

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη του παθογόνου *Coxiella burnetii* σε
διαφορετικά κύτταρα ξενιστές. Έκφραση υπομονάδων του
εκκριτικού συστήματος**

Τρυπάκη Μαρία

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, 2020

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

General Program of Graduate Studies

Division of Biochemistry



Master Thesis

Growth of the pathogen *Coxiella burnetii* in different host cells. Expression of subunits of the secretion system

Trypaki Maria

HERAKLION, 2020

Στον γάτο μου Κουστώ...

Εξεταστική επιτροπή

**Γ. Τσιώτης (Υπεύθυνος Καθηγητής)
Καθηγητής, Τμήμα Χημείας**

Ι. Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας

Α. Ψαρουλάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Ιατρικής Σχολής

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γεώργιου Τσιώτη, και σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Μικροβιακής Παθογένεσης –Μονάδα Ζωνοόσων της Ιατρικής Σχολής, με υπεύθυνη την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα Ψαρουλάκη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους δύο, καταρχάς για την ευκαιρία που μου έδωσε ο κύριος Τσιώτης να εκπονήσω την εργασία αυτή, και την κυρία Ψαρουλάκη για την βοήθεια της και την δυνατότητα να εκπονηθεί μεγάλο μέρος της εργασίας στη Μονάδα Ζωνοόσων (Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας & Μικροβιακής Παθογένεσης).

Ευχαριστώ πολύ την υποψήφια Διδάκτορα Ειρήνη Μαθιουδάκη, καθώς και τον Δρ. Ιωσήφ Βρανάκη για την πολύτιμη συνεργασία που είχαμε και τον χρόνο που αφιέρωσαν για την εκμάθηση πειραμάτων που έγιναν. Ακόμη, ευχαριστώ τον Μεταπτυχιακό φοιτητή Αλέξανδρο Λυραντζάκη για την βοήθεια του στην πρωτεωμική ανάλυση. Επίσης θερμές ευχαριστίες στον Dr. J. Langer, και κ. H. Michel, Max Planck Ινστιτούτο Βιοφυσικής στην Φρανκφούρτη όπου έγινε η πρωτεωμική ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία.

Να ευχαριστήσω θερμά και τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής για την πολύτιμη στήριξη και βοήθεια τους και κυρίως την Βιοχημικό MSc Δέσποινα Αγγουράκη, όπως επίσης να ευχαριστήσω θερμά όλους τους φοιτητές στο εργαστήριο του κυρίου Τσιώτη για το όμορφο κλίμα που είχαμε όλον αυτόν τον καιρό.

Βιογραφικό Σημείωμα

Μ Α Ρ Ι Α Τ Ρ Υ Π Α Κ Η

Πανεπιστήμιο Κρήτης
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Τ.Θ.2208, Ηράκλειο 70013

Χημικός, Τεχνολόγος Εργαστηρίου
Τηλ: 2810 394814
Φαξ: 2810 394582
e-mail: tr.maria@gmail.com

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

2017-παρόν: Μεταπτυχιακή φοιτήτρια στη Βιοχημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
Τίτλος εργασίας: Ανάπτυξη του παθογόνου *Coxiella burnetii* σε διαφορετικά κύτταρα ξενιστές. Έκφραση υπομονάδων του εκκριτικού συστήματος

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2015 Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Λίαν Καλώς: 7.05)
Τίτλος Εργασίας: Ανίχνευση των ισομορφών της πυροσταφυλικής κινάσης (PKM2) σε κυτταρικές καρκίνου του πνεύμονα – Χημειοευαισθησία σε φάρμακα.
- 2004 Πτυχίο Ιατρικών Εργαστηρίων, Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Α.Τ.Ε.Ι) Λάρισας, Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας (Λίαν Καλώς: 7.1)
Τίτλος πτυχιακής εργασίας: Ανασκόπηση των ιστορικών αρχείων του παθογόνου *Mycobacterium tuberculosis*: θεραπευτικά σχήματα, ποσοστά επιβίωσης και ανάπτυξης της νόσου.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ/ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2005-παρόν Τεχνολόγος-Χημικός στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, με ειδικότητα στην ιστολογική αναγνώριση και συλλογή μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων μέσω οπτικής μικροσκοπίας και Microdissector Ultrasonic-Piezostepper (PPMD) system.
- 2004 6 μήνες πρακτική άσκηση στα ιατρικά εργαστήρια του Βενιζέλειου Νοσοκομείου Ηρακλείου (Ανοσολογικό, Αιματολογικό, Μικροβιολογικό, Βιοχημικό, Κυτταρολογικό, Παθολογοανατομικό εργαστήριο) και στο τμήμα Αιμοληψιών του Νοσοκομείου.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Ειδικότητα σε οπτική μικροσκοπία, μικροσκοπία αντίστροφη φάσης και μικροσκοπία φθορισμού (Olympus IX70 ανάστροφο μικροσκόπιο, ZEISS Axio Vert A1, Leica DM200) για αναγνώριση καρκινικών κυττάρων από βιοψίες οργάνων, ιστών, μελανωμάτων, υγρών (πτύελα και σάλιο) και αίματος από κλινικά δείγματα.
- Ειδικότητα σε ιστοπαθολογική αναγνώριση, μικροχειρισμό και συλλογή μεμονωμένων καρκινικών κυττάρων μέσω του Microdissector ultrasonic-Piezostepper (PPMD) system.
- Ικανότητα απομόνωσης DNA από κλινικά δείγματα ιστών και υγρών.
- Ικανότητα εφαρμογής αντιδράσεων PCR και προετοιμασίας ιστολογικών δειγμάτων για αλληλούχιση καρκινικών μεταλλαγών πνεύμονα και παχέος εντέρου με ION torrent.
- Ικανότητα απομόνωσης πρωτεϊνών, εφαρμογής πρωτοκόλλων Western Blot και ηλεκτροφορήσεων SDS και Blue Native.
- Ικανότητα εφαρμογής πρωτοκόλλων ανοσοϊστοχημείας και ανοσοφθορισμού.
- Ικανότητα εφαρμογής πρωτοκόλλων χρωματογραφίας συγγένειας
- Ικανότητα ασηπτικών τεχνικών για καλλιέργειες κυτταρικών σειρών και βακτηρίων.

- Ικανότητα διαχείρισης πρωτοκόλλων μέτρησης ευαισθησίας φαρμάκων σε βακτήρια και κυτταρικές σειρές.
- Ικανότητα λήψης αίματος από ανθρώπους και ζώα.
- Άριστη χρήση του πακέτου Microsoft (Microsoft Word, Excel, Powerpoint και Access).

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- Άριστες δεξιότητες στις εργασιακές ανάγκες του εργαστηρίου.
- Άριστη επικοινωνιακή δεξιότητα με συνεργάτες για ανταλλαγή ιδεών που διασφαλίζουν την επίτευξη των στόχων του εργαστηρίου.
- Ικανότητα και πρωτοβουλία για επίλυση τεχνικών προβλημάτων στο εργαστήριο και λήψης αποφάσεων.
- Άριστη ικανότητα γραφής και παρουσίασης.
- Πρόθυμη για εκμάθηση νέων τεχνικών αλλά και για παροχή βοήθειας στις ανάγκες και απαιτήσεις των συνεργατών.
- Πρόθυμη για ανάληψη νέων καθηκόντων.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- ΑΓΓΛΙΚΑ - Certificate of Proficiency in English (University of Michigan)
- ΓΑΛΛΙΚΑ - Delf 1 – Diplôme d'Etudes en Langue Française

ΒΡΑΒΕΙΑ

- | | |
|------|--|
| 2011 | Βραβείο παρουσίασης εργασίας Ελληνική Εταιρεία Ογκολογίας (17 ^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας). |
| 2010 | Βραβείο παρουσίασης εργασίας Ελληνική Εταιρεία Ογκολογίας (16 ^ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας). |

ΔΙΔΑΚΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 2017 Βοηθός εργαστηρίου στο προπτυχιακό εργαστήριο της Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2017 Βοηθός εργαστηρίου στο προπτυχιακό εργαστήριο της Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

- 2014-2015 Εθελοντική διδασκαλία Αγγλικών, Φυσικής, Μαθηματικών και Χημείας σε παιδιά Δημοτικού και του Γυμνασίου στα χωριά “SOS”.
- 2004 Εθελοντής στους Ολυμπιακούς Αγώνες Αθήνα 2004.
- 2004 Τρίμηνη εθελοντική εργασία στο Βενιζέλειο Νοσοκομείο Ηρακλείου.
- 2005-παρόν Εθελοντική βοήθεια στα αδέσποτα ζώα και στο Δημοτικό Κυνοκομείο Ηρακλείου.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Tryfonidis K, Papadaki C, Assele S, Lagoudaki E, Menis J, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Sfakianaki M, Hasan B, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. 2019. Association of BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1, and TXR1 mRNA expression levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J.* 19(1):15-24.
- Kallergi G, Vetsika EK, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, Katsarlinos P, **Trypaki M**, Messaritakis I, Stournaras C, Georgoulas V, Kotsakis A., 2018. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Ther Adv Med Oncol.* doi: 10.1177/1758834017750121.
- Tryfonidis K, Papadaki C, Assele S, Lagoudaki E, Menis J, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Sfakianaki M, Hasan B, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2018. Association of BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1, and TXR1 mRNA expression levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J.* doi: 10.1038/s41397-018-0013-9.

- Matikas A, Voutsina A, Lagoudaki E, Hatzidaki D, **Trypaki M**, Stoupis G, Tzardi M, Mavroudis D, Georgoulas V., 2017. Detection of KRAS exon 2 mutations in circulating tumor cells isolated by the ISET system from patients with RAS wild type metastatic colorectal Cancer. *Transl Oncol.*, 10(4):693-698. doi: 10.1016/j.tranon.2017.06.005.
- Pontikakis S, Papadaki C, Tzardi M, **Trypaki M**, Sfakianaki M, Koinis F, Lagoudaki E, Giannikaki L, Kalykaki A, Kontopodis E, Saridaki Z, Malamos N, Georgoulas V, Souglakos J.,2017. Predictive value of ATP7b, BRCA1, BRCA2, PARP1, UIMC1 (RAP80), HOXA9, DAXX, TXN (TRX1), THBS1 (TSP1) and PRR13 (TXR1) genes in patients with epithelial ovarian cancer who received platinum-taxane first-line therapy. *Pharmacogenomics J.*, 17(6):506-514. doi: 10.1038/tpj.2016.63.
- Matikas A, Voutsina A, **Trypaki M**, Georgoulas V., 2016. Role of circulating free DNA in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 8(12):810-818. doi: 10.4251/wjgo.v8.i12.810.
- Papadaki C, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Giagkas G, Ioannidis G, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Voutsina A, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J.,2014. PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to front-line platinum-based chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 111(9):1757-64.
- Karachaliou N, Papadaki C, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Sfakianaki M, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J, 2013. Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPOmicron-IIA, TOPOIIB and C-MYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC) who received first line therapy with cisplatin and etoposide. *PLoS One* 13;8(9): e74611.
- Kalikaki A, Koutsopoulos A, Sfakianaki M, Giannikaki E, Kontopodis E, Agelaki S, Souglakos J, Kotsakis A, Lagoudaki E, Georgiou GC, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Papadimitraki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Voutsina A, 2013. Detection of EGFR and KRAS mutations in NSCLC patients of greek origin in daily clinical practice. *Forum of Clinical Oncology* 4(3): 44-52.
- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki L, **Trypaki M**, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2012. *ERCC1* and *BRAC1* mRNA expression in the primary tumour could predict the effectiveness of the 2nd-line cisplatin based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 7(4):663-71.
- Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Messaritakis I, Stathopoulos E, *et al.*, 2011. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One*, 6(1):e15980.
- Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2011. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 104(2):316-23.
- Papadaki Ch, Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Sfakiotaki G, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Messaritakis I, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J., 2011. PKM2 as a biomarker for sensitivity to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Clin. Onc.* 29(4): 434-434.DOI: 10.1200/jco.2011.29.4_suppl.434

- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Ioannidis, G, Tsakalaki, E., **Trypaki M.**, Giagkas, G., Pontikakis S, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J, 2011. PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to cisplatin-based chemotherapy in metastatic/advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Oncology* 6(6): S998-S998.
- Ioannidis G, Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Hatzidaki D, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J, 2011. Predictive and prognostic role of gemcitabine-related genes in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 6(6): S1086-S1087.
- Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, **Trypaki M**, Kontopodis E, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Voutsina A, 2010. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to EGFR and K-RAS mutation status. *Lung Cancer*, 69(1):110-5.
- Papadaki C, Mavroudis D, **Trypaki M**, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Hatzidaki D, Tsakalaki E, Georgoulas V, Souglakos J., 2009. Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen. *Clinical Cancer Research*,15(11):3827-33.
- Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, **Tripaki M**, Chatzidaki D, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Georgoulas V, Rosell R., 2008. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *British Journal of Cancer*, 98(10):1710-5.
- Kalykaki A, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Souglakos J, Stathopoulos E, Georgoulas V, Mavroudis D, Voutsina A, 2008. Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *British Journal of Cancer* 99(6):923-9.
- Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, **Trypaki M**, Staphopoulos E, Georgoulas V, Rosell R, Souglakos J., 2008. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 3(11):e3695.
- Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki A, Souglakos J, Briasoulis E, Murray S, Koutsopoulos A, **Tripaki M**, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V.,2007. 'Classical' but not 'other' mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 97:1560-6.

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Kallergi G, Vetsika E.-K, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, Katsarlinos P, **Trypaki M**, Stournaras C, Georgoulas V, Kotsakis A. Evaluation of PD-L1/PD-1 on Circulating Tumor Cells (CTCs) and on primary tumor in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). AACR Annual Meeting 2017, Washington DC, April, 2017.
- Trypaki M**, Papadaki C, Aivaliotis M, Souglakos I. Detection of the complexes of pyruvate kinase (PKM2) in non-small cell lung cancer cell lines. European Proteomics Association (EuPA). Istanbul, Turkey, June 2016.
- Voutsina A, Kalikaki A, Koutsopoulos M, Sfakianaki M, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Agelaki S, Georgoulas V, Mavroudis D. Next generation sequencing identifies actionable mutations in EGFR-wild type and KRAS mutant non-small cell lung cancer patients. ESMO Congress, Copenhagen, Denmark, December 2016.
- Papadaki C, Pontikakis S, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Koinis F, Tzardi M, Giannikaki L, Sfakianaki M, Kalykaki A, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos I. PKM2 and CD44 tumoral expression to predict the effectiveness of front-line paclitaxel and carboplatin chemotherapy in epithelial ovarian cancer. ASCO Annual Meeting, Chicago, June 2015.
- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Giagkas G, Tsakalaki El, Trypaki M, Pontikakis S, Koulouridi A, Georgoulas V, Souglakos J. PKM2 expression may predict chemosensitivity to cisplatin-based chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). ESMO Congress, Vienna, Austria, October 2012.
- Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki Ch, Mpananis K, Tsakalaki El, **Trypaki M**, Messaritakis I, Georgoulas V, Souglakos J. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, prognostic and predictive values. ESMO Congress, Vienna, Austria, October 2012.
- Papadaki C, Sfakianaki M, Saridaki M, Giagas G, Mpananis K, Tzardi M, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Georgoulas V, Souglakos I. PKM2 mRNA expression to predict disease recurrence in patients with stage II or III colon cancer treated with oxaliplatin in combination with fluoropyrimidines, ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, January 2012.
- Kalikali Ar, Voutsina A, Koutsopoulos A, Pallis A, **Trypaki M**, Souglakos J, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V. Correlation of EGFR mutation status between primary tumor and metastases in NSCLC. 12th World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, September 2007.

CURRICULUM VITAE

M A R I A T R Y P A K I

University of Crete
Translational Oncology Research Lab
Medical School, University of Crete
PO BOX 2208, Heraklion 70013,

Chemist, Medical Technologist
Tel: +30 2810 394814
Fax: +30 2810 394582
E-mail: tr.maria@gmail.com

GRADUATE EDUCATION

2017-present Master's student in Biochemistry, University of Crete, Greece. Thesis title: Growth of the pathogen *Coxiella burnetii* in different host cells. Expression of the subunit DotC.

UNDERGRADUATE EDUCATION

- 2015 B.Sc. in Chemistry, University of Crete, Greece. Thesis title: Detection of pyruvate kinase isoforms (PKM2) in lung cancer cell lines and identification of their conformational changes under the IC50 of cisplatin and erlotinib.
- 2004 B.Sc. in Medical Laboratory Technology, University of Applied Sciences of Thessaly Greece. Thesis title: Reviewing the historical records of *Mycobacterium tuberculosis*: therapeutic schemes, survival rates and development of the disease.

RESEARCH EXPERIENCE/APPOINTMENTS

2005-present Medical Technologist- Chemist, in Translational Oncology Research Lab, Medical School University of Crete with expertise in histological microdissection,

identification and single cancer cell collection using light microscopy and Eppendorf's Microdissector Ultrasonic-Piezostepper (PPMD) system (Director Prof. D Mavroudis, MD).

Apr-Oct 2004 Full-time paid MLS intern, Venizelion Clinical Laboratory, General Hospital "Venizelion" Crete.

PROFESSIONAL SKILLS

- Experienced in light, phase contrast, fluorescence microscopy (Olympus IX70 inverted microscope for advanced cell imaging, ZEISS Axio Vert A1, Leica DM200) for identification of cancer cells deriving from biopsies of various tissues, organs, melanomas, fluids (saliva and sputum) and blood clinical samples.
- Expertise in histological microdissection, micromanipulation and single cancer cell collection using the Eppendorf Microdissector ultrasonic-Piezostepper (PPMD) system.
- Expertise in tissue and fluid specimens preparation for microhistological manipulation and DNA extraction.
- Expertise in DNA extraction, PCR reactions and preparation of histological specimens for ION torrent sequencing using protocols that target lung and intestine mutations reported in lung and intestine cancer.
- Expertise in protein extraction/proteolysis protocols, western blotting, SDS and Blue Native PAGE electrophoresis.
- Expertise in immunohistochemistry and immunofluorescence protocols.
- Expertise in affinity and size exclusion chromatography.
- Expertise in aseptic techniques for media preparation and cell cultures.
- Expertise with protocols used in bacteria and cell cultures for testing and measuring critical levels (IC50) of drug sensitivity of active compounds.
- Expertise in practices in phlebotomy including blood drawing and blood collection from humans and animals.

- Proficiency with Microsoft Word, Excel, and Powerpoint.

PERSONAL SKILLS

- Effective organization skills associated with managing time and prioritizing required work for completion of assigned tasks.
- Excellent communication skills for working with internal and external collaborators to exchange ideas and information to ensure sufficient progress on assigned tasks/ goals.
- Ability to use initiative and judgment to resolve problems individually or as part of a group.
- Ability to provide substantial input into troubleshooting and decision making.
- Good interpersonal, writing and presentation skills.
- Willingness to learn new skills and to assist with the needs and requirements of colleagues and co-workers.
- Willing to embrace new duties / challenges.

LANGUAGES

- ENGLISH - Certificate of Proficiency in English (University of Michigan)
- FRENCH - Delf 1 – Diplôme d'Etudes en Langue Française

AWARDS/FELLOWSHIPS

- | | |
|------|--|
| 2011 | Hellenic Society of Medical Oncology Award in recognition of excellent oral presentation in a scientific conference (17 th Hellenic Conference of Clinical Oncology). |
| 2010 | Hellenic Society of Medical Oncology Award in recognition of excellent oral presentation in a scientific conference (16 th Hellenic Conference of Clinical Oncology). |

TEACHING EXPERIENCE

- 2017 Teaching assistant Chemistry Department (University of Crete) undergraduate course Biochemistry.
- 2017 Teaching assistant Chemistry Department (University of Crete) undergraduate course Analytical Chemistry.

COMMUNITY WORK

- 2014-2015 Volunteer tutor for English, Physics, Math and Chemistry for elementary and high school students through the non-governmental organization "SOS Children's Villages (Greece)", dedicated to the care of orphaned and abandoned children.
- Aug 2004 Olympic Volunteer, Olympic Games Athens 2004.
- Oct-Dec2004 3-month volunteer work as MLS in the Venizelion Clinical, General Hospital "Venizelion" Crete.
- 2006-Present Volunteer for abandoned and mistreated animals.

PUBLICATIONS

- Tryfonidis K, Papadaki C, Assele S, Lagoudaki E, Menis J, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Sfakianaki M, Hasan B, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. 2019. Association of BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1, and TXR1 mRNA expression levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J.* 19(1):15-24.
- Kallergi G, Vetsika EK, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, Katsarlinos P, **Trypaki M**, Messaritakis I, Stournaras C, Georgoulas V, Kotsakis A., 2018. Evaluation of PD-L1/PD-1 on circulating tumor cells in patients with advanced non-small cell lung cancer, *Ther Adv Med Oncol.* doi: 10.1177/1758834017750121.
- Tryfonidis K, Papadaki C, Assele S, Lagoudaki E, Menis J, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Sfakianaki M, Hasan B, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2018. Association of BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1, and TXR1 mRNA expression

levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients with resectable non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics J.* doi: 10.1038/s41397-018-0013-9.

- Matikas A, Voutsina A, Lagoudaki E, Hatzidaki D, **Trypaki M**, Stoupis G, Tzardi M, Mavroudis D, Georgoulas V., 2017. Detection of KRAS exon 2 mutations in circulating tumor cells isolated by the ISET system from patients with RAS wild type metastatic colorectal Cancer. *Transl Oncol.*, 10(4):693-698. doi: 10.1016/j.tranon.2017.06.005.
- Pontikakis S, Papadaki C, Tzardi M, **Trypaki M**, Sfakianaki M, Koinis F, Lagoudaki E, Giannikaki L, Kalykaki A, Kontopodis E, Saridaki Z, Malamos N, Georgoulas V, Souglakos J., 2017. Predictive value of ATP7b, BRCA1, BRCA2, PARP1, UIMC1 (RAP80), HOXA9, DAXX, TXN (TRX1), THBS1 (TSP1) and PRR13 (TXR1) genes in patients with epithelial ovarian cancer who received platinum-taxane first-line therapy. *Pharmacogenomics J.*, 17(6):506-514. doi: 10.1038/tpj.2016.63.
- Matikas A, Voutsina A, **Trypaki M**, Georgoulas V., 2016. Role of circulating free DNA in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 8(12):810-818. doi: 10.4251/wjgo.v8.i12.810.
- Papadaki C, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Giagkas G, Ioannidis G, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Voutsina A, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J., 2014. PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to front-line platinum-based chemotherapy in patients with metastatic non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 111(9):1757-64.
- Karachaliou N, Papadaki C, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Sfakianaki M, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J, 2013. Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPOmicron-IIA, TOPOIIB and C-MYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC) who received first line therapy with cisplatin and etoposide. *PLoS One* 13;8(9): e74611.
- Kalikaki A, Koutsopoulos A, Sfakianaki M, Giannikaki E, Kontopodis E, Agelaki S, Souglakos J, Kotsakis A, Lagoudaki E, Georgiou GC, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Papadimitraki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Voutsina A, 2013. Detection of EGFR and KRAS mutations in NSCLC patients of greek origin in daily clinical practice. *Forum of Clinical Oncology* 4(3): 44-52.
- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki L, **Trypaki M**, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2012. ERCC1 and BRAC1 mRNA expression in the primary tumour could predict the effectiveness of the 2nd-line cisplatin based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 7(4):663-71.
- Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, Sfakianaki M, Pega F, Kalikaki A, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Messaritakis I, Stathopoulos E, et al., 2011. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, PTEN, AREG, EREG expression and skin rash in ≥ 2 line cetuximab-based therapy of colorectal cancer patients. *PLoS One*, 6(1):e15980.
- Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Tryfonidis K, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J., 2011. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 104(2):316-23.

- Papadaki Ch, Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Sfakiotaki G, Tsakalaki El, **Trypaki M**, Messaritakis Ip, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J., 2011. PKM2 as a biomarker for sensitivity to oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer (mCRC). *J. Clin. Onc.* 29(4): 434-434. DOI: 10.1200/jco.2011.29.4_suppl.434
- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Ioannidis, G, Tsakalaki, E., **Trypaki M.**, Giagkas, G., Pontikakis S, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J, 2011. PKM2 as a biomarker for chemosensitivity to cisplatin-based chemotherapy in metastatic/advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Thoracic Oncology* 6(6): S998-S998.
- Ioannidis G, Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Hatzidaki D, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos J, 2011. Predictive and prognostic role of gemcitabine-related genes in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 6(6): S1086-S1087.
- Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, **Trypaki M**, Kontopodis E, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V, Voutsina A, 2010. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to EGFR and K-RAS mutation status. *Lung Cancer*, 69(1):110-5.
- Papadaki C, Mavroudis D, **Trypaki M**, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Hatzidaki D, Tsakalaki E, Georgoulas V, Souglakos J., 2009. Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen. *Clinical Cancer Research*,15(11):3827-33.
- Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, **Trypaki M**, Chatzidaki D, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Georgoulas V, Rosell R., 2008. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *British Journal of Cancer*, 98(10):1710-5.
- Kalykaki A, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Souglakos J, Stathopoulos E, Georgoulas V, Mavroudis D, Voutsina A, 2008. Comparison of EGFR and K-RAS gene status between primary tumours and corresponding metastases in NSCLC. *British Journal of Cancer* 99(6):923-9.
- Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, **Trypaki M**, Staphopoulos E, Georgoulas V, Rosell R, Souglakos J., 2008. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 3(11):e3695.
- Pallis AG, Voutsina A, Kalikaki A, Souglakos J, Briasoulis E, Murray S, Koutsopoulos A, **Trypaki M**, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V.,2007. 'Classical' but not 'other' mutations of EGFR kinase domain are associated with clinical outcome in gefitinib-treated patients with non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 97:1560-6.

SELECTED ABSTRACTS

- Kallergi G, Vetsika E.-K, Aggouraki D, Lagoudaki E, Koutsopoulos A, Koinis F, Katsarlinos P, **Trypaki M**, Stournaras C, Georgoulas V, Kotsakis A. Evaluation of PD-L1/PD-1 on Circulating Tumor Cells (CTCs) and on primary tumor in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). AACR Annual Meeting 2017, Washington DC, April, 2017.
- Trypaki M**, Papadaki C, Aivaliotis M, Souglakos I. Detection of the complexes of pyruvate kinase (PKM2) in non-small cell lung cancer cell lines. European Proteomics Association (EuPA). Istanbul, Turkey, June 2016.
- Voutsina A, Kalikaki A, Koutsopoulos M, Sfakianaki M, **Trypaki M**, Tsakalaki E, Agelaki S, Georgoulas V, Mavroudis D. Next generation sequencing identifies actionable mutations in EGFR-wild type and KRAS mutant non-small cell lung cancer patients. ESMO Congress, Copenhagen, Denmark, December 2016.
- Papadaki C, Pontikakis S, Lagoudaki E, **Trypaki M**, Koinis F, Tzardi M, Giannikaki L, Sfakianaki M, Kalykaki A, Mavroudis D, Georgoulas V, Souglakos I. PKM2 and CD44 tumoral expression to predict the effectiveness of front-line paclitaxel and carboplatin chemotherapy in epithelial ovarian cancer. ASCO Annual Meeting, Chicago, June 2015.
- Papadaki Ch, Sfakianaki M, Lagoudaki E, Giagkas G, Tsakalaki El, **Trypaki M**, Pontikakis S, Koulouridi A, Georgoulas V, Souglakos J. PKM2 expression may predict chemosensitivity to cisplatin-based chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). ESMO Congress, Vienna, Austria, October 2012.
- Saridaki Z, Tzardi M, Sfakianaki M, Papadaki Ch, Mpananis K, Tsakalaki El, **Trypaki M**, Messaritakis I, Georgoulas V, Souglakos J. BRAFV600E mutation analysis in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) in daily clinical practice: correlations with clinical characteristics, prognostic and predictive values. ESMO Congress, Vienna, Austria, October 2012.
- Papadaki C, Sfakianaki M, Saridaki M, Giagas G, Mpananis K, Tzardi M, Tsakalaki E, **Trypaki M**, Georgoulas V, Souglakos I. PKM2 mRNA expression to predict disease recurrence in patients with stage II or III colon cancer treated with oxaliplatin in combination with fluoropyrimidines, ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, San Francisco, January 2012.
- Kalikali Ar, Voutsina A, Koutsopoulos A, Pallis A, **Trypaki M**, Souglakos J, Stathopoulos E, Mavroudis D, Georgoulas V. Correlation of EGFR mutation status between primary tumor and metastases in NSCLC. 12th World Conference on Lung Cancer, Seoul, Korea, September 2007.

Περίληψη

Το βακτήριο *Coxiella burnetii* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού Q, μιας ζωνοδόσου που προκαλεί σημαντικά προβλήματα υγείας καθώς και σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις κατά την εκδήλωσή της.

Πρόκειται για ένα αερογενώς μεταδιδόμενο και εξαιρετικά μολυσματικό βακτήριο αξιοσημείωτη αντοχή στο περιβαλλοντικό στρες που περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1937 σε σφαγεία στην Αυστραλία. Λεπτομερής μελέτη του παθογόνου έχει καταστεί δύσκολη λόγω της υποχρεωτικής ενδοκυτταρικής φύσης του, ωστόσο, η επιτυχής καλλιέργεια της *Coxiella* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, η ανάπτυξη ενός αξενικού μέσου καλλιέργειας, καθώς και η εφαρμογή εργαλείων βιοπληροφορικής έχουν σημειώσει σημαντική πρόοδο στην έρευνα της ζωνοδόσου κατά την τελευταία δεκαετία.

Ένας βασικός παράγοντας που σχετίζεται με την παθογένεια της *Coxiella* είναι το εκκριτικό σύστημα Dot/Icm τύπου IV (T4SS) που χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρωτεϊνών-τελεστών στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Οι πρωτεΐνες-τελεστές που μεταφέρονται μέσω του T4SS μεσολαβούν στην επιβίωση και στον επιτυχή πολλαπλασιασμό του παθογόνου εντός του κυττάρου-ξενιστή.

Στην παρούσα εργασία το βακτήριο *Coxiella burnetii* NM II αναπτύχθηκε σε διαφορετικούς ξενιστές (κύτταρα HeLa, VERO και MRC-5) καθώς και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας ώστε να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες του βακτηρίου και του κυττάρου ξενιστή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μόλυνσης. Επιπλέον, έγινε ετερόλογη έκφραση των υπομονάδων DotC και DotD του T4SS σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* η οποία DotC υπομονάδα χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας με στόχο την δομική ανάλυση της με κρυσταλλογραφία.

Λέξεις-κλειδιά : *Coxiella burnetii*, Q πυρετός, ενδοκυτταρικό παθογόνο, Dot/Icm σύστημα, πρωτεωμική ανάλυση

Abstract

The bacterium *Coxiella burnetii* is the causative agent of Q fever, a zoonotic disease that causes significant health problems and has a significant financial impact on its occurrence. The bacterium is an airborne and highly infectious vector with remarkable resistance to environmental stress, and first described in 1937 in slaughterhouses in Australia. Detailed study of the pathogen has been made difficult due to its obligatory intracellular nature, however, the successful cultivation of *Coxiella* in different cell lines, the development of an axenic culture medium, and the application of bioinformatics tools, have made significant progress in zoonotic research during this decade.

A key factor associated with the pathogenesis of *Coxiella* is the type IV Dot / Icm secretory system (T4SS), used to transport effector proteins to the host cell cytoplasm. The effector proteins transported through T4SS mediate the survival and successful proliferation of the pathogen within the host cell.

In this present work, the *Coxiella burnetii* NM II bacterium was grown in different hosts (HeLa, VERO and MRC-5 cells) as well as in an axenic culture medium, in order to identify the bacterial and host cell proteins at different days post infection. In addition, expression of the DotC subunit of T4SS in *E.coli* receptor cells was characterized by mass spectrometry for structural analysis by crystallography.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Q fever, intracellular pathogen, Dot/Icm system, proteomics

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	17
1. Εισαγωγή	
1.1. Γενικά στοιχεία για την <i>Coxiella burnetti</i>	22
1.2. Κύκλος ανάπτυξης της <i>C. burnetti</i>	25
1.3. Εκκριτικό σύστημα Dot/Icm T4SS.....	28
1.4. Βιογένεση του αναπαραγωγικού κενοτοπίου της <i>C. burnetti</i>	29
1.5. Γενωμικά χαρακτηριστικά.....	31
1.6. Μηχανισμοί που ελέγχονται από την <i>Coxiella</i> για την αποφυγή του πρόωρου θανάτου του ξενιστή.....	34
1.7. Πρωτεωμική ανάλυση.....	35
1.8. Πρωτεϊνική εκχύλιση με την μέθοδο FASP.....	37
1.9. Ιονισμός με την μέθοδο LC-MS/MS.....	38
Σκοπός της εργασίας.....	40
2. Υλικά και Μέθοδοι	
2.1. Κυτταρικές σειρές	
2.1.1. Απόψυξη κυτταρικών σειρών.....	41
2.1.2. Αποκόλληση των κυτάρων με θρυψίνη και ανακαλλιέργεια.....	41
2.1.3. Πάγωμα κυτταρικών σειρών.....	42
2.1.4. Μέτρηση κυττάρων με την χρήση ειδικών κυτταρομετρητών.....	42
2.2. Καλλιέργεια βακτηρίου <i>C. burnetii</i> NM Φάσης II	
2.2.1. Καλλιέργεια της <i>C. burnetii</i> σε κύτταρα VERO.....	44
2.2.2. Καλλιέργεια της <i>C. burnetii</i> σε κύτταρα HeLa.....	45
2.2.3. Καλλιέργεια της <i>C. burnetii</i> σε κύτταρα MRC-5.....	46
2.2.4. Καλλιέργεια της <i>C. burnetii</i> σε αξενικό θρεπτικό μέσο ACCM-D.....	46

2.3. Αναλυτικές τεχνικές

2.3.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης <i>C. burnetii</i> από κύτταρα VERO.....	48
2.3.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης Dot/Icm Τύπου IV εκκριτικού συστήματος.....	49
2.3.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης Dot/Icm Τύπου IV εκκριτικού συστήματος.....	51
2.3.4. Άμεσος ανοσοφθορισμός.....	52
2.3.5. Χρώση Gimenez.....	53
2.3.6. Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υλικού LB (Luria Broth) για καλλιέργεια <i>E.coli</i>	53
2.3.7. Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i> C43(D3).....	55
2.3.8. Καλλιέργεια <i>E.coli</i> C43(D3).....	55
2.3.9. Απομόνωση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης.....	56
2.3.10. Χρωματογραφία συγγένειας.....	58
2.3.11. Συμπύκνωση πρωτεϊνών με Amicon.....	61
2.3.12. Κατακρήμιση πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA).....	62
2.3.13. Απομόνωση πρωτεϊνών περιπλάσματος.....	62
2.3.14. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford.....	62
2.3.15. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο δικιχονικού οξέος.....	63
2.3.16. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE.....	64
2.3.17. Χρώση Blue-Silver Coomassie.....	67
2.3.18. Χρώση αργύρου (συμβατή με MS).....	68
2.3.19. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting).....	69
2.4. Ταυτοποίηση και βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών	70

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης DotC του εκκριτικού συστήματος της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II σε δεκτικά κύτταρα <i>E.coli</i> C43(DE3).....	72
3.2. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης DotD του εκκριτικού συστήματος της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II σε δεκτικά κύτταρα <i>E.coli</i> C43(DE3).....	76

3.3. Αποτελέσματα πρωτοκόλλων απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος της <i>Coxiella</i> Φάσης II σε κύτταρα VERO και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας.....	78
3.4. Ανάλυση του πρωτεομικού προφίλ της <i>Coxiella burnetti</i> Φάσης II κατά την 4η μέρα μόλυνσης των κυττάρων HeLa.....	82
3.4.1. Η πιθανή υπεροξειδάση ARI65789.1 μπορεί να συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II κατά τη μόλυνση των κυττάρων HeLa.....	86
3.4.2. Η συνθάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης ARI66131.1 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της <i>Coxiella</i> Φάσης II επηρεάζοντας τα επίπεδα των διαθέσιμων πουρινών.....	88
3.4.3. Η πρωτεΐνη ARI66660.1 μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεια της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II συμβάλλοντας στη σωστή αναδίπλωση του Dot /Icm εκκριτικού συστήματος IV (T4SS).....	89
3.4.4. Η υποθετική πρωτεΐνη ARI65479.1 (OmpH) και η πρωτεΐνη ARI66478.1 με δράση μοριακής σαπερόνης GroEL φαίνεται να συμμετέχουν στην παθογένεια της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II μέσω της σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών.....	91
3.4.5. Ο παράγοντας Tu (πρωτεΐνη ARI65122.1) φαίνεται να συμμετέχει στην παθογένεια της <i>Coxiella burnetii</i> Φάσης II.....	93
3.5. Πρωτεωμικό προφίλ της <i>Coxiella burnetti</i> Φάσης II κατά τη 2 ^η και 10η μέρα μόλυνσης των κυττάρων MRC-5.....	94
4. Συμπεράσματα.....	100
5. Βιβλιογραφία.....	104

1. Εισαγωγή

1.1. Γενικά στοιχεία για την *Coxiella burnetii*

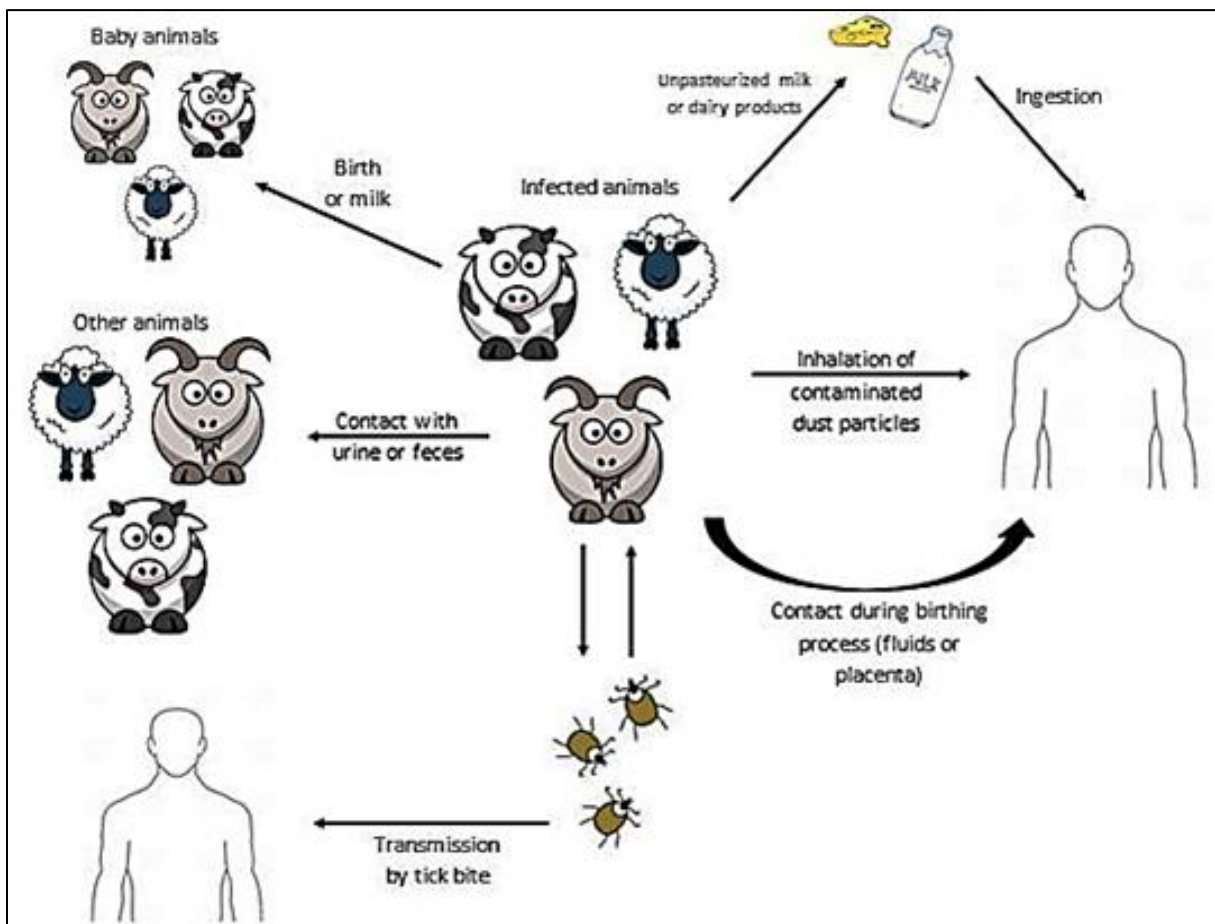
Η *C. burnetii* είναι παθογόνο βακτήριο των ευκαρυωτικών κυττάρων και ανήκει στην οικογένεια *Coxiellaceae* (Εικόνα 1). Η λοίμωξη από *Coxiella* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Αυστραλία, και ονομάστηκε ως «πυρετός των σφαγείων», ή αλλιώς πυρετός Q (Query; Q) λόγω της άγνωστης φύσης του (Derrick et al., 1937). Η *Coxiella* χαρακτηρίστηκε αρχικά ως ιός, ενώ περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι επρόκειτο για βακτήριο το οποίο και ονομάστηκε «*Coxiella burnetii*» προς τιμήν των ερευνητών που το χαρακτήρισαν (Dyer, 1938).

Η *Coxiella* είναι κοκκοβάκιλος μικρού μεγέθους (πλάτος 0.2 μm -0.4 μm και μήκους (0.4 μm -1 μm) με παρόμοιο κυτταρικό τοίχωμα με τα Gram αρνητικά βακτήρια. Παρόλη την ομοιότητα στο τοίχωμα με τα κατά Gram αρνητικά, η ταυτοποίηση της *Coxiella* γίνεται με χρώση Gimenez (βασική ουσία χρώσης η φουξίνη), και όχι χρώση κατά Gram, ενώ η ίδια χρώση μπορεί να εφαρμοστεί σε κλινικά δείγματα ιστών και σε καλλιέργειες (Gimenez 1964).



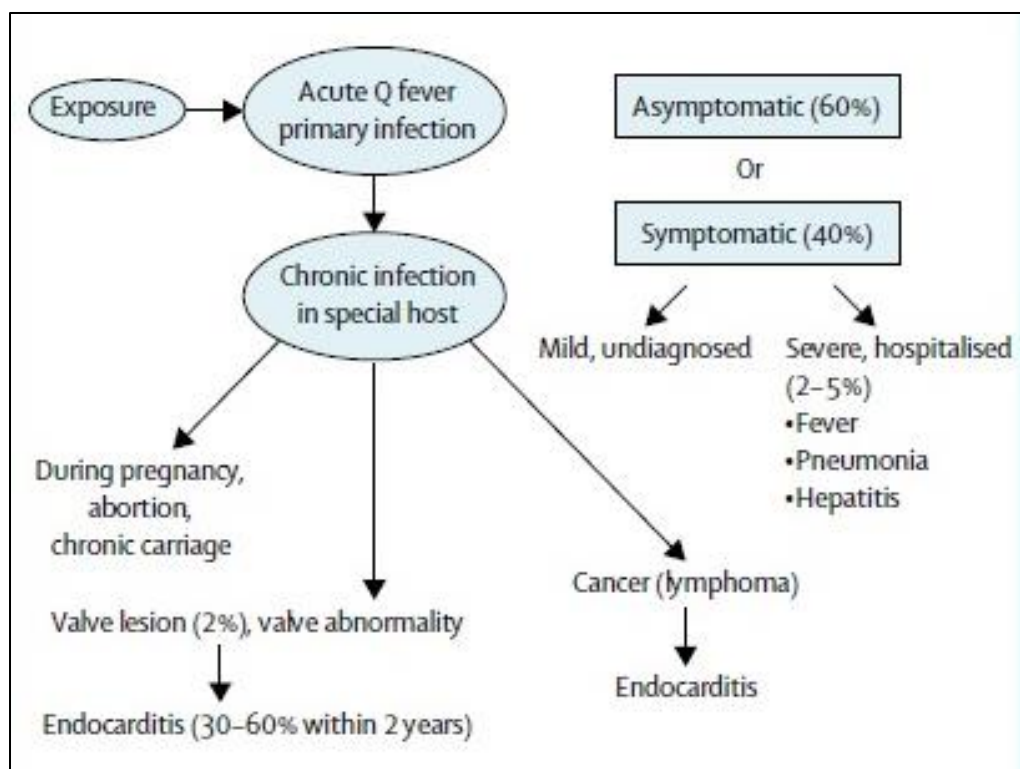
Εικόνα 1: Βακτήριο *Coxiella burnetii* (από Kunkel Microscopy science Photo Library, 2018).

Η *C. burnetii* έχει παγκόσμια γεωγραφική κατανομή και μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο ως ζωνοσός (Süss et al., 2004). Η μετάδοση της μπορεί να γίνει μέσω επαφής ή εισπνοής αερολυμάτων σκόνης και σταγονιδίων από μολυσμένα ζώα. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία κύρια εστία μόλυνσης για τον άνθρωπο, αποτελούν τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή, ενώ άγριας ζωής θηλαστικά και οικόσιτα ζώα καθώς και διάφορα είδη αρθροπόδων (π.χ. τσιμπούρια) λειτουργούν ως φυσικοί ξενιστές. (Εικόνα 2). Η μετάδοση στον άνθρωπο μπορεί να γίνει επίσης και μέσω του πεπτικού σωλήνα με την κατανάλωση νωπού γάλακτος αλλά και προϊόντων που είναι μολυσμένα με *Coxiella* (Marrie 2000; Walker et al., 2001).



Εικόνα 2: Πιθανά μονοπάτια μετάδοσης και πιθανοί ξενιστές του βακτηρίου *C. burnetii*.
(από <https://mechpath.com/author/jsniness>)

Η λοίμωξη από *C. burnetii* μπορεί να εμφανιστεί ως οξεία πνευμονοπάθεια με συμπτώματα παρόμοια της γρίπης γεγονός που καθιστά δύσκολη τη διάγνωσή της (Eldin et al., 2017). Πέρα από την οξεία μορφή, η *C. burnetii* μπορεί να δημιουργήσει επίσης και μια χρόνια λοίμωξη που έχει ως αποτέλεσμα το χρόνιο πυρετό Q. Η χρόνια νόσος μπορεί να εκδηλωθεί επίσης ως ηπατίτιδα (Gomes et al., 2014), οστεομυελίτιδα (Merhej et al., 2012), ίνωση (Melenotte et al., 2018) και σύνδρομο χρόνιας κόπωσης (Roest et al., 2013) (Εικόνα 3).



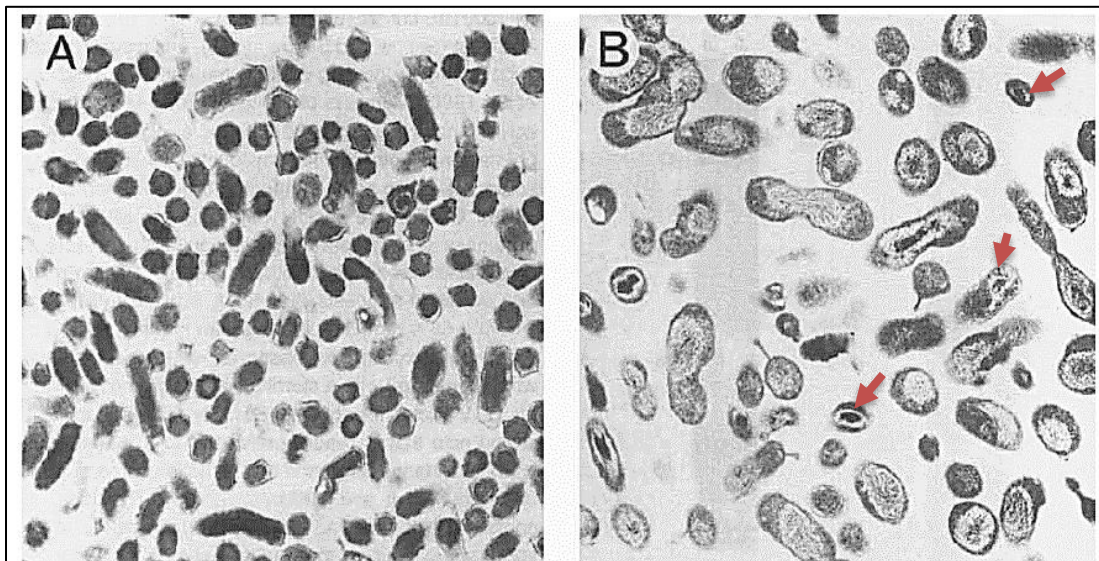
Εικόνα 3: Περιπτώσεις λοίμωξης από *C. burnetii* (από Raoult et al., 2005).

Τα τελευταία στοιχεία από το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Center for Disease prevention and Control; ECDC) ανέφεραν ότι, την περίοδο 2013-2017, 29 ευρωπαϊκές χώρες εμφάνισαν δεδομένα για πυρετό Q. Από αυτές τις χώρες, το 91% των περιπτώσεων ήταν επιβεβαιωμένα κρούσματα. Οι μεγαλύτεροι επιβεβαιωμένοι αριθμοί αναφέρονται στην Ισπανία, Γαλλία και Γερμανία, ενώ θάνατοι λόγω πυρετού Q έχουν αναφερθεί στη Γερμανία, την Πορτογαλία, την Ισπανία και την Ουγγαρία. Η Ελλάδα για την ίδια περίοδο

ανέφερε 4 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις πυρετού Q. (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-systems-overview-2017>)

1.2. Κύκλος ανάπτυξης της *C. burnetii*

Η *C. burnetii* έχει διφασικό κύκλο ανάπτυξης ο οποίος αποτελείται κυρίως από δύο μορφολογικές παραλλαγές. Η μια μορφή της *Coxiella* εμφανίζεται με μικρά κύτταρα και ονομάζεται μορφή SCV (small cell variants; SCV), ενώ η δεύτερη μορφή του παθογόνου χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερα σε μέγεθος κύτταρα και ονομάζεται μορφή LCV (large cell variants; LCVs) (Εικόνα 4). Μια επιπλέον μορφή που αποτελεί ξεχωριστό χαρακτηριστικό της μορφής LCV είναι η ύπαρξη σωματίων που ομοιάζουν με σπόρια (spore-like particles; SLPs), τα οποία προσδένονται στη μεμβράνη και αποτελούν άκρως μολυσματικές μορφές του παθογόνου ενώ είναι ανθεκτικές σε περιβαλλοντικές συνθήκες (McCaul και Williams, 1981).



Εικόνα 4: Μορφολογικές παραλλαγές της *C. burnetii* όπως απεικονίζονται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στα αριστερά (A) απεικονίζεται η μορφή SCV, στα δεξιά (B) απεικονίζεται η μορφή LCV της *Coxiella* που περιέχει SLPs (βέλη) (από Heinzen et al., 1996).

Από τις δύο κύριες μορφές της *Coxiella*, η μορφή LCV είναι η μη μολυσματική, ενώ η SCV είναι μεταβολικά ανενεργή αλλά μολυσματική μορφή του βακτηρίου. Η μορφή SCV είναι ανθεκτική σε παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η απουσία θρεπτικών, ενώ πιθανολογείται, ότι είναι η μορφή του παθογόνου που ξεκινά τη φυσική λοίμωξη. Σε αντίθεση, η μορφή LCV είναι η μεταβολικά ενεργή μορφή της *Coxiella* ικανή για αντιγραφή και πολλαπλασιασμό του βακτηρίου σε μεγάλους αριθμούς εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων (Voth et al., 2007, Coleman et al., 2004).

Μελέτες πρωτεομικής ανάλυσης δείχνουν ότι πρωτεΐνες που εκφράζονται από την μορφή SCV της *Coxiella* εμπλέκονται στην αποφυγή του ανοσοποιητικού μηχανισμού του ξενιστή, ενώ πρωτεΐνες που εκφράζονται από τη μορφή LCV σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση και την ενδοκυτταρική επιβίωση μέσα στον ξενιστή (Coleman et al., 2007). Είναι ενδιαφέρον ότι, ενώ η μορφή SCV της *Coxiella* καταστρέφεται με φορμαλδεΰδη, παρόλα αυτά έχει απομονωθεί από ιστούς που ήταν συντηρημένοι σε φορμαλδεΰδη για 4 έως και 5 μήνες (Angelakis και Raoult 2009).

Κύριο χαρακτηριστικό της δομής της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης είναι η παρουσία λιποπρωτεϊνών, λιποπολυσακχαριτών και φωσφολιπιδίων. Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο των λιποπολυσακχαριτών (LPS) του κυτταρικού τοιχώματος της *C. burnetii* είναι η έλλειψη σταθερής σύνθεσης. Αυτό το γεγονός έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργούνται δυο διαφορετικές αντιγονικές φάσεις του βακτηρίου, η φάση I και η φάση II (Hackstadt et al., 1985). (Hotta et al., 2002). Ειδικότερα, όταν στη σύνθεση των LPS συμμετέχουν δυο σάκχαρα, η βιρενόζη και η διυδροξυστρεπτόζη, η *C. burnetii* βρίσκεται στη φάση I, ενώ, αντίθετα, όταν αυτά τα σάκχαρα απουσιάζουν βρίσκεται στη Φάση II. Οι μικροοργανισμοί της «Φάσης I» συναντώνται στη φύση σε μολυσμένα ζώα, αρθρόποδα και ανθρώπους και είναι ιδιαίτερως μολυσματικοί. Αντιθέτως, οι μικροοργανισμοί της «Φάσης II» είναι λιγότερο μολυσματικοί και κατά κανόνα προκύπτουν στο εργαστήριο μετά από διαδοχικά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες (Toman et al., 1998) (Gürtler et al., 2014). Κατά συνέπεια, η παρουσία του LPS στο τοίχωμα της *Coxiella*, συμβάλλει στην αύξηση της μολυσματικότητας του παθογόνου καθώς σταματά την ταχεία αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή που στηρίζεται στην αναγνώριση πρωτεϊνών του βακτηριακού τοιχώματος.

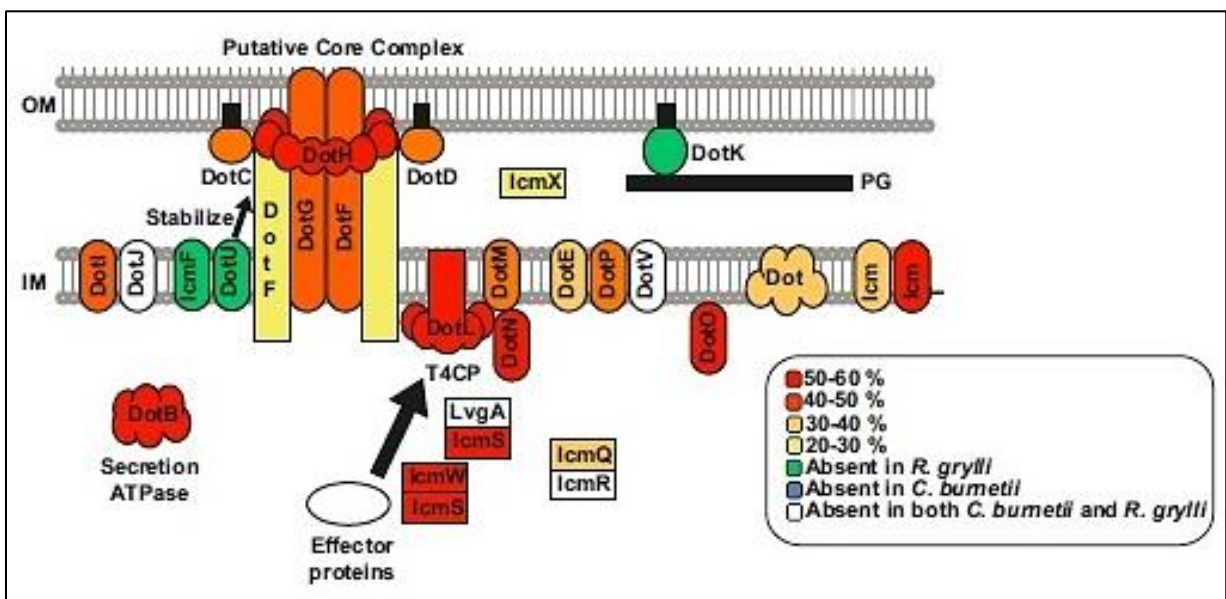
Η διάκριση μεταξύ των στελεχών Φάσης I και Φάσης II της *Coxiella* βασίστηκε σε μονοκλωνικά αντισώματα που ανιχνεύουν τον παράγοντα LPS ο οποίος όπως αναφέρθηκε αποτελεί σημαντικό λοιμογόνο παράγοντα του πυρετού Q. Αναλυτικότερα, μελέτες έδειξαν ότι η μολυσματικότητα της *Coxiella* επηρεάζεται από τη δομή του LPS γεγονός που προκαλεί και την αντιγονική αλλαγή στο παθογόνο (Hackstadt et al., 1985, Hackstadt, 1986; Moos και Hackstadt 1987; Vishwanath και Hackstadt, 1988). Πιο συγκεκριμένα, τα μολυσματικά στελέχη *C. burnetii* Φάσης I, φέρουν πλήρους μήκους λιποπολυσακχαρίτη (Shannon et al., 2005). Κατά την επαναλαμβανόμενη διέλευση της *Coxiella* σε ευκαρυωτικά κύτταρα αλλά και κατά τη διάρκεια καλλιέργειας της *Coxiella* σε αξενικό μέσο, ο λιποπολυσακχαρίτης του εξωτερικού τοιχώματος δεν συντίθεται πλήρως λόγω μη έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση του (Gürtler et al., 2014).

Ειδικότερα, το μη λοιμογόνο στέλεχος Φάσης II προέρχεται από αυθόρμητη διαγραφή 21 γονιδίων που εμπλέκονται στη βιογένεση του λιποπολυσακχαρίτη του μολυσματικού στελέχους Φάσης I. Η ελλιπής σύνθεση του πολυσακχαρίτη προκαλεί έκθεση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης της *Coxiella* στον ξενιστή γεγονός που οδηγεί σε αναγνώριση του παθογόνου από κύτταρα του ανοσοποιητικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μείωση της λοιμογόνου δράσης της *Coxiella* καθώς το παθογόνο μπορεί και καταστέλλεται από την άμυνα του οργανισμού. Τα στελέχη της *Coxiella* που χαρακτηρίζονται από απουσία του πλήρους μήκους λιποπολυσακχαρίτη αποτελούν τα βακτήρια Φάσης II τα οποία είναι λιγότερο μολυσματικά από τα αντίστοιχα της Φάσης I. Πιο συγκεκριμένα, η *Coxiella* της Φάσης II, εμφανίζει χαμηλή μολυσματικότητα σε ζωικά μοντέλα και ελάχιστη μολυσματικότητα στον άνθρωπο. Τα στελέχη της *Coxiella* Φάσης I και II δεν διακρίνονται μορφολογικά.

Ο λιποπολυσακχαρίτης έχει αποτελέσει επίκεντρο πολλών μελετών για σχεδιασμό εμβολίων (Peng et al., 2012). Παράλληλα, η γενετική βάση των διαφορετικών μορφών του LPS καθορίστηκε πρόσφατα (Beare et al., 2018), και εικάζεται ότι θα ανοίξει το δρόμο για τη βελτίωση του σχεδιασμού του εμβολίου για τον πυρετό Q.

1.3. Το εκκριτικό σύστημα Dot/Icm T4SS

Ο πιο κρίσιμος παράγοντας για τη παθογόνο δράση της *C. burnetii* είναι το εκκριτικό σύστημα Dot / Icm T4SS (McDonough et al., 2012). Το Dot/Icm σύστημα έκκρισης της *Coxiella* είναι μηχανισμός που σχετίζεται με τον αντίστοιχο μηχανισμό Dot/Icm που βρίσκεται στη *Legionella* sp. και τη *Rickettsia* sp. και εισάγει πρωτεΐνες-τελεστές στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Εκκριτικό σύστημα τύπου Dot/Icm T4SS σε *Coxiella burnetii* (από Backert και Grohmann, 2018).

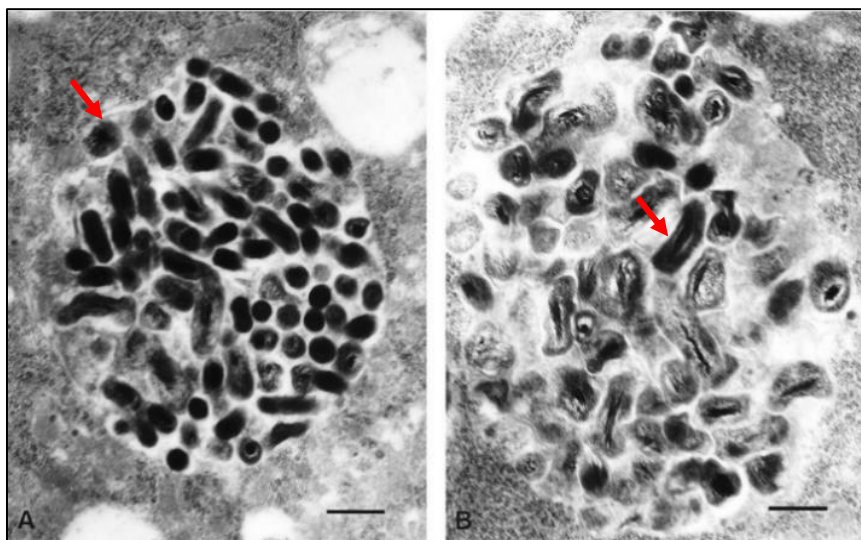
Το Dot/Icm T4SS στην *Coxiella* αποτελείται από 27 διαφορετικές πρωτεΐνες που δημιουργούν ένα σύστημα έκκρισης που σχετίζεται εξελικτικά με τα συζευκτικά πλασμίδια των βακτηρίων (Seshadri et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα, τα στοιχεία του εκκριτικού συστήματος που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-συνοδούς που μεταφέρουν πρωτεΐνες-τελεστές στο διάυλο (core) έκκρισης που σχηματίζεται από τις πρωτεΐνες DotF, DotG και DotH. Ο διάυλος έκκρισης του T4SS επιτρέπει στις πρωτεΐνες-

τελεστές να διέλθουν μέσω του περιπλάσματος και κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης της *C. burnetii* καταλήγοντας τελικά στον ξενιστή.

Την τελευταία δεκαετία έχουν βρεθεί πολλά νέα δεδομένα όσον αφορά στο εκκριτικό σύστημα T4SS και τη μολυσματικότητα της *Coxiella*. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός του κενοτοπίου αντιγραφής της *Coxiella* (βλ. παρακάτω) κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων *Coxiella* με τα μακροφάγα του ανοσοποιητικού, αλλά και η πρόληψη του κυτταρικού θανάτου του ξενιστή, ελέγχονται από τελεστές του T4SS (Qiu και Luo, 2017). Στελέχη *Coxiella* όπου το εκκριτικό τους σύστημα έχει μεταλλαχθεί, μελετώνται σε ζωικά μοντέλα προκειμένου να περιγραφούν έμφυτες αλλά και προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές του βακτηρίου. Όπως αναφέρουν οι μελέτες, η κανονική λειτουργία του T4SS είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του κενοτοπίου αντιγραφής υπογραμμίζοντας τη σπουδαιότητα του T4SS ως καθοριστικό παράγοντα μολυσματικότητα για τον πυρετό Q (Grohmann, et al., 2018).

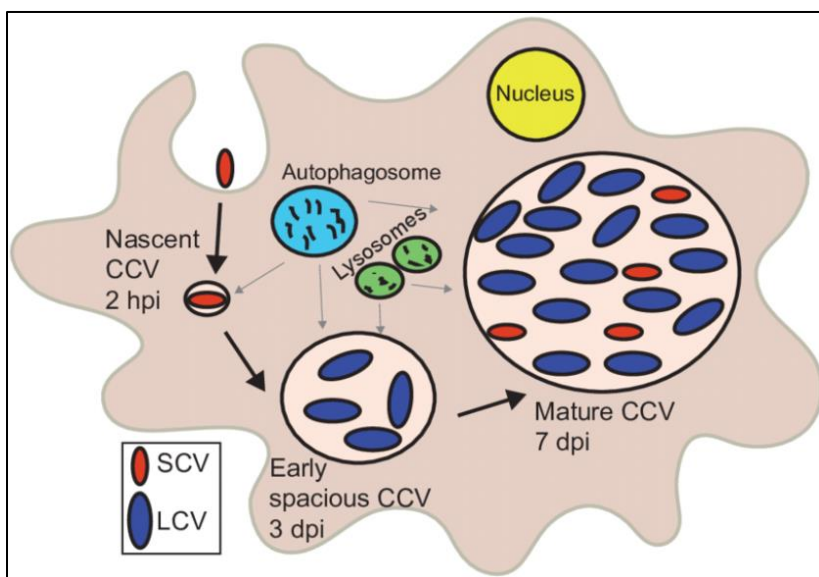
1.4. Βιογένεση του αναπαραγωγικού κενοτοπίου της *C. burnetii*

Όπως αναφέρθηκε, το εκκριτικό σύστημα T4SS είναι ζωτικής σημασίας για την παθογένεια της *Coxiella*. Πειράματα με μεταλλαγές σε *Dot/Icm* γονίδια έχουν δείξει ότι η απουσία του T4SS αποτρέπει το σχηματισμό όψιμων κενοτοπίων αντιγραφής της *Coxiella* (*Coxiella* Containing Vacuoles; CCVs) που συμβάλουν στον πολλαπλασιασμό του παθογόνου εντός του ξενιστή (Kohler και Roy, 2015) (Εικόνα 6). Τουλάχιστον 130 πρωτεΐνες έχουν προταθεί ως τελεστές του T4SS της *Coxiella* που συμβάλλουν στην επιτυχή μολυσματικότητα του παθογόνου εντός του ξενιστή.



Εικόνα 6: Τυπικό κενोटόπιο της *C.burnetii* σε κύτταρα J774A.1. Αριστερά βλέπουμε τα κύτταρα μολυσμένα με *C.burnetii* 2 ώρες μετά την μόλυνση ενώ δεξιά 6 ώρες μετά την μόλυνση. (από Howe και Mallavia, 2000).

Το CCV είναι ενδοκυτταρική δομή που φέρει στοιχεία λυσοσωμάτος και αυτοφαγοσωμάτιου ενώ κατά την ωρίμανσή του αποκτά προοδευτικά όξινο pH (Voth et al., 2007). Όπως παρατηρείται από την Εικόνα 7, η μεταφορά της μορφής SCV της *Coxiella* εντός του κυττάρου ξενιστή προκαλεί την προσκόλληση λυσοσωμάτων αλλά αυτοφαγοσωματίων πάνω στο μετέπειτα αναπαραγωγικό κενोटόπιο. Αυτό οδηγεί στην ωρίμανση και την όξυνση του CCV συμβάλλοντας σημαντικά στον επιτυχή πολλαπλασιασμό του παθογόνου εντός του ξενιστή.

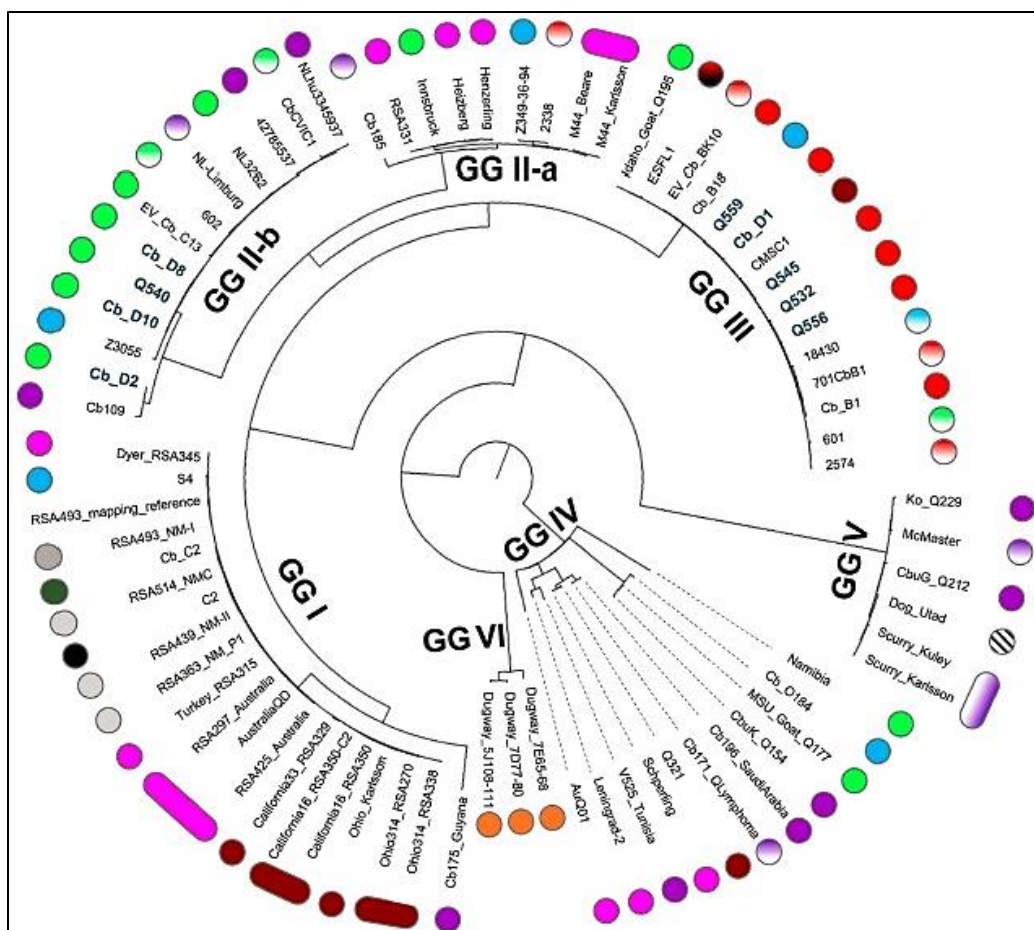


Εικόνα 7: Μηχανισμός βιογένεσης του αναπαραγωγικού κενωτοπίου CCV (από Millar, 2017).

Το βακτήριο αναπτύσσει στρατηγικές προκειμένου να προσαρμοστεί και να πολλαπλασιαστεί μέσα σε αυτό το εξαιρετικά ιδιαίτερο περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, η *Coxiella* κωδικοποιεί ένα σημαντικό αριθμό βασικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται πιθανώς στη ρύθμιση του όξινου περιβάλλοντος των CCVs βοηθώντας έτσι στον επιτυχή πολλαπλασιασμό του παθογόνου (Seshadri et al., 2003).

1.5. Γενωμικά Χαρακτηριστικά

Έχουν περιγραφεί πολυάριθμα στελέχη *C. burnetii* με χρωμοσωμικά γονιδιώματα που κυμαίνονται περίπου στις 2 εκατομμύρια βάσεις (Frazier et al., 1991; Seshadri et al., 2003). Εκτεταμένες μελέτες σύγκρισης των διαφορετικών γονιδιωμάτων επέτρεψαν την ομαδοποίηση των στελεχών *C. burnetii*, σύμφωνα με τη γενετική τους σύνθεση, σε 6 γονιδιωματικές ομάδες (I-VI) (Beare et al., 2006, 2009) (Εικόνα 8). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό ότι αυτές οι ομάδες χαρακτηρίζονται από αναδιατάξεις στο γονιδίωμα (μεταλλαγές είτε στο περιεχόμενο ή την διάταξη των γονιδίων) που επηρεάζουν ως επί το πλείστον τις πρωτεΐνες-τελεστές του εκκριτικού συστήματος T4SS (Larson et al., 2016).



Εικόνα 8: Ο διαχωρισμός της *C. burnetti* βάσει του γενωμικού της προφίλ (από Hemsley et al., 2019).

Γενικά, τα στελέχη της *C. burnetii* κωδικοποιούν γονίδια για τη βιοσύνθεση αμινοξέων, αλλά εμφανίζουν και αυξοτροφία (ανικανότητα σύνθεσης) σε κάποια από αυτά, συμπεριλαμβανομένης της κυστεΐνης. Σε αντίθεση με άλλα υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά βακτήρια, η παρουσία πολλών βιοσυνθετικών γονιδίων επιτρέπει στη *C. burnetii* να παράγει τα απαραίτητα μακρομόρια ξεχωριστά από το κύτταρο-ξενιστή. Το χαρακτηριστικό αυτό, μαζί με τις ιδιαίτερες συνθήκες πολλαπλασιασμού της *C. burnetii*, (π.χ. όξινο pH στο αναπαραγωγικό κενοτόπιο), επέτρεψε την ανάπτυξη ενός αξενικού μέσου καλλιέργειας, της όξινης κιτρικής κυστεΐνης, (acidified citrate cysteine medium; ACCM), η οποία χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ανάπτυξη της *C. burnetii* εκτός του ξενιστή (Omsland et al., 2009). Το αξενικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται και για τη βακτηριακή ανάπτυξη εκτός των κυττάρων-ξενιστών (Omsland et al., 2011, 2013), γεγονός που επέτρεψε την ανάπτυξη γενετικών χειρισμών, όπως

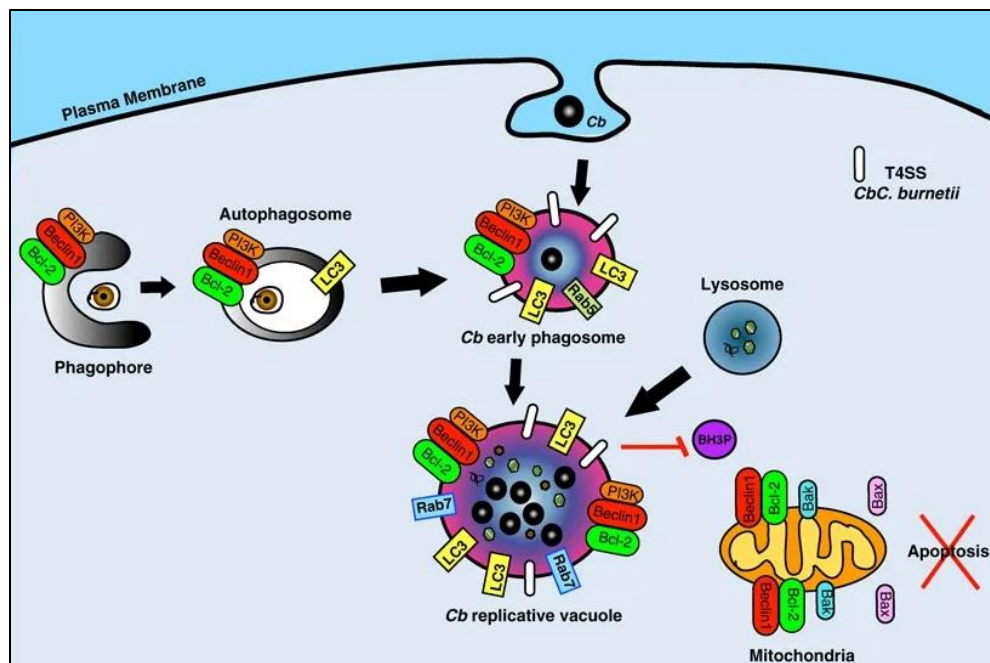
μεταλλαξιογένεση μεταθετών στοιχείων και απαλοιφές γονιδίων που συμβάλλουν στην κατανόηση της μολυσματικότητας του παθογόνου (Beare 2009, 2012).

Εκτός από χρωμοσωμικό DNA, όλα τα στελέχη *C. burnetii* που έχουν απομονωθεί διατηρούν πλασμίδια με αλληλουχίες μεταξύ 37.000 και 55.000 bp, ενώ ένας μικρός αριθμός στελεχών *C. burnetii* ενσωματώνουν πλασμιδιακά γονίδια στο χρωμόσωμα. Οι αλληλουχίες των πλασμιδίων ποικίλλουν μεταξύ των στελεχών. Στο σύνολο έχουν περιγραφεί τα εξής 5 πλασμίδια: QrH1, QrRS, QrDV, QrDG και ένα πλασμίδιο από το στέλεχος CBQY που έχει απομονωθεί στην Κίνα (Samuel et al., 1983, 1988; Λεπτάνικ et al., 1990; Frazier et al., 1991; Ning et al., 1992; Valkova και Kazar, 1995; Lautenschlager et al., 2000; Jager et al., 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι το περιεχόμενο του πλασμιδίου καθορίζει εάν το στέλεχος της *Coxiella* προκαλεί οξεία ή χρόνια ασθένεια (Samuel et al., 1985). Ωστόσο, η ανάλυση πολλών στελεχών *Coxiella* δείχνει ότι αυτή η διάκριση δεν είναι απόλυτη (Glazunova et al., 2005). Αν και πολλές εκκρινόμενες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται σε πλασμίδια, παρόλα αυτά τα εξωχρωμοσωμικά στοιχεία παραμένουν σε μεγάλο βαθμό μη χαρακτηρισμένα και ο ρόλος τους στη λοιμογόνο δράση δεν έχει αποδειχθεί.

Το γονιδίωμα της *Coxiella burnetii* Φάσης II (Φάση II, Nine Mile RSA439, Clone 4) αλληλουχήθηκε πρόσφατα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προκειμένου να γίνει καλύτερα κατανοητή η μοναδική βιολογία αυτού του ενδοκυττάριου παθογόνου (Millar et al., 2017). Παρόλο που ολόκληρο το γονιδίωμα της *Coxiella* Φάσης II έχει ταυτοποιηθεί, μελέτες χρησιμοποιούν ακόμη ως αναφορά το γονιδίωμα της Φάσης I. Ο λόγος έγκειται στο ότι οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των στελεχών *Coxiella burnetii* Φάσης I και Φάσης II φέρουν ελάχιστες και μικρές αλλαγές (κυρίως απουσία κάποιων ομόλογων γονιδίων αλλά και απουσία πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου-SNPs-) (Seshadri et al., 2003; Millar et al., 2017). Παρόλα αυτά, οι διαφοροποιήσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν περιστασιακά σε ασαφή αποτελέσματα καθώς μπορούν να δημιουργήσουν μεγάλες αλλαγές στο πρωτέωμα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πρωτεωμική ανάλυση που έγινε στη συγκεκριμένη μελέτη να ταυτοποιηθούν και ως προς το πλήρως αλληλουχημένο πρωτέωμα της Φάσης II.

1.6. Μηχανισμοί που ελέγχονται από την *Coxiella* για την αποφυγή του πρόωρου θανάτου του ξενιστή

Η *C. burnetii* αναπαράγεται με έναν παρατεταμένο μολυσματικό κύκλο εντός των ευκαρυωτικών κυττάρων που συχνά φτάνει τις 1-2 εβδομάδες. Αυτός ο παρατεταμένος κύκλος ανάπτυξης απαιτεί πρόληψη από την *Coxiella* ώστε να μην επέλθει κυτταρικός θάνατος του ξενιστή πριν ολοκληρωθεί επιτυχώς ο μολυσματικός κύκλος του βακτηρίου. Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα των κυττάρων ξενιστών, η *Coxiella* αποτρέπει αποτελεσματικά την ενδογενή και εξωγενή απόπτωση (Beare et al., 2011; Klingenberg et al., 2013; Macdonald et al., 2014; Cherla et al., 2018) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μονοπάτια που επάγονται από τη *Coxiella* για έλεγχο της αυτοφαγίας και της απόπτωσης του ξενιστή (από Vazquez και Colombo, 2010).

Μελέτες έδειξαν ότι η *C. burnetii* ανταγωνίζεται την ενδογενή απόπτωση και την επαγόμενη από την κυτοκίνη TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), εξωγενή απόπτωση των μακροφάγων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, το παθογόνο φαίνεται να αναστέλλει τη δράση της

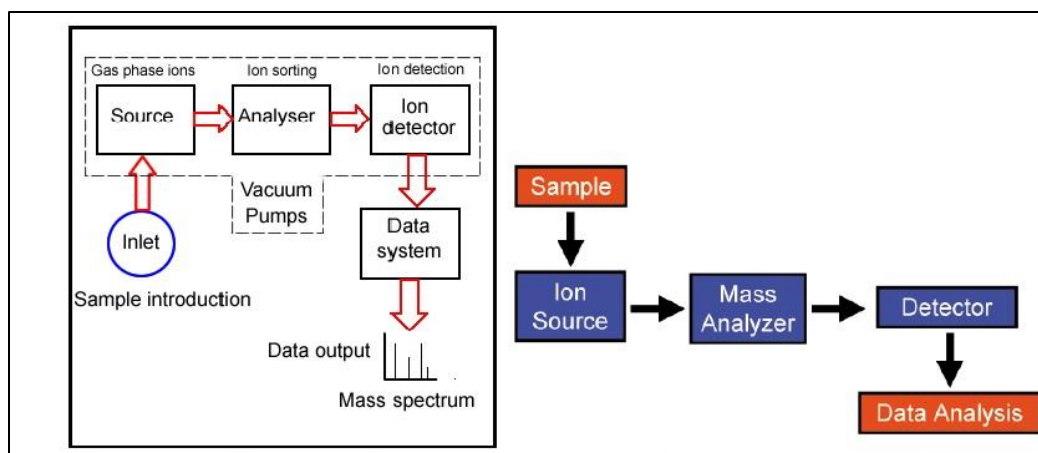
κασπάσης (πρωτεΐνης που σχετίζεται με την κυτταρική απόπτωση) (Luhmann και Roy, 2007), ενώ φαίνεται να προσλαμβάνει την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) στην κενοτοπική μεμβράνη. Επίσης η *C. burnetii* προάγει την επιβίωση του ξενιστή ενεργοποιώντας την κυτταρική σηματοδότηση του ξενιστή ενεργοποιώντας γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια (Voth και Heinzen, 2009; Macdonald et al., 2014; Cherla et al., 2018).

Αντίστοιχα, μελέτες έχουν δείξει ότι η *C. burnetii* αναστέλλει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου και ριζών υδροξυλίου κατά την προσβολή του παθογόνου (Panday et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, το μεταγραφικό προφίλ των μορφών SCV και LCV της *Coxiella* φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά όσον αφορά στο οξειδωτικό στρες. Γονίδια της SCV μορφής εμφανίζουν θετική ρύθμιση σε περοξειρεδοξίνες που σχετίζονται με την εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επίσης θετική ρύθμιση εμφανίζεται και σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αποτοξικοποίηση των ελευθέρων ριζών (Sandoz et al., 2016). Τα παραπάνω δείχνουν ότι η *C. burnetii* χρησιμοποιεί ένα εύρος πρωτεϊνών που πολεμούν το οξειδωτικό στρες αλλά και την απόπτωση και προωθούν την ενδοκυτταρική επιβίωση του κυττάρου μέσα στον ξενιστή.

1.7. Πρωτεωμική ανάλυση

Ως πρωτέωμα μπορεί να οριστεί η συνολική περιεκτικότητα πρωτεϊνών ενός κυττάρου σε σχέση με τον εντοπισμό, τις αλληλεπιδράσεις, και τις μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένο χρόνο και ερεθίσματα. Η πρωτεϊνωματική είναι μία από τις πιο σημαντικές μεθοδολογίες για την κατανόηση της γονιδιακής λειτουργίας (Lander et al., 2001). Σε αντίθεση με τις συμβατικές τεχνικές καθαρισμού και ανάλυσης πρωτεϊνών που βασίζονται σε χρωματογραφία συγγένειας ή στύπωμα Western, οι πρωτεωμικές αναλύσεις χρησιμοποιούν φασματομετρία μάζας (MS) και στοχεύουν στην ανάλυση σύνθετων πρωτεϊνικών δειγμάτων με υψηλότερη ευαισθησία (Yates, 2011).

Η φασματομετρία μάζας (MS) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του λόγου μάζας προς το φορτίο (m/z) και είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών ή πεπτιδίων. Η συνολική διαδικασία περιλαμβάνει τρία βήματα (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Διάγραμμα και λειτουργία οργανολογίας ενός τυπικού φασματογράφου μάζας (από Kang, 2012).

Αρχικά, τα μόρια πρέπει να μετασηματιστούν σε ιόντα αέριας φάσης πράγμα που αποτελεί πρόκληση για τα βιομόρια σε υγρή ή στερεή φάση. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει το διαχωρισμό των ιόντων με βάση τον λόγο μάζας/φορτίου με την χρήση ηλεκτρικών ή μαγνητικών πεδίων σε ένα διαμέρισμα γνωστό ως αναλυτής μάζας. Τέλος, μετράται η συγκεκριμένη τιμή m/z για τα διαχωρισμένα ιόντα. Η συνήθης μέθοδος ιονισμού περιλαμβάνει απόπτωση με laser υποβοηθούμενη από υπόστρωμα (MALDI), επιφανειακή ενισχυμένη εκρόφηση/ιονισμό λέιζερ (SELDI) και ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI) (Yates ,2011).

Ο βασικός στόχος ενός πρωτεϊνωματικού πειράματος είναι να χαρακτηρίσει ολόκληρο το σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα συγκεκριμένο σύστημα ή να κάνει ποσοτική ανάλυση στο δεδομένο πρωτέωμα (Gillet et al., 2016). Η ποσοτική ανάλυση σε κλίμακα πρωτεώματος πραγματοποιείται με ισοτοπική σήμανση πρωτεϊνών-δειγμάτων ή πεπτιδίων (SILAC) και ισοβαρικές ετικέτες για σχετική και απόλυτη ποσοτικοποίηση (iTRAQ) (Ong et al., 2002, Wiese et al., 2007), (label-based ποσοτικοποίηση). Μια άλλη προσέγγιση είναι η ανάλυση χωρίς σήμανση (label-free ποσοτικοποίηση) ολόκληρου το αναγνωρίσιμου πρωτεώματος (Silva et al., 2006, Vildhede et al., 2015). Σε μεθόδους απαλλαγμένες από σημάσεις (label-free), η κανονικοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιεί είτε: α) πληροφορίες που εξαρτώνται από την απόκτηση δεδομένων (Data Dependent Acquisition) και βασίζονται σε πρόδρομα σήματα (MS1), όπου τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου είναι προκατειλημμένα προς την επιλογή πεπτιδίων με το ισχυρότερο σήμα για θραύση, είτε β) ανεξάρτητες πληροφορίες για την απόκτηση

δεδομένων (Data Independent Acquisition) και βασίζονται σε φασματικές μετρήσεις ιόντων θραυσμάτων (MS2) (Ishihama et al., 2005). Αυτό είναι αντίστοιχο της προσέγγισης των συνολικών πρωτεϊνών (Total Protein Approach) (Wisniewski et al., 2014; Wisniewski et al., 2012) και καταλήγει σε πλήρη καταγραφή όλων των MS2 σαρώσεων και υψηλής αποτύπωσης, (Huang et al., 2015).

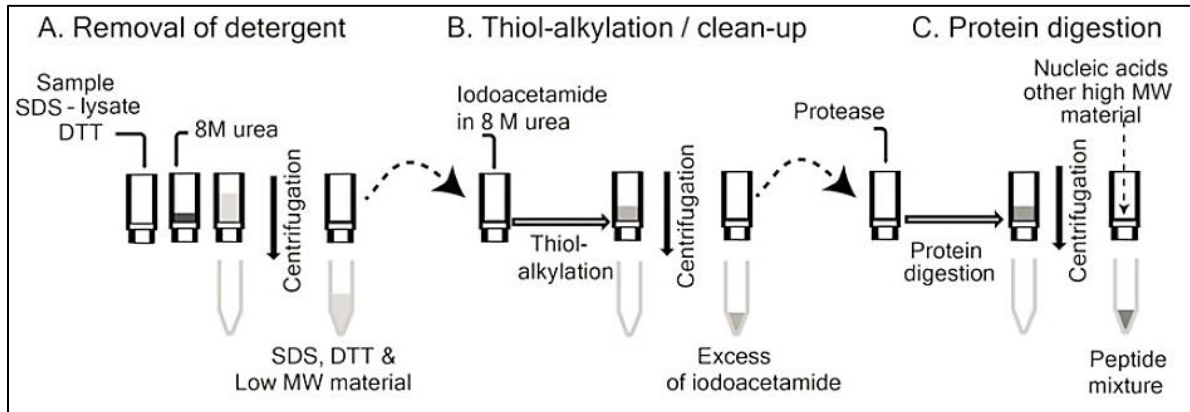
Η μέθοδος DIA-TPA χωρίς ετικέτα, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, επιτρέπει την εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των πρωτεϊνών (Wong και Cagney, 2010) χωρίς τη χρήση προτύπων (π.χ. αλβουμίνη ορού βοδινού (BSA) σε γνωστές συγκεντρώσεις) όπως ισχύει σε άλλες μεθόδους πρωτεωμικής ανάλυσης (Silva et al., 2006). Επίσης, χρησιμοποιεί τη συνολική ένταση πεπτιδικών κορυφών που ανήκουν σε συγκεκριμένη πρωτεΐνη σε σχέση με τη συνολική ένταση όλων των ποσοτικοποιήσιμων πεπτιδίων στο αναλυθέν πρωτέωμα (Wisniewski et al., 2012). Βασίζεται στην υπόθεση ότι, η αναλογία του σήματος MS μίας πρωτεΐνης με εκείνη όλων των πρωτεϊνών εντός ενός δείγματος αντανακλά την αφθονία της πρωτεΐνης στο δείγμα (Wisniewski et al., 2017). Η ποσότητα της πρωτεΐνης i υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Protein}(i) = \frac{\text{MS signal}(i)}{\text{Total MS signal}} \text{Total amount of protein}$$

1.8. Πρωτεϊνική εκχύλιση με την μέθοδο FASP

Η πρωτεϊνική εκχύλιση και η παραγωγή υψηλής απόδοσης πεπτιδίων από βιολογικά δείγματα αποτελούν την προϋπόθεση για επιτυχή πρωτεϊνωματική ανάλυση. Μία νέα προσέγγιση για τη πέψη πρωτεϊνών σε φίλτρα περιστροφής χρησιμοποιώντας δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) ως αποδιατακτικό και ως αποτελεσματικό αδρανοποιητή πρωτεασών περιγράφηκε από τους Manza et al., 2005, αλλά η μέθοδος δεν έγινε δημοφιλής πριν παρουσιαστεί ως FASP (Filter-Aided Sample Preparation), που ενσωματώνει ουρία για την επιτυχή αφαίρεση του απορρυπαντικού SDS (Wisniewski et al. 2009).

Η προετοιμασία του δείγματος με τη βοήθεια φίλτρου (FASP) είναι δημοφιλής λόγω της σχετικής απλότητας και της ικανότητάς του να χαρακτηρίζει περισσότερο το πρωτέωμα (Εικόνα 11). Δυστυχώς, η απώλεια πρωτεΐνης στο φίλτρο και η περιστασιακή βλάβη του φίλτρου μπορεί ακόμα να επηρεάσουν την αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων (Hernandez-Valladares et al., 2016).



Εικόνα 11: Προετοιμασία του δείγματος. α) απομάκρυνση του απορρυπαντικού β) αλκυλίωση και καθαρισμός πρωτεΐνης γ) πρωτεϊνική πέψη και απομόνωση πεπτιδίων (Becher, 2018).

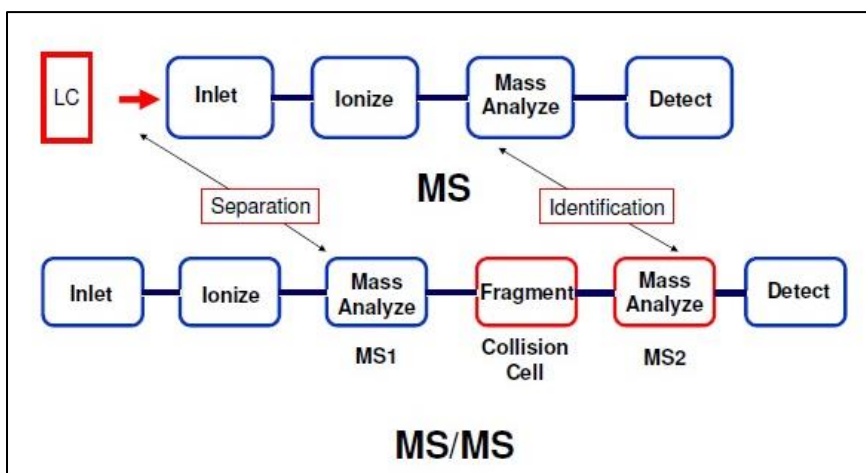
Οι πρωτεΐνες στη μονάδα φίλτρου αλκυλιώνονται στο ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας με ιωδοακεταμίδιο και στη συνέχεια μετατρέπονται σε ρυθμιστικό διττανθρακικού αμμωνίου (AmBic) για ενζυματική πέψη. Τα πεπτίδια έκλυσης μπορούν στη συνέχεια να αναλυθούν με MS χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ή μπορούν να κλασματοποιηθούν με χρωματογραφία μικρής κλίμακας χρησιμοποιώντας ανταλλαγή ανιόντων για να αυξηθεί η πρωτεϊνωματική κάλυψη (Rappsilber et al., 2003; Wisniewski et al., 2009).

1.9. Ιονισμός με την μέθοδο LC-MS/MS

Η υγρή χρωματογραφία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ενός δείγματος στα μεμονωμένα μέρη του. Η LC-MS/MS συνδυάζει τις φυσικές ιδιότητες

διαχωρισμού της HPLC, με την υψηλή αναλυτική ευαισθησία, την εξειδίκευση, και την ακρίβεια της φασματομετρικής ανίχνευσης μάζας.

Μετά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, τα μόρια ιονίζονται χρησιμοποιώντας μια πηγή ενέργειας. Τα ιονισμένα μόρια περνούν μέσω ενός συνόλου μαγνητών, το οποίο διαχωρίζει περαιτέρω τα μόρια με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο. Ο μαγνητικός διαχωρισμός παρέχει την επιλεκτικότητα της μεθοδολογίας, ώστε μόρια που ιονίζονται συγχρόνως αλλά έχουν διαφορετικές μάζες να μπορούν να ανιχνευθούν ανεξάρτητα. Παρομοίως, μόρια που ιονίζονται συγχρόνως και έχουν διαφορετικές μάζες αλλά και διαφορετικά φορτία να μπορούν να ανιχνευθούν πάλι ανεξάρτητα μέσω του MS. Περαιτέρω εξειδίκευση μπορεί να επιτευχθεί όταν συμβαίνουν πολλαπλά γεγονότα ιονισμού. Στην περίπτωση αυτή, η δεύτερη διαδικασία ιονισμού θραύει τα μόρια σε τεμάχια που φέρουν τη δική τους αναλογία μάζας προς φορτίο. Κάθε αρχικό μόριο θραύεται με ένα συγκεκριμένο τρόπο έτσι ώστε ακόμα και αν έχουν την ίδια αναλογία μάζας προς φορτίο μπορούν και διαφοροποιούνται. Η μέθοδος διπλού ιονισμού ονομάζεται MS / MS και χαρακτηρίζεται ως μέθοδος υψηλής αναλυτικής ευαισθησίας η οποία παρέχει μεγάλη αναλυτική ευελιξία όταν πραγματοποιείται μαζί με υγρό χρωματογραφικό διαχωρισμό (LC) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: MS vs MS/MS
(http://www.statelab.ie/Eurachem_images/)

Σκοπός της εργασίας

Αν και τα ζωικά μοντέλα παρέχουν ουσιαστικές πληροφορίες σχετικά με την απόκριση του ξενιστή στην *Coxiella*, διάφορα συστήματα λοίμωξης *ex vivo* έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου που εμφανίζονται σε ιστολογικό και κυτταρικό επίπεδο κατά τη διάρκεια του πυρετού Q. Διάφορες κυτταρικές σειρές έχουν αποδειχθεί αξιόπιστα συστήματα για το χαρακτηρισμό της δράσης της *C. burnetii* από κύτταρα-ξενιστές θηλαστικών. Η *Coxiella* μπορεί να αναπαραχθεί *in vitro*, στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους ανεξάρτητα από το είδος ή την προέλευση των ιστών (Voth et al., 2007). Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, τροφοβλάστες, μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα από ποντίκια, ινδικά χοιρίδια, πίθηκο και πρωτεύοντα. Αυτές οι κυτταρικές σειρές έχουν αποδειχθεί ζωτικής σημασίας για τη μοντελοποίηση αποκρίσεων κυττάρων ξενιστών σε λοίμωξη επιτρέποντας τον χαρακτηρισμό του σχηματισμού των αναπαραγωγικών κενотоπίων της *C. burnetii* (Dragan et al., 2019; van Schaik et al., 2013).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου *C. burnetii* Nine Mile (RSA 439) Φάσης II σε κυτταρικές σειρές HeLa (καρκινική σειρά κυττάρων), VERO (επιθηλιακά κύτταρα νεφρού), MRC-5 (ινοβλάστες πνεύμονα) καθώς και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας, προκειμένου να απομονωθεί το πρωτέωμα του παθογόνου σε διαφορετικές μέρες μετά τη μόλυνση. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος T4SS με κατάλληλα πρωτόκολλα απομόνωσης σε κύτταρα VERO καθώς και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας. Τέλος, έγινε υπερέκφραση της υπομονάδας DotC και DotD του εκκριτικού συστήματος χρησιμοποιώντας δεκτικά κύτταρα *E. coli* προκειμένου να γίνει απομόνωση, χαρακτηρισμός και αποσαφήνιση της δομής των DotC και DotD με φασματομετρία μάζας και κρυσταλλογραφία.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Κυτταρικές σειρές

2.1.1. Απόψυξη κυτταρικών σειρών

Γίνεται μεταφορά των κυττάρων από τους -80°C σε υδατόλουτρο (37°C) και εν συνεχεία σε 15 mL Falcon που περιέχει θρεπτικό. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1200 στροφές (rpm) σε φυγόκεντρο Hettich Universal 32R για απομάκρυνση DMSO. Στην συνέχεια, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων. Έπειτα προσθέτουμε κατάλληλο θρεπτικό αναλόγως την κυτταρική σειρά (βλ. παρακάτω), γίνεται πιπετάρισμα και μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα 25cm^2 . Τέλος, επωάζουμε τα κύτταρα στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 στον επωαστήρα.

2.1.2. Αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη και ανακαλλιέργεια

PBS	K36 Buffer
137 mM NaCl	15.5 mM NaCl
2.7 mM KCl	100 mM KCl
10 mM Na_2HPO_4	33.5 mM K_2HPO_4
1.8 mM KH_2PO_4	16.5 mM KH_2PO_4

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις διαλυμάτων.

Αφαίρούμε το θρεπτικό με πιπέτα Pasteur (aspiration) υπό φλόγα. Γίνεται έκπλυση των κυττάρων 2 φορές με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ή με ρυθμιστικό διάλυμα K36 buffer (πίνακας 1). Η ποσότητα ρυθμιστικού που προστίθεται για την έκπλυση καλύπτει την επιφάνεια της φλάσκας. Στην συνέχεια, απομακρύνουμε το PBS ή K36 με πιπέτα Pasteur (aspiration) υπό φλόγα και προσθέτουμε θρυψίνη (Gibco™ trypsin-EDTA 0.05%) για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια. Για 25cc φλάσκα χρησιμοποιείται 500μL θρυψίνη ενώ για 75cc χρησιμοποιείται 1mL θρυψίνη (trypsin-EDTA 0.05%).

Γίνεται επώαση των κυττάρων για 5 λεπτά στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 στον επωαστήρα. Κατά την διάρκεια της επώασης τα κύτταρα παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί το ποσοστό των κυττάρων που έχουν αποσπαστεί από την

επιφάνεια. Στην συνέχεια προσθέτουμε θρεπτικό για απενεργοποίηση της θρυψίνης. Σημαντικό είναι το καλό πιπετάρισμα για να σπάσουν τα συσσωματώματα μεταξύ των κυττάρων. Έπειτα, μεταφέρουμε τα κύτταρα σε 15mL Falcon και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά σε φυγόκεντρο Hettich Universal 32R σε 789 x g για να απομακρυνθεί η θρυψίνη. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 50μL του υπερκειμένου. Προσθέτουμε θρεπτικό στο Falcon και πιπετάρουμε. Τέλος, μεταφέρουμε σε φιάσκα 75cc και επωάζουμε τα κύτταρα στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ στον επωαστήρα.

2.1.3. Πάγωμα κυτταρικών σειρών

Το πάγωμα των κυτταρικών σειρών γίνεται σε «θρεπτικό παγώματος» (freezing medium) το οποίο περιέχει διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide; DMSO) το οποίο προστατεύει τα κύτταρα από το θάνατο κατά την διαδικασία του παγώματος. Το DMSO παρέχει κρυοπροστασία όμως είναι παράλληλα και τοξικό για τα κύτταρα σε καλλιέργεια. Για αυτό το λόγο απομακρύνεται από το θρεπτικό με φυγοκέντρηση όταν ξεπαγώνουν.

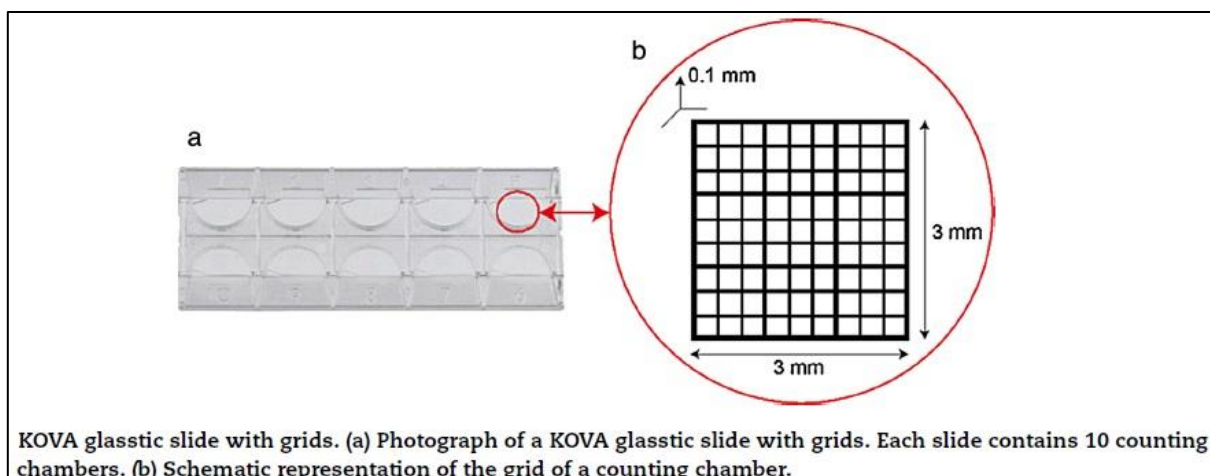
Τα κύτταρα αφού μετρηθούν μεταφέρονται σε ειδικά tubes (cryovials). Συνήθως 2.5x10⁶ κύτταρα ανά vial σε 1 mL θρεπτικού. Προσθέτουμε ίσο όγκο freezing medium στάγδην στα κύτταρα μέσα στο cryovial. Τα cryovials τοποθετούνται σε ειδικό κουτί που στην βάση του περιέχει ισοπροπανόλη. Η ισοπροπανόλη βοηθά στην ομαλή πτώση της θερμοκρασίας (1°C/λεπτά). Τέλος, μεταφέρουμε στους -80° C.

2x Freezing medium:

- 60% θρεπτικό υλικό της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς
- 20% FBS
- 20% DMSO

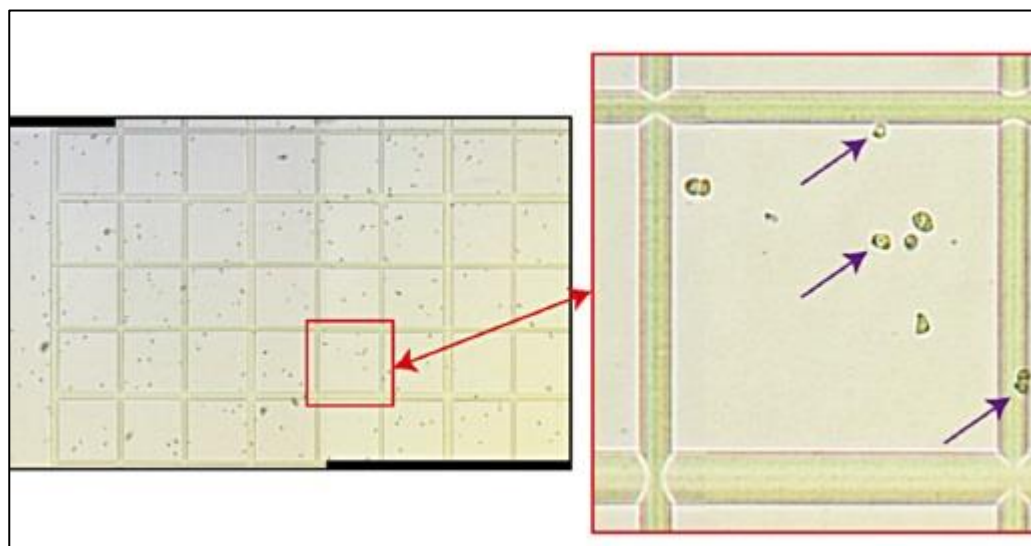
2.1.4. Μέτρηση κυττάρων με την χρήση κυτταρομετρητών

Για την μέτρηση των κυττάρων ξενιστών χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρητής συγκεκριμένων διαστάσεων (KOVA™ Glasstic™ Slide 10 with Grids, Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Ειδικός κυτταρομετρητής (από Piccininia et al., 2014).

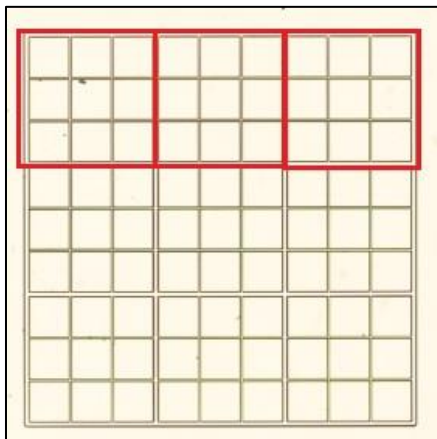
Η διαδικασία καταμέτρησης γίνεται ως εξής : 180 μL trypan-blue ($\text{C}_3\text{H}_24\text{N}_6\text{Na}_4\text{O}_{14}\text{S}_4$, Gibco™ Trypan Blue Solution, 0.4%), αναμιγνύονται με 20 μL δείγματος από την καλλιέργεια. Στην υποδοχή του κυτταρομετρητή τοποθετούνται 10 μL του μίγματος μας και καταμετρώνται τα κύτταρα εντός των τετραγώνων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Αναλυτικότερη απεικόνιση του κυτταρομετρητή (από Piccininia et al., 2014).

Η ποσοτικοποίηση των κυττάρων γίνεται υπολογίζοντας το μέσο όρος του αριθμού των κυττάρων στα 3 τετράγωνα της οριζόντιας σειράς του μεγάλου τετραγώνου (Εικόνα 15). Ο μέσος

όρος κυττάρων που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης ($\times 10$), και τον παράγοντα 10^4 σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευή. Το τελικό αποτέλεσμα ανάγει τον αριθμό των κυττάρων σε 1mL καλλιέργειας.



Εικόνα 15: Απεικόνιση της επιφάνειας που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των κυττάρων (από Piccininia et al., 2014).

2.2. Καλλιέργεια του βακτηρίου *Coxiella burnetii* Φάσης II

2.2.1. Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii* σε κύτταρα VERO

Το στέλεχος αναφοράς *Coxiella burnetii* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι το Nine Mile RSA 493 Φάσης II (αρχική απομόνωση από κρότωνα) και ανήκει στη βακτηριακή συλλογή του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Μια από τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των βακτηρίων *Coxiella burnetii* Nine Mile RSA 493 φάσης II, είναι η προσκολλώμενη σειρά VERO (νεφρικοί ινοβλάστες από τον πράσινο αφρικανικό πίθηκο (CCL-81; ATCC)), η οποία καλλιεργήθηκε σε φλάσκες (25,75 και 175 cc Nunclon ή Corning) με 5, 10 και 40mL αντίστοιχα με θρεπτικό μέσο Leptáimum Essential Medium Eagle (MEM; Gibco Laboratories), συμπληρωμένο με 10% ορού από έμβρυο μόσχου [fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories)

και 1% γλουταμίνης (L-glutaλεπτάε Gibco Laboratories). Η καλλιέργεια έγινε στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Για την μεταφορά των κυττάρων σε νέο θρεπτικό και για τη αποκόλληση τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απόξεσης με scraper αφού προηγουμένως έγιναν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα K36.

Ενιαίοι κυτταρικοί τάπητες VERO ενοφθαλμίστηκαν με *Coxiella burnetii* Nine Mile, Φάσης II σε 10mL MEM (4% FBS, 1% L-glutaλεπτάε), και επώαστηκαν για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 10mL θρεπτικού και οι μολυσμένες καλλιέργειες επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Μετά τις πρώτες 24 ώρες οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν στους 35°C απουσία CO₂, όπου παρέμειναν μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο μόλυνσης (90-95%). Η πορεία της μόλυνσης των κυττάρων ελέγχθηκε με οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και με ανοσοφθορισμό και χρώση Gimenez όσον αφορά στο βακτηριακό φορτίο. Μολυσμένα και μη κύτταρα VERO φυλάσσονται σε 20% MEM, 72% FBS, 8% DMSO στους -80°C.

Επανακαλλιέργεια των φυλάξεων γίνεται σε MEM (15% FBS, 1% L-glutaλεπτάε), αφού πρώτα απομακρυνθεί το τοξικό για τα κύτταρα DMSO. Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας, απομόνωσης και χειρισμού ζωντανών βακτηρίων *Coxiella burnetii* μέχρι και την απενεργοποίηση της επιβάλλεται να γίνονται σε θάλαμο κάθετης ροής τύπου 2, μέσα σε εργαστήριο αρνητικής πίεσης επιπέδου βιο-ασφάλειας 3 (Bio-Safety Level 3; BSL-3), λαμβάνοντας όλα τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας όπως ορίζονται από τα διεθνή μέτρα.

2.2.2. Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii* σε κύτταρα HeLa

Η κυτταρική σειρά HeLa (ATCC® CCL-2™) είναι ανθρώπινη προσκολλώμενη καρκινική σειρά που προέρχεται από αδενοκαρκίνωμα τραχήλου της μήτρας. Για τη σειρά αυτή, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο Λεπτάimum Essential Medium Eagle (MEM; Gibco Laboratories) συμπληρωμένο με 10% ορού από έμβρυο μόσχου [fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories) στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

Μολυσμένα και μη κύτταρα HeLa, φυλάσσονται σε 80% Complete Medium, 15% FBS και 5% DMSO στους -80°C. Ο χειρισμός, η ανακαλλιέργεια η μόλυνση κυττάρων HeLa με *Coxiella burnetii*, πραγματοποιείται όπως στα κύτταρα.

2.2.3. Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii* σε κύτταρα MRC-5

Η προσκολλώμενη κυτταρική σειρά MRC-5 προέρχεται από ανθρώπινους ινοβλάστες του πνεύμονα (ATCC® CCL-171™). Για την καλλιέργεια των MRC-5 χρησιμοποιήσαμε το θρεπτικό μέσο DMEM (Glutamax- 4,5g/L D-Glycose) και 10% ορού από έμβρυο μόσχου (FBS). Για την αποκόλληση ή τη φύλαξη των κυττάρων MRC-5 χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη.

2.2.4. Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii* σε αξενικό θρεπτικό μέσο ACCM-D

Οι Omsland et al. (2009), ανέπτυξαν ένα θρεπτικό μέσο το οποίο μιμείται το κύτταρο ξενιστή (αξενικό μέσο) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό της *Coxiella burnetii* σε περιβάλλον με 2.5% O₂. Η ανάπτυξη του αξενικού μέσου (**Complex *Coxiella* Medium, CCM**) βασίστηκε στους Hackstadt και Williams (1981) οποίοι έδειξαν ότι σημαντική μεταβολική δραστηριότητα της *C. burnetii* εμφανίζεται μόνο σε ρυθμιστικά διαλύματα που μιμούνται συνθήκες μέτριας οξύτητας (pH 4-5) αντίστοιχες του κενοτοπίου της *Coxiella*.

Τα κύρια στοιχεία του CCM στα οποία στηρίχθηκαν οι Omsland et al., (2009) για τη δημιουργία του αξενικού είναι οι 3 πηγές θρεπτικών συστατικών (neoperptone, FBS και μέσο καλλιέργειας κυττάρων RPMI), η υψηλή συγκέντρωση χλωρίου (140 mM) και ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (pH 4,75) (Omsland et al., 2009). Το νέο μέσο ονομάστηκε **Medium Cysteine Acidified Citrate Citrate (ACCM)** και χρησιμοποιείται ευρέως ως αξενικό μέσο καλλιέργειας.

Ions	Final concentration ^{a, b}	Nutrients	Final concentration
Na ⁺	190	Neopeptone	0.1 mg/ml
SO ₄ ⁻	0.06	FBS	1%
Fe ₂ ⁺	0.01	RPMI 1640	1/8X
Cl ⁻	140	Citrate	29
Ca ⁺	0.15	Casamino acids	2.5 mg/ml
Mg ₂ ⁺	1.0	L-cysteine	1.5
K ⁺	4.3		
PO ₄ ⁻	4.5		
NO ₃ ⁻	0.1		
HCO ₃ ⁻	3.0		

^aConcentrations are in mM unless otherwise specified.
^bExcluding contribution from neopeptone and FBS.

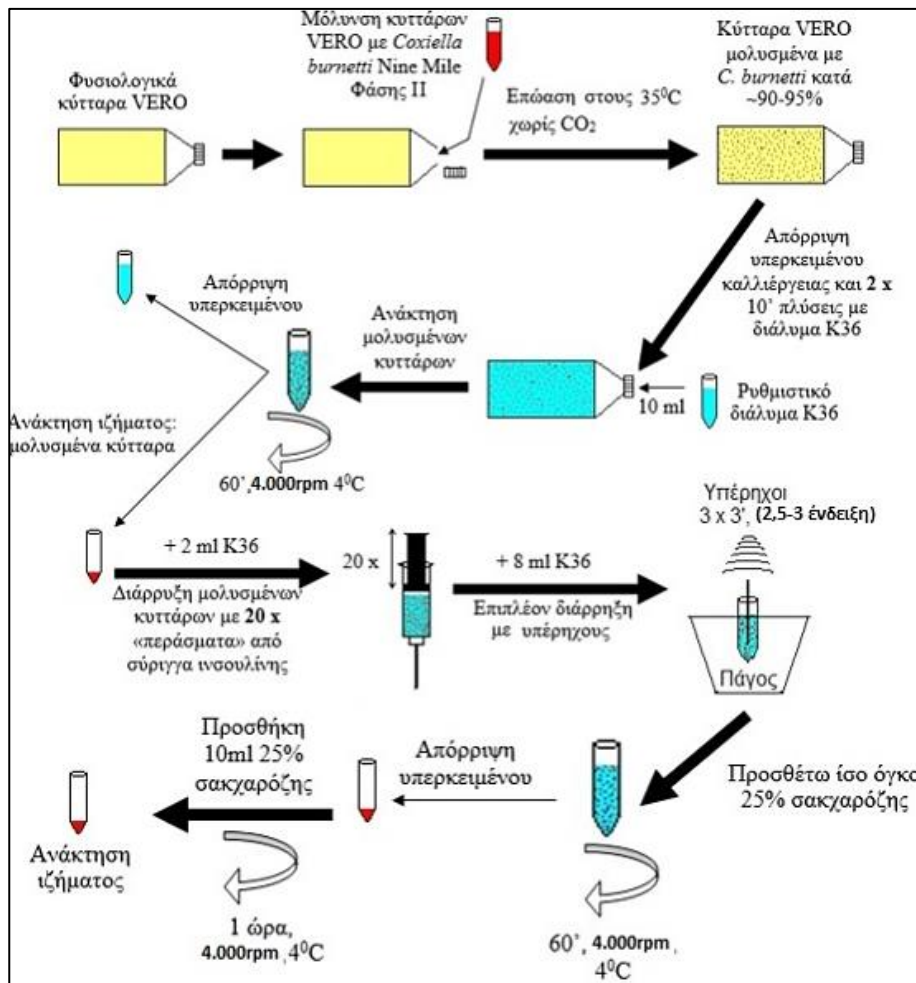
**Πίνακας 2: Συστατικά αξενικού μέσου καλλιέργειας ACCM.
(Omsland et al., 2009)**

Διαδικασία παρασκευή ACCM 1X στο εργαστήριο : Για τη δημιουργία διαλύματος 1X ACCM, πραγματοποιείται διάλυση σκόνης ACCM (Sunrise Science Products, φυλάσσεται στους 2-8°C) σε 1L απιονισμένο νερό με ανάδευση. Το pH ρυθμίζεται στο 4.75 με 6N NaOH και ακολουθείται αποστείρωση του διαλύματος με φιλτράρισμα (φίλτρο διαμέτρου 0.22 μm). Το θρεπτικό τοποθετείται σε φλάσκες (20mL σε 75 cm² φλάσκας), προστίθενται μολυσμένα κύτταρα που έχουν απομονωθεί από τις κυτταρικές σειρές και γίνεται επώαση στους 37°C με συνθήκες 2.5% O₂ και 5% CO₂. Η επώαση στον κλίβανο παραμένει αδιατάραχτη προκειμένου να διατηρηθεί σταθερό το ποσοστό του οξυγόνου και άρα ο πολλαπλασιασμός της *Coxiella*, απουσία ξενιστή. Επιτυχής επώαση και πληρότητα *Coxiella* παρατηρείται με αλλαγή της οπτικής πυκνότητας (θόλωμα) του αξενικού μέσου μέσα σε 7-9 ημέρες.

2.3. Αναλυτικές τεχνικές

2.3.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης *Coxiella burnetii* από κύτταρα VERO

Με την επιβεβαίωση της πληρότητας της μόλυνσης (είτε μικροσκοπικά με τη χαρακτηριστική “διόγκωση” των κυττάρων του ξενιστή, είτε με ανοσοφθορισμό ή χρώση Gimenez) πραγματοποιείται απομόνωση της *C. burnetii* από τον ξενιστή. Το πρωτόκολλο απομόνωσης *C. burnetii* από κύτταρα VERO φαίνεται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16. Πρωτόκολλο απομόνωσης *Coxiella* από κύτταρα VERO (τροποποίηση από Βρανάκης 2010).

Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής: Αρχικά αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο που φυλάσσεται στους -20°C ή στους -80°C. Το θρεπτικό περιέχει ελεύθερα βακτήρια τα οποία μετά από φυγοκέντρηση (1 ώρα, 2.630 x g στους 4 °C, και ανασύσταση σε 1

mL ρυθμιστικού K36), δίνει βακτηριακό φορτίο καθαρής *Coxiella* που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελλοντική μόλυνση κυττάρων ξενιστών.

Εν συνεχεία, οι φλάσκες ξεπλένονται με ρυθμιστικό K36 με προσοχή ώστε να μην ξεκολλήσουν τα κύτταρα (2-3 ξεπλύματα με ποσότητα ρυθμιστικού που καλύπτει την επιφάνεια της φλάσκας). Γίνεται αφαίρεση του ρυθμιστικού K36 και προσθήκη ελάχιστη ποσότητας καθαρού K36 για τη συλλογή των κύτταρα αφού προηγουμένως έχει μεσολαβήσει απόξεση με την χρήση scrapers. Συλλέγουμε τον τάπητα σε Falcon των 50mL και φυγοκεντρούμε για 1 ώρα 2.630 x g στους 4 °C. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 2mL ρυθμιστικού K36.

Γίνεται διάρρηξη των κυττάρων με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης (συνεχείς εισαγωγές/εξαγωγές (20 φορές), μέσα από βελόνα σύριγγας ινσουλίνης. Προσθέτουμε 8mL ρυθμιστικού K36 και περαιτέρω διάρρηξη των κυττάρων. Η διάσπαση των βακτηριακών συσσωματωμάτων γίνεται με υπέρηχους (Virtis Virsonic 475) (3x3λεπτά, ισχύς 25-30W). Τα δείγματα πρέπει να είναι βυθισμένα σε πάγο κατά την διάρκεια όλης της διαδικασίας. Ανάμεσα στους υπέρηχους μεσολαβεί 1 λεπτό διακοπής.

Έπειτα προσθέτουμε ίσο όγκο 25% σουκρόζης και ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 ώρα, 4.000 rpm στους 4°C. Συλλέγουμε και απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 10mL 25% σουκρόζης. Φυγοκεντρούμε για 1ώρα 2.630 x g στους 4°C. Τέλος, γίνεται ανάκτηση του ιζήματος το οποίο φυλάσσεται στους -80°C σε ~2 mL ρυθμιστικό K36 ή σε ~2 mL διάλυμα 25% σουκρόζης.

2.3.2. Πρωτόκολλο απομόνωσης Dot/Icm Τύπου IV εκκριτικού συστήματος

(τροποποίηση από Kubori et al., 2014)

Μετά την απομόνωση του βακτηρίου της *Coxiella* ακολουθούνται τα εξής βήματα για την απομόνωση του Dot/Icm T4SS εκκριτικού συστήματος:

Αρχικά γίνεται επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας των βακτηρίων στον πάγο με ανάδευση, με διάλυμα σουκρόζης (0.5M σουκρόζη και 150mM Tris/HCl, pH 8), παρουσία αναστολέων πρωτεασών.

Έπειτα γίνεται προσθήκη με ανάδευση των παρακάτω διαλυμάτων: αναστολέα πρωτεασών σερίνης, (phenylmethylsulfonyl fluoride; 1mM PMSF, 1mM EDTA, pH 8) και φρέσκου

διαλύματος λυσοζύμης (0.1 mg/mL). Ήπια ανάδευση για άλλα 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο βήμα αυτό επιτυγχάνεται η δημιουργία σφαιροπλαστών.

Στην συνέχεια προσθέτουμε στάγδην 20% Triton X-100 (τελική συγκέντρωση 1%) υπό ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές (~30 λεπτά). Σε αυτό το βήμα πραγματοποιείται λύση των βακτηριακών μεμβρανών. Είναι χαρακτηριστική η αλλαγή του χρώματος του διαλύματος καθώς και η πυκνότητα του.

Προσθέτουμε 3mM MgSO₄ , 5μg/mL DNase I και 10mM EDTA αλλάζοντας το pH σε 10 με τη χρήση 1N NaOH. Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά. Με αυτό το βήμα επιτυγχάνεται η αποσύνθεση του DNA. Επιπλέον, μεγάλα κυστίδια μεμβράνης και θραύσματα που υπάρχουν διασπώνται.

EDTA stock διάλυμα

- 0.5 M EDTA
- Ρυθμίζουμε το pH στο 8.0 με NaOH (αποστείρωση 121 °C για 20 λεπτά)

Διάλυμα Λυσοζύμης

- 20 mg/mL στο διάλυμα σουκρόζης (προετοιμασία πριν την χρήση)

PMSF stock διάλυμα

- 100 mM σε ισοπροπανόλη και φύλαξη στους -20 °C

MgSO₄ stock διάλυμα

- 1 M διάλυμα (αποστείρωση στους 121 °C για 20 λεπτά)

Η ακόλουθη διαδικασία γίνεται στους 4°C : Κάνουμε διαχωρισμό του προϊόντος της κυτταρολύσεως με φυγοκέντρωση (12.000 g στους 4°C για 20 λεπτά) για την απομάκρυνση των μη διασπασμένων κυττάρων.

Στην συνέχεια συλλογή του υπερκείμενου, το οποίο το υπερφυγοκεντρείται (100.000 g για 30 λεπτά στους 4°C) ώστε να κατακρημνισθούν τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου προστίθεται στο ίζημα διάλυμα TET (10mM Tris-Cl pH 8, 1mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1mM PMSF). Το ίζημα αφήνεται στους 4°C κατά την διάρκεια της νύχτας. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη 2-3 mL παγωμένου διαλύματος TET ώστε να

συλλεχθούν όλες οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του εναιωρήματος (14.000 x g για 15 λεπτά στους 4°C) ώστε να απομακρυνθεί το ίζημα. Κάνουμε υπερφυγοκέντρηση του υπερκλειμένου (100.000 x g για 30 λεπτά).

Τέλος, διαλυτοποιούμε το ίζημα μετά την υπερφυγοκέντρηση σε ~300μL TET. Στο στάδιο αυτό το ίζημα είναι έτοιμο για βιοχημική ανάλυση και παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.3.3. Πρωτόκολλο απομόνωσης Dot/Ism Τύπου IV εκκριτικού συστήματος

(τροποποίηση από Kubori et al., 2014)

Ωσμωτικό σοκ

Αρχικά, συγκεντρώνουμε την καλλιέργεια σε 1 mL διαλύματος και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στους 4 °C. Έπειτα κάνουμε απομάκρυνση του υπερκλειμένου και προσθέτουμε 40 mL διαλύματος 1 M σουκρόζης 150 mM Tris/HCl (pH 7.5) και 1 mM EDTA. Φυγοκεντρούμε (15.700 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου). Το υπερκλειμένο απομακρύνεται και αφήνουμε έναν μικρό όγκο από το παραπάνω buffer μέσα στο ίζημα μας (περίπου 40 μL). Το δείγμα παραμένει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται 40mL παγωμένου αποσταγμένου νερού. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex. Το δείγμα τοποθετείται και παραμένει στον πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 15 μg/mL DNase I και 10mM MgCl₂ και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Προστίθενται 20mM EDTA και 150mM TrisCl (pH 7.5) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (15.700g για 30λεπτά στους 4°C).

Τα ιζήματα πλένονται με 40mL παγωμένου διαλύματος TE (10mM Tris Cl pH 7.5 1 mM EDTA) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (15.700 x g για 30 λεπτά στους 4°C). Προσθήκη 2 mL διαλύματος TE. Ρύθμιση του pH σε 10.5 με NaOH. Τέλος, προσθέτουμε 100 μL Triton X-100 και 100 μL PMSF (20 mM) και επώαση για 30 -60 λεπτά στον πάγο υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15.700 x g για 60 λεπτά).

Διαβάθμιση σουκρόζης

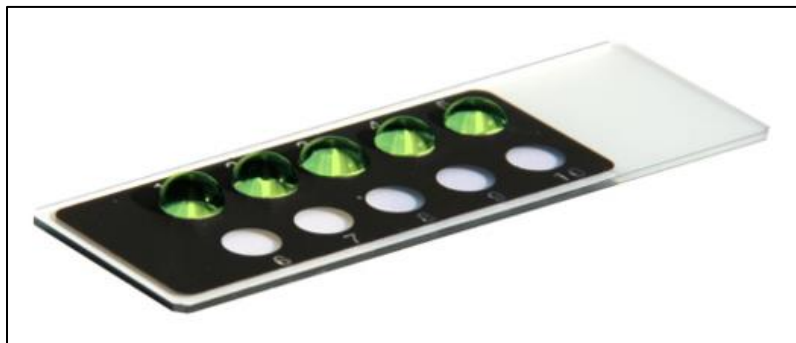
Δημιουργούνται δυο διαλύματα περιεκτικότητας 10% και 40% σουκρόζης σε διάλυμα TE. Από το κάθε διάλυμα σουκρόζης χρησιμοποιούνται 4.5mL στη συσκευή διαβάθμισης (τελικός

9mL: 4.5mL x 2). Προσθήκη 1 mL δείγματος πρωτεϊνών και στη συνέχεια ακολουθεί υπερφυγοκέντρηση (17 ώρες 34.000rpm) και συλλογή 10 κλασμάτων του 1 mL.

2.3.4. Ανοσοφθορισμός

Η τεχνική του άμεσου ανοσοφθορισμού εφαρμόστηκε για την ανίχνευση *C. burnetii* σε μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες.

Πειραματική διαδικασία : πλάκες μικροσκοπίου (multi-well slides, Εικόνα 17) καθαρίστηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης και τοποθετήθηκαν δείγματα από τάπητα κυττάρων. Τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν και μονιμοποιήθηκαν με εμβάπτιση για 10λεπτά σε παγωμένη ακετόνη. Σε κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν 10μL ορού αντισωμάτων (1:100 από δείγμα ασθενούς με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων στην *Coxiella*) και έγινε επώαση για 30λεπτά στους 37°C με υγρασία (προσθήκη νερού στον κλίβανο). Στο τέλος της επώασης έγιναν δυο πλύσεις για 10 λεπτά με PBS pH 7.2 και μια 10 λεπτά με dd H₂O. Οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν και εν συνεχεία σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 20μL anti-human IgG (5G vircell[®]) προσδεμένο με την φθορίζουσα ουσία FITC (fluorescein isothiocyanate), σε PBS ως αντί-αντίσωμα, και έγινε επώαση για 30 λεπτά στους 37°C με υγρασία. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν να στεγνώσουν πριν τη μικροσκοπική παρατήρηση. Στις αντικειμενοφόρους προστέθηκε γλυκερόλη και τα δείγματα εξετάστηκαν με μικροσκόπιο (x100).



Εικόνα 17: πλάκα multi-well (<https://www.immuno-cell.com/wp-content/uploads/printed-slides.jpg>).

2.3.5. Χρώση Gimenez

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, παρόλη την ομοιότητα στο τοίχωμα με τα κατά Gram αρνητικά, η ταυτοποίηση της *Coxiella* γίνεται με χρώση Gimenez (βασική ουσία χρώσης η φουξίνη), και όχι χρώση κατά Gram (Gimenez, 1964).

Με τη μέθοδο αυτή στελέχη της οικογένειας των *Rickettsiales* αλλά και η *Coxiella* βάφονται με βασική φουξίνη [1% (w/v), 1.125% (w/v) φαινόλη και 10% (v/v) αιθανόλη σε d.d.H₂O] ενώ το κύτταρο ξενιστής χρωματίζεται με πράσινο του μαλαχίτη [0.8% (w/v) οξαλικού μαλαχίτη σε d.d.H₂O]. Το δείγμα μονιμοποιείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τρία σύντομα περάσματα από φλόγα, αφού προηγουμένως έχει στεγνώσει. Το διάλυμα φουξίνης αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα (0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M NaHPO₄) σε αναλογία 2:5, και στη συνέχεια φιλτράρεται. Η επιφάνεια της πλάκας που φέρει το δείγμα καλύπτεται με το διάλυμα της βασικής φουξίνης και αφήνεται για 3 λεπτά με ήπια ανάδευση. Η πλάκα ξεπλένεται με νερό και καλύπτεται για 10 δευτερόλεπτα με το διάλυμα του πράσινου του μαλαχίτη. Η πλάκα ξεπλένεται ξανά με νερό και γίνεται επανάληψη του τελευταίου βήματος. Μετά το στέγνωμα, η αντικειμενοφόρος είναι έτοιμη για παρατήρηση.

Διαλύματα :

Διάλυμα Α : 10 g βασικής φουξίνης σε 100 mL 95% αιθανόλη

Διάλυμα Β : 11.25 g φαινόλης σε 250 mL απεσταγμένο H₂O

Ανάμειξη των 2 διαλυμάτων σε 650 mL απεσταγμένο H₂O

Πράσινο του Μαλαχίτη : 2 g malachite green oxalate σε 250 mL diH₂O

Ρυθμιστικό διάλυμα : 3.5 mL 0.2M NaH₂PO₄ , 15.5 mL 0.2 M NaHPO₄, 19 mL dH₂O

2.3.6. Παρασκευή υγρού και στερεού θρεπτικού υλικού LB (Luria Broth) για καλλιέργεια

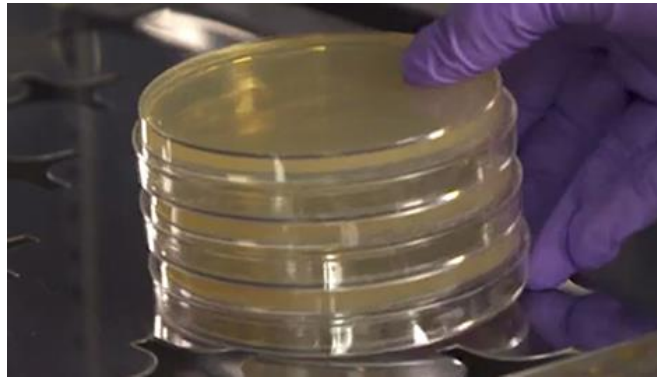
E.coli

Στερεό θρεπτικό LA (Luria Agar) 1Lt

- 10 g Τρυπτόνη
- 10 g NaCl
- 5 g Εκχύλισμα μαγιάς

- 15 g Άγαρ (για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου)
- Ρύθμιση του pH στο 7

Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο, στους 120°C. Σε 100mL από το αποστειρωμένο LB προστίθεται άγαρ και Carbenicillin, (αντιβιοτικό) σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL (1:1000). Το θρεπτικό αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται στα τρυβλία petri (~25mL) τα οποία αφήνονται να στερεοποιηθούν σε θερμοκρασία δωματίου. Τα τρυβλία φυλάσσονται στους 4°C (Εικόνα 18).



Εικόνα 18 : Τρυβλία petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB.

Υγρό θρεπτικό LB (Luria Broth) 1Lt

- 16g Τρυπτόνη
- 5g NaCl
- 10g Εκχύλισμα μαγιάς
- Ρύθμιση του pH στο 7. Ακολουθεί αποστείρωση σε κλίβανο, στους 120°C (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο LB

2.3.7. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* C43(DE3)

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε κατάλληλα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα έγινε με την μέθοδο του θερμικού σοκ. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην βαθμιαία διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Η υψηλή θερμοκρασία δημιουργεί πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίοι επιτρέπουν στο ξένο DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Στη συνέχεια, η μείωση της θερμοκρασίας οδηγεί στην επαναφορά του κυτταρικού τοιχώματος, κλείνοντας τους πόρους που έχουν δημιουργηθεί (Guisbert et al., 2008).

Υλικά για το μετασχηματισμό

- Δεκτικά κύτταρα *E.coli* C43(DE3)
- Πλασμίδιο pTTQ18C3 που φέρει κλωνοποιημένη την πρωτεΐνη DotC
- SOC θρεπτικό μέσο
- Τρυβλίο στερεής καλλιέργειας LB με 50 µg/mL αντιβιοτικού

50µL κυττάρων *E.coli* C43(DE3) μεταφέρονται στον πάγο. Για τον μετασχηματισμό, προστίθενται 0.5µL πλασμιδιακού DNA και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για 1.5 λεπτό στους 42 °C και ξανά στον πάγο για 10 λεπτά. Προστίθεται 1mL SOC μέσου και τα κύτταρα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση (220rpm). Έπειτα, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται για 3 λεπτά στις 5.000 στροφές.

Μετά τη φυγοκέντρηση απομακρύνεται σχεδόν όλο το υπερκείμενο (παραμένουν ~80µL) και γίνεται επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα απλώνονται σε τρυβλίο με το στερεό θρεπτικό που περιέχει αντιβιοτικό. Γίνεται ολονύκτια επώαση στους 37 °C. Τα κύτταρα που έχουν λάβει το πλασμίδιο, θα επιβιώσουν καθώς φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας σε carbenicillin.

2.3.8. Καλλιέργεια *E.coli* C43(DE3)

Χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι υγρών καλλιεργειών για τον πολλαπλασιασμό των μετασχηματισμένων βακτηρίων *E.coli* C43(DE3) : α) Μικρού όγκου (100mL) για να δοκιμάσουμε

την έκφραση της πρωτεΐνης, και β) μεγαλύτερου όγκου (2L) για την υπερέκφραση της επιθυμητής πρωτεΐνης.

Γίνεται προκαλλιέργεια με ασηπτική μεταφορά (με την χρήση φλόγας) 3mL θρεπτικού μέσου σε αποστειρωμένα falcon των 15mL ή των 50mL. Έπειτα γίνεται προσθήκη του αντιβιοτικού σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL (το οποίο παραμένει στον πάγο καθ'όλη την διάρκεια του πειράματος). Γίνεται εμβάπτιση των ανασυνδυασμένων κυττάρων στο Falcon και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση (220rpm).

Για την υπερέκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται καλλιέργειες μεγαλύτερου όγκου (1lt, 2lt κλπ.) στις οποίες έχει προστεθεί το αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 50μg/mL και γίνεται προσθήκη της προκαλλιέργειας (Εικόνα 23). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37 °C υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα (O.D.) σε μήκος κύματος 600nm είναι ~0.5 (εκθετική φάση ανάπτυξης των βακτηρίων).

Ο ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης (IPTG) είναι ισχυρός επαγωγέας της έκφρασης της β-γαλακτοζιτάσης και είναι χρήσιμος ως εργαλείο για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης (Ebbing και Gammon, 2002). Δημιουργείται stock 1M διαλύματος του επαγωγέα IPTG (με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό) και φύλαξη στους -20 °C. Η επαγωγή λαμβάνει μέρος όταν η απορρόφηση της καλλιέργειας στα 600nm είναι 0.5. Η τελική συγκέντρωση του επαγωγέα είναι 0.02mM-1mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση (ο χρόνος επώασης για το πείραμα είναι 2 και 4 ώρες, και οι συγκεντρώσεις του επαγωγέα ήταν 0.5mM και 1mM).

Μετά την επαγωγή τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 6.500 στροφές (AvantiJ-26XP Beckman) στους 4°C. Το ίζημα συλλέγεται σε αποστειρωμένα Falcon των 50mL, ζυγίζεται και φυλάσσεται στους -20°C.

2.3.9. Απομόνωση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης

Υλικά για τη λύση των κυττάρων

- HEPES (1M, pH 7.5)
- EDTA (0.5M)
- Αναστολέας πρωτεασών (PMSF 200mM)

- NaCl 1M
- DNAase

Ρυθμιστικό Δ/μα λύσης

- 20mM HEPES
- 1mM EDTA
- 300mM NaCl

Γίνεται ξεπάγωμα των κυττάρων από τους -20°C σε υδατόλουτρο 37°C. Προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα λύσης σε όγκο ίσο με το βπλάσιο της μάζας των κυττάρων. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται στο διάλυμα λύσης και γίνεται προσθήκη 1mM PMSF και DNAase. Η διάσπαση των κυττάρων έγινε με French press το οποίο ασκεί πίεση 10-20 τόνων στο δείγμα το οποίο, εκτονώνεται στη μέσω μια οπής. Ως αποτέλεσμα, η αλλαγή της υψηλής πίεσης "σπάει" τα τοιχώματα των κυττάρων, και επιτυγχάνουμε την θραύση (French και Milner, 1955). Το δείγμα (40mL) εισάγεται στην κοιλότητα του μηχανήματος και ένα έμβολο κινείται μέσω υδραυλικής αντλίας, που έχει ως αποτέλεσμα την μηχανική σύνθλιψη των κυττάρων. Γίνεται φυγοκέντρηση 12.000 rpm (GA-20 Beckman), 50 λεπτά στους 4 °C προκειμένου να διαχωριστούν τα κύτταρα που έχουν υποστεί θραύση (υπερκείμενο), από τα κύτταρα που παρέμειναν άσπαστα (ίζημα). Το υπερκείμενο που περιέχει τα θραυσματοποιημένα κύτταρα, υφίσταται υπερφυγοκέντρηση 34.000 rpm (TFT 5035 Sorvall) (1 ώρα στους 4 °C ώστε να συλλεχθούν μέσω του ιζήματος. Στην συνέχεια το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και φυλάσσεται στους -80°C. Φυλάσσεται δείγμα από το υπερκείμενο αλλά και το ίζημα για τη μέτρηση της συγκέντρωση των πρωτεϊνών των οποίων θα ελεγχθεί η έκφραση.

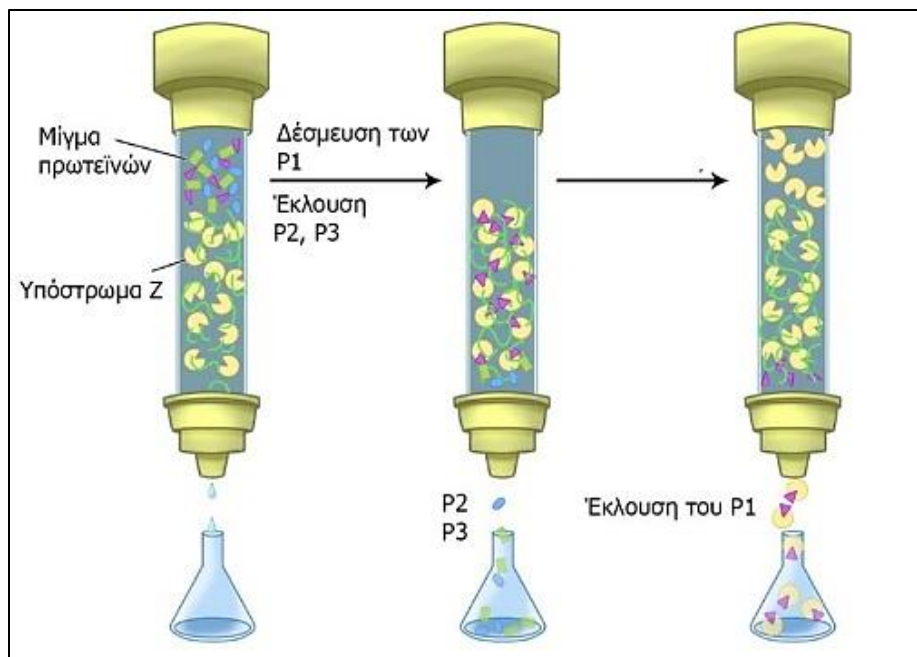
Υλικά για τη διαλυτοποίηση των μεμβρανών

- 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5
- Αναστολέας πρωτεασών PMSF, 200mM
- 0.5mg/mL αβιδίνη για τις πρωτεΐνες που φέρουν strep-tag

Στις μεμβράνες που συλλέχθηκαν μετράται η πρωτεϊνική συγκέντρωση με την μέθοδο Bradford, και γίνεται διαλυτοποίηση με την χρήση απορρυπαντικού DDM 10% σε αναλογία 1:2.5 (ένα μέρος πρωτεΐνης προς 2.5 μέρη DDM). Οι μεμβράνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο από τους -80 ° C για να ξεπαγώσουν. Το DDM και το διάλυμα λύσης προστίθενται σε τελικό όγκο ώστε η τελική πρωτεϊνική συγκέντρωση να είναι ίση με 5-10mg/mL. Τα δείγματα αναδεύονται 1 ώρα σε στους 4° C και έπειτα υπερφυγοκεντρούνται για μια ώρα σε 34.000rpm (TFT 5035 Sorvall), ώστε να διαχωριστούν οι διαλυτοποιημένες μεμβράνες από τις μη διαλυτοποιημένες. Ακολουθεί φιλτράρισμα των διαλυτοποιημένων μεμβρανών με φίλτρο διαμέτρου 0.2μm και χρωματογραφία συγγένειας για την απομόνωση της πρωτεΐνης.

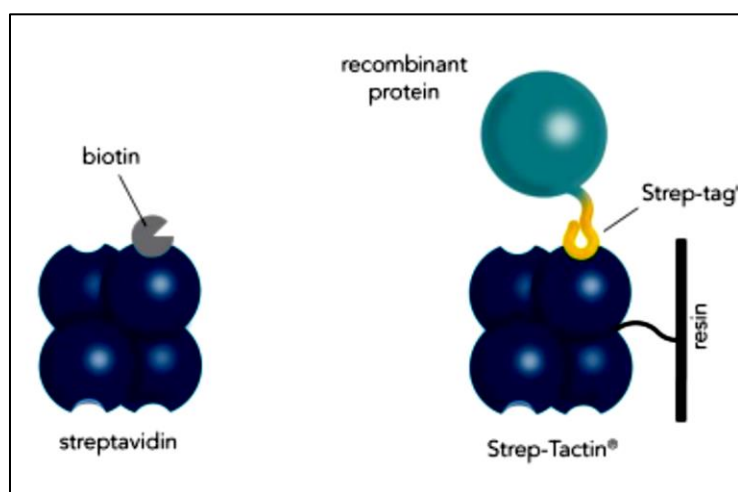
2.3.10. Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας είναι μια μέθοδος, η οποία χρησιμοποιεί την ιδιότητα ορισμένων πρωτεϊνών, να έχουν χημική συγγένεια έναντι ειδικών χημικών ομάδων. Οι χημικές ομάδες αποτελούν το υλικό της στήλης (στατική φάση), ενώ η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (κινητή φάση), δεσμεύεται σταθερά στο υλικό της στήλης με αποτέλεσμα άλλες ενώσεις και βιομόρια που συνυπάρχουν στο διάλυμα να μένουν ελεύθερα και να απομακρύνονται. Η μέθοδος περιλαμβάνει : α) την πρόσδεση της πρωτεΐνης στην στατική φάση, β) την έκπλυση των μη προσδεμένων μορίων, και γ) την έκλυση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Γενική αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας συγγένειας. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική αλληλεπίδραση της στατικής φάσης με την υπό την προσδιορισμό ουσία. Η επιθυμητή πρωτεΐνη δεσμεύεται στην στήλη στο υλικό υποστρώματος-προσδέτη. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες εκλύονται χωρίς να δεσμεύονται στο υπόστρωμα. (Πουλάς και Σιδηρές 2015).

Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που φέρει το strep-tag, κατακρατείται από τα μόρια της στρεπταβιδίνης (στατική φάση), και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαχωριστεί.



Εικόνα 21. Strep-tag πάνω στο οποίο προσδέεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος στη στρεπταβιδίνη (https://www.iba-lifesciences.com/isotope/2/2-1002-001-Manual_Strep-Tactin-Purification.pdf)

Υλικά

- NaCl 1 M
- HEPES 1 M pH 8
- EDTA 0.5 M pH 8
- Desthiobiotin (Mr: 214,26)
- DDM 10%
- HABA (2- [4'-hydroxy-benzeneazo] benzoic acid)
- Tris, 0.1 M
- Στήλη συγγένειας Strep-Tactin column (IBA)

Διαλύματα

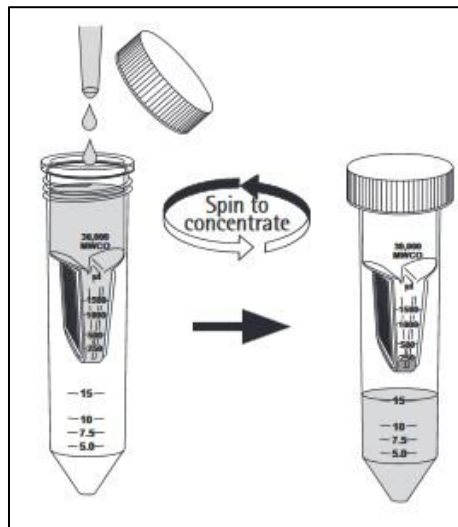
- **Διάλυμα έκπλυσης (Wash Buffer)**
 - 150 mM NaCl
 - 20 mM HEPES, pH 8
 - 1 mM EDTA, pH 8
 - 0.05% DDM
- **Διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer)**
 - Wash Buffer
 - 5mM disthiobiotin
- **Διάλυμα αναγέννησης (Regeneration Buffer)**
 - 100 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - 1 mM EDTA
 - 2 mM HABA

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C. Για μεγάλες πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις διαλυτοποιημένων μεμβρανών χρησιμοποιείται στήλη όγκου 6mL, ενώ για μικρότερες συγκεντρώσεις, στήλη όγκου 3mL. Στην διαδικασία χρωματογραφίας συγγένειας με στήλη στρεπτακτίνης πραγματοποιούνται τα παρακάτω βήματα :

- 1) Πλύση της στήλης με 30-40mL diH₂O
- 2) Εξισορρόπηση με 2 όγκους στήλης διαλύματος έκπλυσης (wash buffer)
- 3) Προσθήκη του πρωτεϊνικού μας διαλύματος στη στήλη και συλλογή του δείγματος.
- 4) Πλύση με 5 όγκους στήλης με διάλυμα έκπλυσης (wash buffer)
- 5) Έκλουση με 6 x 0.5 όγκους στήλης
- 6) Αναγέννηση στήλης με 10x0.5 όγκους στήλης με διάλυμα αναγέννησης (regeneration buffer).
- 7) Πλύση με διάλυμα Tris, 100mM ώστε να απομακρυνθεί διάλυμα αναγέννησης
- 8) Πλύση με 30-50mL diH₂O.
- 9) Φύλαξη της στήλης στους 4°C

2.3.11. Συμπύκνωση πρωτεϊνών με Amicon

Το προϊόν έκλουσης της χρωματογραφίας συγγένειας τοποθετείται στο συλλέκτη Amicon. Η χωρητικότητα του συλλέκτη είναι 10-12mL. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 6.000 rpm (GA-20 Beckman) για 10 λεπτά τη φορά, ώστε ο όγκος του διαλύματος να μειωθεί στα 500μL. Στην συνέχεια το συμπυκνωμένο πρωτεϊνικό διάλυμα τοποθετείται σε Eppendorf και η φύλαξη γίνεται στους -20 °C (Εικόνα 22).



Εικόνα 22: Διαδικασία συμπύκνωσης του διαλύματος έκλουσης μετά από την χρωματογραφία συγγένειας.

(<https://images-na.ssl-images-amazon.com/images/I/71A8g+u8BrL.pdf>)

2.3.12. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA)

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα προστίθεται 10% τριχλωρικού οξέος (100% w/v) και αφήνεται κατά την διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Την επόμενη ημέρα ακολουθεί φυγοκέντρηση 11.500g για 10 λεπτά. Στην συνέχεια ακολουθούν 3 πλύσεις με 100% παγωμένη ακετόνη (ίσος όγκος ακετόνης με το δείγμα) και γίνεται φυγοκέντρηση στις 11.500g για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται μετά από κάθε πλύση και στο τέλος το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει. Για την επαναδιαλυτοποίηση χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα επάξεται σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά πριν την ηλεκτροφόρηση.

2.3.13. Απομόνωση πρωτεϊνών περιπλάσματος

Η ποσότητα των κυττάρων που έχει συλλεχθεί υπό μορφή ιζήματος, διαλύεται με αναλογία 1:10 (10mL διαλύματος/g ιζήματος) στο ρυθμιστικό ώσμωσης. Το μίγμα ομογενοποιείται και αναδεύεται κάθε 5 λεπτά για ένα διάστημα 30 λεπτών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 6.000g για 10 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση το περίπλασμα του κυττάρου συλλέγεται στο υπερκείμενο.

Ρυθμιστικό διάλυμα ώσμωσης

- 0.5M Σουκρόζη
- 1mM EDTA
- 50mM Trizma Base (pH 8)

2.3.14. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο Bradford

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ολικής πρωτεΐνης γίνεται με την φασματοσκοπική μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή είναι χρωματομετρική και στηρίζεται σε αλλαγή στην απορρόφηση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250. Η κόκκινη χρωστική μετατρέπεται σε μπλε με την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη, έτσι η ποσότητα του συμπλόκου που είναι παρούσα στο διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέτρο της συγκέντρωσης της ολικής

πρωτεΐνης με χρήση φωτόμετρου. Η οπτική απορρόφηση του συμπλόκου μετρείται σε μήκος κύματος 595nm.

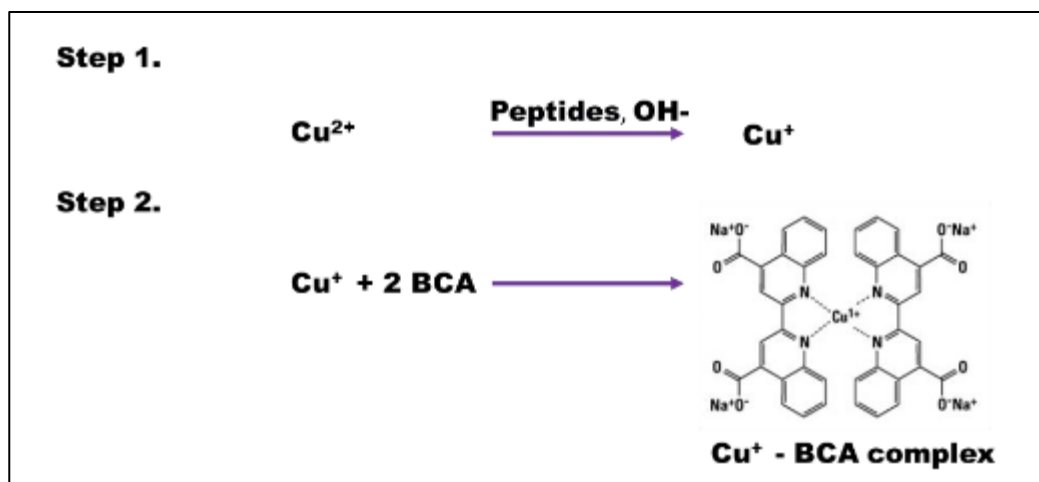
Υλικά για τη μέθοδο Bradford

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

Ο τελικός όγκος των δειγμάτων είναι 1 mL. Για το τυφλό προστίθενται 100μL ρυθμιστικού και 900μL δ/τος Bradford. Οι μεμβράνες και το υπερκείμενο αποτελούν τα άγνωστα δείγματα στα οποία γίνονται δυο διαδοχικές αραιώσεις (1:20 και 1:40) ενώ προσθέτουμε 5μL-10μL πρωτεΐνης. Συμπληρώνεται ρυθμιστικό διάλυμα ως τα 100μL και προστίθενται 900μL του διαλύματος Bradford. Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται περίπου 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, μετρούνται οι απορροφήσεις των δειγμάτων της άγνωστης πρωτεΐνης συγκέντρωσης στα 595nm. Πριν τη μέτρηση πραγματοποιείται μέτρηση με τη χρήση του τυφλού δείγματος.

2.3.15. Μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο δικινχονικού οξέος (Bicinchoninic acid assay, BCA)

Η μέθοδος BCA (Smith et al., 1985) συνδέει την αντίδραση διουρίας με την χρωματομετρική ανίχνευση του μονοσθενούς ιόντος χαλκού από το δικινχονικό οξύ (bicinchoninic acid; BCA). Μετά την αναγωγή του δισθενούς ιόντος χαλκού, ο μονοσθενής χαλκός (Cu^+) αντιδρά με το BCA και το πορφυρό προϊόν που προκύπτει σχηματίζεται με τη χηλίωση δύο μορίων του BCA με ένα ιόν χαλκού (Εικόνα 23). Σε αυξημένες θερμοκρασίες (37°C), ο πεπτιδικός δεσμός είναι υπεύθυνος για την ανάπτυξη χρώματος.



Εικόνα 23: Οι αντιδράσεις πάνω στις οποίες βασίζεται η BCA μέθοδος (Smith et al., 1985).

Τα δείγματα προετοιμάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως αυτόν που αναφέρθηκε για την μέθοδο Bradford και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C. Η απορρόφηση γίνεται σε μήκος κύματος 562nm. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών των αγνώστων δειγμάτων υπολογίζεται με την χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Υλικά για τη μέτρηση πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με την μέθοδο BCA

- Δικιγχονινικό οξύ (BCA)
- Θειικός χαλκός (CuSO₄)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (300mM NaCl, 20mM HEPES, 1mM EDTA)

2.3.16. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου SDS-PAGE

Η μέθοδος βασίζεται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών βάσει του μοριακού τους βάρους. Οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται μέσω θερμότητας μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (LeammLi, 1970). Οι πρωτεΐνες πλέον δεν έχουν δευτεροταγή, τριτοταγή ή τεταρτογενή δομή. Οι προκύπτουσες πρωτεΐνες παίρνουν σχήμα ράβδου και ένα ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο το οποίο είναι αναλογικό του μοριακού τους βάρους (LeammLi, 1970).

Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες κινούνται προς τον θετικό πόλο. Οι μικρότερες πρωτεΐνες κινούνται πιο γρήγορα, και εν τέλει διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους. Το μέγεθος των πόρων της πηκτής εξαρτάται από την αναλογία συγκεντρώσεων μεταξύ ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου. Για την αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου ετοιμάζεται πρώτα το πήκτωμα διαχωρισμού. Για δύο πηκτές διαχωρισμού 10% σε πολυακρυλαμίδιο (τελικός όγκος 20 mL) αναμιγνύονται με την ακόλουθη σειρά τα παρακάτω υλικά:

Resolving Gel (10%)

- 7.9 mL ddH₂O
- 6.7 mL διάλυμα ακρυλαμιδίου/bis 30%
- 5 mL Tris Base 1.5 M (pH 8.8)
- 200 μL SDS 10%
- 192 μL ammonium persulfate 10%
- 8 μL TEMED

Το ακρυλαμίδιο είναι τοξικό μέχρι να πολυμεριστεί. Το ammonium persulfate (APS- υπερθειικό αμμώνιο) φτιάχνεται εκ νέου. Τόσο το TEMED όσο και το APS είναι καταλύτες πολυμερισμού και με την προσθήκη τους στο μίγμα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της πηκτής. Το μίγμα τοποθετείται κάθετα μέχρι συγκεκριμένο ύψος και από πάνω προστίθεται περίπου 1 mL ddH₂O για ισοστάθμισμα. Αφήνεται να πολυμεριστεί περίπου 30 λεπτά μέχρι να πήξει. Το diH₂O αφαιρείται μετά τον πολυμερισμό (Εικόνα 24).

Για δύο πηκτώματα επιστοίβασης 4% σε πολυακρυλαμίδιο (τελικός όγκος 6 mL), αναμιγνύονται τα ακόλουθα υλικά:

Stacking Gel

- 4.2 mL ddH₂O
- 1 mL μείγμα ακρυλαμιδίου 30%

- 760 μ L Tris Base 1M (pH 6,8)
- 60 μ L SDS 10%
- 60 μ L ammonium persulfate 10%
- 6 μ L TEMED

Το μίγμα τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού που έχει ήδη πήξει και ταυτόχρονα προστίθενται το χτενάκι 15mm για να σχηματιστούν οι θέσεις που θα φορτωθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται 30 λεπτά μέχρι να πήξει.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τους -80°C αφήνονται να ξεπαγώσουν σε πάγο. Η κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης υπολογίζεται με βάση την οπτική απορρόφηση και την πρότυπη καμπύλη BSA. Για 20 μg πρωτεΐνης ο όγκος που θα φορτωθεί σε μL είναι $2 \cdot 20 / a$, όπου a είναι τα μg της πρωτεΐνης που έχουν υπολογιστεί για 2 μL πρωτεΐνης σύμφωνα με την εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη BSA. Για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται διάλυμα 3xSDS και β -μερκαπτοαιθανόλης η οποία προστίθεται για να συντελέσει στη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών στα μόρια των πρωτεϊνών και τελικά να καταλήξουν στην γραμμική μορφή τους με αρνητικό φορτίο λόγω του SDS. Η ποσότητα β -μερκαπτοαιθανόλης που χρησιμοποιείται είναι 15% στο διάλυμα 3xSDS. Η ολική ποσότητα του μίγματος αυτού που θα προστεθεί στην πρωτεΐνη είναι η μισή από την ποσότητα της πρωτεΐνης που θα φορτωθεί. Αναλυτικότερα τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

1. Προσθήκη μίγματος 3x sample buffer (12% SDS, 6% β -μερκαπτοαιθανόλη, 10% γλυκερόλη, 0.05% serva blue, 150mM Tris-Cl pH7) στα δείγματα πρωτεΐνης σε απαγωγό.
2. Vortex στα δείγματα πρωτεϊνών.
3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε 100°C στο Heating Block για 10 λεπτά.
4. Στιγμαία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm στους 4°C (φυγόκεντρος Hettich Universal 32R)

Τα δείγματα πρωτεϊνών κατά την διαδικασία παραμένουν σε πάγο. Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης running buffer:

Running buffer

- 25 mM Tris Base
- 250 mM glycine (pH 8.3)
- 10% SDS
- Προσθήκη diH₂O μέχρι τελικό όγκο

Τα χτενάκια αφαιρούνται προσεκτικά από την πηκτή και αφαιρούνται επίσης οι φυσαλίδες. Ειδική σύριγγα Hamilton χρησιμοποιείται για να φορτωθούν τα δείγματα των πρωτεϊνών στην πηκτή και ηλεκτροφορούνται αρχικά στα 120V και στη συνέχεια στα 150V όταν οι πρωτεΐνες περάσουν στο resolving gel. Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται σε θερμοκρασία δωματίου και σταματάνε 15 λεπτά αφότου η χρωστική εγκαταλείψει την πηκτή.

Διάλυμα Αποχρωματισμού

- Οξικό οξύ 7%
- Μεθανόλη 5%
- Nanopure H₂O

2.3.17. Χρώση Blue-Silver Coomassie

Η R-250 με την G-250 διαφέρουν 2 μεθυλομάδες. Η κουμάση προσδένεται στις πρωτεΐνες μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων, όπως επίσης και μέσω Van der Waals δυνάμεων. Ο σχηματισμός του συμπλόκου σταθεροποιεί την αρνητικά φορτισμένη ανιονική μορφή της χρωστικής που παράγει το μπλε χρώμα. Η χρωστική σχηματίζει επίσης ένα σύμπλοκο με το ανιονικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS). Ο σχηματισμός αυτού του συμπλέγματος σταθεροποιεί την ουδέτερη πράσινη μορφή της χρωστικής (Compton και Jones, 1985).

Πριν τη χρώση γίνεται μονιμοποίηση με :

- 30% Μεθανόλη
- 10% Οξικό οξύ

Ακολουθεί επώαση των gels στο διάλυμα μονιμοποίησης για 1 ώρα και ξέπλυμα των gels (x4) με απεσταγμένο νερό (15 λεπτά για κάθε ξέπλυμα). Οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στο working solution της "blue silver" Coomassie είναι :

- 0.12% χρωστική coomassie G-250
- 10% θειικό αμμώνιο
- 10% Φωσφορικό οξύ
- 20% Μεθανόλη

Τα πηκτώματα (gels) μένουν στο διάλυμα χρώσης όλη την νύχτα και την επομένη γίνεται ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (x3-x4).

2.3.18. Χρώση αργύρου (συμβατή με MS)

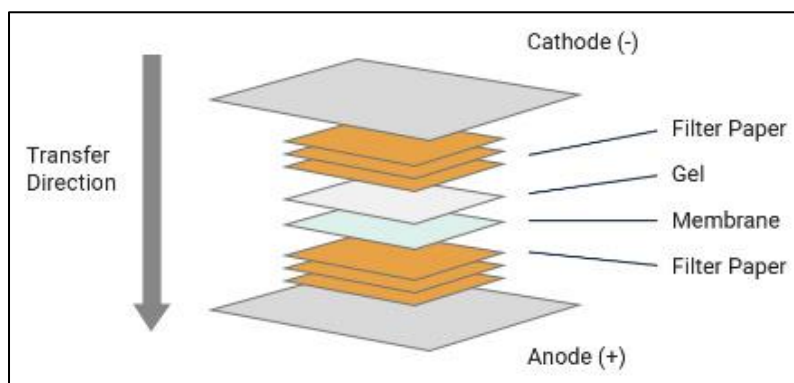
Οι πρωτεΐνες δεσμεύουν τα ιόντα αργύρου, τα οποία μπορούν να αναχθούν, υπό κατάλληλες συνθήκες, για να δημιουργήσουν μια ορατή εικόνα από εξαιρετικά διαμερισμένο μεταλλικό άργυρο που δίνει στις πρωτεΐνες ένα κίτρινο/καφέ χρώμα (Chevallet et al., 2006). Η χρωστική αργύρου έχει ευαισθησία 2 -10 ng πρωτεΐνης ανά ζώνη (Giulian et. al., 1983).

Μετά τον αποχρωματισμό της πηκτής από την Coomassie Brilliant Blue G-250 (με 5% μεθανόλη και 10% οξικό οξύ για 3 ώρες ή περισσότερο), ακολουθούν τα εξής βήματα :

- 1) Μονιμοποίηση (fixation) με 40% αιθανόλη (C_2H_6O) και 10% οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$) για 1 ώρα.
- 2) Πλύσεις με diH_2O για 30 λεπτά ή ολονύχτια ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$).
- 3) 0.02% θειοθειικό νάτριο ($Na_2S_2O_3$) για 1 λεπτό.
- 4) 3 πλύσεις με diH_2O , 20 δευτερόλεπτα την φορά.
- 5) Παγωμένο διάλυμα από 0.1% νιτρικού αργύρου ($AgNO_3$) και 0.025% φορμαλδεΐδης (CH_2O) για 20 λεπτά.
- 6) 3 πλύσεις με diH_2O , 20 δευτερόλεπτα την φορά.
- 7) 3% ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) με 0.05% φορμαλδεΐδη (CH_2O). Στο στάδιο αυτό περιμένουμε να εμφανιστούν οι μπάντες, και η πηκτής μας χρωματίζεται κίτρινη.
- 8) Ο τερματισμός της χρώσης γίνεται με 5% οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$) για 5 λεπτά.
- 9) Αποθηκεύουμε την πηκτής στους $4^\circ C$ σε 1% οξικό οξύ ($C_2H_4O_2$).

2.3.19. Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting)

Ηλεκτροφορητική μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη : Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται για 10 δευτερόλεπτα σε 100% μεθανόλη ώστε να την ενεργοποιήσουμε, και ξεπλένεται με dH_2O υπό ανάδευση για 5 λεπτά. Η πηκτή και η μεμβράνη τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς εφόσον πρωτίστως έχουν καλυφθεί εξωτερικά με 5 στρώσεις διηθητικού χαρτιού τα οποία έχουν εμποτιστεί σε διάλυμα TBST (Εικόνα 24). Η μεμβράνη τοποθετείται στον θετικό πόλο, και η πηκτή στον αρνητικό. Οι φυσαλίδες μεταξύ πηκτής και μεμβράνης απομακρύνονται με ασκώντας ελαφριά πίεση. Η μεταφορά γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σταθερό ρεύμα $1\text{mA}/\text{cm}^2$ για 1,5 ώρα. Μετά το πέρας της μεταφοράς, το επόμενο βήμα είναι το blocking (1 ώρα έως ολονύχτια σε BSA 2% w/v σε TBST), και αφορά στην παρεμπόδιση της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης.



Εικόνα 24: Ανοσοαποτύπωση (<https://cdn1.sinobiological.com>)

TBST

- 10mM Tris/HCl pH=8
- 150mM NaCl
- 0.05% w/v Tween 20

Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα : Η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με το πρωτογενές αντίσωμα (αραίωση 1:1000) που ανιχνεύει το αντιγόνο ενδιαφέροντος. Το αντίσωμα αραιώνεται σε TBST και 5% BSA. Μετά την επώαση η μεμβράνη υφίσταται 3

διαδοχικές πλύσεις με TBST για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος που δεν συνδέθηκε στο αντιγόνο.

Διαδικασία εμφάνισης : Η εμφάνιση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με μόρια τα οποία δίνουν έγχρωμο προϊόν σε μια συγκεκριμένη χημική αντίδραση. Αυτό επιτυγχάνεται με διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (3 πλύσεις των 5 λεπτών), η οποία προσδένεται στο ειδικό αντίσωμα. Με την προσθήκη χρωμογόνου το οποίο ανιχνεύει την αλκαλική φωσφατάση (**BCIP** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, **NBT**: p-nitroblue tetrazolium chloride) εμφανίζονται οι μπάντες ιώδους χρώματος που δηλώνουν την πρωτεΐνη-στόχο.

Αλκαλική Φωσφατάση (ALP Buffer)

- 100mM Tris/HCl, pH=9.5
- 100mM NaCl
- 5mM MgCl₂

2.4. Ταυτοποίηση και βιοπληροφορική ανάλυση των πρωτεϊνών

Τα δεδομένα από το nano LC MS/MS φορτώθηκαν στο λογισμικό MaxQuant (www.maxquant.org), και αναλύθηκαν με τον αλγόριθμο Andromeda. Συνοπτικά, τα φάσματα αντιστοιχηθήκαν με δεδομένα της NCBI, βάση τα γονιδιώματα των *Coxiella burnetii* (strain RSA 493 / Nine Mile phase I) και *Homo sapiens* (Human). Η παράμετρος του mass tolerance των MS/MS τέθηκε 0.5 Da. Το ένζυμο για την *in silico* πέψη είναι η τρυψίνη. Ακόμα ως μεταβλητές τροποποιήσεις τέθηκαν: α) η οξειδωση των κατάλοιπων μεθειονίνης (+15,995) και β) η ακετυλίωση των αμινόξυ- τελικών άκρων (+42,011), ενώ σαν μη μεταβλητή τροποποίηση επιλέχθηκε η καρβοξυαμιδομεθυλίωση (+57,021). Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τον αλγόριθμο MaxLFQ, εφαρμογή MaxQuant (Cox et al., 2014).

Από το MaxQuant προέκυψε ένα αρχείο (protein groups) με τις πρωτεΐνες, και τα δεδομένα που προκύπτουν για κάθε μια από αυτές. Στην συνέχεια το αρχείο φορτώθηκε στο Perseus (Τυαnova και Cox, 2018), v.1.5.3.8 και 1.6.5.0, όπου πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Ακολούθησε η μετατροπή των εντάσεων των πρωτεϊνών σε

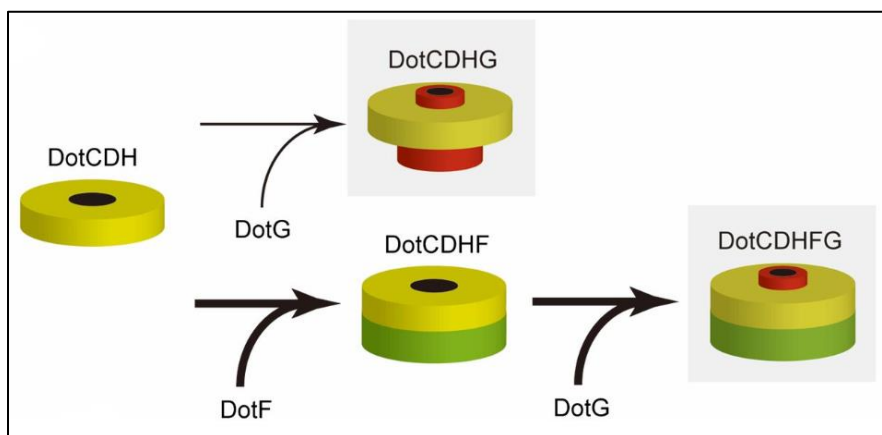
λογαριθμική κλίμακα. Για την σύγκριση των πρωτεϊνικών δειγμάτων έγινε ομαδοποίηση σε τεχνικά (multiple runs) και βιολογικά (συνθήκη) με βάση το εκάστοτε πείραμα. Πραγματοποιήθηκε t-test με την μέθοδο του permutation based FDR. Τέλος το FDR και το s_0 για το κάθε πείραμα και κυμαίνονται στα εύρη: 0.01-0.05 και 0.1 -0.9 αντίστοιχα (Τυανονα και Cox J., 2018).

Όπως αναφέρθηκε το γονιδίωμα της *Coxiella burnetii* Φάσης II (Φάση II, Nine Mile RSA439, Clone 4) αλληλουχήθηκε πρόσφατα (Millar et al., 2017). Παρόλο που ολόκληρο το γονιδίωμα της *Coxiella* Φάσης II έχει ταυτοποιηθεί, μελέτες χρησιμοποιούν ακόμη ως αναφορά το γονιδίωμα της Φάσης I. Ο λόγος έγκειται στο ότι οι αλληλουχίες των γονιδιωμάτων των στελεχών *Coxiella burnetii* Φάσης I και Φάσης II φέρουν ελάχιστες και μικρές αλλαγές (κυρίως απουσία κάποιων ομόλογων γονιδίων αλλά και απουσία πολυμορφισμών μονού νουκλεοτιδίου-SNPs-) (Seshadri et al., 2003; Millar et al., 2017). Οι συντηρημένες περιοχές και ενεργές θέσεις των θετικά ρυθμιζόμενων (upregulated) πρωτεϊνών του στελέχους *Coxiella burnetii* Mile RSA439 Φάσης II ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση της αναζήτησης συντηρημένων περιοχών στο NCBI με όριο (e-value) 0.001 (Marchler-Bauer et al., 2017) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης DotC του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella burnetii* Φάσης II σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* C43(DE3)

Στα πλαίσια της μελέτης της παθογένειας της *Coxiella* υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε η πρωτεΐνη DotC του εκκριτικού συστήματος σε κύτταρα *E.coli* C43(DE3). Η πρωτεΐνη DotC είναι λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης του εκκριτικού συστήματος T4SS και θεωρείται ότι μαζί με τις πρωτεΐνες DotD και DotH βοηθούν στο σχηματισμό του διαύλου έκκρισης του T4SS (Kubori et al., 2014) (Εικόνα 25).

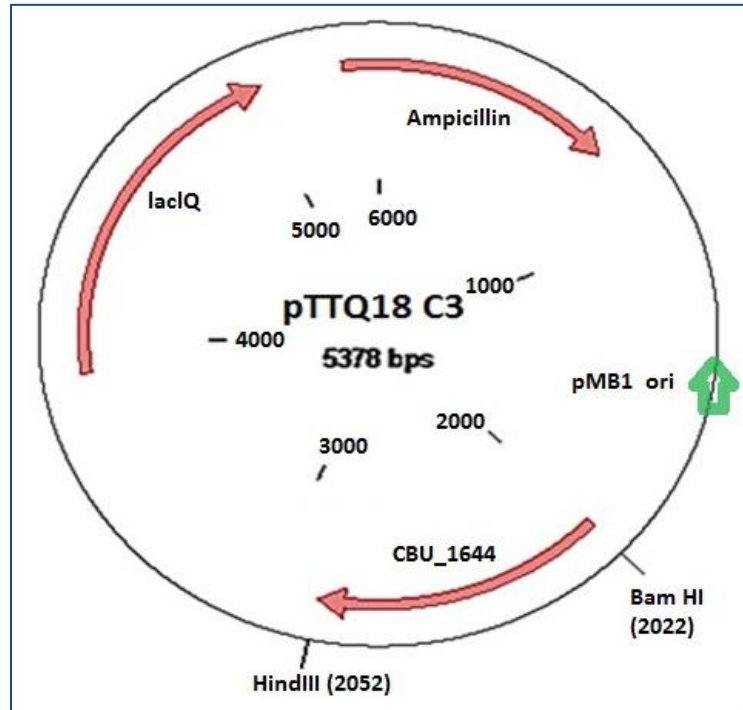


Εικόνα 25: Πιθανό μοντέλο συναρμολόγησης του συμπλέγματος του πυρήνα Dot / Icm T4SS (από Kubori et al., 2014).

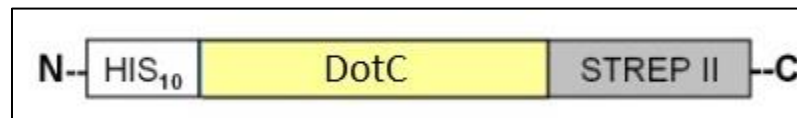
Παρόλα τα προτεινόμενα μοντέλα συναρμολόγησης του Dot/Icm, η δομή και οι επικράτειες της πρωτεΐνης DotC καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο συμμετέχει η συγκεκριμένη πρωτεΐνη στο σχηματισμό του εκκριτικού συστήματος δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένα. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια υπερέκφρασης της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης DotC για περαιτέρω μελέτη.

Για την απομόνωση της DotC δημιουργήθηκε το πλασμίδιο pttQ18 C3 (εικόνες 26,27) που φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο της πρωτεΐνης DotC και εισάχθηκε με μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* C43(DE3). Η έκφραση της πρωτεΐνης έγινε σε καλλιέργειες μεγάλου

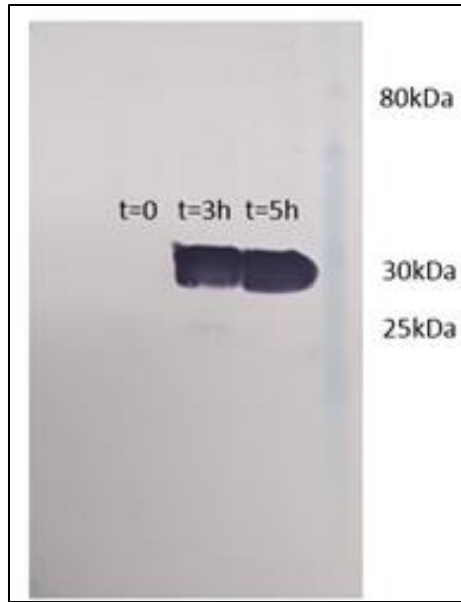
όγκου (1L) στους 37°C. Αρχικά, συλλέχθηκε δείγμα πριν γίνει η επαγωγή (t=0), και έπειτα από 3 και 5 ώρες μετά την επαγωγή. Η πρωτεΐνη έφερε επίτοπο strep-tag που ανιχνεύτηκε με αντί-strep αντίσωμα σε σύπωμα Western (Εικόνα 28).



Εικόνα 26 . Πλασμίδιο pttQ18 C3 που φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο της πρωτεΐνης DotC

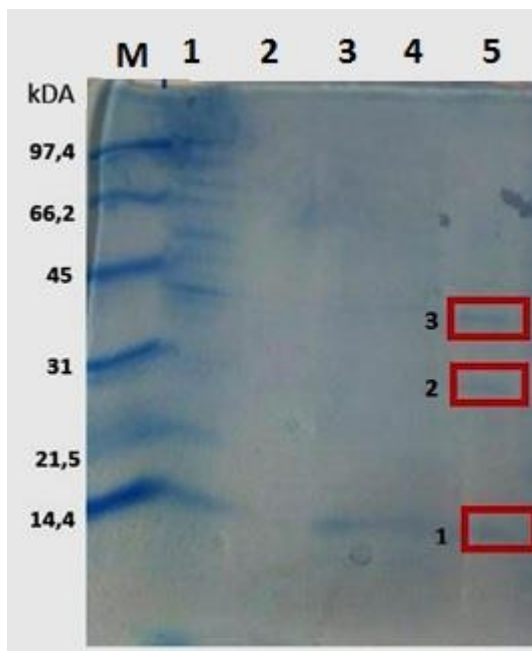


Εικόνα 27. pttQ18 C3 πλασμίδιο



Εικόνα 28: Στύπωμα Western για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης DotC (DotC=30.2 kDa), με την χρήση anti-strep αντισώματος, μετά από 3 και 5ώρες μετά την επαγωγή με 1mM IPTG.

Η ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη που βρίσκεται στις μεμβράνες απομονώθηκε μετά από διαλυτοποίηση και στήλη συγγενείας. Η απομονωμένη πρωτεΐνη αναλύθηκε με SDS-PAGE και οι πρωτεϊνικές λωρίδες απομονώθηκαν για πρωτεωμική ανάλυση (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Blue-Silver Coomassie μετά από ηλεκτροφόρηση SDS PAGE 4-12% πρωτεϊνών των μεμβρανών, μετά από στήλη συγγενείας για τις διαλυτοποιημένες μεμβράνες που περιέχουν την DotC. 1. Flow through, 2. Wash, 3. Elution, 4. Amicon, 5. TCA

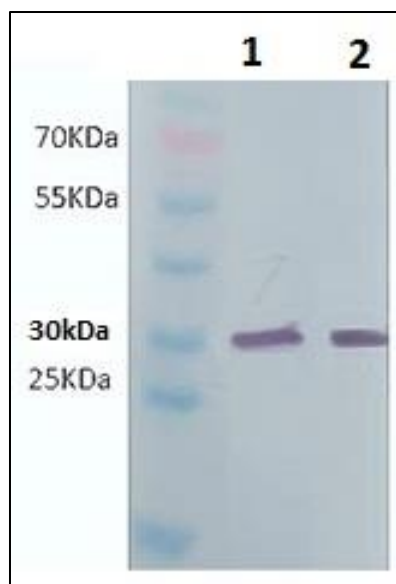
Τα αποτελέσματα από την πρωτεωμική ανάλυση ταυτοποιούν την πρωτεΐνη C στην μπάντα της πηκτής με αριθμό 2, με μοριακό βάρος 30,2 kDa (Πίνακας 3).

Παράλληλα με την καλλιέργεια για την απομόνωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, έγινε καλλιέργεια και για την απομόνωση του περιπλάσματος του ανασυνδυασμένου βακτηρίου, ώστε να ελεγχθεί αν τμήμα της πρωτεΐνης βρίσκεται και στο περίπλασμα. Τα αποτελέσματα για τον έλεγχο της παρουσίας της DotC στο περίπλασμα, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη DotC βρίσκεται και στο περίπλασμα (Εικόνα 29) γεγονός που επιβεβαιώνεται και από υπάρχουσα βιβλιογραφία (Segal et al., 2005). Να αναφέρουμε επίσης ότι οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στις μεμβράνες ήταν 0.61 mg/mL και στο περίπλασμα 0.5 mg/mL.

Συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη μπορεί να απομονωθεί και από το περίπλασμα, όμως χρειάζονται επιπλέον πειράματα καθώς και η μέτρηση της συγκέντρωσης της DotC σε μεμβράνες και περίπλασμα, ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε από που θα μπορεί κάποιος μελλοντικά να απομονώσει την πρωτεΐνη σε περισσότερη συγκέντρωση.

Αριθμός μπάντας	Περιγραφή	Επικάλυψη [%]	Αριθμός πεπτιδίων	Αριθμός PSMs	Αριθμός μοναδικών πεπτιδίων	Score Sequest HT: Sequest HT
2	Πρωτεΐνη DotC T4SS [OS= <i>Coxiella burnetii</i>]	57	14	30	14	88.84
1	Type IV secretion system protein DotC [OS= <i>Coxiella burnetii</i>]	20	4	6	4	10.49
3	DotC [OS= <i>Coxiella burnetii</i> CbuK_Q154]	14	2	3	2	9.46

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ανάλυσης πρωτεώματος των πρωτεϊνών από την πηκτή SDS-PAGE

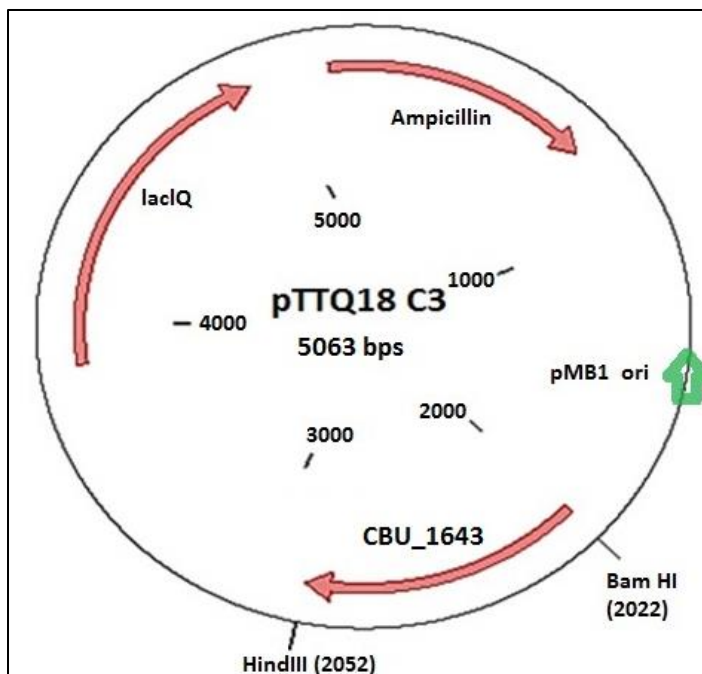


Εικόνα 29: Στύπωμα Western για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης DotC με την χρήση anti-strep αντισώματος, σε πρωτεΐνες των μεμβρανών, και του περιπλάσματος αντίστοιχα. 1. Μεμβάνες, 2. Περίπλασμα

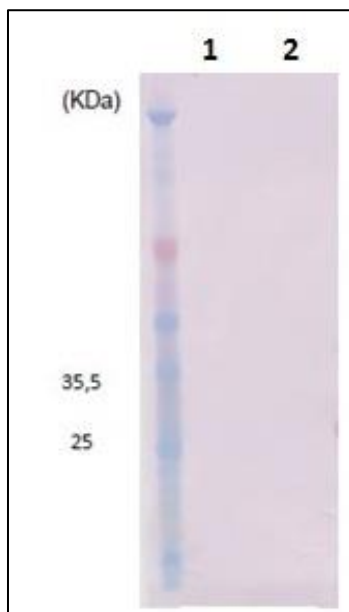
3.2. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης DotD του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella burnetii* Φάσης II σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* C43(DE3)

Ο ρόλος της πρωτεΐνης DotD φαίνεται να είναι εξ ίσου σημαντικός στη δημιουργία του διαύλου του εκκριτικού συστήματος καθώς εικάζεται ότι μαζί με τη DotC και DotH δημιουργούν κοινό σύμπλοκο (Kubori et al., 2014). Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα υπερέκφρασης και απομόνωσης της DotD.

Η DotD είναι κλωνοποιημένη στο πλασμίδιο pTTQ18C3+D (εικόνα 30), το οποίο φέρει στο C-αμινοτελικό άκρο επίτοπο strep-tag. Έγινε δοκιμή σε καλλιέργεια όγκου 100mL στους 37°C. Συλλέχθηκαν δείγματα 3 και 5 ώρες μετά την επαγωγή με IPTG (1mM) (Εικόνα 31).



Εικόνα 30 . Πλασμίδιο pttQ18 C3 +D που φέρει το κλωνοποιημένο γονίδιο της πρωτεΐνης DotD



Εικόνα 31: Στύπωμα Western για τον έλεγχο έκφρασης της πρωτεΐνης DotD (DotD = 18.66 kDa) σε δύο χρονικά διαστήματα μετά την επαγωγή. 1. 3 ώρες μετά την επαγωγή, 2. 5 ώρες μετά την επαγωγή.

Όπως φαίνεται η έκφραση της ανασυνδιασμένης DotD δεν ήταν επιτυχής. Η αποτυχία της έκφρασης μπορεί να σχετίζεται με τις υπάρχουσες συνθήκες του πειράματος (συγκέντρωση επαγωγέα, χρόνοι επώασης του πειράματος).

3.3. Αποτελέσματα πρωτοκόλλων απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella* Φάσης II σε κύτταρα VERO και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας

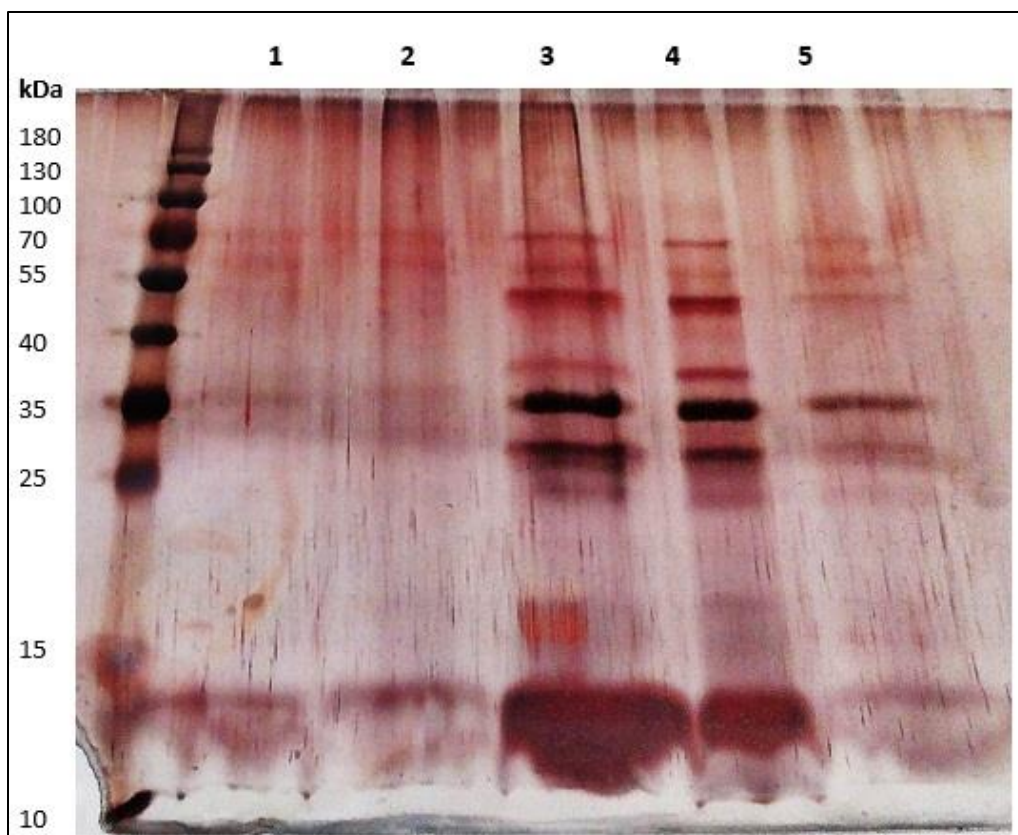
Χρησιμοποιήθηκαν 2 πρωτόκολλα απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella* Φάσης II όπως περιγράφονται από τους Kubori et al. (1992; 2014).

Τα βακτήρια της *Coxiella* Φάσης II απομονώθηκαν από αξενικό μέσο καλλιέργειας ACCM-D κατά την 7^η ημέρα της καλλιέργειας. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 250mL καλλιέργειας από όπου και απομονώθηκαν ~750μL καθαρής *Coxiella*. Τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών μετά από την καμπύλη αναφοράς σύμφωνα με το TritonX-100 αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Ίζημα μετά από φυγοκέντρηση 14.000g	Υπερκείμενο μετά την 1η υπερφυγοκέντρηση	Υπερκείμενο μετά την 2η υπερφυγοκέντρηση	Τελικό ίζημα που αφορά την απομόνωση του εκκριτικού συστήματος
0.238 μg/μL	1 μg/μL	0.28 μg/μL	0.21 μg/μL

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις πρωτεϊνών κατά την διάρκεια του πρωτοκόλλου απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella*.

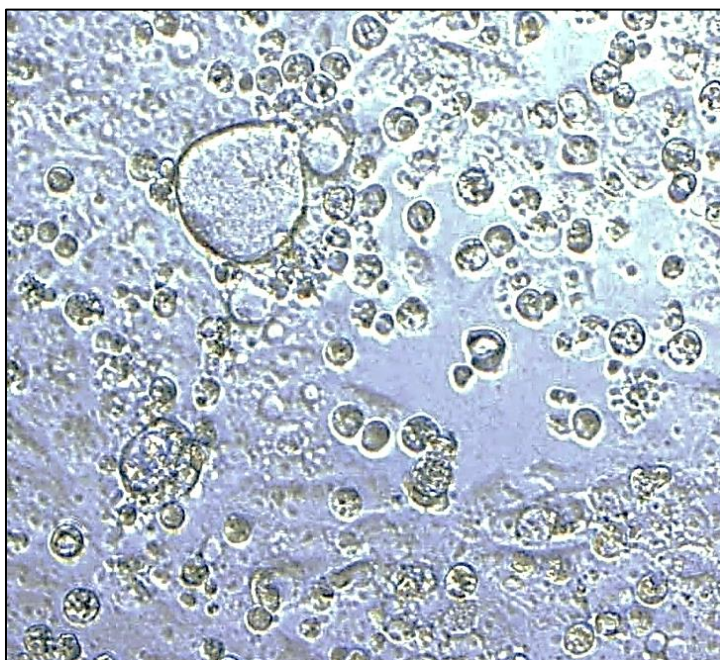
Παρατηρείται ότι, μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών υπάρχει μετά την 1^η υπερφυγοκέντρηση. Αυτό οφείλεται στο ότι σε αυτό το στάδιο του πειράματος οι πρωτεΐνες βρίσκονται στο υδατοδιαλυτό κλάσμα. Στη συνέχεια ακολούθησε κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με τριχλωρικό οξύ (TCA), προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση 20-25μg για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και χρώση αργύρου (Εικόνα 32).



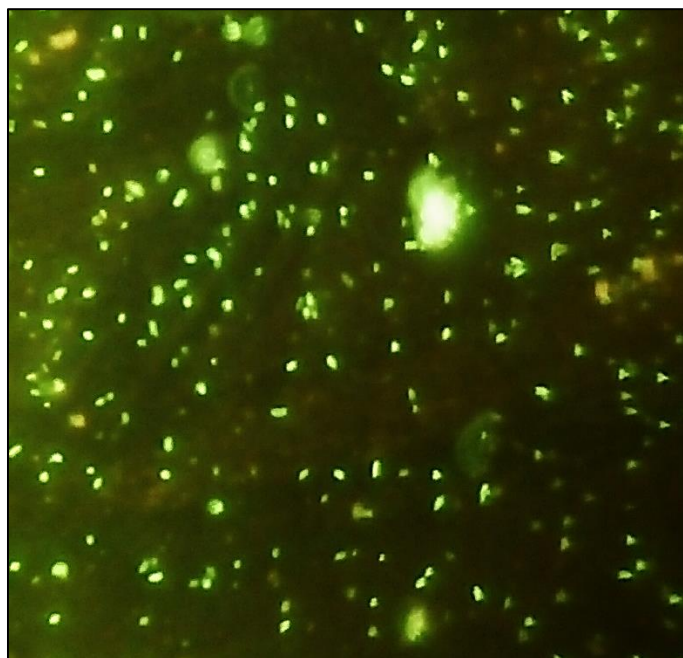
Εικόνα 32: Χρώση αργύρου μετά από SDS-PAGE 12.5% των πρωτεϊνών της *Coxiella* αξενικού μέσου καλλιέργειας ACCM-D μετά την 7η ημέρα καλλιέργειας. 1. 20μg πρωτεϊνών μετά από TCA, από την τελική πελέτα της απομόνωσης που αναμένονται και οι πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος, 2. 20μg πρωτεϊνών μετά από TCA, μετά την φυγοκέντρηση 14.000g, 3. 35μg προϊόντος μετά την 1^η υπερφυγοκέντρηση, 4. 25μg προϊόντος από το υπερκείμενο της 1^{ης} υπερφυγοκέντρησης, 5. 35μg προϊόντος από το υπερκείμενο της 2^{ης} υπερφυγοκέντρησης.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 32, η απομόνωση των πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella burnetii* Φάσης II (πρώτο πηγάδι φόρτωσης στην πηκτή), δεν ήταν επιτυχής. Θα πρέπει ενδεχομένως να γίνει βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου και η ποσότητα του βακτηριακού πληθυσμού που απομονώθηκε ίσως να πρέπει να αυξηθεί.

Τα αποτελέσματα της μόλυνσης των κυττάρων VERO από *Coxiella* φαίνονται στην Εικόνα 33. Ήδη από την 5^η ημέρα της μόλυνσης φαίνεται ότι τα κύτταρα VERO διογκώνονται κάτι που είναι χαρακτηριστικό της μόλυνσης από *Coxiella*. Φλάσκες των 175cm² με κύτταρα VERO επιμολύνθηκαν με *Coxiella* προκειμένου να απομονωθεί το εκκριτικό σύστημα του παθογόνου κατά την 7^η μέρα της μόλυνσης. Η μόλυνση επιβεβαιώθηκε με ανοσοφθορισμό (Εικόνα 34).

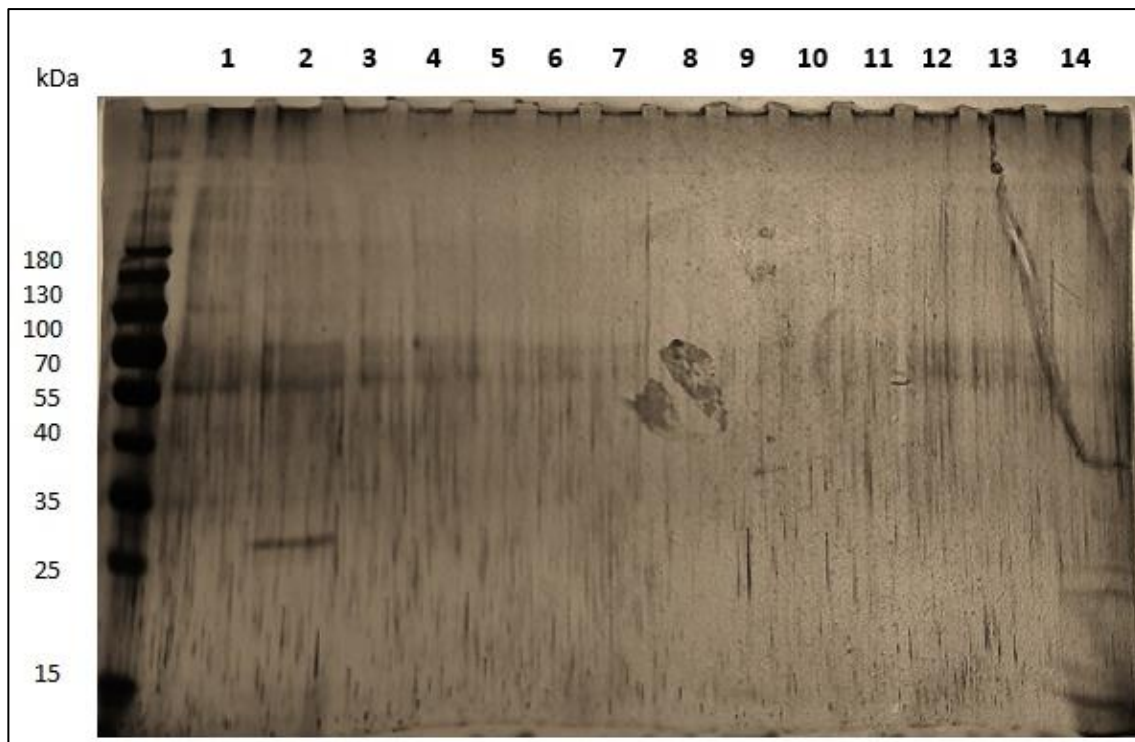


Εικόνα 33: Κύτταρα Vero την 5η μέρα μετά την μόλυνση με *Coxiella* Φάσης II.



Εικόνα 34: Ανοσοφθορισμός της *Coxiella* κατά την 7^η μέρα από τη μόλυνση των κυττάρων VERO. Παρατηρούνται οι βάκιλοι της *Coxiella*.

Μετά τη διαλυτοποίηση των βακτηρίων, ακολούθησε κλασματοποίηση με διαβάθμιση σουκρόζης. Τα κλάσματα της διαβάθμισης καθώς και δείγματα από τα βήματα του πρωτοκόλλου απομόνωσης του εκκριτικού συστήματος έτρεξαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 10%, και έπειτα έγινε χρώση αργύρου (Εικόνα 35).

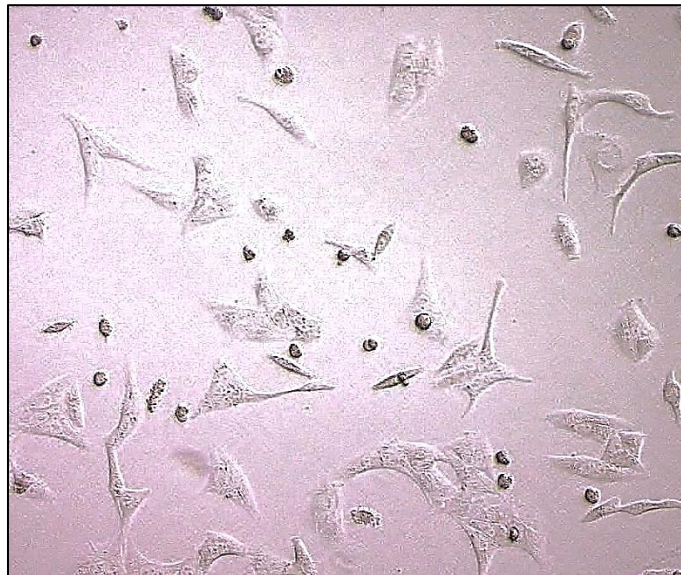


Εικόνα 35: Χρώση αργύρου μετά από SDS-PAGE 10% των πρωτεϊνών της *Coxiella* όπως απομονώθηκαν την 7η ημέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων VERO. 1. S_1 υπερκείμενο, 2. S_2 υπερκείμενο, 3. κλάσμα 1, 4. κλάσμα 2, 5. κλάσμα 3, 6. κλάσμα 4, 7. κλάσμα 5, 8. κλάσμα 6, 9. κλάσμα 7, 10. κλάσμα 8, 11. κλάσμα 9, 12. κλάσμα 10, 13. κλάσμα 11, 14. πρωτεΐνες πριν την διαλυτοποίηση.

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 34, η απομόνωση των πρωτεϊνών του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella burnetii* Φάσης II μετά από μόλυνσης της κυτταρικής σειράς VERO δεν ήταν επιτυχής. Θα πρέπει ενδεχομένως να γίνει βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου και η ποσότητα του βακτηριακού πληθυσμού ίσως θα πρέπει να αυξηθεί.

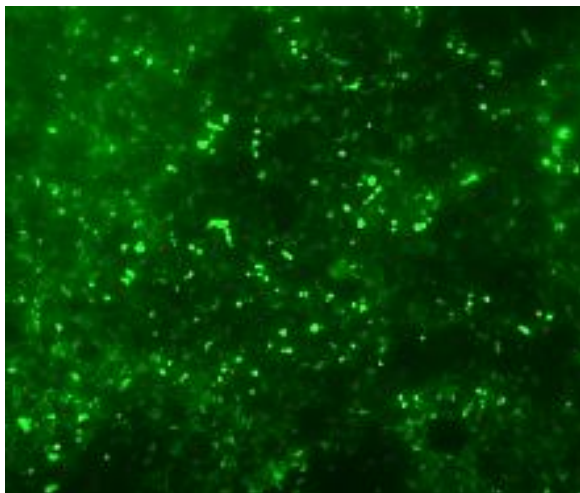
3.4. Ανάλυση του πρωτεομικού προφίλ της *Coxiella burnetti* Φάσης II κατά την 4^η μέρα μόλυνσης των κυττάρων HeLa

Στην προσπάθεια να πετύχουμε αποτελέσματα όσο το δυνατόν εγγύτερα στην μόλυνση από *Coxiella* που υφίσταται ο άνθρωπος, χρησιμοποιήσαμε ανθρώπινη κυτταρική καρκινική σειρά (HeLa). Έγινε μόλυνση κυττάρων HeLa με *Coxiella* Φάσης II μιας φιάσκας 75cm² ενώ παράλληλα μια 2^η φιάσκα έμεινε χωρίς μόλυνση, και αποτελεί το control του πειράματος (Εικόνα 36).



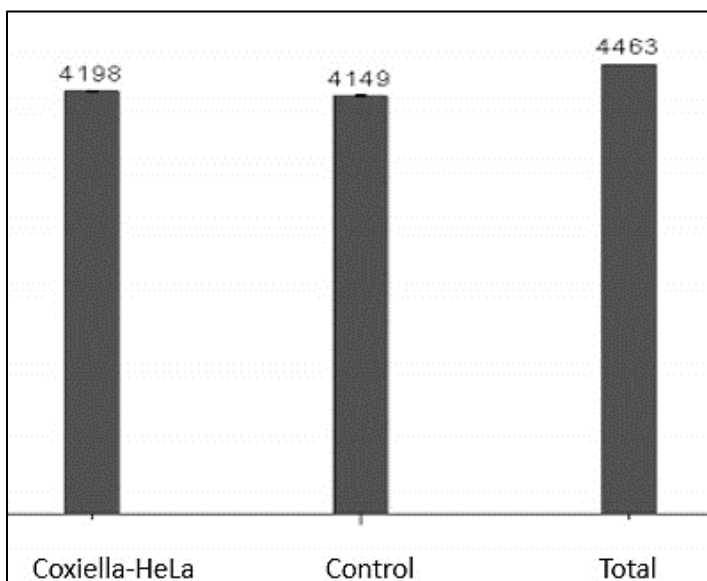
Εικόνα 36: Φυσιολογικά (μη μολυσμένα) κύτταρα HeLa.

Τα κύτταρα της *Coxiella* συλλέχθηκαν την 4^η ημέρα μετά την μόλυνση, ενώ νωρίτερα πραγματοποιήθηκε άμεσος ανοσοφθορισμός που επιβεβαίωσε τη μόλυνση (Εικόνα 37).



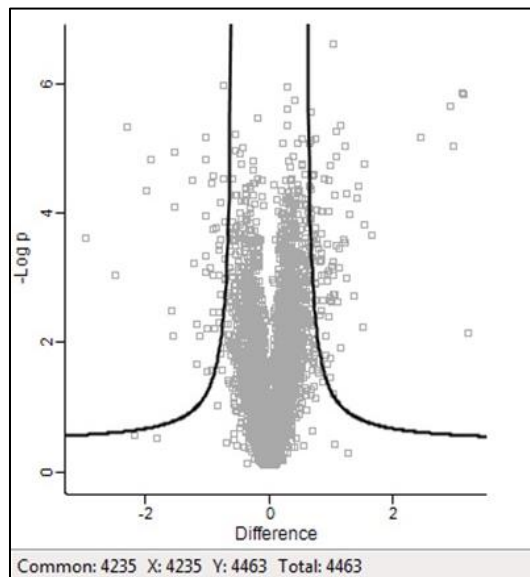
Εικόνα 37: Άμεσος ανοσοφθορισμός για επιβεβαίωση της μόλυνσης των HeLa από *Coxiella* Φάσης II την 4η ημέρα μετά την μόλυνση.

Κατά την ανάλυση του πρωτεώματος ενός βιολογικού δείγματος των μολυσμένων κυττάρων HeLa και του ενός των μη μολυσμένων κυττάρων (control) αντίστοιχα, ανιχνεύθηκαν συνολικά 4463 πρωτεΐνες με τουλάχιστον 2 μοναδικά πεπτίδια (εικόνα 38).



Εικόνα 38. Συνολικές πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν μετά την ανάλυση του πρωτεώματος στα 2 βιολογικά δείγματα που αφορούν α) την 4η ημέρα μετά την μόλυνση των HeLa με *Coxiella burnetii* Nine Mile φάσης II, και β) των μη μολυσμένων HeLa κυττάρων.

Στην συνέχεια έγινε στατιστική ανάλυση του πρωτεώματος με την χρήση του προγράμματος Perseus για την εύρεση των σημαντικά διαφοροποιημένων πρωτεϊνών. Στην εικόνα 39 παρουσιάζεται το Volcano plot στο οποίο πρωτεΐνες που βρίσκονται εκτός της καμπύλης έχουν διαφορετική έκφραση στις δυο συνθήκες.



Εικόνα 39. Volcano Plot των πρωτεϊνών μεταξύ των μολυσμένων κυττάρων HeLa και των μη μολυσμένων κυττάρων (FDR : 0.01 και S_0 : 0.6).

Παρόλο που τα μολυσμένα κύτταρα ήταν στην τέταρτη μέρα μόλυνσης μόνο ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών της *Coxiella* ταυτοποιήθηκε. Στον Πίνακα 6 παρατίθενται οι πρωτεΐνες της *Coxiella burnetti* Φάσης II που εμφάνισαν θετική ρύθμιση την 4^η μέρα της μόλυνσης των κυττάρων HeLa.

	Πρωτεΐνες <i>Coxiella</i> Φάσης I	Πρωτεΐνες <i>Coxiella</i> Φάσης II	Λειτουργία πρωτεϊνών <i>Coxiella</i> Φάσης I	Λειτουργία πρωτεϊνών Φάσης II
1	bcp CBU_0693	ARI65789.1	putative peroxiredoxin bcp	Peroxiredoxin
2	guaA CBU_1341	ARI66131.1	GMP synthase	GMP synthase (glutaleπτά- hydrolyzing)
3	com1 CBU_1910	ARI66660.1	Outer membrane protein	hypothetical protein
4	ompH CBU_0612	ARI65479.1	Outer membrane protein	hypothetical protein
5	tufA tuf-1, CBU_0221.2, CBU_0221b tufB tuf-2, CBU_0236	ARI65122.1	Elongation factor Tu	elongation factor Tu
6	groL groEL, htpB, mopA, CBU_1718	ARI66478.1	60 kDa chaperonin	molecular chaperone GroEL

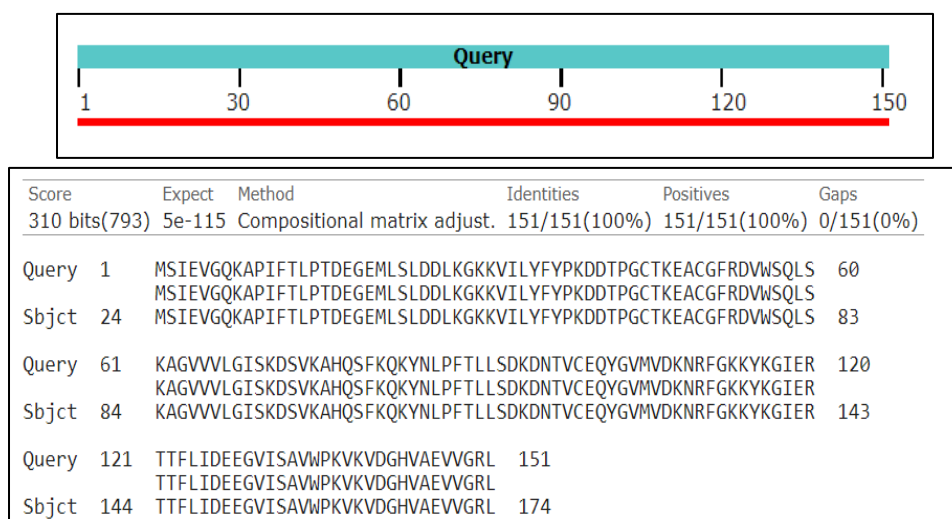
Πίνακας 5: Οι πρωτεΐνες όπως ταυτοποιήθηκαν βάσει του πρωτεώματος της *Coxiella* Φάσης I και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες σύμφωνα με το πρωτέωμα της Φάσης II. Στις επόμενες δύο στήλες φαίνονται οι λειτουργίες τους.

Όπως αναφέρθηκε οι πρωτεΐνες της *Coxiella* φάσης II ταυτοποιήθηκαν βάσει του πρωτεώματος της *Coxiella* Φάσης I που είναι και το πρωτέωμα αναφοράς. Όπως είναι αναμενόμενο, σε επίπεδο γονιδιώματος οι διαφορές μεταξύ της *Coxiella* Φάσης I και Φάσης II είναι ελάχιστες. Παρόλα αυτά στον πίνακα 6 παρατίθενται οι πρωτεΐνες της Φάσης II όπως είναι χαρακτηρισμένες και βάσει του πρωτεώματος της *Coxiella* Φάσης II.

Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος ταυτοποιήθηκαν και ως προς την πιθανή τους δράση, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης του NCBI για συντηρημένες περιοχές/επικράτειες (βλ. Υλικά και Μέθοδοι). Αυτό κρίθηκε απαραίτητο καθώς δύο από τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος χαρακτηρίζονται, σύμφωνα με το πρωτέωμα αναφοράς, ως πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ σύμφωνα με το πρωτέωμα της Φάσης 2, είναι υποθετικές πρωτεΐνες (Πίνακας 5). Η βιοπληροφορική αναζήτηση συντηρημένων περιοχών, μπορεί να δώσει μια ένδειξη για τη δράση της πρωτεΐνης, όμως απαιτείται και πειραματική επιβεβαίωση της δράσης.

3.4.1. Η πιθανή υπεροξειδάση ARI65789.1 μπορεί να συμμετέχει στην αντιοξειδωτική άμυνα της *Coxiella burnetii* Φάσης II κατά τη μόλυνση των κυττάρων HeLa

Η πρωτεΐνη ARI65789.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa, παρουσιάζει 86% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης CBU_0963 της *Coxiella burnetii* Φάσης I που έχει ταυτοποιηθεί ως πιθανή υπεροξειδάση.



Εικόνα 40: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης ARI65789.1 (Subject, 174αα) της χρόνιας μολυσματικής μορφής *Coxiella burnetii* (Φάση II) με την αμινοξική αλληλουχία bcp CBU_0963 (Query, 151αα) της οξείας μολυσματικής μορφής *Coxiella burnetii* (Φάση I).

Η ανάλυση για εύρεση συντηρημένων επικρατειών έδειξε ότι η πρωτεΐνη ARI65789.1 ανήκει στην οικογένεια των υπεροξειδασών (Prxs) (θέσεις της επικράτειας υπεροξειδάσης: 29 έως 174) και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια των επιτακτικών βακτηριοφερρετινών (bacterioferritin comigratory protein- BCP-).

Η αντίσταση στο οξειδωτικό στρες είναι μια διαδικασία-κλειδί που επιτρέπει τα παθογόνα βακτήρια να επιβιώνουν από τις επιδράσεις των ελευθέρων ριζών που παράγονται από τους ξενιστές ως μέσο άμυνας (Storz και Zheng, 2000). Οι υπεροξειδάσες (Prxs) είναι

άφθονες στα παθογόνα και καταλύουν την αντίδραση των υπεροξειδίων αποδίδοντας αντίσταση στο οξειδωτικό στρες.

Ο ρόλος των BCPs ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες έχει βρεθεί σε μελέτες με στελέχη *Burkholderia*, *Helicobacter*, *Chlamydia*, *sp.* καθώς και σε *Coxiella burnetii* και έχει προταθεί ότι έχουν προστατευτικό ρόλο και προσδίδουν αντίσταση στις ελεύθερες ρίζες κατά τη διάρκεια της παθογένειας των βακτηρίων (Wang et al., 2005; Boncompain et al., 2010; Clarke et al., 2010; Desler et al., 2019). Αυτό δείχνει ότι οι πρωτεΐνες BCP αποτελούν ένα μηχανισμό άμυνα που υιοθετείται γενικότερα από παθογόνα συμπεριλαμβανομένης και της *Coxiella*.

Πειραματικές μελέτες με στελέχη *C. burnetii* Φάσης II έδειξαν ότι η πρωτεΐνη BCP CBU_0963 (ή αλλιώς πρωτεΐνη ARI65789.1 βάσει της ταυτοποίησης με το πρωτέωμα της Φάσης II; Πίνακας 6) εμπλέκεται στην αντιστάθμιση του οξειδωτικού στρες κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης του στελέχους (Hicks et al., 2010). Οι Hicks et al., (2010) πρότειναν ότι η υπεροξειδάση BCP έχει μέγιστη έκφραση τόσο στην αρχή της εκθετικής φάσης όσο και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της *Coxiella* Φάσης II. Τα πειράματα των Hicks et al. (2010) έγιναν σε κύτταρα VERO και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η BCP είχε μέγιστα επίπεδα έκφρασης κατά τη 2^η και 3^η μέρα της μόλυνσης που συμπίπτει με την εκθετική φάση ανάπτυξης της χρόνιας μορφής του παθογόνου (*Coxiella* Φάσης II).

Πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε υψηλή θετική ρύθμιση της BCP μετά τον πολλαπλασιασμό στελεχών *C. burnetii* Φάσης I και Φάσης II σε ινοβλάστες ποντικών καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι είναι αναγκαίο να υπάρχει άμεση ενεργοποίηση του μηχανισμού κατά των ελευθέρων ριζών όταν στελέχη *Coxiella* αναπτύσσονται σε κύτταρα που χρησιμοποιούν το οξειδωτικό στρες ως μέσο άμυνας (Dresler et al., 2019).

Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε μέτρηση των επιπέδων ROS στα κύτταρα HeLa μετά τη μόλυνση τους με *Coxiella*. Παρόλα αυτά, μελέτες σε κύτταρα HeLa έδειξαν ότι τα HeLa παράγουν ROS κατά τη μόλυνση τους ως μέρος του αμυντικού τους μηχανισμού (Boncompain et al., 2010). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με ότι αναφέρθηκε παραπάνω, δείχνει ότι η πρωτεΐνη ARI65789.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά τη 4^η μέρα της μόλυνσης των κυττάρων HeLa και μπορεί να βοηθά στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον ξενιστή ως μέσο άμυνας κατά του παθογόνου.

3.4.2. Η συνθάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης ARI66131.1 μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια της *Coxiella* Φάσης II επηρεάζοντας τα επίπεδα των διαθέσιμων πουρινών

Η πρωτεΐνη ARI66131.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα από τη μόλυνση των κυττάρων HeLa, παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της συνθάσης της μονοφωσφορικής γουανοσίνης (GMP synthetase) CBU_1341 της *Coxiella burnetii* Φάσης I).

Η συντηρημένη επικράτεια της πρωτεΐνης ARI66131.1 της *Coxiella* Φάσης II είναι συνθάση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης (GMP synthetase) και φέρει 3 διακριτές υπο-επικράτειες που σχετίζονται με τις θέσεις πρόσδεσης του ATP, το διμερισμό της πρωτεΐνης και τις θέσεις πρόσδεσης του προσδέτη.

Η GMP συνθάση (ARI66131.1) που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά τη 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* στη Φάση II, επηρεάζοντας ενδεχομένως τη δεξαμενή των διαθέσιμων πουρινών και κυρίως της γουανίνης (G) που απαιτούνται για την αντιγραφή του DNA.

Πιο συγκεκριμένα, η GMP συνθετάση εμπλέκεται στη *de novo* βιοσύνθεση των πουρινών (Oliver et al., 2013). Οι πουρίνες είναι δομικοί λίθοι του DNA και του RNA και για το λόγο αυτό ένζυμα που εμπλέκονται στη σύνθεσή τους έχουν γίνει στόχοι για το σχεδιασμό φαρμάκων κατά της μικροβιακής παθογένειας (Morrow et al., 2012, Franklin et al., 2015, Brundell et al., 2016). Παράλληλα, μελέτη σε παθογόνους μύκητες έδειξε ότι η GMP συνθάση επηρεάζει καθοριστικά την παθογένεια των μυκήτων (Rodriguez-Suarez et al., 2007; Chitty et al., 2017) κάτι που μπορεί να ισχύει και στην περίπτωση της παθογένειας της *Coxiella*.

Σύμφωνα με μελέτη σάρωσης υψηλού επιπέδου (high-throughput screening) και βιοπληροφορικές τεχνικές υψηλής απόδοσης για *in silico* σχεδιασμό φαρμάκων, η GMP συνθάση αναγνωρίστηκε ως πιθανό ένζυμο-στόχος κατά της παθογένειας της *Coxiella burnetii* (Franklin et al., 2015). Οι Franklin et al., (2015), ανέφεραν ότι η GMP συνθάση είναι στόχος που θα μπορούσε να φέρει θετικό αποτέλεσμα στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων για τον πυρετό Q.

Δεδομένης της θετικής ρύθμισης της GMP συνθάσης τη 4^η μέρα της μόλυνσης των κυττάρων HeLa υποθέτουμε ότι το συγκεκριμένο ένζυμο χρειάζεται για την επιτυχή

αναπαραγωγή της *Coxiella burnetii* στη Φάση II. Παρόλο που δε γνωρίζουμε τον ακριβή μηχανισμό, υποθέτουμε ότι η GMP συνθάση συνδράμει στη δεξαμενή των διαθέσιμων πουρινών που καλύπτουν τη νέα σύνθεση DNA και RNA κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της *Coxiella* Φάσης II, όπου οι διαδικασίες της αντιγραφής και μεταγραφής είναι έντονες και απαραίτητες για την επιτυχή προσβολή του ξενιστή.

3.4.3. Η πρωτεΐνη ARI66660.1 μπορεί να συμμετέχει στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* Φάσης II συμβάλλοντας στη σωστή αναδίπλωση του Dot /Icm εκκριτικού συστήματος IV (T4SS)

Η πρωτεΐνη ARI66660.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa, παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης CBU_1910 της *Coxiella burnetii* Φάσης I.

Η συντηρημένη επικράτεια στην πρωτεΐνη ARI66660.1 της Φάσης II φαίνεται να ανήκει στην οικογένεια DsbA (θέση 91 έως 248) η οποία φαίνεται να είναι παρόμοια με την πρωτεΐνη Com1 της *Coxiella* Φάσης I.

Παρόλο που ο ρόλος της αλλά και η *in vivo* δράσης της ARI66660.1 στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί, η ομολογία της με την Com1 CBU_1910 της *Coxiella* Φάσης I φαίνεται να την κατατάσσει στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην παθογένεια (Stead et al., 2013). Πειράματα σε κύτταρα VERO επιβεβαίωσαν με ανοσοαποτύπωμα, 27 πρωτεΐνες τελεστές της *Coxiella* Φάσης II που μπορούν και εκκρίνονται μέσω συστημάτων έκκρισης Sec (Stead et al., 2013). Μεταξύ αυτών ήταν και η Com1 (BCU_1910) της *Coxiella* Φάσης I που όπως αναφέρθηκε είναι 100% ομόλογη με την ARI66660.1 της *Coxiella* Φάσης II. Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι η έκκριση της Com1, και κατ'έπекταση ίσως και της ARI66660.1, να απαιτεί πρώτα τη μεταφορά της πρωτεΐνης κατά μήκος της μεμβράνης και έπειτα στο περίπλασμα μέσω των συστημάτων έκκρισης Sec.

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αναζήτηση συντηρημένων περιοχών η πρωτεΐνη ARI66660.1 φαίνεται να έχει δράση δισουλφιδικής αναγωγής.

Οι δισουλφιδικές αναγωγάσες έχουν χαρακτηριστεί σε πολλά βακτήρια (Bardwell et al., 1991) και συμβάλλουν στην αναδίπλωση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης καταλύοντας τον σχηματισμό ενδο- και διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών (McBride et al., 2002).

Οι Ha et al., (2003) έδειξαν ότι γονίδια της οικογένειας DsbA απαιτούνται για τη σωστή αναδίπλωση του εκκριτικού συστήματος III σε ψευδομονάδες κατά τη μόλυνση κυττάρων HeLa. Αντίστοιχα αποτελέσματα με στελέχη *Legionella pneumophila* έδειξαν ότι η λεγιονέλλα χρησιμοποιεί την οξειδοαναγωγή DsbA για την αναδίπλωση δομικών πρωτεϊνών του Dot/Icm εκκριτικού συστήματος IV αλλά και για την επιδιόρθωση λαθών που μπορεί να γίνουν κατά την αναδίπλωση (Kradeh et al., 2015). Οι Kradeh et al., (2015) παρατήρησαν επίσης ότι απαλοιφή του γονιδίου *dsbA* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DsbA στη λεγιονέλλα είχε ως αποτέλεσμα απώλεια της παθογένειας και της κινητικότητας του βακτηρίου που είναι σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχή μόλυνση του ξενιστή (Heras et al., 2009).

Τόσο στην περίπτωση της ψευδομονάδας όσο και της λεγεονέλας η απαλοιφή γονιδίων της οικογένειας DsbA έδειξε να σχετίζεται με απώλεια της παθογένειας καθώς οι δομικές πρωτεΐνες Dot του εκκριτικού συστήματος δεν αναδιπλώθηκαν κατάλληλα λόγω της απουσίας των απαιτούμενων δισουλφιδικών δεσμών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μη σωστή δράση του εκκριτικού συστήματος T4SS που σχετίζεται άμεσα με την παθογένεια της *Coxiella* (Ha et al., 2003; Kradeh et al., 2015).

Η λεγιονέλλα και η *Coxiella* είναι ενδοκυτταρικά παθογόνα που χρησιμοποιούν το T4SS προκειμένου να μεταφέρουν πρωτεΐνες-τελεστές από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στα κύτταρα του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Lifshitz et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε ήδη, η ARI66660.1 έχει 100% ομολογία με την πρωτεΐνη Com1 (BCU_1910) της *Coxiella burnetii* Φάσης I η οποία φαίνεται να έχει δράση οξειδοαναγωγής DsbA. Η δράση της ARI66660.1 δεν είναι γνωστή και απαιτούνται πειραματικές μελέτες προκειμένου να αποδειχθεί. Σύμφωνα όμως με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, φαίνεται ότι ρυθμίζεται θετικά και τη 4^η μέρα μετά τη μόλυνση των HeLa και βάσει της βιβλιογραφίας μπορούμε να υποθέσουμε ότι συμβάλλει στην παθογένεια μέσω της σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη λειτουργία του Dot /Icm εκκριτικού συστήματος IV.

3.4.4. Η υποθετική πρωτεΐνη ARI65479.1 (OmpH) και η πρωτεΐνη ARI66478.1 με δράση μοριακής σαπερόνης GroEL φαίνεται να συμμετέχουν στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* Φάσης II μέσω της σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη ARI65479.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa, παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της CBU_0612 (OmpH) της *Coxiella burnetii* Φάσης I (Εικόνα 44).

Η συντηρημένη επικράτεια στην πρωτεΐνη ARI65479.1 της *Coxiella* Φάσης II φαίνεται να ανήκει στην πρωτεΐνη OmpH (θέση 26 έως 165) που είναι πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης.

Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη OmpH ανιχνεύεται ως αντιγόνο στις λοιμώξεις που πραγματοποιούνται από *Legionella pneumophila* ενώ η πρωτεΐνη Com1 ανιχνεύεται ενεργά σε πρωτεΐνες του ορού από ασθενής με *Rickettsia* sp. (Xiong et al., 2012). Αυτό δείχνει ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες μπορεί να σχετίζονται και με την παθογένεια της *Coxiella*.

Πράγματι, η συντηρημένη επικράτεια της πρωτεΐνης ARI65479.1 ομοιάζει με την πρωτεΐνη OmpH που έχει αναγνωριστεί ως δείκτης για την ενδοκαρδίτιδα που προκαλείται από το χρόνιο πυρετό Q (Parker et al., 2006). Πρωτεωμική προσέγγιση του αντιγονικού προφίλ στελεχών *C. burnetii* Φάσης I και Φάσης II ταυτοποίησε 2 πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης ως πιθανά αντιγόνα (Paradioti et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα οι Paradioti et al., (2011) ανέλυσαν το αδιάλυτο κλάσμα (sarcosyl-insoluble fraction) για την ανεύρεση νέων οροδιαγνωστικών δεικτών και ταυτοποίησαν την υποθετική πρωτεΐνη CBU_0937 με άγνωστη λειτουργία και την πρωτεΐνη CBU_0612 (OmpH) που όπως αναφέρθηκε είναι πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και δείκτης για την ενδοκαρδίτιδα που προκαλείται από τον πυρετό Q (Paradioti et al., 2011).

Παράλληλα, ανοσοπρωτεωμική μελέτη που χρησιμοποίησε ορό από μολυσμένα με *Coxiella* ποντίκια και από ασθενείς με πυρετό Q ανίχνευσε 20 πρωτεΐνες που εκφράστηκαν σε κύτταρα *E. coli* με σκοπό τη δημιουργία μικροσυστοιχιών για την υβριδοποίηση πρωτεϊνών του ορού των ασθενών με πυρετό Q (Xiong et al., 2012). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη OmpH, η πρωτεΐνη Com1 αλλά και η πρωτεΐνη GroEL (αναφέρεται παρακάτω), ήταν τα πιο ενεργά αντιγόνα. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και με μικροσυστοιχιές πρωτεϊνών που βασίζονται σε in vitro μεταγραφή και μετάφραση (IVTT) (το cDNA της πρωτεΐνης τοποθετείται

σε συστοιχίες και στη συνέχεια μετατρέπεται σε πρωτεΐνη με *in vitro* μεταγραφή/μετάφραση) (Beare et al., 2008).

Η πρωτεΐνη ARI65479.1 με συντηρημένη επικράτεια OmpH που ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa δεν έχει ταυτοποιημένο ρόλο στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* Φάσης II. Παρόλα αυτά φαίνεται να είναι πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που ενδεχομένως συμμετέχει, όπως και η πρωτεΐνη OmpH, στην αναδίπλωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών που προκαλούν την παθογένεια της *Coxiella* Φάσης II.

Σχετικά με την πρωτεΐνη ARI66478.1 που βρέθηκε και αυτή να ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa, εμφανίζει 100% αμινοξική ομοιότητα με την πρωτεΐνη GroEL (CBU_1910) της *Coxiella burnetii* Φάσης I.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης ARI66478.1 στην παθογένεια δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί. Παρόλα αυτά, πρωτεομικές μελέτες έχουν δείξει την πρωτεΐνη GroEL της *Coxeilla* Φάσης I, που είναι 100% ομόλογη με την ARI66478.1 της *Coxeilla* Φάσης II, να ανιχνεύεται σε μικροσυστοιχίες δειγμάτων ορού από ποντίκια και ασθενείς που είχαν προσβληθεί από *Coxiella*, αλλά και ως ενεργό αντιγόνο σε μολύνσεις από λεγιονέλλα και στρεπτοκοκκική πνευμονία (Xiong et al., 2012).

Η πρωτεΐνη GroEL είναι μια σαπερόνη που προσδένει ATP και εμπλέκεται στην αναδίπλωση πρωτεϊνικών δομών (Hemlepτάgsen et al., 1988). Υποθέτουμε ότι η πρωτεΐνη ARI66478.1 με δράση σαπερόνης GroEL μπορεί να συμμετέχει στην αναδίπλωση εκκρινόμενων πρωτεϊνών που ευθύνονται για την παθογένεια της *Coxiella* Φάσης II ή να συμμετέχει στη σωστή κυτταρική διαίρεση του παθογόνου.

Όσον αφορά στην κυτταρική διαίρεση, η πρωτεΐνη GroEL συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη FtsZ που συμμετέχει στο σχηματισμού του δακτυλίου κατά τη διαίρεση (Krupper et al., 2014). Παρόλο που ο σχηματισμός του δακτυλίου διαίρεσης είναι ανεξάρτητος από τη δράση της GroEL, η μηχανή της κυτταρικής διαίρεσης (διαιρεσόσωμα; divisionsome) είναι ασταθής όταν απουσιάζουν σαπερόνες (Krupper et al., 2014). Για το λόγο αυτό προτάθηκε ότι η GroEL συμμετέχει είτε στην στρατολόγηση των πρωτεϊνών του διαιρεσοσώματος, είτε λειτουργεί ως σταθεροποιητής του δακτυλίου επιτρέποντας την επιτυχή προσάρτηση των υπολοίπων πρωτεϊνών της μοριακής μηχανής της διαίρεσης (Ogino et al., 2004). Σύμφωνα με τα παραπάνω

φαίνεται ότι, η GroEL μπορεί ενδεχομένως να συμβάλλει και στην επιτυχή διαίρεση της *Coxiella* Φάσης II γεγονός που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό της και άρα τη διατήρηση της παθογένειας της.

Συνοψίζοντας, η θετική ρύθμιση της ARI66478.1 με πιθανή δράση σαπερόνης (GroEL) κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης της *Coxiella* Φάσης II, υποθέτουμε ότι μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια του στελέχους με ποικίλους τρόπους που αφορούν είτε τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών, ή την επιτυχή αναπαραγωγή του στελέχους κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης.

3.4.5. Ο παράγοντας Tu (πρωτεΐνη ARI65122.1) φαίνεται να συμμετέχει στην παθογένεια της *Coxiella burnetii* Φάσης II

Η πρωτεΐνη ARI65122.1 της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκε να ρυθμίζεται θετικά κατά την 4^η μέρα μετά την μόλυνση των κυττάρων HeLa, παρουσιάζει 100% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία του παράγοντα Tu (EF Tu) της *Coxiella burnetii* Φάσης I.

Η πρωτεΐνη ARI65122.1 βρέθηκε να έχει θετική ρύθμιση στην εκθετική φάση ανάπτυξης της *Coxiella burnetii* πληροφορίες όμως για το ρόλο της στην παθογένεια του στελέχους Φάσης II δεν υπάρχουν. Υποθέτουμε ότι μπορεί να συμμετέχει στην επιτυχία της παθογένειας της *Coxiella* Φάσης II διατηρώντας αποτελεσματική τη μετάφραση των πρωτεϊνών του παθογόνου.

Ο παράγοντας Tu εκφράζεται από housekeeping γονίδια (συνεχώς ενεργά γονίδια που απαιτούνται για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής λειτουργίας) και είναι κύριος παράγοντας που σχετίζεται με τη μεταφραστική μηχανή.

Με χρήση ανοσολογικών τεχνικών έχει βρεθεί ότι ο παράγοντας Tu εκφράζεται θετικά σε κύτταρα LCV της *Coxiella* ενώ φαίνεται να είναι μη ανιχνεύσιμος σε κύτταρα SCV. Σύμφωνα με τους Seshadri et al., (1999) το γεγονός αυτό υποστηρίζει ότι τα LCV και SCV κύτταρα της *Coxiella* χαρακτηρίζονται από διαφορές στις μεταβολικές τους δραστηριότητες, με τα LCV κύτταρα να διακρίνονται από εντονότερη δραστηριότητα συγκριτικά με τα SCV.

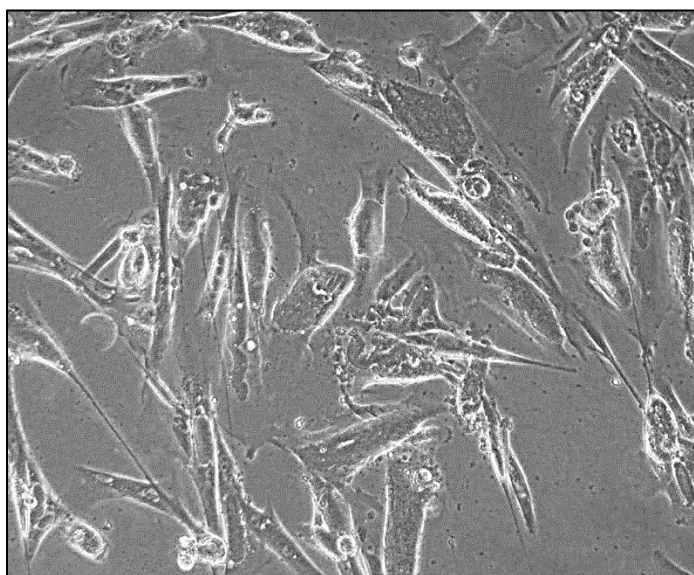
Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι, ο παράγοντας Tu παρόλο που είναι πρωτεΐνη του κυτταροπλάσματος εντοπίζεται και στην κυτταρική επιφάνεια πολλών παθογόνων (Henderson και Martin, 2011). Ο παράγοντας Tu δε φέρει προβλεπόμενες αλληλουχίες-οδηγούς ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που να δικαιολογεί την παρουσία του εκτός κυτταροπλάσματος.

Παρόλα αυτά φάνηκε ότι ο ρόλος του στην επιφάνεια παθογόνων είναι να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες άμυνας του ξενιστή ενισχύοντας τη λοιμογόνο δράση του παθογόνου (Schaumburg et al., 2004; Yu et al., 2018).

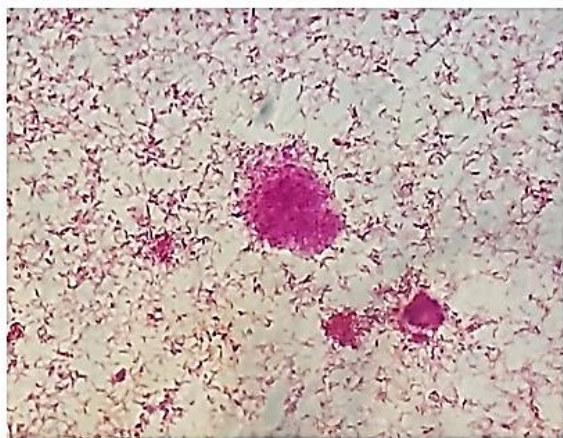
Όπως αναφέρθηκε, δεν υπάρχουν πληροφορίες για το ρόλο του παράγοντα Tu στην παθογένεια της *Coxiella* Φάσης II. Η θετική ρύθμιση που παρουσιάζει κατά την 4^η μέρα της μόλυνσης υποθέτουμε ότι μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεια της *Coxiella* Φάσης II μέσω της διατήρησης της επιτυχή αναπαραγωγής του παθογόνου ή να προέρχεται από άλλες δράσεις που χρήζουν περισσότερη διερεύνηση στη *Coxiella*.

3.5. Πρωτεομικό προφίλ της *Coxiella burnetti* Φάσης II κατά τη 2^η και 10^η μέρα μόλυνσης των κυττάρων MRC-5

Τα κύτταρα MRC-5 μολύνθηκαν με το παθογόνο (Εικόνα 41) ενώ εν συνεχεία έγινε συλλογή μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων σε 3 χρονικές περιόδους (2^η, 10^η και 19^η μέρα καλλιέργειας). Τα χρονικά διαστήματα επιβεβαιώθηκαν βάσει χρώσης Gimenez (Εικόνα 42) και ανοσοφθορισμού (Εικόνες 43, 44). Τα συγκεκριμένα χρονικά σημεία που επιλέχθηκαν φαίνεται να αντιπροσωπεύουν την λανθάνουσα φάση (2^η μέρα μετά τη μόλυνση), την εκθετική φάση (9^η μέρα) και την στατική φάση (19^η μέρα) ανάπτυξης.



Εικόνα 41: Μολυσμένα κύτταρα MRC-5 (6th day post infection)

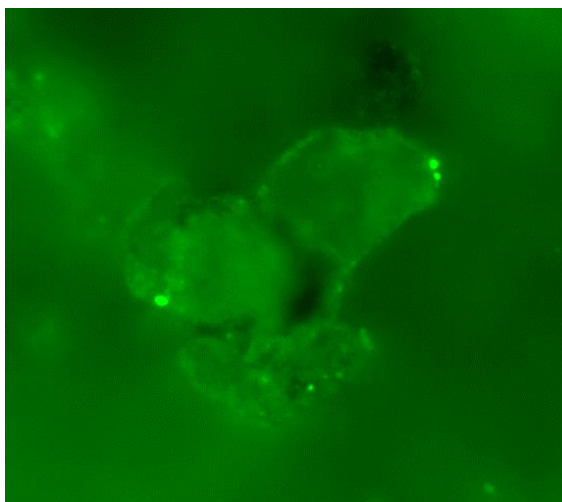


Μολυσμένα MRC-5 cells (15^η μέρα μετά την μόλυνση)

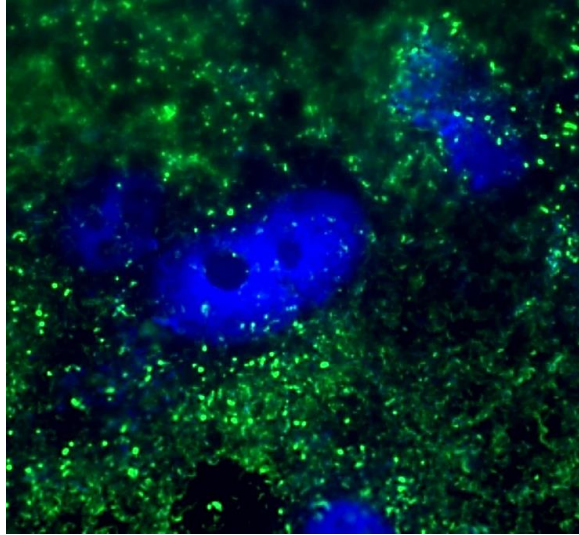


Μη μολυσμένο MRC-5 κύτταρο

Εικόνα 42: Χρώση Gimenez σε κύτταρα MRC-5 μολυσμένα με *Coxiella* Φάσης II (αριστερά), και σε μη μολυσμένα MRC-5 (δεξιά) την 15^η μέρα καλλιέργειας. Παρατηρούμε τους βακίλους της *Coxiella* χρωματισμένους με την φουξίνη, ενώ στα μη μολυσμένα κύτταρα η χρώση δεν έχει βιάψει λόγω της μη παρουσίας των βακτηρίων.



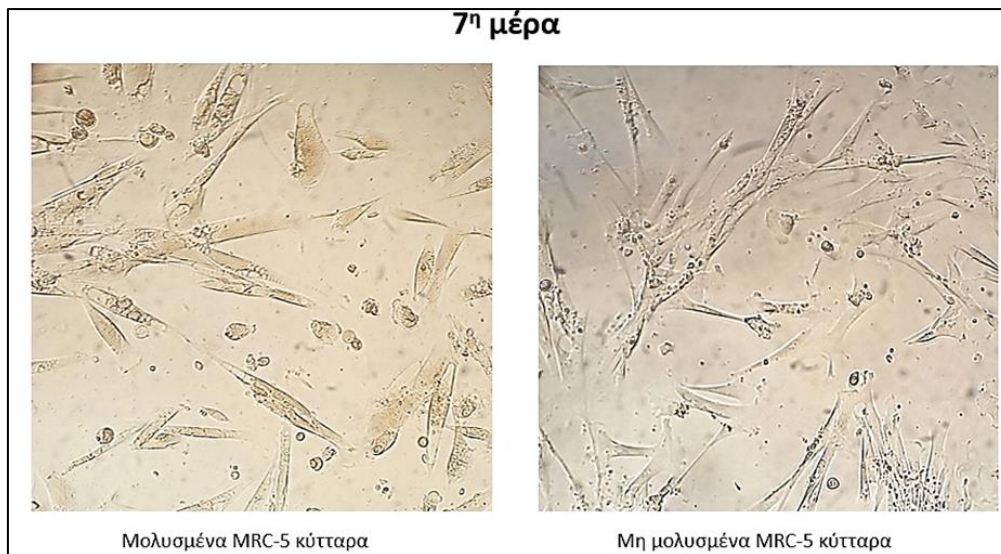
Εικόνα 43: Άμεσος ανοσοφθορισμός σε μολυσμένα κύτταρα MRC-5. Διακρίνονται 3 κύτταρα MRC-5 στην φωτογραφία, και στην μεμβράνη των MRC-5 κυττάρων διακρίνονται βάκιλοι *Coxiella*.



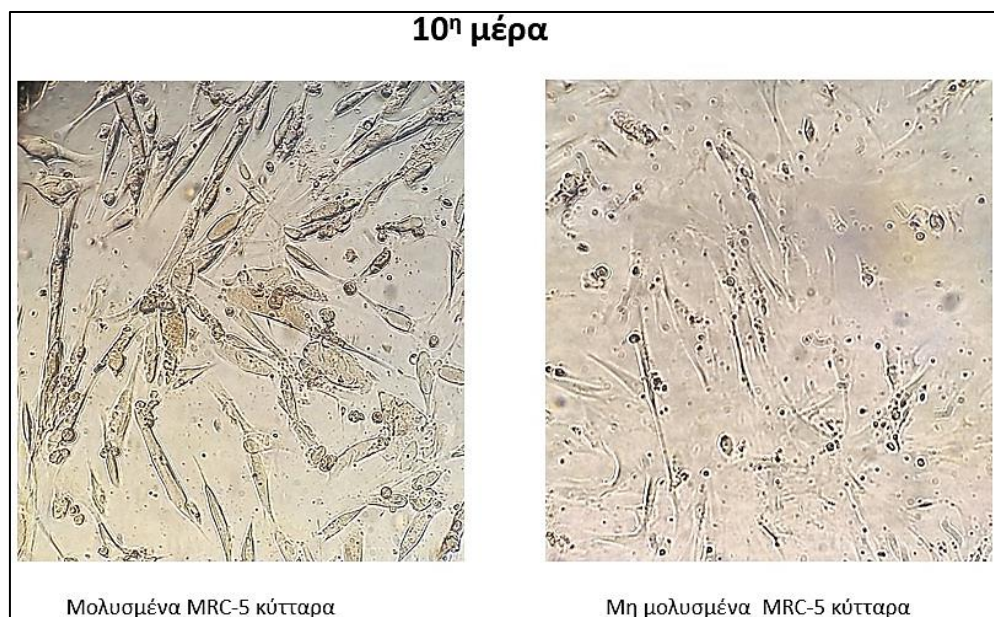
Εικόνα 44: Άμεσος ανοσοφθορισμός με DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαιουλινδόλη, προσδένεται στο DNA) , ανιχνεύει πυρήνες MRC-5 (μπλε), και με πράσινο (FITC) τους βάκιλους της *Coxiella burnetii*.

Ο αριθμός των κυττάρων MRC-5 σε κάθε φιάσκα ανερχόταν περίπου στα 8×10^6 κύτταρα. Για το κάθε χρονικό σημείο επιλογής υπήρχαν φιάσκες μολυσμένων και μη μολυσμένων κυττάρων. Η λήψη των κυττάρων έγινε όπως αναλύθηκε στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι.

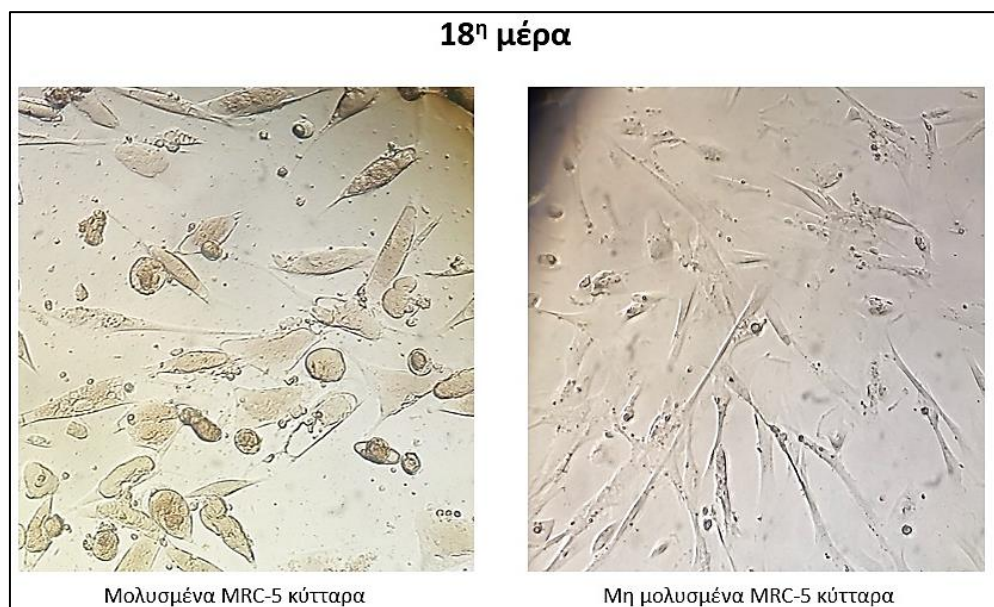
Η μικροσκοπική εικόνα των κυττάρων κατά την διάρκεια της μόλυνσης των κυττάρων MRC-5 ήταν χαρακτηριστική της ανάπτυξης των βακτηρίων όπως φαίνεται και στις Εικόνες 45-47 που ακολουθούν.



Εικόνα 45: Μολυσμένα MRC-5 με *Coxiella* Φάσης II την 7η ημέρα μετά την μόλυνση (αριστερά), μη μολυσμένα κύτταρα MRC-5 (δεξιά).



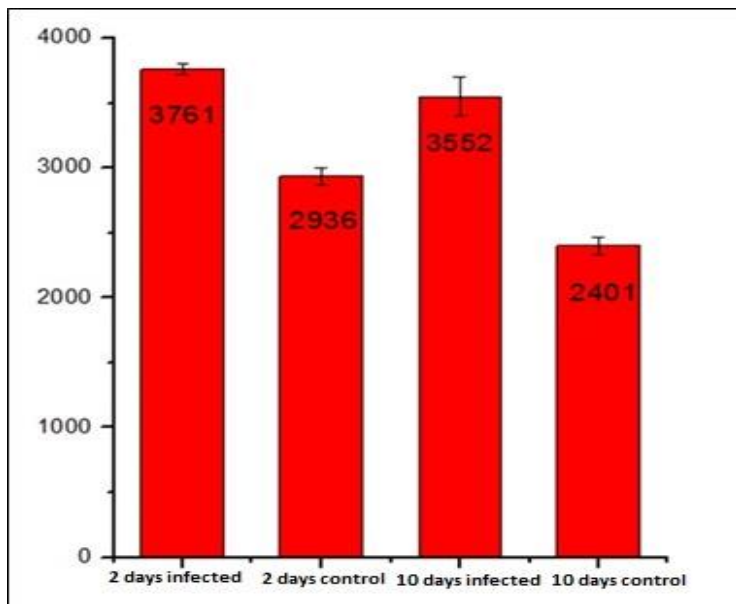
Εικόνα 46: Μολυσμένα MRC-5 με *Coxiella* Φάσης II την 10η ημέρα μετά την μόλυνση (αριστερά), μη μολυσμένα κύτταρα MRC-5 (δεξιά).



Εικόνα 47: Μολυσμένα MRC-5 με *Coxiella* Φάσης II την 18η ημέρα μετά την μόλυνση (αριστερά), μη μολυσμένα κύτταρα MRC-5 (δεξιά).

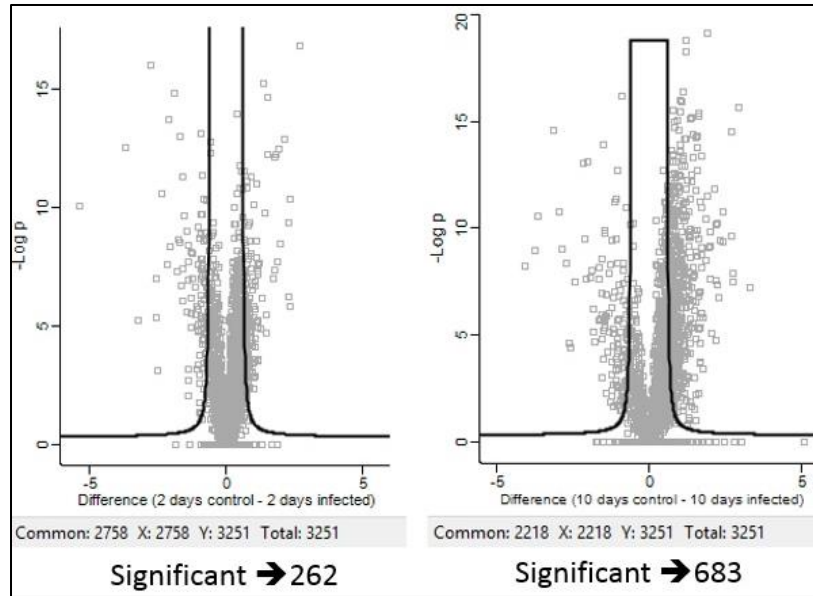
Κατά την ανάλυση του πρωτεύματος τριών βιολογικών δειγμάτων των μολυσμένων κυττάρων MRC-5 και των τριών των μη μολυσμένων κυττάρων (control) αντίστοιχα,

ανιχνεύθηκαν συνολικά οι πρωτεΐνες που παρατίθενται στην Εικόνα 48, με τουλάχιστον 4 και παραπάνω μοναδικά πεπτίδια :



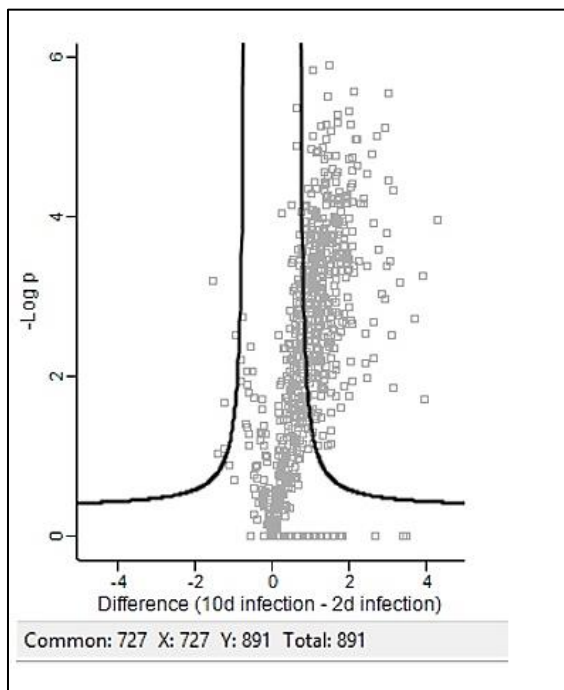
Εικόνα 48. Συνολικές πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν μετά την ανάλυση του πρωτεώματος στα βιολογικά δείγματα που αφορούν α) την 2η και 10η ημέρα μετά την μόλυνση των MRC-5 με *Coxiella burnetii* Nine Mile φάσης II, και β) των μη μολυσμένων MRC-5 κυττάρων στις αντίστοιχες ημέρες καλλιέργειας.

Τα πρωτεομικά δεδομένα της *Coxiella* φάσης II που έχουν προκύψει από την ανάλυση των δύο εκ των τριών χρονικών σημείων (2^{ης} και 10^{ης} μέρας) δείχνουν θετική ρύθμιση για 262 πρωτεΐνες κατά τη 2^η ημέρα μετά την μόλυνση και 683 πρωτεΐνες για την 10^η ημέρα μετά την μόλυνση (Εικόνα 49).



Εικόνα 49: Volcano plot ανθρώπινων πρωτεϊνών μεταξύ της 2ης και 10ης ημέρας μετά την μόλυνση των MRC-5 κυττάρων (FDR : 0.01, So : 0.9).

Σύγκριση μεταξύ των δύο χρονικών σημείων έδειξε ότι υπάρχουν 373 σημαντικές πρωτεΐνες μεταξύ της 2^{ης} και της 10^{ης} ημέρας στην *Coxiella* Φάσης II (Εικόνα 50).



Εικόνα 50 : Volcano plot για την σύγκριση των πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* μεταξύ της 2ης και 10ης ημέρας μετά την μόλυνση των MRC-5 κυττάρων. Ανευρέθηκαν 373 σημαντικές πρωτεΐνες. (FDR : 0.01, So : 0.9)

Παρατηρείται ότι οι σημαντικές πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* Φάσης II που βρέθηκαν στα κύτταρα MRC-5 ήταν πολύ περισσότερες σε σχέση με αυτές που βρέθηκαν στα κύτταρα HeLa σε παρόμοια μέρα μετά τη μόλυνση (957 πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* κατά την μόλυνση των MRC-5, έναντι 6 πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* κατά την μόλυνση των HeLa). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στα κύτταρα MRC-5 χρησιμοποιήθηκε θρυψίνη για την αποκόλληση των κυττάρων από την φλάσκα, ενώ στα κύτταρα HeLa χρησιμοποιήσαμε scraper, και κατά συνέπεια έγινε σπάσιμο αρκετών κυττάρων με αυτήν την μηχανική μέθοδο. Επίσης είναι πιθανόν η φυγοκέντρηση που έγινε για την λήψη των κυττάρων MRC-5 ήταν ήπια (1200rpm για 5-6 λεπτά), σε αντίθεση με τα κύτταρα HeLa τα οποία φυγοκεντρήθηκαν σε μέγιστες στροφές (~4300 rpm) για 1 ώρα. Αυτό μπορεί να συνέβαλλε στη διάρρηξη των κυττάρων κατά την διάρκεια μιας τόσο έντονης φυγοκέντρησης.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ανάλυση του πρωτεώματος της *Coxiella* μετά από μόλυνση κυττάρων MRC-5 πραγματοποιήθηκε μόλις πρόσφατα ενώ εκκρεμεί ακόμη η ανάλυση του τρίτου χρονικού σημείου που επιλέχθηκε. Για τους λόγους αυτούς περαιτέρω αποσαφήνιση και συζήτηση του ρόλου των πρωτεϊνών είναι σε εξέλιξη και χρήζει περισσότερης διερεύνησης.

4. Συμπεράσματα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έγινε μελέτη της ανάπτυξης του βακτηρίου *C.burnetii* Nine Mile (RSA 439) Φάσης II σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές (HeLa, VERO και MRC-5) καθώς και σε αξενικό μέσο καλλιέργειας, με σκοπό να απομονωθεί το εκκριτικό σύστημα αλλά και να αναλυθεί το πρωτέωμα του παθογόνου σε διαφορετικές ημέρες μόλυνσης. Παράλληλα, έγιναν προσπάθειες απομόνωσης των πρωτεϊνών DotC και DotD του εκκριτικού συστήματος T4SS μέσω υπερέκφραση τους σε πλασμιδιακούς φορείς.

Οι πρωτεΐνες DotC και DotD φαίνεται να συμμετέχουν στο σχηματισμό του διαύλου έκκρισης του T4SS και για το λόγο αυτό η επαγόμενη έκφρασή τους μέσω κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων διασφαλίζει επαρκείς ποσότητες πρωτεΐνης για χαρακτηρισμό μέσω

φασματομετρίας μάζας και κρυστάλλωσης για αποσαφήνιση των δομών τους. Όπως αναφέρθηκε, η υπερέκφραση και η απομόνωση της DotC ήταν επιτυχής, και συλλέχθηκε ποσότητα πρωτεΐνης για περαιτέρω ανάλυση. Αντίθετα, προσπάθειες υπερέκφρασης της DotD έδειξαν ότι είναι πιθανόν να χρειάζεται να ξαναγίνουν τα πειράματα κάτω από άλλες συνθήκες.

Όσον αφορά στα πειράματα μόλυνσης των κυτταρικών σειρών HeLa, Vero και MRC-5 καθώς και του αξενικού μέσο καλλιέργειας με *Coxiella* Φάσης II, η απομόνωση του βακτηριακού πρωτεώματος σε διαφορετικές μέρες έγινε με επιτυχία. Παρατήρηση με οπτική μικροσκοπία, ανοσοφθορισμό και χρώση Gimenez, επιβεβαίωσαν αρχικά την επιτυχή μόλυνση των κυτταροκαλλιεργειών με *Coxiella* Φάσης II. Τα κύτταρα των ξενιστών φάνηκαν να διογκώνονται μετά την επιμόλυνση, στοιχείο που δείχνει επιτυχή μόλυνση, ενώ ο ανοσοφθορισμός αλλά και η χρώση Gimenez έδειξαν τον εντοπισμό του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή. Στα πειράματα μόλυνσης, η απομόνωση του εκκριτικού συστήματος της *Coxiella* με διαλυτοποίηση και κλασματοποίηση των κυττάρων VERO δεν ήταν επιτυχής, ενώ ανεπιτυχής ήταν επίσης και η απομόνωση του εκκριτικού συστήματος απουσία ξενιστού (αξενικού μέσου καλλιέργειας).

Το πρωτέωμα της *Coxiella* Φάσης II απομονώθηκε με επιτυχία κατά τη 2^η, 10^η μέρα της μόλυνσης κυττάρων MRC-5, ενώ βρίσκεται σε εξέλιξη και η ανάλυση του πρωτεώματος της 19^{ης} μέρας μετά την μόλυνση. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι απομονώθηκαν ~950 πρωτεΐνες της *Coxiella* Φάσης II εκ των οποίων ~370 σημαντικά διαφορετικές, όμως όπως ήδη σχολιάστηκε η πρωτεωμική ανάλυση είναι ακόμη σε εξέλιξη με αποτέλεσμα πιο λεπτομερής χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών να μη περιλαμβάνεται στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες της *Coxiella* Φάσης II που ταυτοποιήθηκαν με επιτυχία κατά τη 4^η μέρα της μόλυνσης κυττάρων της καρκινικής σειράς HeLa (6 πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* Nine Mile ανιχνεύθηκαν), ο αριθμός τους έρχεται σε αντίθεση με τον αριθμό των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν από την μόλυνση των MRC-5. Όπως αναφέραμε, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να προκύπτει λόγω α) της χρήσης της θρυψίνης ως μέσο αποκόλλησης των κυττάρων από την φλάσκα, έναντι του scraper που μπορεί να σπάσει τα κύτταρα, β) λόγω της ήπιας φυγοκέντρησης που υπέστη τα MRC-5 μετά την αποκόλληση τους και γ) λόγω του λιγότερου χρόνου φυγοκέντρησης (~7 λεπτά έναντι 60 λεπτών) που υπέστη τα MRC-5.

Τα αποτελέσματα για τα HeLa έδειξαν πρωτεΐνες που επιτελούν διαφορετικές δράσεις στο παθογόνο. Όπως συζητήθηκε λεπτομερώς στην ενότητα Αποτελέσματα-Συζήτηση, θετική ρύθμιση εμφάνισαν πρωτεΐνες με δράση περοξυρεδοξίνης που εμπλέκονται στην καταπολέμηση των ελευθέρων ριζών καθώς και πρωτεΐνες με δράση δισουλφιδικής οξειδοαναγωγής, που εμπλέκονται στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου αποτελούν μέσω άμυνας από τους ξενιστές με σκοπό την αντιμετώπιση των παθογόνων. Τα κύτταρα HeLa ακολουθούν αυτό το μηχανισμό άμυνας όταν προσβάλλονται από παθογόνα. Σύμφωνα με αυτό, δεν αποτελεί έκπληξη η έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων από την *Coxiella* Φάσης II προκειμένου να κατασταλεί ο μηχανισμός αντίστασης του ξενιστή. Αντίστοιχα οι πρωτεΐνες με δράση δισουλφιδικής οξειδοαναγωγής έχουν αναφερθεί από τη βιβλιογραφία ότι εμπλέκονται στην παθογένεια του βακτηρίου μέσω σωστής αναδίπλωσης του εκκριτικού συστήματος T4SS. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, παθογόνα που δεν εκφράζουν πρωτεΐνες με δράση δισουλφιδικών οξειδοαναγωγασών χάνουν την παθογένεια τους καθώς επηρεάζεται η δράση του εκκριτικού συστήματος Dot/Icm.

Άλλες πρωτεΐνες που βρέθηκαν να ρυθμίζονται θετικά κατά την μόλυνση των κυττάρων HeLa ήταν η πρωτεΐνη-συνοδός GroEL και ο παράγοντας Tu που σχετίζεται με την μετάφραση. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν πολύ διακριτούς ρόλους στο γένωμα των βακτηρίων. Παρόλα αυτά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι, μπορεί να χαρακτηρίζονται από παραπάνω δράσεις καθώς η GroEL πέρα από σαπερόνη, φαίνεται να παίζει ρόλο στην κυτταρική διαίρεση των παθογόνων. Αντίστοιχα για την πρωτεΐνη Tu, είναι ενδιαφέρον ότι παρόλο που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα πρόσφατα απομονώθηκε σε μεμβράνες παθογόνων χωρίς να φέρει αλληλουχία-οδηγό. Ο ρόλος της πρωτεΐνης Tu σχετίστηκε με την παθογένεια των βακτηρίων όπως συζητήθηκε αναλυτικότερα στην ενότητα Αποτελέσματα-Συζήτηση.

Οι τελευταίες δύο πρωτεΐνες που φαίνεται να ρυθμίζονται θετικά κατά την 4^η μέρα μόλυνσης των HeLa από στελέχη *Coxiella* Φάσης II, είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη OmpH και πρωτεΐνη με δράση GMP συνθάσης. Η GMP συνθάση μπορεί να εμπλέκεται στην παθογένεια του στελέχους επηρεάζοντας τα επίπεδα των διαθέσιμων πουρινών (βλ. ενότητα Αποτελέσματα-Συζήτηση), ενώ προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου ταυτοποίησαν την OmpH ως ισχυρό αντιγόνο και προτάθηκε ως νέος οροδιαγνωστικός δείκτης.

Το επόμενο βήμα του εργαστηρίου είναι η ταυτοποίηση και μελέτη των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν μετά τη μόλυνση των κυττάρων MRC-5 που θα αποτελεί και την πρώτη μελέτη χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών της *Coxiella* Φάσης II σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Βρανάκης Ι.**, (2010). Μελέτη μοριακών μηχανισμών παθογένειας και αντιβιοτικής ανθεκτικότητας του φορέως του πυρετού Q *Coxiella burnetii*, ενός ενδοκυττάριου βακτηρίου. Ηράκλειο
2. **Πουλάς Κ., Σιδεράς Σ.**, (2015). Εργαστηριακές Μέθοδοι Ανάλυσης Πρωτεϊνών, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα.
3. **Angelakis, E., Raoult, D.**, (2010). Q fever. *Vet Microbiol* 140:297–309.
4. **Backert, S., Grohmann, E.**, (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 413.
5. **Bardwell, J.C., McGovern, K., Beckwith, J.** (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67(3):581-9.
6. **Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A** (2006). Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole genome comparisons. *J. Bacteriol.* 188:2309-24.
7. **Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., et al.** (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect Immun* 77:642-56.
8. **Beare, P.A., Howe, D., Cockrell, D.C., Omsland, A., Hansen, B., Heinzen, R.A.** (2009). Characterization of a *Coxiella burnetii* ftsZ mutant generated by Himar1 transposon mutagenesis. *J Bacteriol* 191:1369-81.
9. **Beare P.A., Gilk, S.D., Larson, C.L., Hill, J., Stead, C.M., Omsland, A., Cockrell DC, Howe D, Voth DE, Heinzen RA.** (2011). Dot/Icm Type 1000 IVB Secretion System Requirements for *Coxiella burnetii* Growth in Human Macrophages. *MBio* 2011 2: e00175-11.
10. **Beare, P.A.** (2012). Genetic manipulation of *Coxiella burnetii*. *Adv Exp Med Biol* 984:249-71.

11. **Beare**, P.A., Jeffrey, B.M., Long, C.M., Martens, C.M., Heinzen, R.A. (2018). Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLoS Pathog* 14: e1006922.
12. **Boncompain**, G., Schneider, B., Delevoye, C., Kellermann, O., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., (2010). Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 78(1):80-7.
13. **Blundell**, R. D., Williams, S. J., Arras, S. D., Chitty, J. L., Blake, K. L., Ericsson, D. J., Tibrewal, N., Rohr, J., Koh, Y. Q., Kappler, U., Robertson, A. A., Butler, M. S., Cooper, M. A., Carreras, C.W., Santi, D.V. (1995). The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem*. 64:721-62.
14. **Chitty**, J.L., Tatzenko, T.L., Williams, S.J., Koh, Y.Q., Corfield, E.C., Butler, M.S., Robertson, A.A., Cooper, M.A., Kappler, U., Kobe, B., Fraser, J.A. (2017). GMP synthase is Required for virulence factor production and infection by *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem*. 292(7):3049-3059.
15. **Clarke**, D.J., Ortega, X.P., Mackay, C.L., Valvano, M.A., Govan, J.R., Campopiano, D.J., Langridge-Smith, P., Brown, A.R., (2010). Subdivision of the bacterioferritin comigratory protein family of bacterial peroxiredoxins based on catalytic activity. *Biochemistry* 49(6):1319-30.
16. **Cherla**, R., Zhang, Y., Ledbetter, L., Zhang, G. (2018). *Coxiella burnetii* inhibits neutrophil apoptosis by exploiting survival pathways and antiapoptotic protein Mcl-1. *Infect Immun* 86:e00504-17.
17. **Coleman**, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A. (2004). Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol*. 186:7344-52.
18. **Coleman** SA, Fischer ER, Cockrell DC, Voth DE, Howe D, Mead DJ, Samuel JE, Heinzen RA. (2007). Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect Immun* 75:290-8.
19. **Dresler**, J., Klimentova, J., Pajer, P., Salovska, B., Fucikova, A.M., Chmel, M., Schmoock, G., Neubauer, H., Mertens-Scholz, K. (2019). Quantitative proteome profiling of *Coxiella*

- burnetii reveals major metabolic and stress differences under axenic and cell culture cultivation. *Front Microbiol.* 10: 2022.
20. **Derrick**, E.H.. (1937). "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis, and laboratory investigation. *Med J Aust.*,2: 281-99.
 21. **Dragan**, A.L., Kurten, R.C., Voth, D.E. (2019). Characterization of early stages of human alveolar infection by the Q fever agent *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 87: e00028-19.
 22. **Dyer**, R.E. (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Human infection. Pub. Health Rep.* 53: 2277-82.
 23. **Eldin** C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clin Microbiol Rev* 30:115-90.
 24. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance systems overview [Internet, downloadable spreadsheet]. Stockholm: ECDC; 2018. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-systems-overview-2017>.
 25. **Franklin**, M. C., Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M., Gary, E., Hillerich, B., Yao, Z. K., Carlier, P. R., Totrov, M., Love, J. D. (2015). Structural genomics for drug design against the pathogen *Coxiella burnetii*. *Proteins* 83: 2124–2136.
 26. **Frazier**, M.E., Heinzen, R.A., Stiegler, G.L, Mallavia, L.P., (1991). Physical mapping of the *Coxiella burnetii* genome. *Acta Virol.* 35:511-8.
 27. **Gillet**, L. C., Leitner, A., & Aebersold, R. (2016). Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: Entering the high-throughput era for hypothesis testing. *Annual Review of Analytical Chemistry* 9(1): 449–472.
 28. **Gimenez**, D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Techn.* 39:135–140.
 29. **Glazunova** O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D.(2005). *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis* 11:1211-7.
 30. **Gomes**, M.M., Chaves, A., Gouveia, A., Santos, L. (2014). Two rare manifestations of Q fever: splenic and hepatic abscesses and cerebral venous thrombosis, with literature review ma non troppo. *BMJ Case Rep*: bcr2013202843.

31. **Grohmann**, E., Christie, P.J., Waksman, G., Backert. S., (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 107(4): 455–471.
32. **Gürtler** L, Bauerfeind U, Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H., (2014). *Coxiella burnetii* - pathogenic agent of Q (Query) fever. *Transfus Med Hemother.* 41(1):60-72.
33. **Ha**, U.-H., Wang, Y., Jin, S. (2003). DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect Immun.* 71(3):1590-5.
34. **Hackstadt**, T., Peacock, M.G., Hitchcock, P.J., Cole, R.L. (1985). Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun* 48:359-65.
35. **Hackstadt**, T. (1986). Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect. Immun.* 52:337-40.
36. **Heinzen**, R.A., Howe, D., Mallavia, L.P., Rockey, D.D., Hackstadt, T. (1996). Developmentally regulated synthesis of an unusually small, basic peptide by *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol.* 22(1):9-19.
37. **Hemmingsen S.M.**, Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333(6171):330-4.
38. **Hemsley**, C.M., O'Neill, P.A., Essex-Lopresti, A., Norville, I.H., Atkins, T.P., Titball, R.W. (2019). Extensive genome analysis of *Coxiella burnetii* reveals limited evolution within genomic groups. *BMC Genomics.* 20(1):441.
39. **Heras**, B., Shouldice, S.R., Totsika, M., Scanlon, M.J., Schembri, M.A., Martin, J.L (2009). DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 7:215–225.
40. **Hernandez-Valladares**, M., Aasebø, E., Mjaavatten, O., Vaudel, M., Bruserud, Ø., Berven, F., Selheim, F., (2016). Reliable FASP-based procedures for optimal quantitative proteomic and phosphoproteomic analysis on samples from acute myeloid leukemia patients. *Biol. Proced. Online*: 18, 13.

41. **Hicks**, L.D., Raghavan, R., Battisti, J.M., Minnick MF. (2010). A DNA-binding peroxiredoxin of *Coxiella burnetii* is involved in countering oxidative stress during exponential-phase growth. *J Bacteriol.* 192(8):2077-84.
42. **Hotta**, A., Kawamura, M., To, H., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K. (2002). Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 70(8):4747-9.
43. **Howe**, D., Mallavia, L.P. (2000). *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun.* 68(7):3815-21.
44. **Huang**, Q., Yang, L., Luo, J., Guo, L., Wang, Z., Yang, X., Jin, W., Fang, Y., Ye, J., Shan, B., Zhang, Y., (2015). SWATH enables precise label-free quantification on proteome scale *Proteomics* 15 (7): 1215–1223.
45. **Jager**, C., Lautenschlager, S., Willems, H., Baljer, G., (2002). *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol* 89:161-6.
46. **Ishihama**, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., Mann, M., (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* 4(9): 1265–1272.
47. **Kang**, J.S., (2012). Principles and applications of LC-MS/MS for the quantitative bioanalysis of analytes in various biological samples. In: Tandem mass spectrometry - applications and principles, Prasain, J. (ed), InTech, Croatia ISBN: 978-953-51-0141-3.
48. **Klingenbeck**, L., Eckart, R.A., Berens, C., Luhrmann, A. (2013). The *Coxiella burnetii* type IV secretion system substrate CaeB inhibits intrinsic apoptosis at the mitochondrial level. *Cell Microbiol* 15:675-87.
49. **Kohler**, L. J., Roy, C.R. (2015). Biogenesis of the lysosome-derived vacuole containing *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect.* 17(0): 766–771.
50. **Kpadeh**, Z.Z., Day, S.R., Mills, B.W., Hoffman, P.S. (2015). Legionella pneumophila utilizes a single-player disulfide-bond oxidoreductase system to manage disulfide bond formation and isomerization. *Mol Microbiol.* 95(6):1054-69.

51. **Kupper**, M., Guptas S.K., Feldhaars H., Gross, R. (2014). Versatile roles of the chaperonin GroEL in microorganism-insect interactions. *FEMS Microbiol Lett.* 353(1):1-10.
52. **Lander**, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
53. **Larson**, C.L., Martinez, E., Beare, P.A., Jeffrey, B., Heinzen, R.A., Bonazzi, M., (2016). Right on Q: genetics begin to unravel *Coxiella burnetii* host cell interactions. *Future Microbiol* 792(11):919-39.
54. **Lautenschlager**, S., Willems, H., Jager, C., Baljer, G. (2000). Sequencing and characterization of the cryptic plasmid QpRS from *Coxiella burnetii*. *Plasmid* 44:85-8.
55. **Luhrmann**, A., Roy, C.R. (2007). *Coxiella burnetii* inhibits activation of host cell apoptosis through a mechanism that involves preventing cytochrome c release from mitochondria. *Infect Immun* 75:5282-9.
56. **Lifshitz**, Z., Burstein, D., Peeri, M., Zusman, T., Schwartz, K., Shuman, H.A., Pupko, T., Segal, G. (2013). Computational modeling and experimental validation of the Legionella and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *PNAS* 19110(8):E707-15.
57. **McBride**, J. W., Ndip, L.M., Popov, V.L., Walker, D.H., (2002). Identification and Functional Analysis of an immunoreactive DsbA-Like thio-disulfide oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infect Immun.* 70(5): 2700–2703.
58. **Macdonald**, L.J., Graham, J.G., Kurten, R.C., Voth, D.E. (2014). *Coxiella burnetii* exploits host cAMP-dependent protein kinase signalling to promote macrophage survival. *Cell Microbiol.* 16:146-59.
59. **Manza**, L.L., Stamer, S.L., Ham, A.J., Codreanu, S.G., Liebler, D.C., (2015). Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. *Proteomics* 5:1742–5.
60. **Marchler-Bauer A**, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Geer LY, Bryant SH. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res.* 45(D):200-3.

61. **Marrie**, T.J., Mandell, G.L., Bennett, J.F., Dolin, F. (2000). *Coxiella burnetii* (Q fever). In: Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone pp. 2043–2050.
62. **McCaul**, T.F., Williams, J.C., (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol.* 147(3):1063-76.
63. **McDonough**, J.A., Newton, H.J., Roy, C.R. (2012). *Coxiella burnetii* secretion systems. *Adv Exp Med Biol* 984:171-97.
64. **Melenotte** C, Izaaryene J, Gomez C, Delord M, Prudent E, Lepidi H, Mediannikov O, Lacoste M, Djossou F, Mania A, Bernard N, Huchot E, Mège JL, Brégeon F, Raoult D. (2018). *Coxiella burnetii*: A hidden pathogen in interstitial lung disease? *Clin Infect Dis* 67:1120-4.
65. **Merhej**, V., Tattevin, P., Revest, M., Le Touvet, B., Raoult, D. (2012). Q fever osteomyelitis: a case report and literature review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35:169-72.
66. **Millar**, J.A., Beare, P.A., Moses, A.S., Martens, C.A., Heinzen, R.A., Raghavan, R. (2017). Whole-genome sequence of *Coxiella burnetii* Nine Mile RSA439 (Phase II, Clone 4), a laboratory workhorse strain. *Genome Announc.* 5(23). pii: e00471-17.
67. **Millar**, J.A., (2017). Uncovering *Coxiella burnetii*'s pathogenicity by elucidating its metabolism and host interactions. MSc thesis, Portland State University, pp. 190.
68. **Minnick** MF, Heinzen RA, Douthart R, Mallavia LP, Frazier ME. (1990). QpRS-specific sequences from *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci* 590:514-22.
69. **Moos**, A., Hackstadt, T. (1987). Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect. Immun.* 55:1144-50.
70. **Morrow**, C. A., Valkov, E., Stamp, A., Chow, E. W., Lee, I. R., Wronski, A., Williams, S. J., Hill, J. M., Djordjevic, J. T., Kappler, U., Kobe, B., Fraser, J. A. (2012). De novo GTP biosynthesis is critical for virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens* 8: e1002957.
71. **Ning**, Z., Yu, S.R., Quan, Y.G., Xue, Z. (1992). Molecular characterization of cloned variants of *Coxiella burnetii* isolated in China. *Acta Virol* 36:173-83.

72. **Omsland A**, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Heinzen RA. (2009). Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *PNAS* 106:4430-4.
73. **Omsland A**, Beare PA, Hill J, Cockrell DC, Howe D, Hansen B, Samuel JE, Heinzen RA. (2011). Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl Environ Microbiol* 77:3720-5.
74. **Omsland, A.**, Hackstadt, T., Heinzen, R.A. (2013). Bringing culture to the uncultured: *Coxiella burnetii* and lessons for obligate intracellular bacterial pathogens. *PLoS Pathog* 9: e1003540.
75. **Panday, A.**, Sahoo, M.K., Osorio, D., Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 12:5-23.
76. **Papadioti, A.**, Markoutsas, S., Vranakis, I., Tselentis, Y., Karas, M., Psaroulaki, A., Tsiotis, G., (2011). A proteomic approach to investigate the differential antigenic profile of two *Coxiella burnetii* strains. *Journal of Proteomics* 74(7): 1150-1159.
77. **Parker, N.**, Barralet, J., Bell, A., (2006). Q fever. *Lancet*, 367: 679-688.
78. **Peng, Y.**, Zhang, Y., Mitchell, W.J., Zhang, G. (2012). Development of a lipopolysaccharide-targeted peptide mimic vaccine against Q fever. *J Immunol*. 189(10):4909-20.
79. **Qiu, J.**, Luo, Z.Q. (2017). Legionella and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol* 15:591-605.
80. **Ong, S.-E.**, Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by αεπτάο acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1(5): 376–386.
81. **Rappsilber, J.**, Ishihama, Y., Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrixassisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*. 75:663–70.
82. **Rodriguez-Suarez, R.**, Xu, D., Veillette, K., Davison, J., Sillaots, S., Kauffman, S., Hu, W., Bowman, J., Martel, N., Trosok, S., Wang, H., Zhang, L., Huang, L. Y., Li, Y., Rahkhoodae, F., et al. (2007). Mechanism-of-action deterλεπτάοation of GMP synthase inhibitors and

- target validation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Biol.* 14: 1163–1175.
83. **Roest**, H.I., Bossers, A., van Zijderveld, F.G., Rebel, J.M (2013). Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Vet Q* 33:148-60.
 84. **Samuel**, J.E., Frazier, M.E., Kahn, M.L., Thomashow, L.S., Mallavia, L.P. (1983). Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 41:488-93.
 85. **Samuel**, J.E., Frazier, M.E., Mallavia, L.P. (1985). Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 49:775-9.
 86. **Samuel**, J.E., Frazier, M.E., Mallavia, L.P. (1988). Stability of plasmid sequences in an acute Q823 fever strain of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol* 134:1795-805.
 87. **Sandoz KM**, Popham DL, Beare PA, Sturdevant DE, Hansen B, Nair V, Heinzen RA.. (2016). Transcriptional profiling of *Coxiella burnetii* reveals extensive cell wall remodeling in the small cell variant developmental form. *PLoS One* 11: e0149957.
 88. **Schaumburg J**, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jänsch L, Wehland J, Kärst U. (2004). The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* 4:2991–3006.
 89. **Segal G.**, Feldman M., Zusman T., (2005). The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*, *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2005) 65–81
 90. **Seshadri**, R., Hendrix, L.R., Samuel, J.E. (1999). Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 67(11): 6026–6033.
 91. **Seshadri**, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., et al. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *PNAS* 100:5455-60.
 92. **Shannon**, J.G., Howe, D., Heinzen, R.A. (2005). Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *PNAS* 102:8722-7.

93. **Silva**, J. C., Gorenstein, M. V., Li, G. -Z., Vissers, J. P. C., & Geromanos, S. J. (2006). Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Molecular & Cellular Proteomics* 5(1): 144–156.
94. **Stead**, C.M., Omsland, A., Beare, P.A., Sandoz, K.M., Heinzen, R.A. (2013). Sec-mediated secretion by *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.* 13:222.
95. **Storz**, G., and M. Zheng. 2000. Oxidative stress, *In* G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, DC p. 47–60.
96. **Süss**, J., Fingerle, V., Hunfeld, K.P., Schrader, C., Wilske, B., (2004). Durch Zecken übertragbare humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz*, 47:470–486.
97. **Valkova**, D., Kazar, J., (1995). A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett* 125:275-80.
98. **Van Schaik**, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M., Samuel, J.E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol* 11:561-73.
99. **Vazquez**, C.L., Colombo, M.I. (2010). *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ.*17 (3):421–38.
100. **Vildhede**, A., Wiśniewski, J. R., Norén, A., Karlgren, M., & Artursson, P. (2015). Comparative proteomic analysis of human liver tissue and isolated hepatocytes with a focus on proteins deterλεπτάίng drug exposure. *Journal of Proteome Research* 14(8): 3305–3314.
101. **Vishwanath**, S., Hackstadt, T. (1988). Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 56:40-4.
102. **Voth**, D.E., Heinzen, R.A. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol.*, 9:829-40.
103. **Voth**, D.E., Heinzen, R.A. (2009). Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for *Coxiella burnetii* antiapoptotic activity. *Infect Immun* 77:205-13.
104. **Walker**, D., Roault, D., DumLer, J.S., Marrie, T., Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L. (2001). Rickettsia, Mycoplasma and Chlamydia *In*:

- Harrison's principles of internal medicine. 15th ed. Philadelphia: McGraw Hill, pp. 1065–1073.
105. **Wang**, G., Olczak, A.A., Walton, J. P., Maier, R.J., (2005). Contribution of the *Helicobacter pylori* thiol peroxidase bacterioferritin comigratory protein to oxidative stress resistance and host colonization. *Infect. Immun.* 73:378–384
 106. **Wiese**, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E., & Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7(3): 340–350.
 107. **Wisniewski**, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6:359–62.
 108. **Wisniewski**, J.R., Zougman, A., Mann, M. (2009). Combination of FASP and StageTip based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. *J Proteome Res.* 8:5674–8.
 109. **Wisniewski**, J.R., Ostasiewicz, P., Dus, K., Zielinska, D.F., Gnad, F., Mann, M., (2012). Extensive quantitative remodeling of the proteome between normal colon tissue and adenocarcinoma, *Mol. Syst. Biol.* 8: 611.
 110. **Wisniewski**, J.R., Hein, M.Y., Cox, J., Mann, M., (2014). A "proteomic ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol. Cell. Proteomics* 13 (12): 3497–3506.
 111. **Wong**, J.W., Cagney, G., (2010). An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 604:273-83. doi: 10.1007/978-1-60761-444-9_18.
 112. **Xiong**, X., Wang, X., Wen, B., Graves, S., Stenos, J., (2012). Potential serodiagnostic markers for Q fever identified in *Coxiella burnetii* by immunoproteomic and protein microarray approaches. *BMC Microbiology* 12: 35.
 113. **Yates** III, J.R. (2011). A century of mass spectrometry: from atoms to proteomes. *Nature Methods*, 8(8): 633–637.

114. Yu, Y., Wang, H., Wang, J., Feng, Z., Wu, M., Liu, B., Xin, J., Xiong, Q., Liu, M., Shao, G., (2018). Elongation Factor thermo unstable (EF-Tu) moonlights as an adhesin on the surface of *Mycoplasma hyopneumoniae* by binding to fibronectin. *Front. Microbiol.* 9:974.