.10M Na-Citrate	4.0	3.57% Methanol	
158	16.39% dioxane	0.10M MES	5.5	4.39% ethylene glycol	
159	45.94% 1 or 2-propanol	0.10M Na-Citrate	4.0	3.85% 2-Butanol	3.06% Glycerol
160	36.24% Na or K -Chloride	0.10M MES	6.5	2.06% PEG200	
161	11.53% Mg-Acetate	0.10M TRIS-HCl	8.0	8.81% PEG600	0.03% triton-X100
162	11.10% Na-K-Tartrate	0.10M TRIS-HCl	8.0		
163	18.11% CuCl2-CuSO4	0.10M BisTriPro	9.0	0.07M Am-Phosphate	
164	14.99% Am-Chloride	0.10M TRIS-HCl	8.0	2.28% 1 or 2 propanol	0.05% tween20
165	5.48% Na Citrate	0.10M MES	6.5	0.02M Ba-Chloride	0.08% tween20
166	13.71% 1 or 2-propanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.05M urea	0.03% triton-X100
167	14.15% Li or Na-Sulfate	0.10M HEPES	7.0	9.91% 1 or 2 propanol	
168	14.07% 2-Butanol or 1-butano%	0.10M TRIS-HCl	8.5	1.78% Methanol	
169	24.68% PEG1000 or 1500	0.10M Glycine	9.5	7.88% ethylene glycol	0.06% triton-X100
170	16.83% Am-Phosphate	0.10M MES	6.5		0.05% tween20
171	23.18% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M MES	6.5	9.83% Methanol	
172	42.40% Am-Sulfate	0.10M MES	5.5	9.15% 2-Butanol	
173	40.69% Na-Citrate	0.10M MES	5.5		1.92% Glycerol
174	26.85% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	9.12% Methanol	0.09% triton-X100
175	41.39% Na or K-Formate	0.10M TRIS-HCl	8.0	2.85% PEG400	
176	16.05% MPD	0.10M BisTriPro	9.0	7.08% diethyleneglycol	
177	37.27% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.04M Am-Sulfate	0.09% tween20
178	13.41% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M TRIS-HCl	8.5	1.03% ethylene glycol	0.08% triton-X100
179	22.35% Na-K-Phosphate	0.10M TRIS-HCl	8.5	8.49% Methanol	
180	29.16% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M HEPES	7.5		
181	29.42% dioxane	0.10M Glycine	9.5	0.05M Am-Phosphate	
182	26.03% Li or Na-Sulfate	0.10M BisTriPro	9.0		
183	14.13% PEG 200 or 400	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.08M Am-Sulfate	0.09% tween20
184	6.49% ethylene glycol %28d%	0.10M Glycine	9.5	0.01M Mg-Chloride	
185	11.20% CsCl	0.10M HEPES	7.5	9.17% Ethanol	
186	40.01% Am-Chloride	0.10M HEPES	7.5	6.40% 2-Butanol	

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
187	5.18% CsCl	0.10M Na-Acetate	4.0	0.09M glycine	0.07% triton-X100
188	9.03% ethylene glycol %28d%	0.10M MES	5.5	0.08M Zn-Acetate	
189	49.59% MPD	0.10M MES	5.5	5.15% ethylene glycol	
190	2.68% PEG20000	0.10M MES	5.5	5.26% diethyleneglycol	9.48% Glycerol
191	34.93% Na-K-Phosphate	0.10M MES	6.5		9.13% Glycerol
192	5.29% Mg-Acetate	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.05M urea	9.87% Glycerol
193	40.32% Am-Sulfate	0.10M TRIS-HCl	8.5	1.10% ethylene glycol	
194	5.15% Na or K-Acetate	0.10M Na-Citrate	4.0		
195	30.47% 1 or 2-propanol	0.10M MES	6.5		
196	11.58% Am-Chloride	0.10M Glycine	9.5	9.86% MPD	7.36% Glycerol
197	9.02% Na or K-Acetate	0.10M HEPES	7.0	2.90% Ethanol	
198	20.50% Na-Citrate	0.10M MES	5.5	0.03M Ba-Chloride	
199	28.22% Na or K-Acetate	0.10M MES	6.5	8.52% 1 or 2 propanol	
200	38.72% Na-K-Tartrate	0.10M TRIS-HCl	8.5	5.18% ethylene glycol	0.09% tween20
201	23.22% Zn-Acetate or SO4	0.10M TRIS-HCl	8.5	4.73% diethyleneglycol	
202	34.52% Na or K -Chloride	0.10M Glycine	9.5	0.03M Na-Citrate	
203	17.37% ethylene glycol	0.10M Glycine	9.5	3.91% PEG600	4.89% Glycerol
204	43.88% MPD	0.10M Glycine	9.5	4.08% diethyleneglycol	
205	46.26% Ethanol or Methanol	0.10M MES	6.5	0.09M glycine	
206	12.26% Na or K -Chloride	0.10M MES	6.5	0.92% MPD	
207	18.37% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	7.93% PEG600	
208	4.87% PEG20000	0.10M Na-Acetate	4.0	5.20% 2-Butanol	
209	25.05% PEG 200 or 400	0.10M MES	6.5	0.05M glycine	9.07% Glycerol
210	22.86% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M MES	6.5	7.43% MPD	
211	43.81% Na or K -Chloride	0.10M MES	6.5		0.08% triton-X100
212	17.32% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	6.99% dioxane	0.02% triton-X100
213	24.15% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.08M Zn-Acetate	
214	36.33% Am-Nitrate	0.10M BisTriPro	9.0	1.00% PEG200	
215	56.14% MPD	0.10M MES	5.5		
216	25.30% Na or K -Chloride	0.10M MES	5.5	0.09M Li-Chloride	
217	28.87% MPD	0.10M HEPES	7.0		3.04% Glycerol
218	2.84% PEG20000	0.10M HEPES	7.0	0.04M glycine	0.10% tween20
219	20.73% PEG 200 or 400	0.10M HEPES	7.5	2.31% diethyleneglycol	
220	28.13% PEG600	0.10M Na-Acetate	4.0	9.91% MPD	
221	19.36% PEG1000 or 1500	0.10M BisTriPro	9.0	7.00% Methanol	7.79% Glycerol
222	9.46% CsCl	0.10M Na-Citrate	4.0	9.89% dioxane	0.06% triton-X100
223	25.68% Ethanol or Methanol	0.10M MES	5.5	0.02M glycine	9.76% Glycerol
224	8.77% Na or K-Formate	0.10M MES	5.5	4.01% Ethanol	
225	28.26% 1 or 2-propanol	0.10M HEPES	7.5	0.09M glycine	
226	38.22% Na-K-Tartrate	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.01M Na-Acetate	
227	7.53% Na-Citrate	0.10M Glycine	9.5	8.84% Methanol	7.59% Glycerol
228	5.76% Na or K-Acetate	0.10M Glycine	9.5	2.99% ethylene glycol	8.78% Glycerol
229	34.60% Am-Phosphate	0.10M BisTriPro	9.0		
230	39.88% Am-Nitrate	0.10M HEPES	7.0	0.06M Mg-Chloride	
231	51.39% 1 or 2-propanol	0.10M MES	5.5	0.06M Am-Sulfate	
232	34.96% Zn-Acetate or SO4	0.10M MES	5.5	0.05M glycine	7.48% Glycerol
233	40.58% Zn-Acetate or SO4	0.10M BisTriPro	9.0	1.38% PEG400	0.02% tween20
234	6.79% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M MES	5.5	0.08M imidazole	
235	32.75% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.06M Li-Chloride	
236	10.69% Na or K-Acetate	0.10M TRIS-HCl	8.0	6.15% PEG400	
237	56.12% MPD	0.10M MES	5.5	0.02M Li-Sulfate	
238	11.85% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.04M Li-Chloride	3.27% Glycerol
239	26.51% Ethanol or Methanol	0.10M HEPES	7.5	6.62% PEG600	7.18% Glycerol
240	2.55% PEG20000	0.10M MES	6.5	0.02M glycine	
241	17.82% Ethanol or Methanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.03M Na-K-Tartrate	
242	30.36% Na-K-Phosphate	0.10M MES	6.5	0.17M Am-Phosphate	
243	36.01% Na-Formate	0.10M MES	6.5	5.16% dioxane	
244	38.54% Na-K-Tartrate	0.10M Na-Citrate	4.0	4.92% diethyleneglycol	
245	10.57% Na or K -Chloride	0.10M TRIS-HCl	8.5	7.55% Ethanol	0.03% tween20
246	28.40% Na-K-Tartrate	0.10M Na-Acetate	4.0	0.03M glycine	

	Precipitant	Buffer	pH	Additive	Detergent
247	18.94% Am-Nitrate	0.10M MES	6.5	0.02M Cs-Chloride	6.96% Glycerol
248	21.94% dioxane	0.10M HEPES	7.5	7.41% 2-Butanol	0.05% triton-X100
249	31.31% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M MES	6.5	0.09M Na-Acetate	6.85% Glycerol
250	14.14% Na-K-Phosphate	0.10M Glycine	9.5	9.03% MPD	0.03% triton-X100
251	40.31% Zn-Acetate or SO4	0.10M MES	5.5	4.52% 2-Butanol	
252	19.20% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	8.55% PEG400	
253	25.14% Na-K-Tartrate	0.10M Glycine	9.5	0.04M glycine	
254	17.17% ethylene glycol	0.10M BisTriPro	9.0	0.02M Zn-Acetate	
255	19.96% PEG 4k or 6k or 8k	0.10M HEPES	7.5	7.37% PEG200	0.09% tween20
256	19.56% MPD	0.10M Glycine	9.5		
257	32.09% Am-Nitrate	0.10M TRIS-HCl	8.0	0.03M glycine	
258	21.07% Am-Nitrate	0.10M Na-Acetate	4.0	9.96% 1 or 2 propanol	
259	35.42% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M Na-Citrate	4.0	0.05M Am-Sulfate	
260	44.62% KNO3	0.10M HEPES	7.0		
261	19.26% Am-Chloride	0.10M Glycine	9.5	5.04% diethyleneglycol	4.77% Glycerol
262	32.59% Am-Chloride	0.10M TRIS-HCl	8.5	2.01% Ethanol	0.07% tween20
263	17.15% Na-Formate	0.10M MES	6.5	4.38% dioxane	
264	24.91% PEG 200 or 400	0.10M Na-Citrate	4.0	0.09M Li-Chloride	
265	27.60% Zn-Acetate or SO4	0.10M MES	6.5	0.94% Methanol	0.02% triton-X100
266	2.19% PEG20000	0.10M MES	6.5	0.06M Ca-Chloride	0.06% tween20
267	27.94% Am-Chloride	0.10M HEPES	7.5	0.03M Am-Sulfate	
268	7.10% ethylene glycol	0.10M BisTriPro	9.0	0.06M Mg-Chloride	6.20% Glycerol
269	20.95% Na or K-Acetate	0.10M MES	6.5	7.34% Ethanol	
270	9.57% Na-Citrate	0.10M HEPES	7.0	0.04M glycine	
271	29.14% CuCl2-CuSO4	0.10M Glycine	9.5		
272	32.78% 2-Butanol or 1-butanol	0.10M Glycine	9.5	0.10M Ca-Chloride	9.91% Glycerol
273	13.71% PEG1000 or 1500	0.10M HEPES	7.5	7.07% 1 or 2 propanol	6.41% Glycerol
274	21.57% PEG600	0.10M Glycine	9.5	6.71% MPD	1.90% Glycerol
275	18.30% Li or Na-Sulfate	0.10M HEPES	7.0	0.99% MPD	
276	38.94% Na or K -Chloride	0.10M MES	5.5	0.02M Am-Sulfate	
277	15.32% Na or K-Acetate	0.10M MES	5.5	6.06% 1 or 2 propanol	1.84% Glycerol
278	20.65% Li or Na-Sulfate	0.10M HEPES	7.5		
279	12.93% PEG 200 or 400	0.10M Glycine	9.5	0.02M Am-Sulfate	6.51% Glycerol
280	15.31% PEG600	0.10M MES	6.5	0.82% diethyleneglycol	
281	7.87% Zn-Acetate or SO4	0.10M BisTriPro	9.0	0.09M Cs-Chloride	
282	4.76% PEG20000	0.10M HEPES	7.0	3.75% Methanol	
283	18.80% PEG 200 or 400	0.10M TRIS-HCl	8.0	4.29% Ethanol	0.04% triton-X100
284	43.39% 2-Butanol or 1-butano%	0.10M MES	6.5	3.03% Methanol	7.93% Glycerol
285	8.38% Na-Citrate	0.10M TRIS-HCl	8.5		
286	15.18% Li or Na-Sulfate	0.10M MES	6.5	0.02M Ba-Chloride	
287	26.97% Na-K-Tartrate	0.10M BisTriPro	9.0	0.03M Na-Acetate	3.70% Glycerol
288	47.90% 1 or 2-propanol	0.10M HEPES	7.0	0.01M Ca-Chloride	

Το εκατοστιαίο ποσοστό των αλάτων ως κύριων κατακρημνιστών αναφέρεται στο ποσοστό κορεσμένου διαλύματος του συγκεκριμένου άλατος.

B) PEG-Ion screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
1	25.64% PEG8000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.19M Li-Sulfate
2	5.12% PEG6000	0.10M TRIS-HCl	8	0.13M Na-Acetate
3	14.32% PEG6000	0.10M MES	5.5	0.08M Li-Chloride
4	7.07% PEG400	0.10M MES	6	0.20M Li-Chloride
5	1.88% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.24M K-Iodide
6	9.43% PEG200	0.10M MES	6.5	0.27M Am-Sulfate
7	28.57% PEG6000	0.10M MES	6	0.09M Na-Acetate
8	22.35% PEG6000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.29M Li-Sulfate
9	7.16% PEG4000	0.10M HEPES	7	0.16M Li-Chloride
10	28.15% PEG1000	0.10M HEPES	7.5	0.07M K-Acetate
11	24.59% ethylene glycol	0.10M HEPES	7	0.08M Am-Floride
12	25.96% PEG1500	0.10M MES	6	0.15M Li-Chloride
13	5.29% PEG 20k	0.10M MES	6.5	0.17M Na-Formate

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
14	18.93% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8	0.25M Na-H ₂ -Phosphate
15	7.50% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.06M Na-Bromide
16	18.32% PEG600	0.10M HEPES	7.5	0.26M Am-Sulfate
17	17.44% PEG4000	0.10M TRIS-HCl	8	0.24M Na-Formate
18	11.87% ethylene glycol	0.10M MES	5.5	0.17M Ca-Chloride
19	26.99% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8	0.08M Na-Thiosulfate
20	28.92% PEG200	0.10M HEPES	7	0.18M K-Iodide
21	11.37% PEG8000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.12M K-Chloride
22	13.29% PEG1500	0.10M HEPES	7.5	0.08M K-H ₂ -Phosphate
23	27.10% PEG8000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.18M Na-Sulfate
24	21.76% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.12M Na ₂ -H-Phosphate

Γ) Organics – Ion Screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
1	13.23% 2-Butanol	0.10M MES	5.5	0.13M Am-Sulfate
2	27.67% acetone	0.10M MES	6.5	0.10M Ni-Sulfate
3	6.82% Isopropanol	0.10M MES	6.5	0.23M Li-Chloride
4	8.43% Isopropanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.16M Na-Acetate
5	18.52% n-propanol	0.10M HEPES	7	0.28M Na-Chloride
6	22.76% 2-Butanol	0.10M MES	6	0.08M Ca-Chloride
7	19.61% 1-butanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.08M K-Acetate
8	29.85% n-propanol	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.18M Am-Fluoride
9	16.00% acetone	0.10M MES	6.5	0.20M K-Acetate
10	17.15% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.14M Na-Sulfate
11	22.49% glycerol	0.10M MES	6.5	0.17M K-H ₂ -Phosphate
12	21.41% acetone	0.10M MES	6.5	0.07M Na-Sulfate
13	17.13% 2-butanol	0.10M HEPES	7.5	0.14M Na-Acetate
14	21.56% n-propanol	0.10M MES	6.5	0.25M Na-Thiosulfate
15	29.94% MPD	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.21M Am-Fluoride
16	10.50% Isopropanol	0.10M HEPES	7	0.17M Na-Bromide
17	11.43% glycerol	0.10M MES	5.5	0.30M Na ₂ -H-Phosphate
18	10.04% glycerol	0.10M HEPES	7	0.24M Na-Formate
19	8.16% glycerol	0.10M HEPES	7.5	0.06M Ca-Chloride
20	18.38% n-propanol	0.10M MES	6	0.06M Na-Formate
21	36.21% MPD	0.10M TRIS-HCl	8	0.10M Na ₂ -H-Phosphate
22	25.96% glycerol	0.10M TRIS-HCl	8	0.15M Na-H ₂ -Phosphate
23	28.00% acetone	0.10M MES	6	0.07M Na-Bromide
24	28.75% Isopropanol	0.10M HEPES	7.5	0.19M K-Nitrate

Δ) MPD – Ion screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
1	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Cu-Chloride
2	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na-Sulfate
3	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M K-H ₂ -Phosphate
4	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Ni-Sulfate
5	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na-Thiosulfate
6	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Am-Sulfate
7	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Ca-Chloride
8	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Li-Chloride
9	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Li-Sulfate
10	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Sr-Chloride
11	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M K-Iodide
12	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na-Bromide
13	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M K ₂ -H-Phosphate
14	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M K-Chloride
15	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na ₂ -H-Phosphate
16	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na-H ₂ -Phosphate
17	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Ba-Chloride
18	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Na-Chloride
19	20.00% MPD	0.10M HEPES	7.5	0.10M Si-Nitrate

20	20.00%	MPD	0.10M	HEPES	7.5	0.10M	Na-Formate
21	20.00%	MPD	0.10M	HEPES	7.5	0.10M	Na-Acetate
22	20.00%	MPD	0.10M	HEPES	7.5	0.10M	K-Acetate
23	20.00%	MPD	0.10M	HEPES	7.5	0.10M	K-Nitrate
24	20.00%	MPD	0.10M	HEPES	7.5	0.10M	Am-Floride

E) ORG-PEG screen

	Precipitant	Additive	Buffer	pH
1	16.24% Methanol	4.71% PEG4000	0.10M HEPES	7.5
2	20.93% 2-Butanol	4.83% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8
3	25.82% isopropanol	8.95% PEG6000	0.10M HEPES	7
4	38.40% MPD	5.71% PEG600	0.10M HEPES	7
5	14.63% Glycerol	5.41% PEG4000	0.10M TRIS-HCl	8.5
6	26.44% Methanol	6.17% PEG200	0.10M TRIS-HCl	8.5
7	24.49% Glycerol	4.45% PEG 20k	0.10M MES	5.5
8	16.34% Aceton	6.58% PEG400	0.10M MES	6
9	29.24% isopropanol	3.42% PEG1000	0.10M MES	5.5
10	14.79% 1-butanol	3.77% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8
11	39.72% Glycerol	3.23% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8
12	7.01% MPD	7.22% ethylene glycol	0.10M MES	6
13	17.26% Aceton	1.14% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8
14	19.81% n-propanol	9.17% PEG200	0.10M TRIS-HCl	8
15	19.78% Ethanol	4.97% PEG4000	0.10M TRIS-HCl	8
16	18.67% 1-butanol	4.33% PEG8000	0.10M MES	6
17	7.49% isopropanol	6.82% ethylene glycol	0.10M MES	6
18	28.34% 2-Butanol	5.78% PEG1500	0.10M TRIS-HCl	8.5
19	27.82% Aceton	8.27% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8.5
20	26.14% n-propanol	2.80% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8.5
21	22.20% 1-butanol	9.43% ethylene glycol	0.10M HEPES	7
22	19.64% Methanol	5.75% PEG400	0.10M HEPES	7.5
23	20.04% Aceton	5.47% PEG6000	0.10M HEPES	7.5
24	10.26% 1-butanol	7.78% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8

ΣΤ) PEG – Ion Screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
1	29.80% PEG400	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.73% Glycerol
2	26.79% PEG1000	0.10M MES	6.5	4.42% MPD
3	16.70% PEG1000	0.10M MES	5.5	1.64% 2-Butanol
4	12.04% PEG600	0.10M MES	5.5	2.05% Methanol
5	29.32% PEG1500	0.10M HEPES	7.5	1.58% PEG600
6	16.05% PEG400	0.10M TRIS-HCl	8.5	0.66% MPD
7	12.82% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8.5	5.00% PEG600
8	16.76% PEG8000	0.10M MES	6.5	1.34% Methanol
9	12.15% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.5	8.31% Aceton
10	14.65% PEG1500	0.10M HEPES	7.5	6.93% isopropanol
11	25.59% PEG200	0.10M HEPES	7	6.31% 1-butanol
12	7.04% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8	2.05% PEG600
13	8.67% PEG200	0.10M HEPES	7	8.48% 1-butanol
14	16.08% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8	8.42% PEG400
15	28.07% PEG200	0.10M TRIS-HCl	8.5	1.39% ethylene glycol
16	20.60% PEG600	0.10M TRIS-HCl	8.5	18.35% MPD
17	9.26% PEG400	0.10M MES	6	4.13% Aceton
18	13.16% ethylene glycol	0.10M MES	6	15.00% Glycerol
19	2.86% PEG 20k	0.10M TRIS-HCl	8	7.71% n-propanol
20	16.28% PEG1000	0.10M TRIS-HCl	8.5	8.40% n-propanol
21	21.89% PEG600	0.10M MES	6.5	0.26% Aceton
22	18.41% PEG600	0.10M HEPES	7.5	4.87% Glycerol
23	19.52% ethylene glycol	0.10M TRIS-HCl	8.5	3.85% 1-butanol
24	20.61% PEG4000	0.10M MES	6.5	8.78% Methanol

E) PEG screen

	Precipitant	Buffer	pH
1	6.69% PEG 8000	0.10M HEPES	8.1
2	5.91% PEG 8000	0.10M HEPES	6.9
3	8.17% PEG 4000	0.10M HEPES	8.1
4	23.73% PEG 1000	0.10M HEPES	8.1
5	6.03% PEG 4000	0.10M HEPES	8.1
6	7.55% PEG 6000	0.10M HEPES	8.1
7	21.04% PEG 600	0.10M HEPES	8.1
8	34.19% MPD	0.10M HEPES	6.9
9	7.09% PEG 400	0.10M HEPES	8.1
10	6.42% PEG 6000	0.10M HEPES	8.1
11	38.91% MPD	0.10M HEPES	8.1
12	26.76% PEG 400	0.10M HEPES	8.1
13	6.99% ethylene glycol	0.10M HEPES	8.1
14	22.27% PEG 1000	0.10M HEPES	6.9
15	6.27% PEG 20k	0.10M HEPES	8.1
16	9.17% PEG 4000	0.10M HEPES	8.1
17	6.32% PEG 1500	0.10M HEPES	8.1
18	13.21% PEG 4000	0.10M HEPES	6.9
19	19.16% PEG 6000	0.10M HEPES	8.1
20	14.30% PEG 1500	0.10M HEPES	8.1
21	27.93% PEG 600	0.10M HEPES	8.1
22	37.80% MPD	0.10M HEPES	8.1
23	11.75% ethylene glycol	0.10M HEPES	6.9
24	27.41% PEG 1000	0.10M HEPES	8.1

ΣΤ) Low pH screen

	Precipitant	Buffer	pH	Additive
1	26.24% tert-Butanol	0.10M Na-Citrate	4.6	0.15M Na-Malonate
2	23.87% PEG 1000	0.10M Na-Acetate	4.0	3.60% PEG1000
3	26.97% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	1.38% PEG1000
4	28.93% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	9.67% Isopropanol
5	12.09% tert-Butanol	0.10M Na-Citrate	4.6	0.00% NONE
6	26.62% Isopropanol	0.10M Na-Citrate	4.6	0.36M Na-K-Tartrate
7	12.55% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	7.12% tert-Butanol
8	17.51% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	6.95% tert-Butanol
9	29.30% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.00% NONE
10	13.25% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.12M Ca-Chloride
11	29.50% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.39M Mg-Chloride
12	26.50% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.04M Ca-Chloride
13	29.00% PEG 1000	0.10M Na-Acetate	4.0	1.36% tert-Butanol
14	22.31% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	9.15% Isopropanol
15	20.07% Isopropanol	0.10M Na-Citrate	4.6	8.12% tert-Butanol
16	29.43% PEG 1000	0.10M Na-Acetate	4.0	0.30M Na-K-Tartrate
17	25.27% Isopropanol	0.10M Na-Citrate	4.6	6.67% tert-Butanol
18	10.99% tert-Butanol	0.10M Na-Citrate	4.6	0.09M Na-Malonate
19	11.68% PEG 1000	0.10M Na-Acetate	4.0	0.21M Mg-Chloride
20	21.01% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.12M Ca-Chloride
21	28.60% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.29M Mg-Chloride
22	29.88% Isopropanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.00% NONE
23	23.27% PEG 1000	0.10M Na-Acetate	4.0	0.38M Na-Malonate
24	15.17% tert-Butanol	0.10M Na-Acetate	4.0	0.14M Mg-Chloride

Z) Organics_Volatile Organics screen

	Precipitant	Additive
1	33.05% MPD	8.38% Isopropanol
2	13.31% MPD	14.83% Methanol
3	30.45% MPD	25.70% Methanol
4	10.97% PEG 400	8.02% Isopropanol
5	30.55% diethylene glycol	27.89% Ethanol
6	12.52% glycerol	32.15% Methanol
7	12.49% MPD	26.71% Ethanol
8	42.30% ethylene glycol	19.69% Ethanol
9	35.36% PEG600	26.48% tert-Butanol
10	27.62% MPD	29.98% Isopropanol
11	41.74% ethylene glycol	21.03% Isopropanol
12	43.60% PEG 400	12.14% Isopropanol
13	42.94% ethylene glycol	14.19% Isopropanol
14	12.18% glycerol	12.56% Isopropanol
15	20.79% MPD	10.22% Isopropanol
16	41.68% MPD	26.01% Methanol
17	10.47% MPD	29.27% Methanol
18	26.79% diethylene glycol	15.65% Methanol
19	22.21% MPD	13.84% Ethanol
20	26.94% PEG 200	11.18% Isopropanol
21	26.18% MPD	7.47% Ethanol
22	15.77% glycerol	24.59% Ethanol
23	23.27% MPD	34.64% Methanol
24	14.47% PEG 200	21.44% Ethanol

Πίνακες συστηματικών συνθηκών που εξετάστηκαν επιπλέον των εμπορικών:

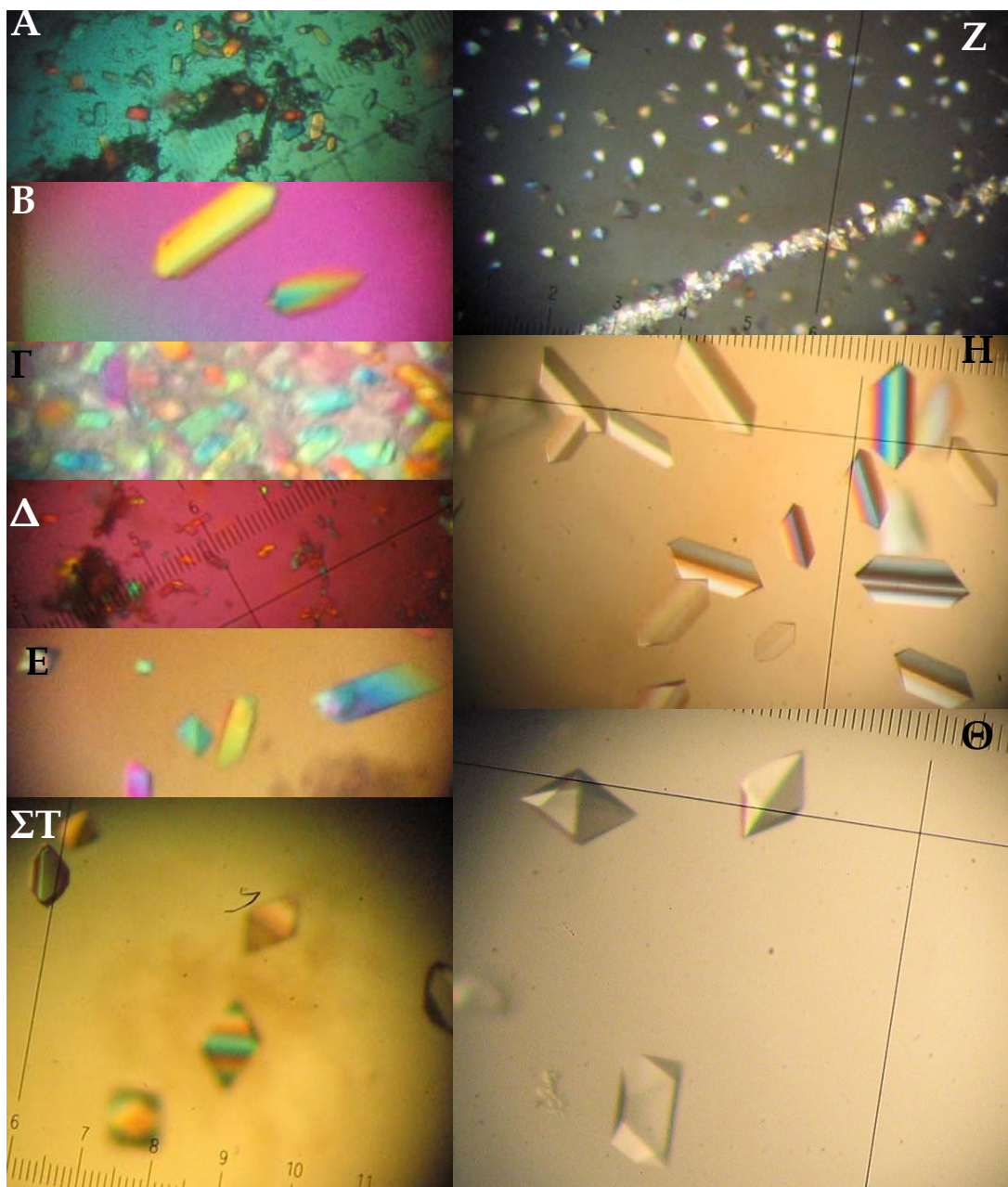
	20% PEG8000	23% PEG8000	26% PEG8000	29% PEG8000	32% PEG8000
pH 7.0 HEPES 0.1 M					
pH 7.5 HEPES 0.1 M					
pH 8.0 TRIS 0.1 M					
pH 8.5 TRIS 0.1 M					

	3% PEG8000	6% PEG8000	9% PEG8000	12% PEG8000	15% PEG8000	18% PEG8000
pH 5.5 MES 0.1 M						
pH 6.0 MES 0.1 M						
pH 6.5 MES 0.1 M						

	15% MPD	20% MPD	25% MPD	30% MPD	35% MPD	40% MPD
-						
0.1M KNO ₃						
0.2M KNO ₃						
0.1M KNO ₃						
0.1M HEPES pH 8.1						

8.5 Φαινόμενα που παρουσιάστηκαν στις σταγόνες κρυστάλλωσης

8.5.1 AvrPphF ORF1: Κρύσταλλοι

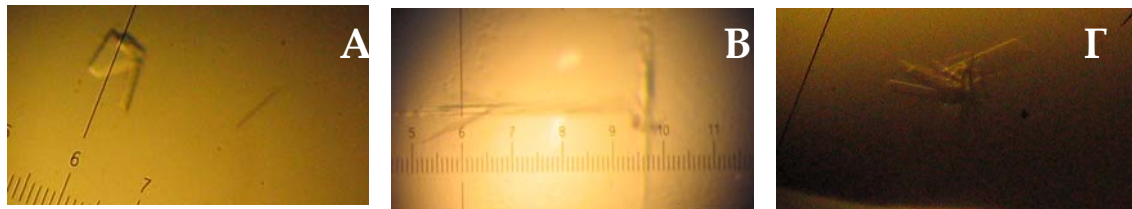


A, B, Γ, Δ, E, ΣΤ, Z, H) Φωτογραφίες από στερεοσκόπιο με χρήση διασταυρούμενων πολωμένων φακών για την παρατήρηση του φαινομένου διάσπασης της προσπίπτουσας δέσμης σε δύο κατά την διάθλαση τους από ύλη με περιοδική διάταξη (διπλοδιαθλαστικότητα, birefringence). Οι κρύσταλλοι με αυτόν τον τρόπο εμφανίζονται με διαφορετικό χρώμα από ότι το περιβάλλον τους. **A, Δ** Εκτός από κρυστάλλους οι συνθήκες παρουσιάζουν και έντονο ίζημα (σιούρα συσσωματώματα). **Z** Το ίδιο φαινόμενο (διπλοδιαθλαστικότητας) άνευ παρεμβολής πλαστικού υλικού (πολυμερούς). Η γυάλινη καλυπτρίδα που συγκρατεί την κρεμαστή σταγόνα έχει αφαιρεθεί από το πλαστικό πιάτο Linbro και τίθεται σε άμεση παρατήρηση. Κατά αυτόν τον τρόπο το πεδίο εμφανίζεται σκούρο ενώ οι κρύσταλλοι φωτεινοί. Η φωτεινή γραμμή που διαπερνά την κρεμαστή σταγόνα διαγωνίως αποτελείται από κρυστάλλους οι οποίοι προήλθαν με την τεχνική σποράς ίχνους (streak-seeding). Κατά την τεχνική αυτή κατάλληλη τριχά χρησιμοποιείται (συνήθως από ουρά αλόγου) για να

ακουμπήσει έναν είδη ανεπτυγμένο κρύσταλλο. Προσαρτίζει έτσι στην επιφάνεια της αόρατα με γυμνό οφθαλμό μικροσκοπικά κρυσταλλικά συσσωματώματα τα οποία στην συνέχεια μεταφέρονται σε νέα κρεμαστή ή καθιστή σταγόνα. Με την απλή χάραξη της νέας σταγόνας με την τριχία, τα κρυσταλλικά αυτά συσσωματώματα χρησιμοποιούνται ως σπόροι για την παραγωγή κρυστάλλων στην νέα σταγόνα. Με αυτό τον τρόπο είναι εύκολος ο διαχωρισμός της διαδικασίας πυρήνωσης από την διαδικασία ανάπτυξης της κρυστάλλωσης. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η συνθήκη ευνοεί ακόμα την πυρήνωση αφού έχουν εμφανιστεί κρύσταλλοι και εκτός της γραμμής σποράς. **Θ)** Κρύσταλλοι σε απλή παρατήρηση. Η διαφορετική μορφολογία των κρυστάλλων επεξηγείται στο κεφάλαιο 4, σελίδα 119, εικόνα 4.2.

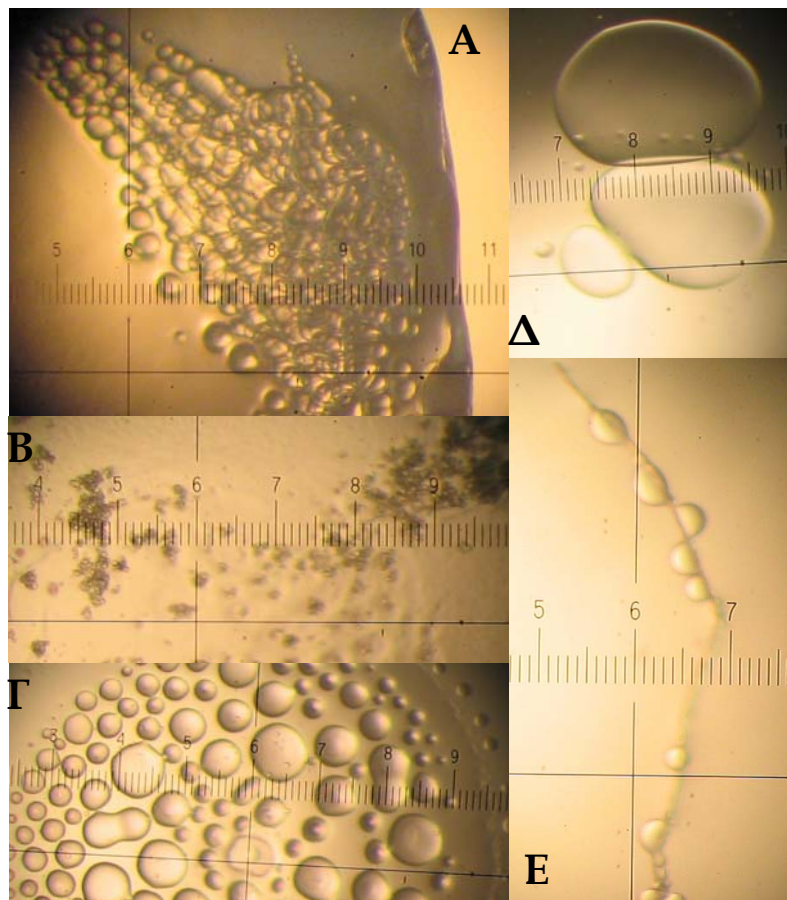
8.5.2 AvrPphF ORF2 : Κρύσταλλοι

Κρύσταλλοι της μολυσματικής πρωτεΐνης AvrPphF ORF1 σε απλή παρατήρηση. Οι κρύσταλλοι όπως προέκυψαν από το εμπορικό screen Crystal Screen I (Hampton Research) χωρίς περαιτέρω βελτίωση σε τρεις διαφορετικές συνθήκες. Οι υπόλοιπες συνθήκες στις οποίες εμφανίστηκαν κρύσταλλοι της ίδιας πρωτεΐνης παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 3, σελίδα 98, πίνακας 3.1.



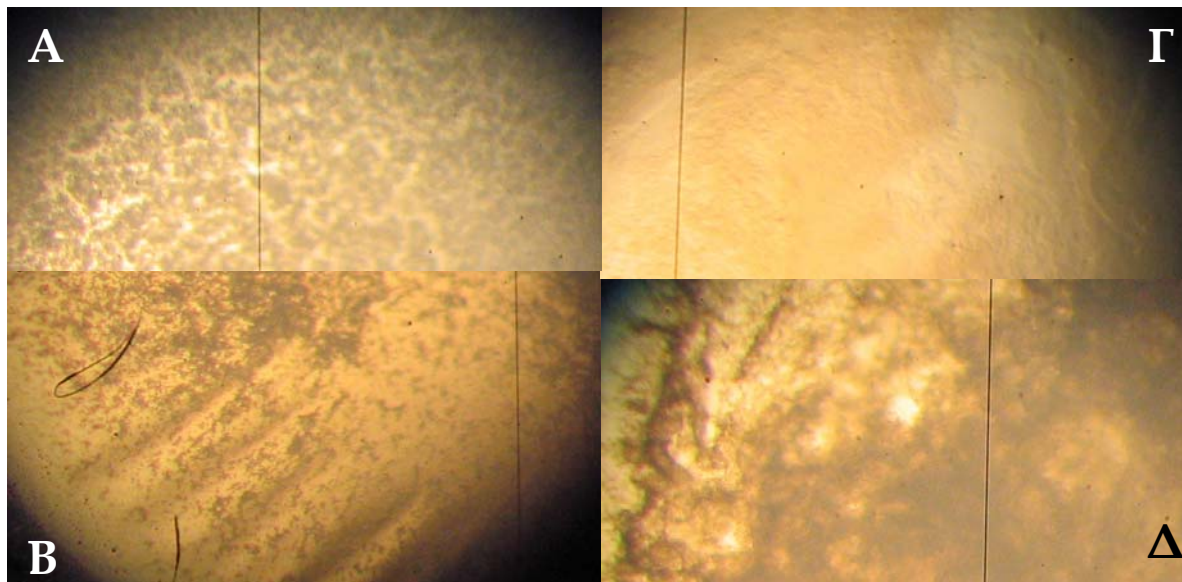
8.5.3 HrpO : Σταγόνες ελαίου και διάφοροι τύποι διαχωρισμού φάσεως

A, Γ, Δ, E) Σταγόνες ελαίου ή διαχωρισμοί φάσεως όπως δημιουργούνται κατά τα πειράματα κρυστάλλωσης της HrpO. **B)** Σκούροι σχηματισμοί μεταξύ σταγόνων ελαίου και ιζήματος φαίνεται να βρίσκονται στην ίδια σταγόνα όπου παρατηρείται και δημιουργία γέλης (στο φόντο, εντύπωση αδρής επιφάνειας). **E)** Σταγόνες ελαίου έχουν δημιουργηθεί γύρω από μία ίνα που τυχαία βρέθηκε εντός της σταγόνας κρυστάλλωσης. Παραπλήσια φαινόμενα εμφανίζονται συχνά σε περιπτώσεις όπου η παρουσία ετερογενών σωμάτων στην σταγόνα κρυστάλλωσης ευνοεί την ενπυρήνωση και την



ανάπτυξη κρυστάλλων όταν οι συνθήκες πετυχαίνουν την μετασταθερή περιοχή της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

8.5.4 HrpG : Διάφορα είδη ιζήματος



A) Τυπικό κοκκώδες ιζήμα κατά την κατακρήμνιση της πρωτεΐνης HrpG. **B)** Σκούρο ιζήμα κατά την κατακρήμνιση της πρωτεΐνης ενώ παρατηρούνται «κυματισμοί» στην επιφάνεια της σταγόνας. Οι κυματισμοί αυτοί οφείλονται σε ένα υμένιο που δημιουργείται στην επιφάνεια της σταγόνας (skin). Εικάζεται ότι η εμφάνιση του υμενίου συνεπάγεται την μετουσίωση της πρωτεΐνης. Δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ κρύσταλλοι σε αυτές τις περιπτώσεις. **Γ)** Εμφάνιση γέλης (εντύπωση αδρής επιφάνειας) στην σταγόνα κρυστάλλωσης ή ελαφρύς τύπος καφέ ιζήματος. Το ιζήμα καφετιάς απόχρωσης έχει επίσης συνδεθεί με μετουσίωση της πρωτεΐνης μιας και δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ κρύσταλλοι από αυτό. **Δ)** Βαριά μορφή ιζήματος καφέ χρώματος.

8.6 Αρχείο συλλογής δεδομένων σκέδασης σε μικρές γωνίες

Συλλογή δεδομένων σκέδασης από διάλυμα στην γραμμή ακτινοβολίας X33 (DESY- EMBL, Hamburg Outstation) όπως έλαβαν χώρα στην παρούσα διατριβή.

Run No	Description of the sample/buffer	c (mg/ml)	Current mA	Ion Chamber	Pin Diode	Total count 103
8/6/2005						
1	Buffer BSA		125.4	1.48	5.66	283
2	BSA	5.8	124.3	1.47	5.6	282
3	Buffer BSA		123	1.45	5.55	281
4	Buffer HrpG		119.7	1.42	5.05	275
5	HrpG	23	118	1.39	4.99	273
6	HrpG repeat	23	117	1.37	4.97	273
7	Buffer HrpG		116.2	1.38	4.89	271
8	HrpG	13.8	114.8	1.36	4.83	269
9	Buffer G		113.6	1.35	4.79	268
10	HrpG	6.9	112.6	1.34	4.76	267
11	Buffer G		111.5	1.32	4.71	265
12	HrpG	2.3	110.5	1.31	4.67	264
13	Buffer HrpG		109.7	1.3	4.63	263

Run No	Description of the sample/buffer	c (mg/ml)	Current mA	Ion Chamber	Pin Diode	Total count 103
14	Buffer HrpG		106.8	1.27	4.51	259
15	HrpG-14C	20	106	1.26	4.47	258
16	Buffer HrpG		105.3	1.25	4.44	257
17	Buffer HrpG		103.6	1.24	4.37	254
18	HrpG-14C	12	102.8	1.23	4.33	253
19	Buffer HrpG		102.1	1.22	4.3	252
20	HrpG-14C	6	101.3	1.21	4.26	251
21	Buffer HrpG		100.5	1.2	4.22	249
29	Buffer HrpO		139.1	1.62	5.93	293
30	HrpO	35	137.7	1.62	5.84	292
31	Buffer HrpO		136.2	1.6	5.8	290
32	HrpO	35	135	1.58	5.74	289
33	HrpO (repeat)	35	133.9	1.57	5.7	288
34	Buffer HrpO		132.7	1.56	5.64	287
35	HrpO	21	131.5	1.55	5.63	286
36	Buffer HrpO		130.3	1.53	5.55	285
37	HrpO	10.5	129.1	1.52	5.52	284
38	Buffer HrpO		125.6	1.51	5.46	283
39	HrpO	3.5	126.7	1.49	5.41	282
40	Buffer HrpO		125.6	1.48	5.35	281
11/6/2005						
17	ORF1 buffer		93.1	1.06	4.04	273
18	ORF1	14.6	92.5	1.06	4.02	272
19	ORF1 buffer		91.7	1.05	3.99	271
20	ORF1	8.7	91.1	1.04	3.95	270
21	ORF1 buffer		90.5	1.04	3.92	269
22	ORF1	4.4	89.9	1.03	3.89	268
23	ORF1 buffer		89.1	1.02	3.87	267
24	ORF1 & ORF2	12	88.6	1.02	3.83	266
25	ORF1 buffer		88	1.01	3.82	265
26	ORF1 & ORF2	6	87.5	1	3.8	264
27	ORF1 buffer		86.8	1	3.77	263
28	ORF1 & ORF2	3	86.2	0.99	3.75	262
29	ORF1 buffer		85.8	0.99	3.74	261
30	HrcQb buffer		141.2	1.54	6.06	315
31	HrcQb	20	139.7	1.52	5.95	314
32	HrcQb	10	136.2	1.48	5.77	311
34	HrcQb buffer		134.4	1.46	5.69	310
35	HrcQb	5	133	1.45	5.65	309
36	HrcQb buffer		131.7	1.44	5.62	308
37	HrpG & HrpO buffer		130.1	1.43	5.48	307
38	HrpG & HrpO	20?	128.8	1.42	5.43	306
39	HrpG & HrpO buffer		127.4	1.4	5.34	305
41	HrpG-14C & HrpO	20?	125	1.38	5.28	304
42	HrpG & HrpO buffer		123.9	1.37	5.26	303
4/11/2005						
13	buffer ORF1		116.5	1.7	1.97	279
14	ORF1 pPR1	11	115.7	1.73	1.95	278
15	buffer ORF1		114.8	1.7	1.94	278
16	ORF1 pPR1	5.5	113.8	1.68	1.94	277
17	buffer ORF1		113.3	0	0	276
18	buffer ORF1		112.7	1.65	1.91	275
19	ORF1 pPR1	2.6	111.9	1.68	1.88	275
20	buffer ORF1		111.2	1.65	1.91	274
22	HrpO gf pH 7.5	5.4	127.1	1.83	1.68	285
23	buffer HrpO pH 7.5 gf		126.1	1.83	1.68	285
24	buffer HrpO pH 7.5 peak		125.3	1.82	1.67	284
25	HrpO peak pH 7.5	1	124.7	1.81	1.65	283
26	buffer HrpO pH 7.5 peak		123.7	1.79	1.65	283

Run No	Description of the sample/buffer	c (mg/ml)	Current mA	Ion Chamber	Pin Diode	Total count 103
27	buffer HrpO pH 8.5 gf		123	1.78	1.67	282
28	HrpO gf pH 8.5	5.1	122.1	1.77	1.64	281
29	buffer HrpO pH 8.5 gf		121.2	1.77	1.67	281
30	buffer HrpO pH 8.5 peak		120.5	1.76	1.64	280
31	HrpO peak pH 8.5	1	119.6	1.75	1.61	279
32	buffer HrpO pH 8.5 peak		118.9	1.73	1.6	278
33	buffer HrpO pH 9.5 gf		118.1	1.73	1.62	278
34	HrpO gf pH 9.5	8.2	117.5	1.72	1.6	277
35	buffer HrpO pH 9.5 gf		116.7	1.71	1.58	276
36	buffer HrpO pH 9.5 peak		116.1	1.7	1.57	275
37	HrpO peak pH 9.5	1.7	115.3	1.69	1.55	275
38	buffer HrpO pH 9.5 peak		114.5	1.68	1.53	274
13/2/2006						
32	buffer ORF2rm		133	46	4.66	278
33	ORF2rm	0.88	131.1	44	4.66	275
34	buffer ORF2rm		128.9	44	4.99	273
35	buffer ORF1 & ORF2 rm		126.9	44	4.81	271
36	ORF1 & ORF2 rm	3.48	125.1	43	4.84	270
37	buffer ORF1 & ORF2 rm		122.8	42	4.85	267
38	ORF1 & ORF2 rm	1.75	121.2	42	4.9	265
39	buffer ORF1 & ORF2 rm		119.6	42	4.92	264
40	buffer ORF1 & ORF2 (21γ)		117.8	41	4.86	262
41	ORF1 & ORF2 (21γ)	3.68	116.2	40	4.84	260
42	buffer ORF1 & ORF2 (21γ)		114.6	40	4.82	257
43	ORF1 & ORF2 (21γ)	1.84	112.9	39	4.74	255
44	buffer ORF1 & ORF2 (21γ)		111.3	39	4.69	253
14/2/2006						
82	buffer ORF1		108.1	38	4.84	248
83	ORF1	7.4	107	38	4.84	247
84	buffer ORF1		106	37	4.82	245
85	ORF1	3.7	104.9	36	4.8	243
86	buffer ORF1		103.9	36	4.79	242
87	buffer HrcQb		102.8	36	4.83	240
88	HrcQb	0.4	101.9	35	4.8	238
89	buffer HrcQb		101	35	4.76	237
90	buffer HrcQb-C		100.1	35	4.74	235
91	HrcQb-C	25	99.1	35	4.73	233
92	buffer HrcQb-C		98.1	35	4.7	232
93	HrcQb-C	12.5	97.2	35	4.63	230
94	buffer HrcQb-C		96.2	35	4.62	228

rm: reductive methylated sample

peak: το δείγμα όπως εκλύεται από την στήλη μοριακής διήθησης χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. ανταποκρίνεται στο κλάσμα που εμπεριέχει την κορυφή του χρωματογραφήματος

gf: δείγμα της πρωτεΐνης που έχει υποστεί gel-filtration και έχει συγκεντρωθεί με δια-διύληση

8.7 Χαρακτηριστικά των γραμμών ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκαν

Χαρακτηριστικά των γραμμών ακτινοβολίας στο σύγχροτρο DESY όπου πραγματοποιήθηκε η συλλογή δεδομένων στην παρούσα διατριβή. Στην γραμμή ακτινοβολίας X33 (Roessle *et al.*, 2007) συλλέχθηκαν δεδομένα σκέδασης από διάλυμα ενώ στις X11 και BW7A (Pohl *et al.*, 2001) δεδομένα σκέδασης από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.

Γραμμή Ακτινοβολίας	X11	X33	BW7A
Πηγή Συγχρότρου	Δακτύλιος DORIS III, Μαγνήτης καμπής	Δακτύλιος DORIS III, Μαγνήτης καμπής	Δακτύλιος DORIS III, 1 Tesla πολυπολική

Γραμμή Ακτινοβολίας	X11	X33	BW7A
Καθρέπτης 1	-	-	συσκευή wiggler Επικαλυμένος με Rh, zerodur
Συσκευή Μονοχρωματισμού	Si[111], οριζόντιας εστίασης	Ασύμμετρος κρύσταλλος Si[111], οριζόντιας εστίασης	Σταθερής εξόδου διπλός κρύσταλλος Si [111], οριζόντιας εστίασης
Καθρέπτης 2	Κάμψης, κάθετης εστίασης	Επικαλυμένος με Rh, zerodur, κάθετης εστίασης	Επικαλυμένος με Rh, zerodur, κάθετης εστίασης
Μήκος Κύματος Προσπίπτουσας Ακτινοβολίας	0.81 Å (15.3 KeV)	1.5 Å	0.7-1.8 Å (7 – 18 KeV)
Εστιακό σημείο Slits	2 mm x 0.4 mm 0.1 x 0.1 ως 2 x 2 mm	2 mm x 0.6 mm 4 ζεύγη βολφραμίου	2 mm x 0.4 mm 0.05 x 0.05 ως 1 x 1 mm
Σύστημα Ελέγχου Θερμοκρασίας δείγματος	Oxford 600series Cryosystem	Huber ministoct (-30 ως 220° C)	Oxford 600series Cryosystem
Συσκευή τοποθέτησης δείγματος	Γωνιόμετρο μονού άξονα	Κυψελίδες Mica	Γωνιόμετρο μονού άξονα
Ανιχνευτής	MARCCD 165 mm	MAR δίσκος ειδώλου 345 mm	MARCCD 165 mm
Απόσταση ανιχνευτή - δείγματος	35 - 790 mm	900 – 4000 mm	35 – 790 mm
Γωνία ανόρθωσης ανιχνευτή	-	-	Κάθετη ανύψωση έως 8 cm
Μικροσπεκτρο- φωτόμετρο	-	-	Amp Tek XR100T energy sensitive X-ray fluorescence detector

Χαρακτηριστικά παρατηρούμε την μεγάλη απόσταση μεταξύ ανιχνευτή και δείγματος που απαιτείται για την συλλογή δεδομένων χαμηλής διακριτικότητας στην γραμμή ακτινοβολίας X33 σε σχέση με τις γραμμές ακτινοβολίας που χρησιμοποιούνται στην μακρομοριακή κρυσταλλογραφία. Συγκεκριμένα η BW7A διαθέτει επιπλέον σύστημα ανίψωσης του ανιχνευτή της για συλλογή δεδομένων υψηλότερης διακριτικότητας όποτε καθίσταται αναγκαίο. Διαφορές παρουσιάζονται επίσης και στο τρόπο τοποθέτησης των ανιχνευτών στις γραμμές ακτινοβολίας που προορίζονται για συλλογή δεδομένων σκέδασης από διάλυμα.

8.8 Δικτυακοί τόποι και προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν

8.8.1 On-line προγράμματα ανάλυσης αμινοξικής αλληλουχίας

Η μεθοδολογία των προγραμμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω αναλύεται στο εδάφιο 2.1. Η χρήση των προγραμμάτων είναι ελεύθερη εκτός αν δηλώνεται κάτι άλλο.

Psi-BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Πρόγραμμα στοίχισης της υπό μελέτη αλληλουχίας με αλληλουχίες που έχουν κατατεθεί στις βάσεις δεδομένων. Αναζήτηση και εύρεση αλληλουχιών που φέρουν ομοιότητες με την υπό μελέτη αλληλουχία. Καθορισμός μοτίβων και νέα αναζήτηση.

Psi-PRED

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

Πρόγραμμα πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

3D-PSSM

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/index2.html>

Πρόγραμμα αναγνώρισης αναδίπλωσης (fold recognition) της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

PHYRE

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>

Πρόγραμμα αναγνώρισης αναδίπλωσης (fold recognition) της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

mGenTHREADER

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

Πρόγραμμα αναγνώρισης αναδίπλωσης (threading) της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

FoldIndex

<http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex>

Πρόγραμμα πρόβλεψης σφαιρικότητας της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

DAS

<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>

Πρόγραμμα πρόβλεψης διαμεμβρανικών α -ελίκων της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

AGADIR

www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadirstart.html

Πρόγραμμα πρόβλεψης μεταπτώσεων των α -ελίκων ενός πεπτιδίου.

I-sites/HMMSTR/Rosetta

www.bioinfo.rpi.edu/~bystrc/hmmstr/server.php

Πρόγραμμα *ab initio* πρόβλεψης της τρισδιάστατης δομής της υπό μελέτη αμινοξικής αλληλουχίας.

RADAR

<http://www.ebi.ac.uk/Radar/>

Πρόγραμμα πρόβλεψης αμινοξικών επαναλήψεων της υπό μελέτη αλληλουχίας.

CLUSTAL_W

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης.

8.8.2 On-line προγράμματα υπολογισμού συνθηκών κρυστάλλωσης

CRYSTOOL

www-structure.llnl.gov/crstool/crstool.html

Πρόγραμμα υπολογισμού τυχαίων συνθηκών κρυστάλλωσης κατόπιν περιορισμού του χώρου έρευνας από τον χρήστη. Ατελώς παραγοντική έρευνα (Incomplete Factorial).

Hampton – Make Tray

<http://www.hamptonresearch.com/stuff/MakeTray.aspx>

Πρόγραμμα αυτόματου υπολογισμού ποσοτήτων για την δημιουργία συστηματικών σαρώσεων.

8.8.3 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων SAXS

ATSAS

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/software.html>

Πακέτο προγραμμάτων ανάλυσης δεδομένων SAS.

PRIMUS

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/primus.html>

Αναγωγή των πειραματικών δεδομένων και επεξεργασία.

GNOM

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/gnom.html>

Πρόγραμμα έμμεσου μετασχηματισμού Fourier.

DAMMIN

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/dammin.html>

Πρόγραμμα *ab initio* καθορισμού της δομής μέσω προσομοίωσης ανόπτησης από δεδομένα SAXS. Παράγει μοντέλα ψευδών ατόμων.

GASBOR

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/gasbor.html>

Πρόγραμμα *ab initio* καθορισμού της δομής μέσω προσομοίωσης ανόπτησης από δεδομένα SAXS. Παράγει μοντέλα ψευδών καταλοίπων. Συνυπολογίζει και ψευδά μόρια νερού.

CREDO

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/credo.html>

Υπολογίζει τμήματα που λείπουν από μοντέλα ψευδών καταλοίπων ή μοντέλα ατομικής διακριτικότητας.

OLIGOMER

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/oligomer.html>

Υπολογισμός των κλασματικών όγκων των συστατικών σε μείγματα με βάση τις γνωστές εντάσεις σκέδασης των συστατικών.

SUPCOMB

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/supcomb.html>

Αυτοματοποιημένη στοίχιση μοντέλων υψηλής και χαμηλής διακριτικότητας. Χρησιμοποιείται στην σύγκριση μοντέλων ανά ζεύγη από όποια μέθοδο και αν προέρχονται: κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, NMR, SAXS, κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία.

DAMAVER

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/damaver.html>

Σύνολο προγραμμάτων για την στοίχιση των μοντέλων, επιλογή του πιο τυπικού και δημιουργία του μέσου μοντέλου.

MASSHA

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/massha.html>

Πρόγραμμα μοντελοποίησης σταθερών σωμάτων (rigid body) υψηλής διακριτικότητας βασισμένα σε δεδομένα SAXS.

CRYSOL

<http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/crysol.html>

Αξιολόγηση της σκέδασης ακτίνων-X σε μικρές γωνίες από μοντέλα υψηλής διακριτικότητας. Παρασκευή θεωρητικών καμπύλων της έντασης της σκέδασης.

8.8.4 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.

Η ομάδα των Συνεργατικών Υπολογιστικών Ερευνητικών έργων [Collaborative Computational Projects (CCPs)], βοηθά την πανεπιστημιακή κοινότητα στην ανάπτυξη, υποστήριξη και διανομή υπολογιστικών προγραμμάτων προάγοντας τις καλύτερες υπολογιστικές μεθόδους. Για την περίπτωση της κρυσταλλογραφίας το έργο νούμερο 4 (CCP4, <http://www.ccp.ac.uk/>) παρέχει τα περισσότερα προγράμματα (<http://www.ccp4.ac.uk/download.php>) τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και παρουσιάζονται παρακάτω.

MOSFLM/SCALA

Αναγωγή των πειραματικών δεδομένων και αρχική επεξεργασία.

TRUNCATE

Υπολογισμός των πλατών των παραγόντων δομής από τις εντάσεις. Έλεγχος των στατιστικών των εντάσεων για την ανίχνευση περιπτώσεων διδυμίας. Διάγραμμα Wilson.

POLARRFN

Πρόγραμμα που υπολογίζει την γρήγορη συνάρτηση περιστροφής σε πολικό σύστημα συντεταγμένων.

FFT

Πρόγραμμα γρήγορου μετασχηματισμού Fourier που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συνάρτησης Patterson.

MOLREP

Πρόγραμμα μοριακής αντικατάστασης.

REFMAC5

Πρόγραμμα βελτιστοποίησης του κρυσταλλογραφικού μοντέλου. Χρησιμοποιήθηκε για βελτιστοποίηση σταθερού σώματος (rigid-body refinement).

HKL-package

http://www.csb.yale.edu/userguides/datamanip/denzo/denzo_descrip.html

Εμπορικό πακέτο προγραμμάτων για την αναγωγή των πειραματικών δεδομένων και την αρχική τους επεξεργασία.

CNS

<http://cns.csb.yale.edu/v1.1/main/text.html>

Πακέτο προγραμμάτων για τον χειρισμό δεδομένων κρυσταλλογραφίας και NMR. Χρησιμοποιήθηκε κυρίως για βελτιστοποίηση torsion.

XtalView

<http://www.msg.ucsf.edu/local/programs/xtalview/xtalview.html>

Πακέτο προγραμμάτων για τον χειρισμό δεδομένων κρυσταλλογραφίας. Χρησιμοποιήθηκε κυρίως το πρόγραμμα γραφικών Xfit για την απεικόνιση του μοντέλου και των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας.

8.8.5 Προγράμματα ανάλυσης δεδομένων κυκλικού διχρωισμού.

CDPRO

<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>

Πακέτο προγραμμάτων υπολογισμού κύριων συνιστωσών για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής βάση σημαντικού αριθμού πρωτεϊνικών συνόλων αναφοράς. Η ανάλυση γίνεται βάση των προγραμμάτων SELCON3, CDSSTR, και CONTILL (εδάφιο 2.9.2.1).

DICHROPROT

<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/>

Πακέτο προγραμμάτων υπολογισμού κύριων συνιστωσών για την εκτίμηση των ποσοστών δευτεροταγούς δομής βάση σημαντικού αριθμού πρωτεϊνικών συνόλων αναφοράς. Η ανάλυση γίνεται βάση των προγραμμάτων SELCON, CDSSTR, CONTIN, K2D, VARSELEC.

8.8.6 Λοιπά προγράμματα ανάλυσης αρχείων pdb.

HYDROPRO

<http://leonardo.fcu.um.es/macromol/programs/hydropro/hydropro.htm>

Πρόγραμμα υπολογισμού θεωρητικών υδροδυναμικών χαρακτηριστικών από μοντέλα υψηλής και χαμηλής διακριτικότητας μέσω μοντελοποίησης σφαιριδίων.

PyMOL

<http://pymol.sourceforge.net/>

Πρόγραμμα απεικόνισης μοντέλων χαμηλής και υψηλής διακριτικότητας καθώς και χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας.

SpdbV

<http://au.expasy.org/spdbv/>

Πρόγραμμα απεικόνισης μοντέλων υψηλής διακριτικότητας.

8.9 Στατιστική ανάλυση Wilson

Προσδιορισμός των απόλυτων παραγόντων δομής F_{abs} (F absolute). Ονομάζουμε K τον συντελεστή μετατροπής των σχετικών παραγόντων δομής F_{rel} (F relative) σε F_{abs} ως εξής:

$$\overline{F_{rel}^2} = K \overline{F_{abs}^2}$$

καθώς ισχύουν οι σχέσεις: 1) $\overline{F_{abs}^2} = \sum_{i=1}^N f_i^2$ όπου f_i ο ατομικός παράγοντας σκέδασης ο οποίος εξαρτάται από τον θερμοϊκό συντελεστή B_i , με N τον αριθμό των ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα και 2) $f_i = f_{oi} \exp[-2B_i(\sin \theta / \lambda)]$ όπου f_{oi} ο ατομικός παράγοντας σκέδασης στην θερμοκρασία του απολύτου μηδενός, που για γωνία σκέδασης $\theta = 0^\circ$ ισούται με τον ατομικό αριθμό του στοιχείου, μπορούμε να γράψουμε:

$$\overline{F_{rel}^2} = K \sum_{i=1}^N f_i^2 = K \sum_{i=1}^N f_{oi}^2 \exp[-2B_i(\sin \theta / \lambda)^2].$$

Θεωρώντας ότι όλα τα άτομα δονούνται ομοιόμορφα με καθολικό θερμοϊκό συντελεστή δόνησης B ($B = \text{overall temperature factor}$) ισχύει:

$$\overline{F_{rel}^2} = K \exp[-2B(\sin \theta / \lambda)^2] \sum_{i=1}^N f_{oi}^2$$

$$\frac{\overline{F_{rel}^2}}{\sum_{i=1}^N f_{oi}^2} = K \exp[-2B(\sin \theta / \lambda)^2]$$

και λογαριθμίζοντας:

$$\ln \frac{\overline{F_{rel}^2}}{\sum_{i=1}^N f_{oi}^2} = -2B(\sin \theta / \lambda)^2 + \ln K$$

Καθώς ισχύει: $\overline{f_{oi}^2} = \frac{\sum_{i=1}^N f_{oi}^2}{N}$, η παραπάνω σχέση μπορεί να γραφτεί και ως:

$$\ln \frac{\overline{F_{rel}^2} / N}{\overline{f_{oi}^2}} = -2B(\sin \theta / \lambda)^2 + \ln K.$$

Και στις δύο περιπτώσεις οι σχέσεις παρουσιάζονται με την μορφή ευθείας εξίσωσης όπου:

$y = \ln \frac{\overline{F_{rel}^2} / N}{\overline{f_{oi}^2}}$, $x = (\sin \theta / \lambda)^2$, $a = -2B$ και $b = \ln K$. Από την προσεγγιστική ευθεία Wilson

προσδιορίζεται ο συντελεστής K και ο συντελεστής B της ομοιόμορφης θερμοϊκής δόνησης των ατόμων στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυστάλλου (καθολικός θερμοϊκός παράγοντας).

8.10 Λεξιικό αγγλικών όρων

A

Absorption= Απορρόφηση

Adsorption= Προσρόφηση

B

Baseline= Ευθεία βάσης

Beam Stop= Φράκτης ακτινοβολίας

Bed Volume = Ογκος Στρώματος
 Bell-shaped curve= Κωδωνοειδής καμπύλη
 Birefridgence = Διπλο-διαθλαστικότητα

C

Calculated Structure Factor= Εξ υπολογισμού Παράγοντας Δομής
 C-centered=Μονοεδρικός Κεντρομένο
 Central Limit Theorem= Κεντρικό Οριακό Θεώρημα
 Cluster analysis= Ανάλυση συστάδων
 Coiled-coil=Σπειροειδές σπείραμα
 Collimator= Κατευθυντήρας
 Complex conjugate=Συζυγής μιγαδικός
 Contour level= Ισοψής επίπεδο
 Convolution= Συνέλιξη
 Correlation Factor= Συντελεστής Συσχέτισης
 Cross-linking= Δια-σύνδεση

D

Data reduction = Αναγωγή των δεδομένων
 Deletion mutant = Μετάλλαγμα Έλλειψης
 Desorption= Εκρόφηση
 Diafiltration= Διαδιύλιση
 Direct Fourier Transform= Άμεσος ή Ευθύς Μετασχηματισμός Fourier
 Domain swap = Αντιμετάθεση Επιγρατειών
 Dummy Atoms = Ψευδή άτομα

E

Eigenvalue=Ιδιοτιμή
 Eigenvector=Ιδιοδιάνυσμα
 Elution= Έκλυση
 Experimental Hutch = Πειραματικός κλωβός
 Extinction Coefficient = Συντελεστής απόσβεσης
 Extrapolation to zero concentration = Εξαγωγή σε άπειρη διάλυση

F

Fast Fourier Transform= Γρήγορος μετασχηματισμός Fourier
 F-centered= Ολοεδρικός Κεντρωμένο
 Form Factor = Παράγοντας Μορφής ή Σχήματος
 Full-length = Πλήρους Μήκους

H

Half-width=Ημιέυρος
 Histidine Tag = Ακροφύσιο Ιστιδινών
 Hydrodynamic Radius= Υδροδυναμική Ακτίνα
 Hypersensitive Response= Αντίδραση Υπερευαισθησίας

I

I-centered= Ενδοκεντρομένο
 Incomplete Factorial search= Ατελώς Παραγοντική έρευνα
 Indexing= Δεικτοδότηση
 Indirect Fourier Transform= Έμμεσος μετασχηματισμός Fourier

K

Kernel= Πυρήνας

M

Major Axis = Μείζονας άξονας
 Maximum likelihood= Μέγιστη Πιθανοφάνεια
 Mean Normalized Spatial Discrepancy = Μέση Κανονικοποιημένη Χωρική Ασυμφωνία
 Melting temperature = Θερμοκρασία μετάπτωσης
 Merging=Συγχώνευση
 Mirror plane= Επίπεδο κατοπτρισμού

Modulus=μέτρο
 Molar concentration = Γραμμομοριακή συγκέντρωση
 Molar Ellipticity = Γραμμομοριακή Ελλειπτικότητα
 Molten Globule= Εύπλαστη σφαίρα
 Momentum transfer = Μεταφορά ροπής – Άνυσμα σκέδασης
 Monodisperse=Μονοδιάσπαρτο
 Monomodal= Μονοκόρυφη (καμπύλη)
 Mosaicity= Μωσαϊκότητα

N

Needle structure= Βελονοειδής δομή
 Neural Networks= Νευρωνικά Δίκτυα
 Nodulation outer proteins= Εξωτερικές Πρωτεΐνες Ροζιδίωσης
 Nodules=Ροζίδια

O

Oblate = Σφαιροειδές πεπλατυσμένο στους πόλους
 Observed Structure Factor= Παρατηρούμενος Παράγοντας Δομής
 Origin= Αρχή
 Orthogonal functions= Ορθογώνιες συναρτήσεις
 Orthonormal=Ορθοκανονικός, Ορθομοναδιαίος
 Oscillation method= Στρεφόμενη μέθοδος
 Outlier= Αιρεσία ή απομονωμένη τιμή
 Overall Thermal B Factor= Καθολικός Θερμικός Παράγοντας B
 Overlay= Υπέρθωση

P

Partial Reflections= Εν μέρη καταγεγραμμένες ανακλάσεις
 Pathovar=παθότυπος
 Point group symmetry= Ομάδα συμμετρίας σημείου ή σημειακή ομάδα συμμετρίας
 Pre-Molten Globule=Προ-εύπλαστη σφαίρα
 Principal Component Analysis= Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών
 Profil=Κατατομή
 Prolate = Ωοειδές σφαιροειδές
 Protein Domain = Πρωτεϊνική επικράτεια
 Pseudo-complete Factorial = Πλήρως ψευδο-παραγοντική

R

Radius of gyration= Γυροσκοπική ακτίνα
 Reductive Methylation= Αναγωγική Μεθυλίωση
 R(reliability)-factor= Συντελεστής Αξιοπιστίας
 Refinement = Βελτιστοποίηση
 Residual= Υπόλοιπο
 Ridge-regression= Ψευδο-ορθογώνια παλινδρόμηση
 Rigid -body= Άκαμπτο σώμα
 Robust= Ανθεκτικός

S

Screw Axis= Άξονας ελίωσης
 Self association = Ίδιο-σύνδεση
 Self-consistent= Ίδιο-συνέπεια
 Serovar=
 Server=Διακομιστής
 Simulation Annealing= Προσωμοίωση Ανόπτησης
 Singular Value Decomposition = Ανάλυση Ιδιαζουσών Τιμών
 Slit= Σχισμή, Παράθυρο
 Smoothing=Εξομάλυνση
 Sonication = Υπερηχοβόληση
 Sparse Matrix = Σποραδικός Πίνακας
 Spherical Harmonics= Σφαιρικές Αρμονικές
 Storage ring = Αποθηκευτικός δακτύλιος

T

Termination effects= Τερματικές επιδράσεις

Thermal Unfolding = Θερμοεπαγόμενη Αποδιάταξη

Trial and Error Method= Μέθοδος διαδοχικών δοκιμών και σφαλμάτων

Two-fold axis= Διπλός άξονας

Two-fold screw axis= Διπλός άξονας ελικώσης

8.11 Αναφορές

- Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore B., Frare E., Picotti P. & Zambonin M., 2004. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Polonica* 51, 299.
- Kamal J.K.A., Xia T., Pal S.K., Zhao L. & Zewail A.H., 2004. Enzyme functionality and salvation of Subtilisin Carlsberg: from hours to femtoseconds. *Chem. Phys. Lett.* 387, 209.
- Kingsbury N. & Masters C.J., 1970. On the determination of Component Molecular Weights in Complex Protein Mixtures by means of Disc Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 36, 144.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15, 680.
- Pohl E., Gonzalez A., Hermes C. & van Silfhout R.G., 2001. Overview of the tunable beamlines for protein crystallography at the EMBL Hamburg Outstation; an analysis of current and future usage and developments. *J. Synchrotron Rad.* 8, 1113.
- Roessle M.W., Klaering R., Ristau U., Robrahn B., Jahn D., Gehrmann T., Konarev P., Round A., Fiedler S., Hermes C. & Svergun D., 2007. Upgrade of the small-angle X-ray scattering X33 beamline at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *J. Appl. Cryst.* 40, Supplement.
- Stebbins C. E. & Galan J.E., 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature.* 414, 77.