

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗΣ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

**Μοριακή ανάλυση της αλληλεπίδρασης του
DEAD κινητήρα της SecA με την
προπρωτεΐνη**

ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΧΑΤΖΗ

Επιβλέπων Καθηγητής: Τάσος Οικονόμου

Ηράκλειο

Σεπτέμβριος 2008

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ SUMMARY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Εκκριτικά συστήματα Βακτηρίων
- 1.2 Το Sec σύστημα μετατόπισης
- 1.3 Η SecA ATPase
- 1.4 Η SecA ως RNA ελικάση
- 1.5 Μοντέλο κατάλυσης μετατόπισης προπρωτεΐνης από τη SecA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΝΕΣΗ ΣΤΟ ΜΟΤΙΒΟ Ib(TPGR) ΤΩΝ ΕΛΙΚΑΣΩΝ

- 2.1 Δημιουργία μεταλλάξεων της SecA στο μοτίβο Ib(TPGR) της SecA(Μ. Κουκάκη, Γ. Γκουρίδης)Ε
- 2.2 Έλεγχος *in vivo* γενετικής συμπληρωματικότητας
- 2.3 Κατασκευή SecAΔC παραγώγων με τις σημειακές μεταλλάξεις στο μοτίβο Ib
- 2.4 Καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της SecA

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SecA ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΜΟΤΙΒΟ Ib

- 3.1 Δραστικότητα ATPασης (Ενδογενής, μεμβρανική , μετατόπισης)
- 3.2 Δοκιμασία *in vitro* μετατόπισης προπρωτεΐνης
- 3.2 Ενδογενής δραστικότητα ATPασης των SecA μεταλλαγμάτων, ως αποτέλεσμα θερμοκρασιακών μεταβολών
- 3.3 Ενδογενής δραστικότητα ATPασης των SecAΔC παραγώγων , ως αποτέλεσμα θερμοκρασιακών μεταβολών
- 3.4 Αναλυτικός βιοχημικός χαρακτηρισμός του παραγώγου SecA(L187A)
 - 3.4.1 Μέτρηση της Μεμβρανικής δραστικότητας ATPασης έπειτα από τιτλοδότηση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων
 - 3.4.2 Μέτρηση της δραστικότητας μετατόπισης ATPασης έπειτα από τιτλοδότηση προπρωτεΐνης
 - 3.4.3 Μέτρηση της σταθεράς διάστασης του παραγώγου SecA(L187A) για το μεμβρανικό SecYEG σύμπλοκο
 - 3.4.4 Μέτρηση της μεμβρανικής δραστικότητας ATPάσης της SecA(L187A) ως συνάρτηση θερμοκρασιακών μεταβολών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

5.2 Δοκιμασία γενετικής συμπληρωματικότητας

5.3 Καθαρισμός των His-SecA πρωτεϊνών με χρωματογραφία συνάφειας Ni²⁺-NTA

5.4 Δραστικότητα ΑΤΡασης

5.5 *In vitro* μετατόπιση της proOmpA προπρωτεΐνης στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων

5.7 Δοκιμασίες μέτρησης συγγένειας της [³⁵S]-His SecA και των μεταλλαγμάτων με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG

5.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

5.9 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από αντισώματα

5.10 Χρώση πρωτεϊνών με coomassie blue

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Η SecA είναι μια RNA ελικάση που προσφέρει την απαραίτητη ενέργεια στο Sec σύστημα μεταφοράς προπρωτεϊνών διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Δομικά αποτελείται από τον κινητήρα DEAD, που είναι χαρακτηριστικός για όλες τις ελικάσες και από δύο περιοχές λειτουργικής εξειδίκευσης, την περιοχή πρόσδεσης προπρωτεΐνης (PBD) και την καρβοξυτελική περιοχή (C-domain). Ο κινητήρας DEAD αποτελείται από την περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου (NBD) και από την IRA2 περιοχή. Ανάμεσά τους δεσμεύεται το νουκλεοτίδιο. Το PBD αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους β κλώνους (Stem) που φύονται μέσα από το NBD και από μια σφαιρική περιοχή, τον βολβό. Το Stem βρίσκεται απέναντι από την α8 έλικα του NBD και η αλληλεπίδρασή τους είναι η μοναδική, όπου ο DEAD κινητήρας είναι σε φυσική επαφή με το PBD.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σημασίας της α8 έλικας για την SecA καθώς και της αλληλεπίδρασής της με το Stem κατά τη διάρκεια της μετατόπισης των προπρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν επτά μεταλλάγματα της έλικας α8. Από την παρατήρηση ότι 5 από τα 7 μεταλλαγμένα παράγωγα δεν ήταν λειτουργικά όπως η SecA, οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η α8 έλικα είναι σημαντική για τη SecA. Μελετώντας αναλυτικότερα τις βιοχημικές ιδιότητες των μεταλλαγμάτων βρέθηκε ότι ένα από αυτά, που αναμένεται να χαλαρώνει την αλληλεπίδραση της α8 έλικας με το Stem, είχε διαφορετικό πρότυπο δραστικότητα ATPάσης από τη SecA και η αναλυτική του μελέτη έδειξε ότι απουσία προπρωτεΐνης, προσομοίαζε τη δραστικότητα ATPάσης της αγρίου τύπου SecA κατά τη διάρκεια μετατόπισης προπρωτεϊνών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση της έλικας α8 με το Stem είναι σημαντική για τη μετατόπιση των προπρωτεϊνών από τη SecA.

Abstract

SecA is the motor subunit of the bacterial protein translocase nanomachine. During preprotein translocation SecA undergoes controlled cycles of ATP hydrolysis accompanied by domain movements that are expected to lead to preprotein translocation. SecA is formed by the DEAD motor and two specialization domains, the Preprotein Binding Domain (PBD) and the C-domain. The DEAD motor is formed by two subdomains, the Nucleotide Binding Domain (NBD) and the IRA2. The PBD contacts the helicase DEAD motor through a narrow Stem that packs tightly against helix $\alpha 8$ of the NBD. The $\alpha 8$ helix- Stem interaction is the only part of the protein where the PBD is in physical contact with the DEAD motor.

In order to understand the role of the $\alpha 8$ helix for SecA and the importance of its interaction with the Stem for the preproteins translocation, single point mutations were introduced at the $\alpha 8$ helix. Five out of the seven mutated derivatives had reduced functionality compared to the SecA. One out of the mutated derivatives, that it is expected to loosen the $\alpha 8$ -stem interaction, it had in the absence of a preproprein the biochemical phenotype that SecA has when it is translocating preproteins. It was recently determined that the preprotein signal peptide attaches to SecA at a site in the immediate vicinity of the $\alpha 8$ helix-Stem interface. Clearly Stem-DEAD motor interaction is critical for translocase activity. We propose that preproteins control the SecA motor by regulating the $\alpha 8$ -Stem interaction.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εκκριτικά συστήματα Βακτηρίων

Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο και διαχωρίζει το εξωτερικό του κυττάρου από το εσωτερικό. Περίπου το ένα τρίτο των πρωτεϊνών που συντίθενται από το κύτταρο εκκρίνονται ή εισάγονται στο εσωτερικό της μεμβράνης. Μεταξύ των πρωτεϊνών που εκκρίνονται είναι τα υδρολυτικά ένζυμα, οι πρωτεΐνες του περιπλάσματος, οι τοξίνες καθώς και προεξοχές της επιφάνειας του βακτηριακού κυττάρου όπως το μαστίγιο και τα ινίδια (pilli). Στις πρωτεΐνες που εισάγονται στο εσωτερικό της μεμβράνης ανήκουν αυτές που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση, στην επιλεκτική μεταφορά, στην παραγωγή ενέργειας, στην υποδοχή κυτταρικών σημάτων και στην βιογέννεση του κυτταρικού τοιχώματος και της μεμβράνης (Papanikou et al, 2007).

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει πολύπλοκες μοριακές μηχανές προκειμένου να μετατοπίζουν τις πρωτεΐνες τους διαμέσου της μεμβράνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από τα βακτήρια μπορεί να διαιρεθεί σε δύο ή τρία διακριτά βήματα. Το πρώτο είναι η στόχευση στην πλασματική μεμβράνη, στη συνέχεια στην εξωτερική μεμβράνη για τα Gram αρνητικά βακτήρια και στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου στόχου, κυρίως όταν πρόκειται για μολυσματικούς παράγοντες. Στα βακτήρια υπάρχουν δεκαέξι συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών (Economou et al, 2006) κάποια εκ των οποίων θα περιγραφούν παρακάτω.

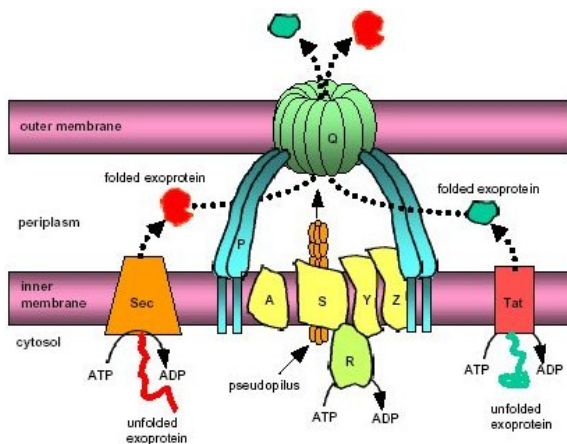
Τύπου 1 εκκριτικό σύστημα

Το εκκριτικό σύστημα τύπου 1 είναι αρκετά διαδεδομένο στη φύση και συναντάται στα Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Το σύστημα απαρτίζεται από τους ABC μεταφορείς που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη και από τις MFPs (membrane fusion proteins) ή OMFs (outer membrane factors) βοηθητικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων. Για την μεταφορά των πρωτεϊνών είναι απαραίτητη η υδρόλυση του ATP από τις ABC πρωτεΐνες. Οι ABC πρωτεΐνες

απαρτίζονται από δύο διαμεμβρανικές και δύο κυτταροπλασματικές περιοχές που είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του ATP. Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση αναγνωρίζονται από το σύστημα από το πεπτιδίο οδηγό, που βρίσκεται στην καρβοξυτελική τους περιοχή. Ωστόσο πέρα από το πεπτιδίο οδηγό για να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες από το σύστημα πρέπει να έχουν το κατάλληλο μέγεθος και να αποδιπλώνονται με ευκολία (Saier, 2006). Οι ABC πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με τις MFPs ή OMFs και έτσι επιτρέπεται η έξοδος της πρωτεΐνης και από την εξωτερική μεμβράνη, όταν αυτή υπάρχει (Holland, Schmitt and Young, 2005). Οι OMFs προσφέρουν ένα διαμεμβρανικό κανάλι ενώ οι MFPs πιθανόν συνδέουν την εσωτερική μεμβράνη με την εξωτερική (Harley et al, 2000).

Τύπου 2 εκκριτικό σύστημα (T2SS)

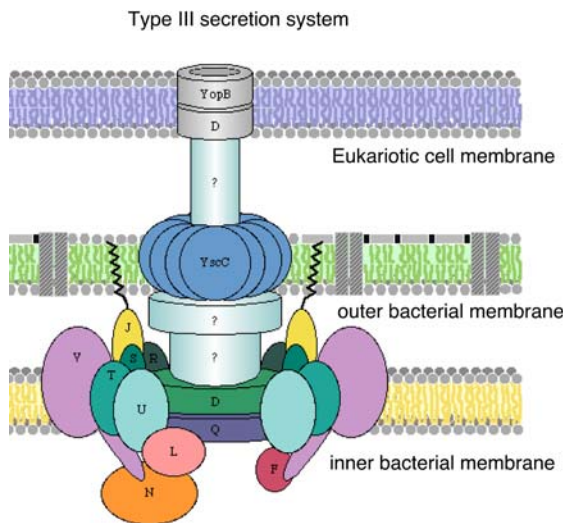
Το εκκριτικό σύστημα τύπου 2 συναντάται αποκλειστικά στα Gram αρνητικά βακτήρια. Μέσω του συγκεκριμένου συστήματος εκκρίνονται πρωτεΐνες που έχουν διέλθει στο περίπλασμα μέσω του Sec και σπανίως του Tat εκκριτικού συστήματος της εσωτερικής μεμβράνης. Στη συνέχεια διέρχονται σε αναδιπλωμένη κατάσταση μέσω πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων και τελικά καταλήγουν στον εξωκυττάριο χώρο (Economou et al, 2006). Παρόλο που το T2SS συναντάται αποκλειστικά στα Gram αρνητικά βακτήρια, το Sec σύστημα είναι καθολικό και απαραίτητο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Το Sec σύστημα θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση εκκριτικών συστημάτων των βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες που διέρχονται από το Sec ή/και το TAT σύστημα στα Gram⁻ βακτήρια διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη διαμέσου πρωτεϊνών-καναλιών που ονομάζονται OMFs ή MFPs

Τύπου 3 εκκριτικό σύστημα (T3SS)

Οι πρωτεΐνες που αποτελούν το εκκριτικό σύστημα τύπου 3, συντίθενται κυτταροπλασματικά και επιτρέπουν την έκκριση πρωτεϊνών διαμέσου των δύο μεμβρανών των Gram αρνητικών βακτηρίων (Hueck et al,1998). Το T3SS συναντάται συνήθως σε παθογόνα βακτήρια και χρησιμοποιείται για τη μεταφορά μολυσματικών παραγόντων (Yip et al, 2005). Το εκκριτικό σύστημα απαρτίζεται από μια περιφερική ATPάση και από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης που σχηματίζουν κανάλια από τα οποία διέρχονται οι πρωτεΐνες. Επίσης επειδή συνήθως οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T3SS στοχεύονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, σχηματίζεται ένας διάυλος που ξεκινάει ως συνέχεια των T3SS πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και καταλήγει στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Olsson et al, 2004) .



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Οι πρωτεΐνες του διαπερνούν τρεις μεμβράνες, την εσωτερική και εξωτερική του Gram⁻ βακτηρίου και την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Το σύστημα τροφοδοτείται με ενέργεια από μια ATPάση που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου(N)

Τύπου 4 εκκριτικό σύστημα (T4SS)

Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που αποτελούν το εκκριτικό σύστημα τύπου 4, διαπερνούν τις δύο μεμβράνες των Gram αρνητικών ή τη μία των Gram θετικών βακτηρίων και την πεπτιδογλυκάνη. Διαμέσου του T4SS μεταφέρονται πρωτεΐνες και σύμπλοκα πρωτεϊνών-DNA από το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Christie and Cascales, 2005). Ξενιστές μπορεί να είναι βακτήρια, ζύμες και φυτά (Hamilton et al, 2005). Για την έκκριση διαμέσου του T4SS απαιτείται ενέργεια αλλά δεν είναι ξεκάθαρο αν η ενέργεια για όλη τη μεταφορά παρέχεται σε ένα βήμα ή σε περισσότερα (Saier, 2006).

Τύπου 5 εκκριτικό σύστημα (T5SS)

Το εκκριτικό σύστημα τύπου 5 συναντάται αποκλειστικά στα Gram αρνητικά βακτήρια. Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το Sec σύστημα σχηματίζουν ένα β-βαρέλι στην εξωτερική μεμβράνη με την καρβοξυτελική τους περιοχή. Από εκεί διέρχεται η αμινοτελική περιοχή σε αποδιπλωμένη κατάσταση. Το χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου συστήματος μεταφοράς είναι ότι δεν απαιτείται τροφοδοσία με ενέργεια (αυτομεταφορείς)[Economou et al, 2006, Oomen et al, 2004, Skillman et al,2005].

TAT

Το TAT εκκριτικό σύστημα συναντάται σε Gram αρνητικά και θετικά βακτήρια, σε ευκάρεα και σε αρχαία. Απαρτίζεται από τέσσερις συνολικά πρωτεΐνες και ως ενέργεια για τη μεταφορά πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η πρωτονοκίνητη δύναμη. Οι πρωτεΐνες του TAT εκκριτικού συστήματος σχηματίζουν ένα μεγάλο σύμπλοκο στη μεμβράνη που αλληλεπιδρά με πλήρως αναδιπλωμένες πρωτεΐνες που στο αμινοτελικό τους άκρο φέρουν την αλληλουχία- οδηγό RRXFLK. Μέσω του TAT εκκριτικού συστήματος μεταφέρονται στο περίπλασμα κυρίως αναγωγάσες οι οποίες πριν από την μετατόπισή τους συνδέονται με τους συμπαράγοντες με τους οποίους δρουν (Yen et al, 2002, Berks and Palmer 2005, Saier, 2006).

Omp85

Η πρωτεΐνη Omp85 είναι απαραίτητη για την εισαγωγή των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων (Malinverni et al 2006). Η ίδια εισέρχεται στο περίπλασμα από το Sec σύστημα και έχειδειχθεί ότι δημιουργεί κανάλια στην εξωτερική μεμβράνη των οποίων η ενεργότητα ρυθμίζεται τις πρωτεΐνες που μεταφέρονται (Economou et al, 2006).

1.2 Το Sec σύστημα μετατόπισης

Από τα εκκριτικά συστήματα που περιγράφηκαν στην παράγραφο 1.1 μόνο το Sec συναντάται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και είναι απαραίτητο για τη ζωή.

Δομικά απαρτίζεται κυρίως από το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG και από την περιφερική ATPάση SecA (Brundage et al., 1990)

Το SecYEG σύμπλοκο

Η απομόνωση και κρυστάλλωση του SecYEG συμπλόκου βοήθησε στην κατανόηση της λειτουργίας του καναλιού καθώς και της λειτουργίας του Sec συστήματος έκκρισης (Van den Berg et al, 2004). Η πρωτεΐνη SecE και η απαραίτητη για τη ζωή SecG πλαισιώνουν τη SecY η οποία σχηματίζει ένα κανάλι από το οποίο πιθανολογείται ότι διέρχονται τα πολυπεπίδια. Η έξοδος του καναλιού καλύπτεται από μια α έλικα (plug) η οποία φαίνεται να είναι σημαντική για τη λειτουργία της SecY και κατά τη διάρκεια της μεταφοράς πρέπει να μετατοπίζεται και να αφήνει το κανάλι ακάλυπτο (Van den Berg et al, 2004). Οι πρωτεΐνες μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου του SecY καναλιού από ένα μόνο SecYEG ωστόσο το SecYEG σύμπλοκο σχηματίζει ολιγομερή (Breyton et al, 2002; Mori et al, 2003) τα οποία ενδέχεται να ευνοούν τη μεταφορά (paranίκου et al, 2007).

Η SecA

Η SecA υδρολύει ATP και παρέχει στο σύστημα την απαραίτητη ενέργεια για τη μεταφορά των πρωτεϊνών. Η βιοχημική ανάλυση και η κρυστάλλωση της έχει προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία της. Η δομή και ο τρόπος λειτουργίας της SecA αναλύονται εκτενώς στην παράγραφο 1.3.

Μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου του Sec μονοπατιού

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το Sec εκκριτικό σύστημα μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια.

Στάδιο 1

Αρχικά οι πρωτεΐνες που προορίζονται για έκκριση πρέπει να διακριθούν από τις κυτταροπλασματικές και να στοχευθούν στη μεμβράνη. Η στόχευση γίνεται μέσω των πεπτιδίων οδηγών, μήκους 20-30 αμινοξέα, που φέρουν οι προπρωτεΐνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Το πεπτίδιο οδηγός αποτελείται από τουλάχιστον ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ στο αμινοτελικό τους άκρο και από μια περιοχή 8-12 υδρόφοβων αμινοξέων. Ο ρόλος του πεπτιδίου οδηγός είναι να διακριθούν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες από τις κυτταροπλασματικές και σε ορισμένες περιπτώσεις να καθυστερήσει η αναδίπλωση της προπρωτεΐνης (Randall et al., 2002). Μετά τη σύνθεσή τους οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες προσδένονται στο SRP (Luirink et al, 2004) ή στη σαπερόνη SecB (Ullers et al., 2004)

όπου και στις δύο περιπτώσεις η πρωτεΐνη στοχεύεται στη μεμβράνη. Στην περίπτωση όπου προσδεθεί στο SRP η στόχευση γίνεται στον αντίστοιχο υποδοχέα της μεμβράνης FtsY και για τη μετατόπιση δεν χρησιμοποιείται η SecA. Μέσω του SRP στοχεύονται κυρίως πρωτεΐνες που εισέρχονται στη μεμβράνη. Στην περίπτωση όπου η προπρωτεΐνη προσδεθεί στη SecB τότε στοχεύεται στη SecA, η οποία έχει θέση δέσμευσης για τη SecB (Hartl et al., 1990).

Στάδιο 2

Όταν οι προπρωτεΐνες καταλήξουν στη μεμβράνη, διέρχονται διαμέσου του SecY καναλιού που πλαισιώνεται από τις πρωτεΐνες SecE και SecG. Η SecA ATPάση και η πρωτονιοκίνητη δύναμη παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια για τη μετατόπιση. Επιπλέον πρωτεΐνες, που όμως δεν είναι απαραίτητες για τη ζωή, μπορεί να διευκολύνουν την κατάλυση της αντίδρασης της μετατόπισης.

Στάδιο 3

Όταν η πρωτεΐνη εξέλθει από το SecY κανάλι ή εισαχθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, το πεπτιδίο οδηγός κόβεται από τις αντίστοιχες πρωτεάσες (Paetzel et al., 2002). Στην περίπτωση που έχει διέλθει από την κυτταροπλασματική μεμβράνη αναδιπλώνεται σωστά στην trans πλευρά της (Mogensen et al., 2005)

1.3 Η SecA ATPase

Η SecA ανήκει στην υπερικογένεια 2 των RNA ελικασών. Δομικά απαρτίζεται από τον κινητήρα DEAD ο οποίος είναι χαρακτηριστικός των RNA ελικασών και από δύο περιοχές που τη διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες ελικάσες και της προσφέρουν ειδικότητα στην αναγνώριση των προπρωτεϊνών και στον έλεγχο της δραστηριότητας ATPάσης. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται περιοχή δέσμευσης προπρωτεΐνης [Preprotein Binding Domain(PBD)] και καρβοξυτελική περιοχή [C-domain] αντίστοιχα.

Ο DEAD κινητήρας αποτελείται από την περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου[Nucleotide Binding Domain (NBD)] και από τον ενδομοριακό ρυθμιστή της ATPάσης 2 [Intramolecular Regulator of ATPase 2 (IRA2)] (Karamanou et al., 1999; Papanikou et al., 2005; Sianidis et al., 2001) . Μεταξύ των δύο αυτών περιοχών βρίσκεται ο θύλακας πρόσδεσης νουκλεοτιδίου ο οποίος πλαισιώνεται από δομικά μοτίβα ελικασών τα οποία

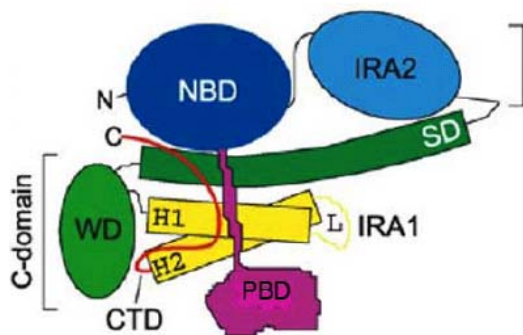
έχουν προταθεί ότι συνδέουν την πρόσδεση του ATP και την υδρόλυσή του με την μετατόπιση των προπρωτεϊνών (Price et al., 1996; Keramisanou et al., 2006)

Πιο αναλυτικά η καρβοξυτελική περιοχή της SecA (C-domain) απαρτίζεται από τέσσερις υπο-δομές

1. Το Scaffold domain: Μια α έλικα 46 αμινοξέων που ελέγχει το άνοιγμα και κλείσιμο του DEAD κινητήρα (Mori et al., 2006) 2. Το Wing Domain: Μια δομική περιοχή που αποτελεί μοριακό διακόπτη της IRA1 περιοχής 3. Την IRA1 που ρυθμίζει την ενεργότητα μετατοπάσης της SecA και 4. Τη C-terminal Domain (CTD) που βρίσκεται στο τέλος της καρβοξυτελικής περιοχής και δεν είναι απαραίτητη για την κατάλυση της μετατόπισης των προπρωτεϊνών (Breukink et al., 1995).

Η περιοχή δέσμευσης προπρωτεΐνης (PBD) απαρτίζεται από δύο αντιπαράλληλους β-κλώνους (Stem) που φύονται από την περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου και από μια δίλοβη σφαιρική περιοχή τον βολβό (bulb) (Paranikou et al., 2005).

Όταν οι προπρωτεΐνες προσδεθούν στο PBD, οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται στη SecA μεταφέρονται αλλοεστερικά στον κινητήρα DEAD όπου τελικά υδρολύεται το ATP (Karamanou et al., 2007). Αυτός ο τρόπος επικοινωνίας του κινητήρα DEAD με τις περιοχές που αλληλεπιδρούν με τις προπρωτεΐνες εξασφαλίζεται από τη φυσική επαφή του PBD με το C-domain και του IRA1 με τον κινητήρα DEAD (Vrontou et al., 2004).



Εικόνα 3: Το μόριο της SecA και οι διαφορετικές υπο-δομές του. WD: wing Domain, SD: Scaffold Domain, CTD: C-terminal Domain

1.3.1 Ο ολιγομερισμός της SecA

Η σταθερά διάστασης του διμερούς της SecA είναι 1μM, ενώ η συγκέντρωσή της στο κύτταρο είναι 2-5μM, επομένως αναμένεται ότι η SecA στο κύτταρο βρίσκεται σε διμερή

μορφή (Driessen, 1993). Η κατανομή της πιστεύεται πως είναι ίση στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα. Το σημείο του διμερισμού, παρόλο που η SecA έχει κρυσταλλωθεί και ως διμερές, δεν είναι με βεβαιότητα γνωστό μιας και στις διαφορετικές κρυσταλλικές δομές φαίνεται διαφορετικό σημείο (Hunt et al., 2002; Zimmer et al., 2006; Papanikolaou et al., 2007).

1.3.2 Το ολοένζυμο SecA-SecY

Η SecA αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια που έχουν το διαμεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG με συγγένεια 5-40 nM (Hartl et al., 1990). Το σημείο αλληλεπίδρασης δεν είναι με βεβαιότητα γνωστό μιας και τα δύο μόρια δεν έχουν συγκρυσταλλωθεί. Ωστόσο από βιοχημικά πειράματα καθώς και από τις δομές του κάθε μορίου ξεχωριστά έχει γίνει η πρόβλεψη κάποιων περιοχών που θα μπορούσαν να αποτελούν σημεία αλληλεπίδρασης των δύο μορίων. Η SecY έχει εκτεθειμένες κυτταροπλασματικές λούπες που θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν με τη SecA (Van der Berg et al., 2004), ενώ από την πλευρά της SecA έχει δείχθει βιοχημικά ότι ο κινητήρας DEAD είναι σημαντικός για την αλληλεπίδραση με τη SecY. Επίσης απουσία της καρβοξυτελικής περιοχής η SecA έχει τέσσερις φορές λιγότερη συγγένεια για τη SecY, επομένως αναμένεται και η καρβοξυτελική περιοχή να είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση των δύο μορίων (Vrontou et al., 2004).

1.3.3 SecA και μοριακοί συνδέτες

1. SecA και φωσφολιπίδια

Η SecA αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Τα φορτισμένα φωσφολιπίδια (φωσφατιδιλογλυκερόλη και καρδιολιπίνη) είναι απαραίτητα για την έκκριση πρωτεϊνών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τα όξινα φωσφολιπίδια που είναι προσδεδεμένα στη SecYEG ενισχύουν την πρόσδεση της SecA καθώς και την ενεργότητα ATPάσης της (Lill et al., 1990)

2. SecA και SecB

Η SecB είναι μια κυτταρική σαπερόνη που δεν είναι απαραίτητη για τη ζωή και δεν συναντάται σε όλα τα βακτήρια. Ωστόσο εκεί όπου υπάρχει διευκολύνει τη διαδικασία της μετατόπισης των προπρωτεϊνών. Στο κύτταρο βρίσκεται σε τετραμερή μορφή,

προσδένει τα πολυπεπίδια που προορίζονται για έκκριση πιθανόν από τα εκτεθειμένα υδρόφοβα κατάλοιπα και στη συνέχεια προσδένεται στη SecA. Με τον τρόπο αυτό φέρνει την εκκρινόμενη πρωτεΐνη κοντά στο σύστημα έκκρισης διευκολύνοντας τη μετατόπισή της (Randall et al., 1998).

3. SecA και προπρωτεΐνη

Έπειτα από την πρόσδεσή της στη SecA, η SecB απελευθερώνεται με έναν ATP εξαρτώμενο τρόπο και η προπρωτεΐνη προσδένεται στη SecA (Fekkes et al., 1997). Για την πρόσδεση αυτή συμμετέχει τουλάχιστον το PBD. Το πεπτιδίο οδηγός που αποκτά δομή α έλικας μετά την αλληλεπίδρασή του με τη SecA, έχει δειχθεί (Gelis et al, 2007) ότι προσδένεται στο θύλακα που σχηματίζεται μεταξύ του βολβού, του PBD και του IRA1. Βιοχημικά πειράματα έχουν δείξει ότι η ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης μπορεί αρχικά να προσδένεται στο βολβό (Baud et al., 2005).

4. SecA και νουκλεοτίδιο

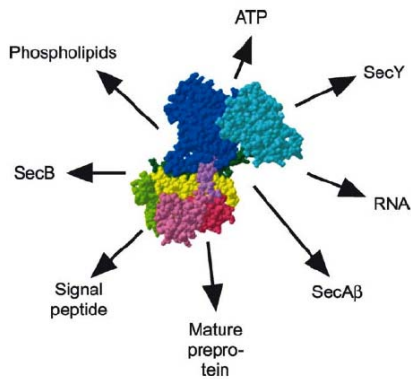
Η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου (NBD) της SecA έχει υψηλή συγγένειας για το νουκλεοτίδιο. Τα περισσότερα από τα αμινοξέα που προσδέουν το νουκλεοτίδιο βρίσκονται στο NBD. Σύμφωνα με τις κρυσταλλικές δομές παρουσία ή απουσία του νουκλεοτιδίου δεν φαίνεται να συμβαίνουν μεγάλες δομικές αλλαγές στη SecA (Hunt et al., 2002; Zimmer et al., 2006; Papanikolaou et al., 2007) Ωστόσο ανάμεσα στις δύο περιοχές του κινητήρα DEAD σχηματίζεται μια γέφυρα άλατος (θύρα 1) μεταξύ ενός θετικά και ενός αρνητικά φορτισμένου αμινοξέος η οποία ελέγχει τους καταλυτικούς κύκλους της SecA ανοιγοκλείνοντας την περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίου κάτω από τον έλεγχο του PBD (Karamanou et al., 2007). Το ανοιγοκλείσιμο του θύλακα ρυθμίζει τη συγγένεια της SecA για το ADP που είναι και το περιοριστικό βήμα για τους πολλαπλούς καταλυτικούς κύκλους που πραγματοποιεί η SecA.

Η αλληλεπίδραση της SecA με τους συνδέτες της γίνεται με ορισμένη σειρά και κατόπιν παραγωγής ενέργειας όπως αναλύεται στη παράγραφο 1.3.4

1.3.4 SecA και παραγωγή ενέργειας

Προκειμένου να μεταφερθούν οι πρωτεΐνες διαμέσου του Sec συστήματος χρειάζεται ενέργεια που παρέχεται από το ATP και από την πρωτονιοκίνητη δύναμη (Schiebel et al., 1991). Αρχικά για να ξεκινήσει η διαδικασία της μεταφοράς προπρωτεϊνών απαιτείται η

υδρόλυση του ATP, στη συνέχεια η SecA με προσδεμένο το ADP σταθεροποιείται θερμικά και η απελευθέρωσή του είναι το περιοριστικό βήμα για την συνέχιση της κατάλυσης της μεταφοράς (Fak et al., 2004). Το περιοριστικό αυτό βήμα ξεπερνιέται από την αλληλεπίδραση της SecA με τις μεμβράνες και την προπρωτεΐνη, που αυξάνουν τη δραστηριότητά της ως ATPάση (Karamanou et al., 2007). Κατά τη διάρκεια της μετατόπισης προπρωτεϊνών η SecA εισέρχεται και εξέρχεται στη μεμβράνη με την ενέργεια που προσφέρεται από την υδρόλυση του ATP. Με τους επαναλαμβανόμενους κύκλους της SecA, η προπρωτεΐνη μεταφέρεται στην trans πλευρά της μεμβράνης. Η πρωτονοκίνητη δύναμη και πιθανόν και η SecA συνεισφέρουν στο να μην «γλιστρήσει» η προπρωτεΐνη και επιστρέψει στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια των κύκλων της μεταφοράς (Schiebel et al., 1991).



Εικόνα 4: Η SecA και οι μοριακοί συνδέτες με τους οποίους αλληλεπιδρά. Όλα τα μόρια που φαίνονται στο σχήμα αλληλεπιδρούν με τη SecA και επηρεάζουν τη λειτουργία της

1.4 Η SecA ως RNA ελικάση

Ως RNA και DNA ελικάσες χαρακτηρίζονται συνήθως τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση διαχωρισμού των δίκλωνων νουκλεοτιδικών αλυσίδων με ενεργειακά εξαρτώμενο τρόπο (Cordin et al, 2006). Η SecA ανήκει στην υπεροικογένεια 2 των ελικασών και μετατρέπει την ενέργεια που εκλύεται από την υδρόλυση του ATP σε μηχανικό έργο για την μετατόπιση προπρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης. Κατά τρόπο ανάλογο οι ελικάσες χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP για την αποδίπλωση / άνοιγμα νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Όλα τα μέλη της υπεροικογένειας 2 των ελικασών και επομένως και η SecA, έχουν δύο χαρακτηριστικές

Rec-A τύπου δομές και περιλαμβάνουν 9 συντηρημένα μοτίβα. Τα χαρακτηριστικά μοτίβα καθώς και οι λειτουργικές τους ιδιαιτερότητες περιγράφονται παρακάτω.

1) Q-Μοτίβο: Είναι το πιο πρόσφατα χαρακτηρισμένο μοτίβο, η συντηρημένη αλληλουχία του παρουσιάζει 60% ομοιότητα μεταξύ των ελικασών και έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά απευθείας με το προσδεμένο νουκλεοτίδιο. Είναι μάλιστα απαραίτητο για την πρόσδεση της αδενίνης (του ATP) (Cordin et al., 2004)

2) Μοτίβο I: Είναι γνωστό και ως Walker A μοτίβο και έχει βρεθεί πως είναι κρίσιμο για τη δράση των ενζύμων ως ελικάσες και ATPάσες (Walker et al., 1988).

3,4) Μοτίβο Ia και Μοτίβο Ib: Τα μοτίβα Ia και Ib με τις συντηρημένες αλληλουχίες PTRELA και TPGR δεν φαίνεται να συμμετέχουν άμεσα στην πρόσδεση ή στην υδρόλυση του ATP. Ωστόσο έχειδειχθεί για κάποιες ελικάσες ότι συμμετέχουν στην πρόσδεση του υποστρώματος (RNA) μαζί με τα μοτίβα IV και V (Rogers et al., 2002).

5) Μοτίβο II: Το μοτίβο II είναι γνωστό και ως Walker B και μαζί με το Walker A είναι απαραίτητα για την ενεργότητα ATPάσης των ενζύμων (Iost et al., 1999).

6) Μοτίβο III: Το μοτίβο III με την συντηρημένη αλληλουχία SAT έχει προταθεί ότι συνδέει την ενεργότητα ATPάσης και ελικάσης των ενζύμων (Pause and Sonenberg, 1992).

7) Μοτίβο IV: Είναι το λιγότερο χαρακτηρισμένο μοτίβο των ελικασών. Πέρα από την συντηρημένη αλληλουχία που είναι γνωστή (Gorbalenya and Koonin, 1993) δεν υπάρχουν πειράματα που να δείχνουν τη λειτουργική του σημασία

8) Μοτίβο V: Μαζί με τα μοτίβα Ia, Ib και IV έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην πρόσδεση του RNA (Caruthers et al., 2000)

9) Μοτίβο VI: Έχει βρεθεί πως είναι σημαντικό για τη πρόσδεση του RNA αλλά και για την ενεργότητα ATPάσης των ελικασών (Rogers et al., 2002)

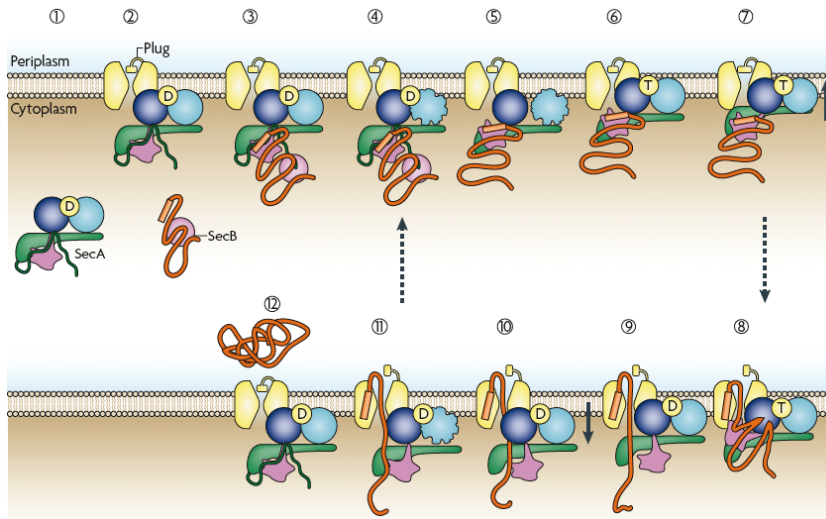
Μοντέλο κατάλυσης μετατόπισης της προπρωτεΐνης από τη SecA

Συνδυάζοντας την υπάρχουσα γνώση για τη λειτουργία της SecA έχει προταθεί ένα μοντέλο για τη λειτουργία της κατά τη μετατόπιση των προπρωτεϊνών.

Αρχικά η SecA βρίσκεται στο διάλυμα με ένα ADP μόριο προσδεμένο (Sianidis et al., 2001). Στη συνέχεια προσδένεται στο SecYEG σύμπλοκο της μεμβράνης κυρίως με τον

DEAD κινητήρα και πιθανόν και με τις κυτταροπλασματικές λούπες του SecYEG (εικόνα 5, βήμα 2). Η πρόσδεση στη μεμβράνη οδηγεί σε δομικές αλλαγές κυρίως στο καρβοξυτελικό άκρο (C-domain) και στο PBD. Οι δομικές αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα τη διέγερση της μεμβρανικής ATPάσης ενώ αυξάνουν τη συγγένεια της μεμβρανικής SecA για το SecB (Hartl et al., 1990). Στο επόμενο βήμα η SecA προσδένει μέσω του PBD και πιθανόν του C-domain το πεπτίδιο οδηγό και την αμινοτελική περιοχή του ώριμου μέρους της προπρωτεΐνης (Baud et al., 2002; Papanikou et al., 2005) (εικόνα 5, βήματα 3,4). Η πρόσδεση αυτή επιφέρει επιπλέον δομικές αλλαγές στη SecA που οδηγούν στο άνοιγμα της θύρας 1 (Karamanou et al., 2007). Το άνοιγμα αυτό απομακρύνει το IRA2 από το NBD και οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια για το ADP το οποίο τελικά απομακρύνεται από τη SecA (εικόνα 5, βήμα 5). Στο στάδιο αυτό, πριν δηλαδή εισαχθεί η SecA στη μεμβράνη, απομακρύνεται και η SecB (Fekkes et al., 1997). Στο επόμενο βήμα το ATP προσδένεται στον κινητήρα DEAD. Η πρόσδεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα η SecA να εισάγεται βαθύτερα στη μεμβράνη (Economou et al., 1995) (εικόνα 5, βήματα 6,7). Η εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη μπορεί να έχει δύο πιθανούς ρόλους. Ο πρώτος είναι να «προετοιμάσει» το SecY κανάλι για την εισαγωγή της προπρωτεΐνης και ο δεύτερος να εισαγάγει την ίδια την προπρωτεΐνη βαθύτερα στο κανάλι. Αρχικά στο κανάλι εισέρχεται το σηματοδοτικό πεπτίδιο, το οποίο τοποθετείται κατά τέτοιο τρόπο που επιτρέπει στην υπόλοιπη πρωτεΐνη να διέλθει διαμέσου του καναλιού (εικόνα 5, βήμα 8) (Osborne et al., 2007). Έπειτα το ATP υδρολύεται, η προπρωτεΐνη απελευθερώνεται μερικώς μέσα στο κανάλι (Osborne et al., 2007) και η SecA εξέρχεται από την μεμβράνη και επανέρχεται στη δομική κατάσταση που βρισκόταν αρχικά έχοντας προσδεμένο ένα μόριο ADP (εικόνα 5, βήματα 9-12). Η SecA πραγματοποιεί επαναμβανόμενους κύκλους υδρόλυσης ATP έως ότου μεταφερθεί το πολυπεπτίδιο διαμέσου του καναλιού. Σε κάθε κύκλο μεταφέρονται περίπου 30 αμινοξέα (Schiebel et al., 1991; Joly et al., 1993). Η διαδικασία της μετατόπισης ευνοείται και από την πρωτονιοκίνητη δύναμη η οποία μπορεί να διευκολύνει την ολοκλήρωση της μετατόπισης όταν η προπρωτεΐνη δεν είναι προσδεμένη στη SecA (Schiebel et al., 1991).

Το τελευταίο στάδιο είναι αυτό της ωρίμανσης της προπρωτεΐνης. Το πεπτιδίο οδηγός κόβεται από πεπτιδάσες και η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται και αποκτά τη λειτουργική της κατάσταση όταν βρίσκεται εξωτερικά της πλασματικής μεμβράνης.



Εικόνα 5: Μοντέλο για την κατάλυση της μετατόπισης των προπρωτεϊνών από τη SecA. Η διαδικασία της μετατόπισης περιγράφεται από 12 βήματα συνδυάζοντας την υπάρχουσα γνώση για το Sec σύστημα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΝΕΣΗ ΣΤΟ ΜΟΤΙΒΟ Ib (TPGR) ΤΩΝ ΕΛΙΚΑΣΩΝ

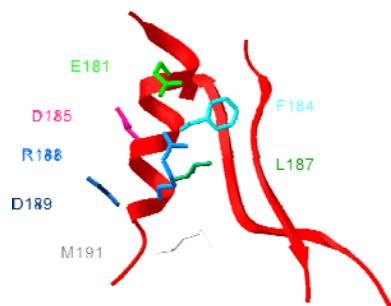
Η SecA ανήκει στην οικογένεια των RNA ελικασών (Koonin and Gorbalenya, 1992) που συμμετέχει στη μεταφορά των πρωτεϊνών που προορίζονται για έκκριση διαμέσου της μεμβράνης. Δομικά απαρτίζεται από δύο RecA τύπου περιοχές που είναι χαρακτηριστικές της οικογένειας των ελικασών και αποτελούν τον κινητήρα DEAD (motor). Στον κινητήρα της SecA που απαρτίζεται από τις περιοχές δέσμησης νουκλεοτιδίου (NBD) και IRA2, προσδένεται το νουκλεοτίδιο (Vrontou and Economou, 2004). Η λειτουργική εξειδίκευση της SecA προέρχεται από δύο άλλες περιοχές: την περιοχή δέσμησης προπρωτεΐνης (PBD) και την καρβοξυτελική περιοχή (C-domain). Η πρώτη ευθύνεται για τη δέσμηση της προπρωτεΐνης από τη SecA και η δεύτερη για τον έλεγχο της υδρόλυσης του ATP από τον κινητήρα DEAD (Karamanou et al. 2007). Η περιοχή δέσμησης της προπρωτεΐνης αποτελείται από δύο αντιπαράλληλους β κλώνους (Stem) που βρίσκονται απέναντι από την α8 έλικα του NBD και από τον Βολβό, μια δίλοβη δομική περιοχή (Papanikou et al 2005, Vrontou et al, 2004). Το Stem είναι η μοναδική περιοχή της SecA που το PBD είναι σε φυσική επαφή με το NBD.

Η SecA είναι γνωστό ότι έπειτα από την πρόσδεση της προπρωτεΐνης επικοινωνεί αλλοεστερικά με τον κινητήρα DEAD, το ATP υδρολύεται και έτσι εκλύεται η απαιτούμενη ενέργεια για τη μετατόπιση της πρωτεΐνης διαμέσου της μεμβράνης.

Σύμφωνα με την πρόσφατα δημοσιευμένη δομή της SecA με το πεπτίδιο οδηγό (signal peptide) της προπρωτεΐνης (Gelis et al, 2007), φαίνεται ότι το πεπτίδιο οδηγός προσδένεται σε γεινίαση με την περιοχή αλληλεπίδρασης της έλικας α8 με το Stem. Επίσης από την ίδια δομή φαίνεται ότι τα αμινοξέα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δομική μεταβολή εξαιτίας της πρόσδεσης του σηματοδοτικού πεπτιδίου βρίσκονται πάνω στο Stem (Gelis et al, 2007). Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η αλληλεπίδραση της α8 έλικας με το Stem είναι σημαντική για τη λειτουργία της πρωτεΐνης καθώς και αν συμμετέχει στη μετάδοση του αλλοεστερικού σήματος προκλήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στην έλικα α8.

2.1 Δημιουργία μεταλλάξεων της SecA στο μοτίβο Ib (TPGR) της SecA

Για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της α8 έλικας με το Stem, δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις στην α8 έλικα (Η μεταλλαξογένεση πραγματοποιήθηκε από τους Γιώργο Γκουρίδη και Μαρίνα Κουκάκη). Τα αμινοξέα E181, F184, D185, L187, R188, D189 και M191 μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες. Τα συγκεκριμένα κατάλοιπα επιλέχθηκαν με βάση τη θέση τους πάνω στην έλικα α8 και τη συντήρησή τους ανάμεσα στις SecA πρωτεΐνες διαφορετικών ειδών βακτηρίων. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6 οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων L187 και M191 προσανατολίζονται προς την πλευρά του Stem ενώ η πλευρική αλυσίδα του D185 καταλοίπου βρίσκεται από την πλευρά της έλικας που επικοινωνεί με την υπόλοιπη πρωτεΐνη. Η διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τα παραπάνω μεταλλαγμένα γονίδια μετασχηματίστηκαν σε BL21.19 στελέχη της *E. coli* και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συνάφειας Ni²⁺-NTA (παράγραφος 2.4)

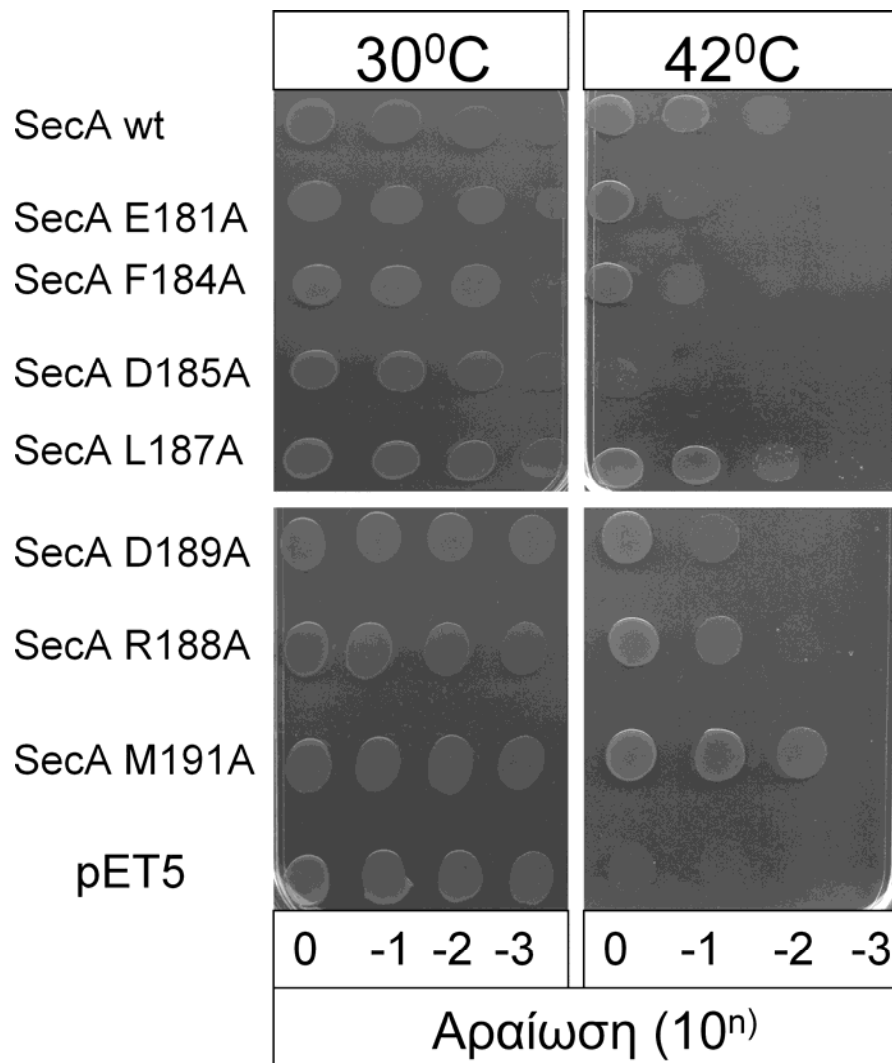


Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής α8 έλικα –Stem. Στην εικόνα φαίνεται ο προσανατολισμός και ο τύπος των αμινοξέων της έλικας που μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες.

2.2 Έλεγχος *in vivo* γενετικής συμπληρωματικότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί αν οι μεταλλαγές που προκλήθηκαν στην πρωτεΐνη επηρεάζουν τη λειτουργία της, πραγματοποιήθηκε *in vivo* έλεγχος της γενετικής συμπληρωματικότητας. Για τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BL21.19 (Mitchell and Oliver, 1993) που στους 42⁰C εκφράζει μια μη λειτουργική, θερμοευαίσθητη χρωμοσωμική SecA. Την ιδιότητά του αυτή εκμεταλλευόμαστε για να παρατηρήσουμε τη λειτουργικότητα της μεταλλαγμένης SecA όταν η χρωμοσωμική δεν εκφράζεται. Πιο συγκεκριμένα BL21.19 κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τα γονίδια για τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, την αγρίου τύπου SecA αλλά και το πλασμίδιο (pET5) χωρίς SecA. Τα BL21.19 κύτταρα εκφράζουν τη χρωμοσωμική SecA στους 30⁰C ενώ αδυνατούν να την εκφράσουν στους 42⁰C, όπου εκφράζεται μόνο η πλασμιδιακή. Αρχικά τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 30⁰C έως

ότου φτάσουν στην ίδια οπτική πυκνότητα. Στη συνέχεια αραιώθηκαν και η ικανότητά τους να μεγαλώσουν σε 4 διαφορετικές αραιώσεις στους 42⁰C συγκρίθηκε με αυτή των κυττάρων που ήταν μετασχηματισμένα με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται από την εικόνα 7, όλα τα μεταλλάγματα της SecA εκτός από δύο, δεν μπορούν να υποκαταστήσουν πλήρως τη χρωμοσωμική SecA του θερμοευαίσθητου στελέχους. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η α8 έλικα είναι σημαντική για τη λειτουργία της SecA. Τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τις SecA(L187A) και SecA(M191A) υποκαθιστούν πλήρως την αγρίου τύπου SecA (εικόνα 7). Αντίθετα αυτά που εκφράζουν την SecA(D185A) πρωτεΐνη δεν μεγαλώνουν σχεδόν καθόλου. Ο θνησιγόνος φαινότυπος της συγκεκριμένης μεταλλαγής μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το κατάλοιπο D185 είναι κρίσιμο για τη σωστή λειτουργία της SecA.



Εικόνα 7: In vivo έλεγχος της γενετικής συμπληρωματικότητας. Καλλιέργειες του στελέχους BL21.19 που φέρουν είτε τον πλασμιδιακό φορέα μόνο του, είτε με τα μεταλλάγματα της έλικας α8 [SecA(E181A, F184A, D185A, L187A, R188A, D189A)], είτε με τη SecA αγρίου τύπου καλλιεργήθηκαν στους 30°C έως ότου αποκτύσουν την ίδια οπτική πυκνότητα. Στη συνέχεια αραιώθηκαν και τοποθετήθηκαν με τη μορφή σταγόνων ίδιου όγκου σε τρυβλίο με θρεπτικό LB υλικό. Ακολούθησε επώαση 16 ωρών στους 30°C και στους 42°C.

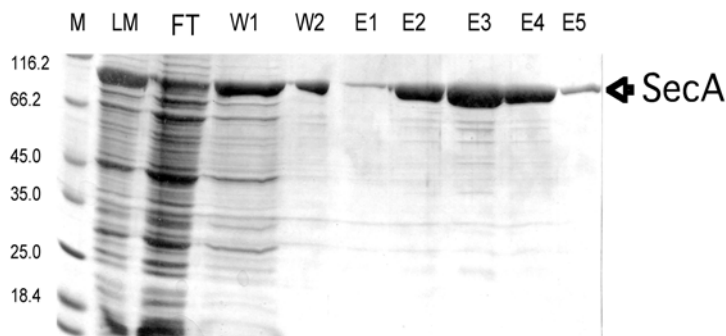
2.3 Κατασκευή SecAΔC παραγώγων με τις σημειακές μεταλλάξεις στο μοτίβο Ib

Για την κατασκευή των SecAΔC παραγώγων (Η κατασκευή τους πραγματοποιήθηκε από τον Γιώργο Γκουρίδη) με τις σημειακές μεταλλάξεις που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.1, έγινε υποκλωνοποίηση ενός τμήματος DNA που φέρει τη μεταλλαγή από τον

πλασμιδιακό φορέα pIMBB7 στον pIMBB8. Ο τελευταίος προέκυψε από την εισαγωγή ενός κωδικονίου λήξης στο γονίδιο της SecA στον pIMBB7. Το πλασμίδιο pIMBB8 εκφράζει το αμινοτελικό (1-610) κομμάτι της SecA υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή ως ανεξάρτητο πολυπεπίδιο. Για την παραγωγή των SecAΔC παραγώγων έγινε υποκλωνοποίησή τους από τον pIMBB7 φορέα με τα ένζυμα *Kpn* I και *Bam* HI στα κολλώδη άκρα του pIMBB8 φορέα. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν τα SecAΔC: E181A, F184A, D185A, L187A, R188A, D189A, M191A παράγωγα. Τα πλασμίδια που κωδικοποιούσαν τα παραπάνω μεταλλαγμένα γονίδια μετασχηματίστηκαν σε BL21.19 στελέχη της *E. coli* και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συνάφειας Ni²⁺-NTA (παράγραφος 2.5)

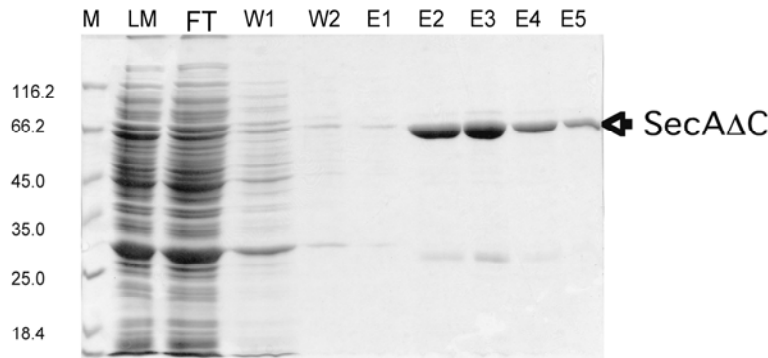
2.4 Καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της SecA

Οι SecA καθώς και οι SecAΔC πρωτεΐνες με τις σημειακές μεταλλάξεις απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺-NTA. Κάθε πρωτεΐνη που εκφράζεται από τους πλασμιδιακούς φορείς pIMBB7 και pIMBB8, φέρει στο αμινοτελικό της άκρο έναν εξαϊστιδινικό επίτοπο ο οποίος προσδίδει συγγένεια για τα Ni²⁺ μόρια του χρωματογραφικού υλικού. Όλες οι πρωτεΐνες εκτός από μία SecAΔC(D185A) απομονώθηκαν σε αρκετή ποσότητα και ικανοποιητική καθαρότητα ώστε να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω βιοχημικά πειράματα. Οι εικόνες 8 και 9 αποτελούν αντιπροσωπευτικά παραδείγματα του καθαρισμού των SecA και SecAΔC πρωτεϊνών αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται εμφανίζονται σε μοριακό βάρος 98 KD και 68 KD αντίστοιχα. Η SecAΔC(D185A) πρωτεΐνη παρόλο που φαινόταν να εκφράζεται στη συνέχεια δεν απομονωνόταν σε ικανοποιητικό βαθμό, πιθανόν εξαιτίας του σχηματισμού αδιάλυτων συσσωματωμάτων (inclusion bodies) έπειτα από την υπερέκφρασή της στο κύτταρο.



Εικόνα 8: Αντιπροσωπευτική εικόνα καθαρισμού SecA πρωτεΐνης (SecA_{L187A}). M: πρωτεϊνικός μάρτυρας, LM: το υλικό που φορτώθηκε στην

κολώνα, FT: οτιδήποτε δεν συγκρατήθηκε από την κολώνα, W1,W2: δείγμα από το ξέπλυμα της κολώνας, E1-E5: δείγματα από την πρωτεΐνη που εκλούσθηκε από την κολώνα. Η πηκτική πολυακρυλαμίδης (13%) έχει υποστεί χρώση με coomassie blue χρωστική R-250.



Εικόνα 9:
Αντιπροσωπευτική εικόνα καθαρισμού SecAΔC πρωτεΐνης (SecAΔC(L187A)). Οι συντομογραφίες είναι όπως και στην εικόνα 3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

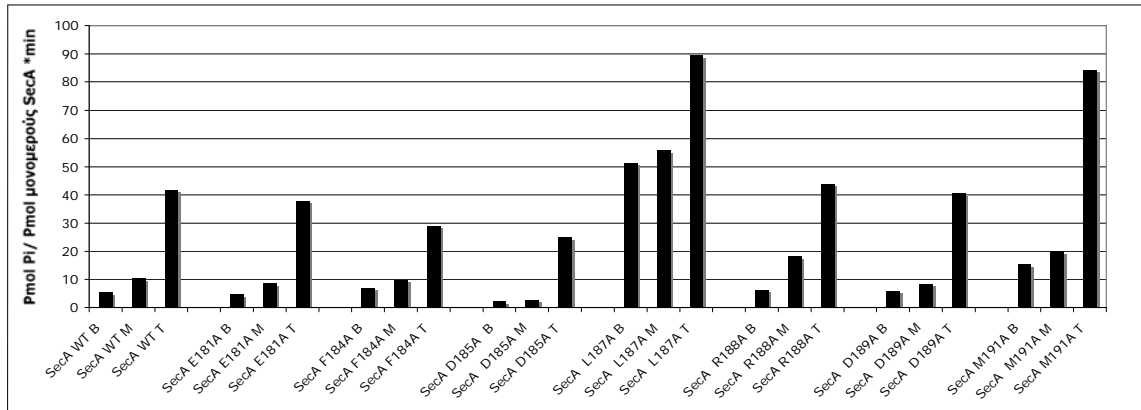
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SecA ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΜΟΤΙΒΟ Ib

3.1 Δραστικότητα ΑΤΡασης (ενδογενής, μεμβρανική , μετατόπισης)

Προκειμένου να χαρακτηριστούν οι πρωτεΐνες βιοχημικά και να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταλλαγές έχουν επηρεάσει τη λειτουργία τους , μετρήθηκε η ικανότητά τους να υδρολύουν ΑΤΡ. Πιο συγκεκριμένα μετρήθηκε η δραστικότητα ΑΤΡάσης όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο διάλυμα (ενδογενής), παρουσία ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (μεμβρανική) και παρουσία προπρωτεΐνης (μετατόπισης) (Lill, Dowhan et al,1990). Από προηγούμενες εργασίες είναι γνωστό ότι η SecA στο διάλυμα υδρολύει μικρές ποσότητες ΑΤΡ. Η υδρολυτική της ικανότητα διεγείρεται ελαφρώς παρουσία μεμβρανών και αυξάνεται κατά πολύ παρουσία προπρωτεΐνης.

Στην εικόνα 10 φαίνονται τα picomoles φωσφόρου που υδρολύει το κάθε πρωτομερές της SecA στη μονάδα του χρόνου. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που ο φαινότυπός τους είναι όμοιος με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη [SecA(L187A) και SecA(M191A)], έχουν αυξημένες μονάδες υδρόλυσης φωσφόρου και στις τρεις διαφορετικές καταστάσεις. Μάλιστα η πρωτεΐνη SecA(L187A) έχει ενδογενή υδρόλυση φωσφόρου περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη που δίνει θνησιγόνο φαινότυπο, SecA(D185A), έχει αρκετά χαμηλότερες μονάδες υδρόλυσης ΑΤΡ και στις

τρεις καταστάσεις . Η συγκεκριμένη μεταλλαγή επηρεάζει την ικανότητα της πρωτεΐνης να υδρολύει ATP ακόμα και όταν βρίσκεται στο διάλυμα. Την ικανότητα αυτή δεν την ανακτά επαρκώς παρουσία μεμβρανών και προπρωτεΐνης. Οι υπόλοιπες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που δεν είναι λειτουργικές όπως η αγρίου τύπου, όπως φάνηκε από τον *in vivo* έλεγχο της γενετικής συμπληρωματικότητας, έχουν παρόμοιες με της αγρίου τύπου ή μειωμένες μονάδες υδρόλυσης ATP.

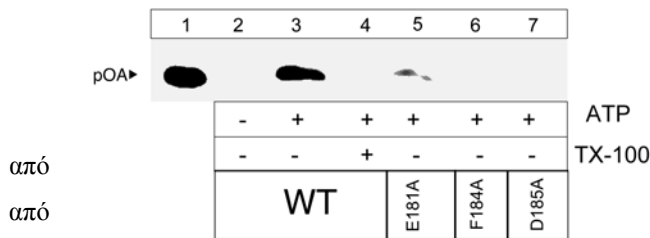


Εικόνα 10: Μέτρηση της ικανότητας υδρόλυσης ATP από κάθε πρωτομερές της SecA στη μονάδα του χρόνου και στις τρεις διαφορετικές καταστάσεις, ενδογενή, μεμβρανική και μετατόπισης. B: ενδογενής, M:μεμβρανική, T:μετατόπισης.

3.2 Δοκιμασία *in vitro* μετατόπισης προπρωτεΐνης

Προκειμένου τα μεταλλάγματα της SecA να χαρακτηριστούν περαιτέρω βιοχημικά και να διαπιστωθεί αν μπορούν να εκκρίνουν προπρωτεΐνες, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία της *in vitro* μετατόπισης προπρωτεΐνης στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιείται η proOmpA που είναι φυσικό υπόστρωμα της SecA και παρατηρείται η ικανότητα των πρωτεϊνών να την εκκρίνουν παρουσία ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων και ATP. Σε κάθε δοκιμασία υπάρχει ένα δείγμα όπου προστίθενται το ανιοντικό απορρυπαντικό TritonX-100 το οποίο διαλυτοποιεί τις μεμβράνες και κάνει την προπρωτεΐνη προσβάσιμη στην πρωτεϊνάση K που προστίθεται έπειτα από το πέρας της αντίδρασης για να απομακρύνει την προπρωτεΐνη που δεν μετατοπίστηκε. Με αυτό το πείραμα ελέγχου διασφαλίζεται ότι το σήμα είναι από την προπρωτεΐνη που μεταφέρθηκε και όχι από συσσωματώματα στη μεμβράνη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 11, από τις τρεις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν,

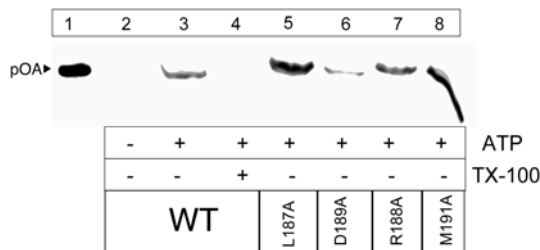
(SecA:E181A, F184A, D185A) μόνο η SecA(E181A)[γραμμή 5] έχει την ικανότητα να μεταφέρει ένα μικρό ποσοστό proOmpA σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου(εικόνα 11, γραμμή 3). Οι άλλες δύο πρωτεΐνες (γραμμές 6 και 7) δεν δίνουν κανένα σήμα proOmpA έπειτα από ανίχνευση με το αντίστοιχο αντίσωμα.



Εικόνα 11: *In vitro* μετατόπιση της proOmpA στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων, την αγρίου τύπου SecA (γραμμή 3) και τα μεταλλαγμένα παράγωγα (γραμμές 5-7).

Γραμμή 1: 5% της προστιθέμενης proOmpA, γραμμή 4: TritonX-100 αντίδραση ελέγχου. Το ανιοντικό απορρυπαντικό χρησιμοποιείται για να επιβεβαιωθεί ότι το σήμα προέρχεται από την προπρωτεΐνη που μετατοπίστηκε και όχι από συσσωματώματα της στη μεμβράνη.

Στην εικόνα 12 φαίνεται η δοκιμασία της *in vitro* μετατόπισης προπρωτεΐνης από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (SecA:L187A, R188A, D189A, M191A). Όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να μετατοπίσουν την proOmpA διαμέσου των μεμβρανών με τις SecA(L187A)[γραμμή 5] και SecA(M191A)[γραμμή 8] να δίνουν το ισχυρότερο σήμα .



Εικόνα 12: *In vitro* μετατόπιση της proOmpA στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων, από την αγρίου τύπου SecA(γραμμή 3) και από τα μεταλλαγμένα παράγωγα (γραμμές 5-8).

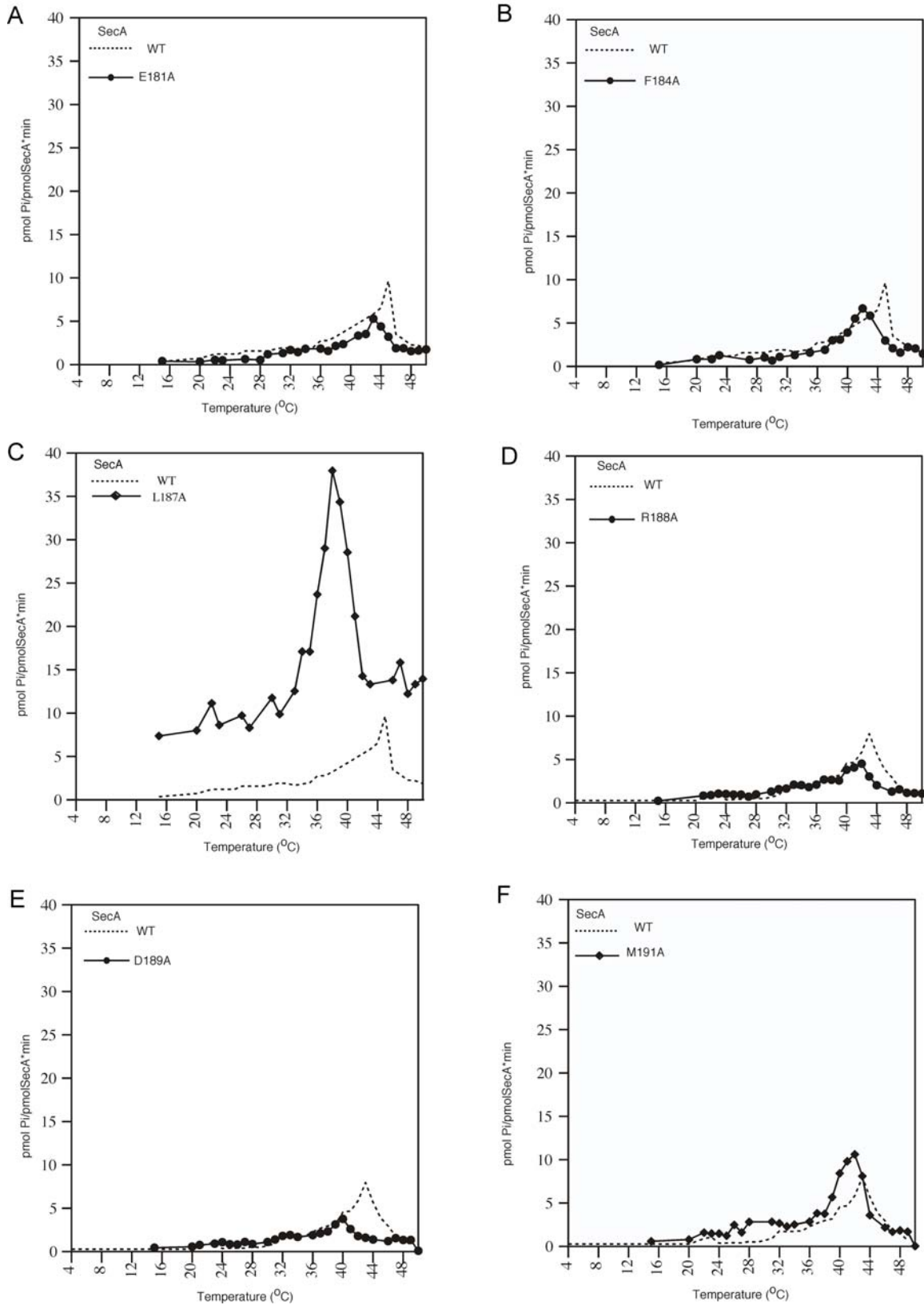
Γραμμές 1,5: όπως και στην εικόνα 6

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της *in vitro* δοκιμασίας μετατόπισης προπρωτεΐνης έρχονται σε συμφωνία με τον *in vivo* έλεγχο γενετικής συμπληρωματικότητας και με την δραστηριότητα ATPασης. Οι πρωτεΐνες με τον χειρότερο φαινότυπο στην *in vivo* δοκιμασία (SecA: E181A, F184A, D185A) δεν μπορούν ή μπορούν ελάχιστα να καταλύσουν τη μεταφορά της προπρωτεΐνης εντός των μεμβρανικών κυστιδίων. Αντίθετα οι πρωτεΐνες (SecA: L187A, R188A, D189A, M191A) που είναι πλήρως ή εν

μέρη λειτουργικές στον *in vivo* έλεγχο και έχουν δραστικότητα ΑΤΡασης, καταλύουν τη μεταφορά.

3.2 Ενδογενής δραστικότητα ΑΤΡασης των SecA μεταλλαγμάτων, ως αποτέλεσμα θερμοκρασιακών μεταβολών

Για να κατανοήσουμε καλύτερα τις αλλαγές και τις διαφορές των μεταλλαγμάτων με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, μετρήθηκε η ενδογενής δραστικότητα ΑΤΡασης σε ένα εύρος θερμοκρασιών 4⁰C-50⁰C. Η αύξηση της θερμοκρασίας αντικατοπτρίζει την σταδιακή αύξηση της ενέργειας που χρειάζεται μια νανομηχανή (SecA) για να λειτουργήσει, δηλαδή να υδρολύσει ΑΤΡ.



Εικόνα 13: Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 1XBB με 40 μg/ml SecA, 0.4mg/ml BSA και 0,01M ATP. Ο χρόνος επώασης ήταν 12 min, το εύρος θερμοκρασιών αναγράφεται στον άξονα των X. Στον

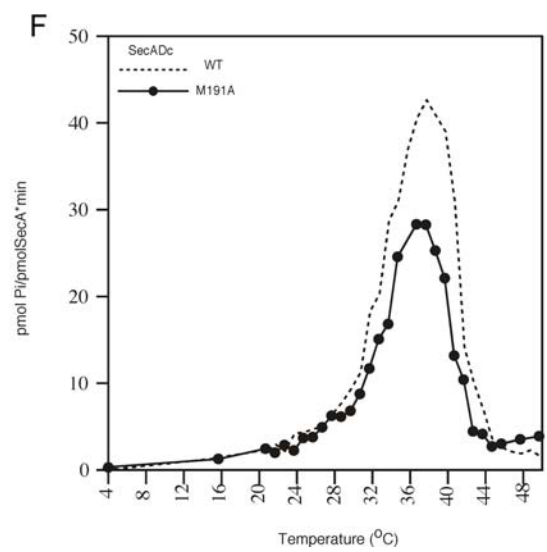
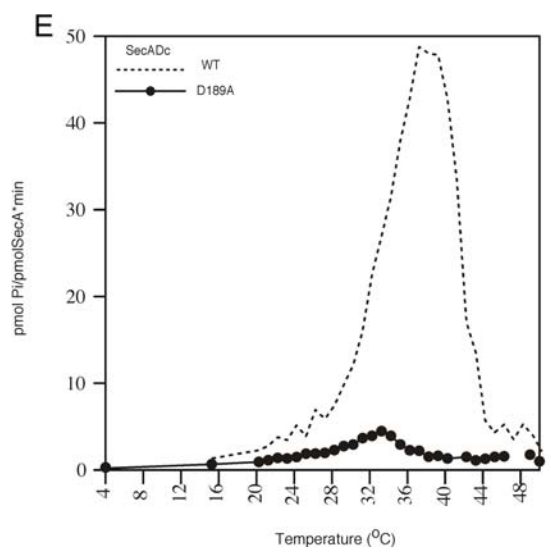
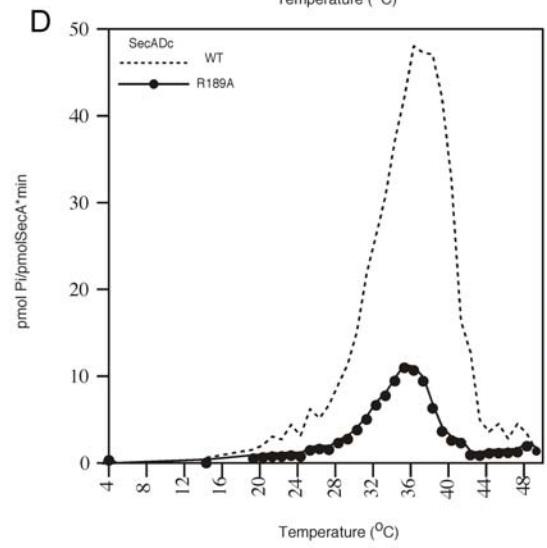
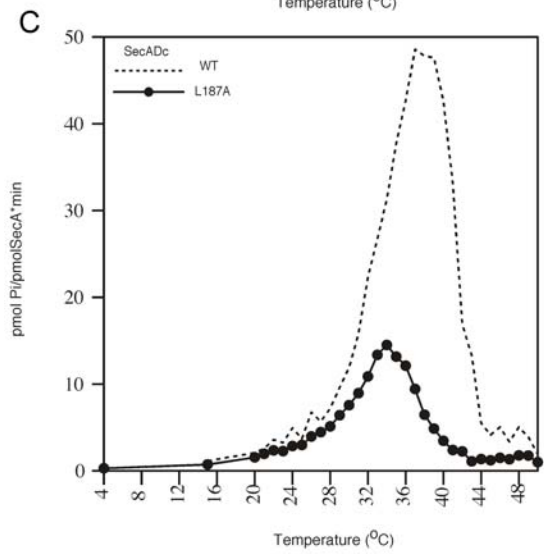
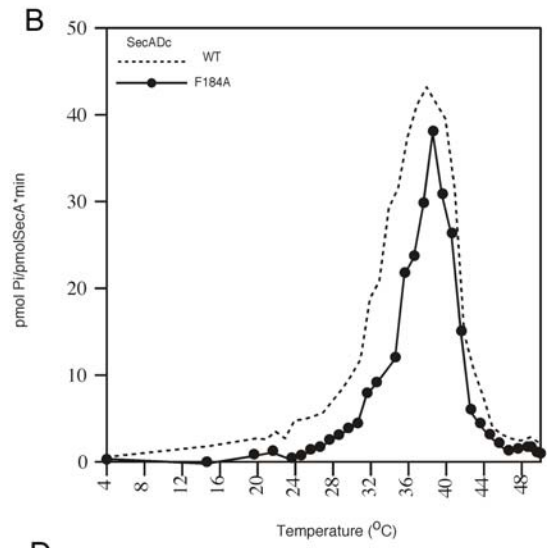
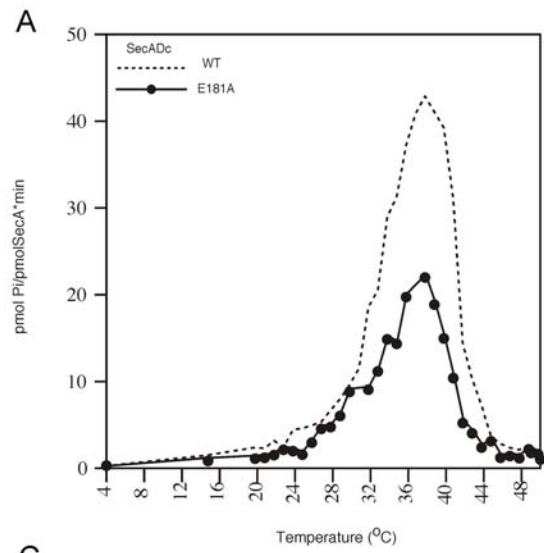
άξονα των Y φαίνονται τα picomoles φωσφόρου που υδρολύονται από κάθε πρωτομερές της SecA στη μονάδα του χρόνου(min).

Όπως φαίνεται από την εικόνα 8 η καμπύλη της αγρίου τύπου πρωτεΐνης ακολουθεί ένα πρότυπο. Στην αρχή (4⁰C-32⁰C) η υδρόλυση του ATP είναι πολύ χαμηλή, στη συνέχεια σταδιακά αυξάνεται φτάνοντας στο μέγιστο της υδρόλυσης που είναι περίπου στους 43⁰C. Έπειτα η υδρόλυση μειώνεται και στους 50⁰C έχει γίνει σχεδόν μηδενική. Τα μεταλλάγματα της SecA: E181A, F184A, R188A, D189A (εικόνα: 8A, 8B, 8D, 8E) ακολουθούν το πρότυπο καμπύλης της αγρίου τύπου SecA εκτός από την περιοχή που μεγιστοποιείται η υδρόλυση του ATP (40⁰C-44⁰C) όπου έχουν χαμηλότερες μονάδες υδρόλυσης και επομένως σχηματίζουν χαμηλότερη καμπύλη από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (SecAWT). Επίσης όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες έχουν χαμηλότερη θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης ATP από την SecAWT. Οι πρωτεΐνες SecA: L187A, M191A (εικόνα 8C, 8F) που είναι και οι μόνες που δίνουν φαινότυπο αγρίου τύπου στον in vivo έλεγχο γενετικής συμπληρωματικότητας, έχουν υψηλότερες μονάδες υδρόλυσης ATP στις θερμοκρασίες μέγιστης υδρόλυσης. Ειδικότερα η SecA(L187A) έχει τέσσερις φορές υψηλότερες μονάδες στη θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης ATP. Επίσης η θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης ATP είναι μετατοπισμένη κατά 7⁰C, δηλαδή είναι 37⁰C για την SecA(L187A) και 44⁰C για την αγρίου τύπου SecA.

Συμπερασματικά τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι όλα τα μεταλλάγματα στην α8 έλικα χρειάζονται λιγότερη ενέργεια για να υδρολύσουν ATP. Τέσσερις από τις έξι μεταλλαγές έχουν ελαττώσει την ικανότητα της πρωτεΐνης να υδρολύει ATP. Επιπροσθέτως στην περιοχή όπου η έλικα α8 αλληλεπιδρά με το Stem βρίσκεται μια μεταλλαγή, η SecA(L187A), που αλλάζει δραματικά την ικανότητα της πρωτεΐνης να ελέγχει την υδρόλυση του ATP. Οι ενδογενής μονάδες υδρόλυσης του συγκεκριμένου μεταλλάγματος είναι συγκρίσιμες με την ATPase μετατόπισης της αγρίου τύπου SecA.

3.3 Ενδογενής δραστηριότητα ATPase των SecAΔC παραγώγων, ως αποτέλεσμα θερμοκρασιακών μεταβολών.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η ενδογενής δραστικότητα ATPασης των SecAΔC παραγώγων σε θερμοκρασιακό εύρος από (4⁰C-50⁰C) όπως ακριβώς περιγράφηκε και για τις SecA πρωτεΐνες στην παράγραφο 3.2. Η ΔC μορφή των SecA χρησιμοποιήθηκε για να κατανοήσουμε κατά πόσο οι μεταλλαγές έχουν επηρεάσει τη «μηχανή» υδρόλυσης ATP της SecA. Στη SecAΔC λείπει το καρβοξυτελικό άκρο της SecA το οποίο είναι γνωστό (karamanou et. al, 2007) ότι ρυθμίζει αρνητικά τον έλεγχο υδρόλυσης του ATP από τη SecA. Για το λόγο αυτό η αγρίου τύπου SecAΔC έχει πολύ ψηλότερες μονάδες ενδογενούς ATPασης από την ολόκληρη SecA. Στην καμπύλη για την αγρίου τύπου ΔC πρωτεΐνη η υδρόλυση του ATP ξεκινάει από χαμηλότερες θερμοκρασίες (περίπου 24⁰C) και η θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης είναι οι 37⁰C. Στην εικόνα 9 φαίνεται ότι όλα τα μεταλλάγματα της έλικας α8 έχουν χαμηλότερες μονάδες υδρόλυσης ATP από SecAΔC. Η παραπάνω παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και οι επτά σημειακές μεταλλαγές πάνω στην α8 έλικα επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα της SecA να υδρολύει ATP, απουσία της καρβοξυτελικής περιοχής .



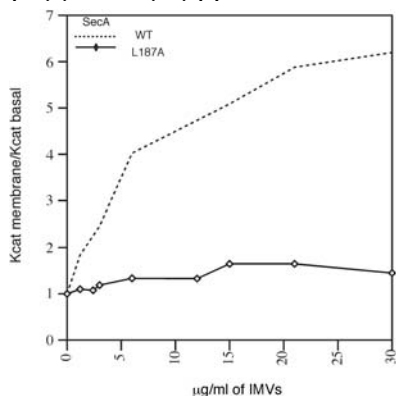
Εικόνα 14: Οι συνθήκες του πειράματος είναι ίδιες όπως περιγράφηκαν στην εικόνα 13. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι SecA ΔC μορφές των μεταλλαγμάτων της α8 έλικας.

3.4 Αναλυτικός βιοχημικός χαρακτηρισμός του παραγώγου SecA(L187A)

Όπως περιγράφηκε παραπάνω το μετάλλαγμα SecA(L187A) φαίνεται να έχει αρκετά τροποποιημένες ιδιότητες από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, οστόσο υποκαθιστά πλήρως τη λειτουργία της χρωμοσωμικής SecA στην δοκιμασία *in vivo* γενετικής συμπληρωματικότητας και καταλύει τη μεταφορά της proOmpA στα IMVs εξίσου αποτελεσματικά με την SecA. Πιο συγκεκριμένα έχει πολύ υψηλές μονάδες ενδογενούς ΑΤΡασης που αυξάνονται ελάχιστα μετά την προσθήκη μεμβρανών, ενώ η ΑΤΡαση μετατόπισης διεγείρεται μόλις μιάμιση φορά (εικόνα 10). Το αποτέλεσμα αυτό γέννησε το ερώτημα αν η SecA(L187A) μπορεί να διεγείρει τις μονάδες ΑΤΡάσης της, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μεμβρανών και προπρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό μετρήθηκε η μεμβρανική δραστηριότητα και η δραστηριότητα μετατόπισης ΑΤΡάσης έπειτα από τιτλοδότηση μεμβρανών και προπρωτεΐνης αντίστοιχα.

3.4.1 Μέτρηση της μεμβρανικής δραστηριότητας ΑΤΡασης έπειτα από τιτλοδότηση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων

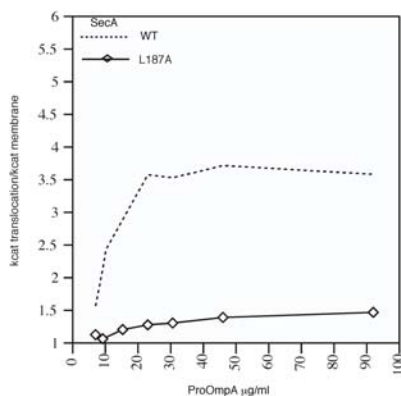
Έπειτα από τιτλοδότηση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων, όπως φαίνεται από την εικόνα 15, η SecA αγρίου τύπου αυξάνει τη διέγερσής της επί της ενδογενούς δραστηριότητας, μέχρι και έξι φορές. Αντίθετα η SecA(L187A) φαίνεται να διεγείρεται μιάμιση φορά πάνω από την ενδογενή δραστηριότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων.



Εικόνα 15: Τιτλοδότηση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων σε SecA αγρίου τύπου και στην SecA(L187A). Στον άξονα των Y φαίνονται οι φορές διέγερσης της μεμβρανικής δραστηριότητας επί της ενδογενούς. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 12 λεπτά. Η συγκέντρωση της SecA σε κάθε αντίδραση ήταν 20μg/ml.

3.4.2 Μέτρηση της δραστηριότητας μετατόπισης ΑΤΡασης έπειτα από τιτλοδότηση προπρωτεΐνης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση προπρωτεΐνης προκειμένου να διαπιστωθεί αν θα διεγερθεί η δραστηριότητα μετατόπισης επί της μεμβρανικής σε υψηλές συγκεντρώσεις προπρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16 ενώ η SecA διεγείρεται περίπου τέσσερις φορές από την proOmpA, η SecA(L187A) διεγείρεται μόλις μιάμιση φορά ακόμα και στις υψηλές συγκεντρώσεις προπρωτεΐνης.



Εικόνα 16: Μέτρηση της δραστηριότητας μετατόπισης ΑΤΡασης έπειτα από τιτλοδότηση προπρωτεΐνης. Στον άξονα των Y φαίνονται οι φορές διέγερσης της δραστηριότητας μετατόπισης επί της μεμβρανικής. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 37°C για 12 λεπτά. Η συγκέντρωση της SecA σε κάθε αντίδραση ήταν 20µg/ml.

3.4.3 Μέτρηση της σταθεράς διάστασης του παραγώγου SecA(L187A) για το μεμβρανικό SecYEG σύμπλοκο

Η παρατήρηση ότι η SecA(L187A) δεν διεγείρεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις μεμβρανών, δημιούργησε το ερώτημα αν αυτό συμβαίνει εξαιτίας μειωμένης συγγένειας της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης για τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια. Για να απαντηθεί το ερώτημα, μετρήθηκε η συγγένεια της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και του μεταλλάγματος SecA(L187A) για τη SecYEG. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε ραδιοσημασμένη ³⁵S-SecA σαν ανιχνευτής και αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη-σημασμένης SecA. Στη συνέχεια μετρήθηκε η SecA που δεσμεύεται στο μεμβρανικό κλάσμα, ακριβώς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.7. Όπως φαίνεται στον πίνακα 1 η σταθερά διάστασης του μεταλλάγματος SecA(L187A) είναι 114nM δηλαδή τρεις περίπου φορές μικρότερο από της αγρίου τύπου. Επομένως η SecA(L187A) αναγνωρίζει και προσδέεται στο SecYEG σύμπλοκο και επομένως η συγγένεια πρόσδεσης δεν αποτελεί αιτία για τη μειωμένη διέγερση της μεμβρανικής δραστηριότητας.

Πίνακας 1: Σταθερές διάστασης της SecA και της SecA(L187A) για τη SecYEG στη μεμβράνη στους 4°C.

Πρωτεΐνη	K_D (nM)
SecA	40
SecA(L187A)	114

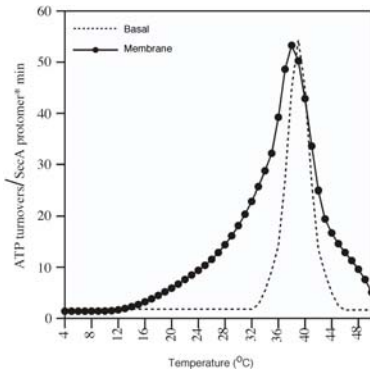
3.4.4 Μέτρηση της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης της SecA(L187A) ως συνάρτηση θερμοκρασιακών μεταβολών

Όπως παρατηρήθηκε από τη δοκιμασία τιτλοδότησης με ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια και μέτρησης της μεμβρανικής δραστικότητας, στους 37 °C πραγματοποιείται μια ελάχιστη διέγερση της μεμβρανικής δραστικότητας του μεταλλάγματος SecA(L187A) ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις μεμβρανών.

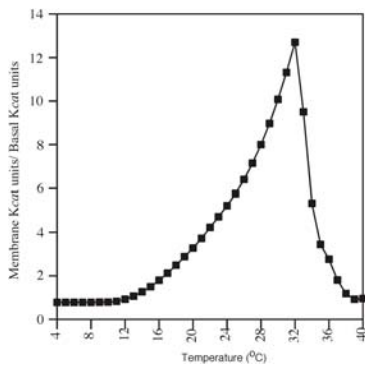
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το μετάλλαγμα διεγείρεται από τις μεμβράνες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπου οι ενδογενής μονάδες υδρόλυσης ΑΤΡάσης είναι χαμηλότερες ή αν ακολουθεί το πρότυπο της ενδογενούς δραστικότητας ΑΤΡάσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης της SecA(L187A) ως συνάρτηση θερμοκρασιακών μεταβολών. Για τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε υψηλή συγκέντρωση μεμβρανών (18μg/ml), που όπως φαίνεται από την εικόνα 10 διεγείρει έξι φορές τη μεμβρανική δραστηκότητα της SecAWT επι της ενδογενούς. Οι συνθήκες του πειράματος, εκτός της θερμοκρασίας, ήταν ακριβώς ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 3.4.1. Όπως φαίνεται από την εικόνα 17 η καμπύλη της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης δεν ακολουθεί αυτή της ενδογενούς. Η διέγερση των μονάδων ΑΤΡάσης παρουσία μεμβρανών ξεκινάει από τους 16°C, αντίθετα όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο διάλυμα ξεκινάει από τους 32°C. Κοντά στους 32°C η διέγερση της μεμβρανικής δραστικότητας επί της ενδογενούς είναι περίπου 12 φορές (εικόνα 18). Αντίθετα στους 37°C που οι μονάδες ενδογενούς δραστικότητας είναι ιδιαίτερα υψηλές, η διέγερση γίνεται μόλις 1,5 φορά, ακριβώς όσο είχε παρατηρηθεί και στην παράγραφο 3.4.1

Συμπερασματικά, το μετάλλαγμα SecA(L187A) έχει ψηλές μονάδες μετατροπής ΑΤΡ από κάθε πρωτομερές της SecA και στις τρεις δραστικότητες ΑΤΡάσης (Ενδογενής, μεμβρανική, μετατόπισης). Παρόλο που η πρωτεΐνη είναι πλήρως λειτουργική, δεν

ακολουθεί το πρότυπο διέγερσης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης ανάλογα με τη δραστικότητα ΑΤΡασης . Ωστόσο από την παράγραφο 3.4.4 φαίνεται πως υπάρχει μεμβρανική διέγερση που δεν είναι ορατή στους 37⁰C εξαιτίας πολύ υψηλών μονάδων ενδογενούς ΑΤΡασης.



Εικόνα 17: Μέτρηση της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης της SecA(L187A) ως συνάρτηση θερμοκρασιακών μεταβολών. Στον άξονα των X φαίνεται η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε κάθε αντίδραση. Στον άξονα των Y φαίνεται η υδρόλυση ATP από κάθε πρωτομερές της SecA(L187A) στη μονάδα του χρόνου. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν SecA :20μg/ml, IMVs :18μg/ml, 0.01M ATP. Ο χρόνος επώασης ήταν 12 min



Εικόνα 18: Ο λόγος της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης της SecAL187A προς την ενδογενή. Στον άξονα Y φαίνονται οι φορές διέγερσης της μεμβρανικής δραστικότητας ΑΤΡάσης επί της ενδογενούς . Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν SecA :20μg/ml, IMVs :18μg/ml, 0.01M ATP. Ο χρόνος επώασης ήταν 12 min

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η SecA αποτελεί έναν μικροκινητήρα που καταλύει τη μετατόπιση των πολυπεπτιδικών υποστρωμάτων διαμέσου του SecYEG καναλιού της μεμβράνης. Η κατάλυση της μεταφοράς γίνεται σε διάφορα στάδια όπου η SecA βρίσκεται σε διαφορετικές δομικές καταστάσεις. Ο μηχανισμός που περιγράφει τη σειρά των γεγονότων της κατάλυσης, δεν είναι πλήρως ολοκληρωμένο. Ωστόσο κάποια βασικά βήματα είναι γνωστά. Για να κατανοηθεί περαιτέρω η σειρά των γεγονότων από την πρόσδεση της προπρωτεΐνης στη SecA έως και την μετατόπισή της διαμέσου της μεμβράνης, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της έλικας α8 με το Stem.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της σημασίας της έλικας α8 για την πρωτεΐνη και της αλληλεπίδρασής της με το Stem για την κατάλυση της μεταφοράς των προπρωτεϊνών. Η υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση της α8 έλικας με το Stem μπορεί να είναι σημαντική για τη λειτουργία της SecA προέκυψε από τη δομή της SecA με το πεπτίδιο οδηγός (Gelís et al. 2007).

Αρχικά για να διαλευκάνουμε το ρόλο της έλικας α8 στην πρωτεΐνη πραγματοποιήσαμε σημειακές μεταλλάξεις. Από τον *in vivo* έλεγχο της γενετικής συμπληρωματικότητας παρατηρήσαμε ότι 5 (SecA: E181A, F184A, D185A, R188A, D189A) από τα 7 αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες οδηγούσαν σε πρωτεΐνες που δεν μπορούσαν να υποκαταστήσουν τη χρωμοσωμική SecA. Η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι η α8 έλικα είναι σημαντική για τη λειτουργία της SecA. Επιπροσθέτως ο θνησιγόνος φαινότυπος της μεταλλαγής του D185 σε αλανίνη, που είναι ένα κατάλοιπο της α8 έλικας με προσανατολισμό προς την υπόλοιπη SecA μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι η επικοινωνία της α8 έλικας με την υπόλοιπη πρωτεΐνη είναι σημαντική.

Η ικανότητα των μεταλλαγμάτων να υδρολύουν ATP διαπιστώθηκε από τη μέτρηση δραστηριότητας ATPάσης σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις (ενδογενής, μεμβρανική, μετατόπισης). Όλα τα μεταλλάγματα που ήταν λιγότερο λειτουργικά από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη σύμφωνα με την *in vivo* δοκιμασία γενετικής συμπληρωματικότητας είχαν χαμηλότερες μονάδες υδρόλυσης ATP και στις τρεις διαφορετικές καταστάσεις.

Αντίθετα τα πλήρως λειτουργικά μεταλλάγματα (SecA: L187A, M191A) είχαν ψηλότερες μονάδες υδρόλυσης ATP από την SecA. Φαίνεται επομένως ότι οι σημειακές μεταλλαγές που οδήγησαν σε προβληματικό φαινότυπο έχουν επηρεάσει την ικανότητα της πρωτεΐνης να υδρολύει ATP.

Η ικανότητα των μεταλλαγμάτων να καταλύουν τη μεταφορά της προπρωτεΐνης διαπιστώθηκε από την δοκιμασία *in vitro* μετατόπισης της proOmpA σε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια. Τρία από τα μεταλλάγματα της α8 έλικας (SecA: E181A, F184A, D185A) δεν έχουν σχεδόν καθόλου την ικανότητα να μεταφέρουν proOmpA (εικόνα 11). Τα υπόλοιπα τέσσερα ((SecA: L187A, R188A, D189A, M191A) φαίνεται να μεταφέρουν ένα ποσοστό, με τις SecA:L187A και M191A να είναι οι πιο λειτουργικές πρωτεΐνες (εικόνα 12). Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τη δραστικότητα ATPάσης και με τον *in vivo* έλεγχο της γενετικής συμπληρωματικότητας, φανερώνοντας τις λειτουργικές επιπτώσεις που έχει επιφέρει κάθε μεταλλαγή στην SecA.

Στη συνέχεια για να κατανοήσουμε πως οι μεταλλαγές έχουν επηρεάσει τη λειτουργία της SecA, μετρήθηκε η ενδογενής δραστικότητα ATPάσης σε θερμοκρασιακό εύρος από 4⁰C -50⁰C. Όπως ήταν αναμενόμενο τα μεταλλάγματα που έχουν λειτουργικά προβλήματα είχαν μειωμένες μονάδες υδρόλυσης ATP που ήταν διακριτές εκεί όπου η SecA έχει αυξημένες μονάδες υδρόλυσης (32⁰C -45⁰C). Επιπλέον όλα τα μεταλλάγματα είχαν μετατοπισμένη σε χαμηλότερους βαθμούς τη θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης. Η παραπάνω παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και οι 7 μεταλλαγές επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά της υδρόλυσης από τον DEAD κινητήρα και επομένως η α8 έλικα είναι σημαντική για τη λειτουργία του.

Το μετάλλαγμα SecA(L187A) είχε τέσσερις φορές ψηλότερες μονάδες ενδογενούς υδρόλυσης από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και θερμοκρασία μέγιστης υδρόλυσης είναι μετατοπισμένη στους 37⁰C τη στιγμή που για τη SecA είναι 44⁰C. Αυτή η θερμοκρασιακή μετατόπιση είναι χαρακτηριστική για μεταλλάξεις της «θύρας 1(gate 1)» (Karamanou et. al, 2007). Η θύρα 1 είναι ένας ιοντικός δεσμός (γέφυρα άλατος) που σχηματίζεται μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου καταλοίπου D212 και του θετικά φορτισμένου R566. Τα παραπάνω κατάλοιπα βρίσκονται στις NBD και IRA2 δομικές περιοχές της SecA αντίστοιχα. Η μεταλλαγή του R566 σε αλανίνη μετατοπίζει το μέγιστο της ενδογενούς ATPάσης στους 38⁰C (Karamanou et. al, 2007). Σύμφωνα με την

ίδια βιβλιογραφική πηγή το άνοιγμα της θύρας 1 είναι απαραίτητο για τη μετατόπιση των πρωτεϊνών από της SecA . Η παρατήρηση ότι η SecA(L187A) πρωτεΐνη έχει παρόμοιο βιοχημικό φαινότυπο με ένα μετάλλαγμα που αδυνατεί να σχηματίσει τον ιοντικό δεσμό στις θέσεις 212-566 μας επιτρέπει να υποθέσουμε ότι ο δεσμός αυτός μπορεί εύκολα να σπάει στο συγκεκριμένο μετάλλαγμα. Στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη ο δεσμός σπάει μόνο κατά τη διάρκεια της κατάλυσης μεταφοράς της προπρωτεΐνης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα για τις SecAΔC μορφές των μεταλλαγμάτων της α8 έλικας. Οι SecAΔC μορφές χρησιμοποιήθηκαν για να κατανοήσουμε την επίδραση των μεταλλαγών της έλικας α8 στον DEAD κινητήρα. Όλα τα μεταλλάγματα είχαν χαμηλότερες μονάδες ενδογενούς ATPάσης σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλαγές των συντηρημένων καταλοίπων της έλικας α8 όχι μόνο επηρεάζουν την υδρόλυση του ATP όπως είδαμε από την παράγραφο 3.3 αλλά την επηρεάζουν αρνητικά. Επιπλέον συμπεραίνουμε ότι για τα μεταλλάγματα SecA:L187A και M191A, έχουν υψηλότερες μονάδες υδρόλυσης από την SecA μόνο όταν υπάρχει η καρβοξυτελική περιοχή (C-domain).

Τα μεταλλάγματα SecA:L187A και M191A που δίνουν φαινότυπο παρόμοιο με της SecA, έγιναν σε κατάλοιπα της α8 έλικας που αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα του Stem (Εικόνα 6). Η δομική επίπτωση που αναμένεται να έχουν οι παραπάνω μεταλλαγές στη SecA είναι να χαλαρώνουν την αλληλεπίδραση της έλικας α8 με το Stem. Πιο συγκεκριμένα η SecA(L187A), έχει ιδιαίτερα ψηλές μονάδες υδρόλυσης και δεν ακολουθεί το πρότυπο διέγερσης μεμβρανικής ATPάσης και ATPάσης μετατόπισης της SecA (Εικόνα 10). Παρόλα αυτά είναι πλήρως λειτουργική όπως φαίνεται από τον *in vivo* έλεγχο της γενετικής συμπληρωματικότητας και από την *in vitro* μετατόπιση προπρωτεΐνης σε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια. Από τα επτά μεταλλάγματα που αναλύθηκαν αρχικά, ο βιοχημικός φαινότυπος του SecA(L187A) φάνηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρον, για το λόγο αυτό αναλύθηκε εκτενέστερα.

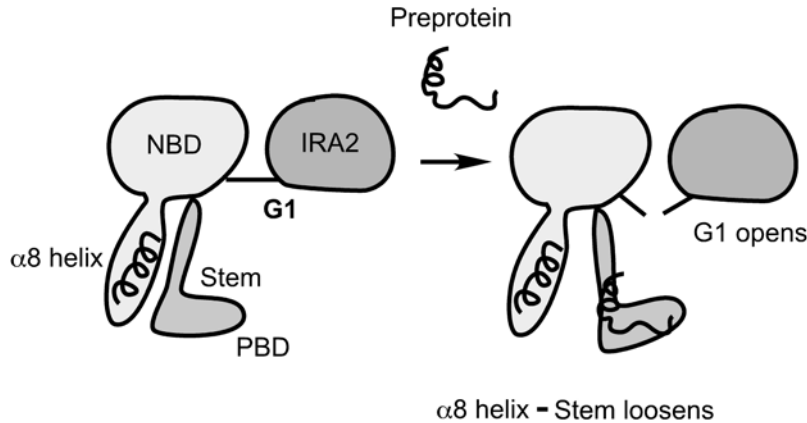
Η μεμβρανική δραστηριότητα ATPάσης και η ATPάση μετατόπισης της SecA(L187A) διεγείρονται ελάχιστα στους 37 από την παρουσία μεμβρανών και προπρωτεΐνης τη στιγμή που η SecA διεγείρεται περίπου 2 και 5 φορές αντίστοιχα (εικόνα 10). Το συγκεκριμένο μετάλλαγμα δημιούργησε την απορία αν η διέγερση της ATPάσης

μετατόπισης επί της μεμβρανικής είναι συνδεδεμένη με την κατάλυση της μετατόπισης του υποστρώματος ή αν οι αυξημένες μονάδες ΑΤΡάσης μετατόπισης είναι ικανές για την μετατόπιση του υποστρώματος.

Αρχικά για να διαπιστωθεί αν το μετάλλαγμα έχει την ικανότητα να διεγείρει την μεμβρανική δραστηριότητα ΑΤΡάσης και την ΑΤΡάση μετατόπισης πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων και προπρωτεΐνης. Όταν οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 37⁰C δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία διέγερση της ΑΤΡάσης ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις μεμβρανών και προπρωτεΐνης. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ποσότητα των μεμβρανών και της προπρωτεΐνης δεν ήταν ο περιοριστικός παράγοντας για την χαμηλή διέγερση ΑΤΡάσης. Από το αποτέλεσμα αυτό υποθέσαμε ότι η χαμηλή διέγερση δεν οφείλεται σε μειωμένη συγγένεια της SecA(L187A) για τις μεμβράνες και την προπρωτεΐνη. Παρόλα αυτά η συγγένεια της πρωτεΐνης για το SecYEG σύμπλοκο μετρήθηκε. Από τη μέτρηση βρέθηκε πως η σταθερά διάστασης είναι 114nM. Ο αριθμός αυτός είναι πολύ μικρότερος από την ποσότητα της SecA στο κύτταρο και μόνο 3 φορές μικρότερος από της αγρίου τύπου SecA. Επομένως η SecA(L187A) αναγνωρίζει και προσδένεται στο SecYEG σύμπλοκο της μεμβράνης.

Στη συνέχεια προκειμένου να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποια διέγερση της μεμβρανικής ΑΤΡάσης σε ένα εύρος θερμοκρασιών, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της μεμβρανικής δραστηριότητας ΑΤΡάσης της SecA(L187A) ως συνάρτηση θερμοκρασιακών μεταβολών. Για τη δοκιμασία αυτή χρησιμοποιήθηκε αυξημένη συγκέντρωση ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων. Όπως φαίνεται από την παράγραφο 3.4.4 υπάρχει μεμβρανική διέγερση που στους 32⁰C φτάνει τις 12 φορές. Επίσης η διέγερση της μεμβρανικής ΑΤΡάσης ξεκινάει σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία από την ενδογενή. Όπως φαίνεται από την εικόνα 16, το πρότυπο καμπύλης της μεμβρανικής δραστηριότητας είναι πολύ διαφορετικό από της ενδογενούς. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στους 37⁰C δεν μπορούσαμε να παρατηρήσουμε τη διέγερση της μεμβρανικής ΑΤΡάσης και επομένως την απόκριση της SecA(L187A) στην ύπαρξη μεμβρανών, εξαιτίας των ιδιαίτερα αυξημένων μονάδων ενδογενούς ΑΤΡάσης.

Συμπερασματικά η $\alpha 8$ έλικα $\alpha 8$ είναι σημαντική για τη λειτουργία της πρωτεΐνης και οι μεταλλαγές συντηρημένων αμινοξέων της οδηγούν τον DEAD κινητήρα σε μειωμένη ικανότητα υδρόλυσης. Το χαλάρωμα της αλληλεπίδρασης $\alpha 8$ έλικας –Stem δεν οδηγεί σε πρωτεΐνες με προβληματικό φαινότυπο. Ωστόσο φαίνεται να δημιουργούνται μεταλλάγματα με χαρακτηριστικά πιο κοντά σε αυτά που έχει η SecA κατά τη διάρκεια μετατόπισης προπρωτεϊνών. Υποθέτουμε επομένως ότι το χαλάρωμα της αλληλεπίδρασης της έλικας $\alpha 8$ με το Stem είναι σημαντικό κατά τη διάρκεια της μετατόπισης προπρωτεϊνών από τη SecA. Στην εικόνα 19 φαίνεται ένα υποθετικό μοντέλο για τη μετατόπιση των προπρωτεϊνών από τη SecA.



Εικόνα 19: Υποθετικό μοντέλο μετατόπισης προπρωτεϊνών από τη SecA. Κατά τη διάρκεια της μετατόπισης προπρωτεϊνών από τη SecA η αλληλεπίδραση της $\alpha 8$ έλικας με το Stem χαλαρώνει και ο ιοντικός δεσμός που αποκαλείται θύρα 1 σπάει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υλικά και μέθοδοι

5.1 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

5.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά:

- TAE 10X
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Πηκτικό (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης) 5X
- Χτένες, συσκευή ηλεκτροφόρησης

Πρωτόκολλο:

Διαλύουμε την ενδεδειγμένη ποσότητα αγαρόζης σε σκόνη σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X και μετά θερμαίνουμε σε φούρνο μικροκυμάτων. Ψύχουμε στη συνέχεια το πήκτωμα στους 56 °C και προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/μl. Αφαιρούμε μετά την πήξη την χτένα και το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα.

Φορτώνουμε τα δείγματα στο πήκτωμα και εφαρμόζουμε το κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο.

5.1.2 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA με αλακαλική λύση

1. Εμβολιάζουμε, από φρέσκια στερεή καλλιέργεια κυττάρων LB, με μοναδική αποικία 5ml LB που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάζουμε τα κύτταρα ολονύκτια στην κατάλληλη θερμοκρασία.

2. Συλλέγουμε τα κύτταρα που αντιστοιχούν σε 1.5 ml υγρής καλλιέργειας με φυγοκέντρηση 2 min στα 13.000 rpm / θερμοκρασία δωματίου.

3. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε 200 μl διαλύματος P1 το οποίο περιέχει RNάση A (100μg/ml). Επωάζουμε για 5 min / θερμοκρασία δωματίου.

4. Προσθέτουμε 200 μl διαλύματος P2 και αντιστρέφουμε τον δοκιμαστικό σωλήνα 5-6 φορές. Επωάζουμε τα κύτταρα για 2 min / θερμοκρασία δωματίου.

5. Προσθέτουμε 200 μl διαλύματος P3 αντιστρέφουμε τον δοκιμαστικό σωλήνα 5-6 φορές και επωάζουμε για 15 min / πάγο.

6. Προσθέτουμε 150 μl διαλύματος χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1. Αναμειγνύουμε εκτενώς και επωάζουμε για 5 min / πάγο.

7. Φυγοκεντρούμε για 15 min στα 13.000 rpm / 4°C.
8. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε έναν καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα.
9. Προσθέτουμε 1.2 ml παγωμένης αιθανόλης, αναμειγνύουμε και επωάζουμε για 15 min / -80 °C
10. Φυγοκεντρούμε για 15 min στα 13.000 rpm, απομακρύνουμε το υγρό και ξεπλύνουμε το ίζημα με παγωμένη αιθανόλη 70%. Φυγοκεντρούμε για 10 min στα 13.000 rpm / 4°C, απομακρύνουμε το υγρό και αφήνουμε να στεγνώσει το ίζημα.
11. Επαναδιαλύουμε το ίζημα προσθέτοντας αποστειρωμένο νερό milli-Q

5.1.3 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων

Υλικά:

- LB υγρό θρεπτικό υλικό
- Τρυβλία με LB
- TFB1, παγωμένο
- TFB2, παγωμένο
- Ξηρός πάγος / υδατόλουτρο αιθανόλης

Πρωτόκολλο:

1. Εμβολιάζουμε 2.5 ml LB με μοναδική αποικία από στερεό θρεπτικό υλικό LB και επωάζουμε τα κύτταρα υπό ανάδευση ολονύχτια στη κατάλληλη θερμοκρασία
2. Εμβολιάζουμε 250 ml LB με τα 2.5 ml της ολονύχτιας καλλιέργειας (1:100), προσθέτουμε 20 mM $MgSO_4$ και επωάζουμε τα κύτταρα μέχρι $O.D_{600} = 0.4 - 0.6$
3. Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 5 min στα 4500 rpm / 4°C
4. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 100 ml παγωμένου TFB1
5. Επωάζουμε τα κύτταρα για 5 min στον πάγο
6. Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 5 min στα 4500 rpm / 4°C
7. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10 ml παγωμένου TFB2

8. Επωάζουμε τα κύτταρα για 60 min στον πάγο, τα ψύχουμε με το υδατόλουτρο αιθανόλης στο οποίο έχει προστεθεί ξηρός πάγος και τα αποθηκεύουμε στους -80°C .

5.1.4 Μετασηματισμός κυττάρων (G)

Υλικά:

- Αποστειρωμένοι σωλήνες πολύ-προπυλενίου 17 x 100 mm.
- LB θρεπτικό
- Τρυβλία LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό
- Υδατόλουτρο στους 42°C

Πρωτόκολλο:

1. Ψύχουμε στον πάγο τους αποστειρωμένους σωλήνες πολύ-προπυλενίου
2. Τοποθετούμε τα δεκτικά κύτταρα στο πάγο από τους -80°C μέχρι να ξεπαγώσουν.
3. Μεταφέρουμε περίπου 100 μl δεκτικών κυττάρων στους αποστειρωμένους σωλήνες πολύ-προπυλενίου.
4. Προσθέτουμε 2-10 ng DNA στα 100 μl δεκτικών κυττάρων
5. Τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο για μισή ώρα
6. Επωάζουμε τα κύτταρα για 60 min / 42°C και αμέσως τα τοποθετούμε στον πάγο για 2 min
7. Προσθέτουμε 900 μl υγρού θρεπτικού LB και επωάζουμε για 60 min τα κύτταρα υπό ανάδευση
8. Επιστρώνουμε τα κύτταρα σε LB τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό και τα επωάζουμε για 15 h στη κατάλληλη θερμοκρασία

5.1.5 Δημιουργία σημειακών μεταλλαγών με τη μέθοδο quick change mutagenesis protocol

Σημειακές μεταλλαγές εισήχθησαν στην α8 έλικα της SecA. Για την εισαγωγή των μεταλλαγών αρχικά σχεδιάστηκαν εκκινητές αποτελούμενοι από 33 βάσεις DNA. Κάθε εκκινητής έφερε το μεταλλαγμένο κωδικόνιο το οποίο πλαισιωνόταν από 15 βάσεις εκατέρωθεν. Ως μήτρα για την μεταλλαξογένεση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pET5/His-SecA. Για να εισαχθούν οι μεταλλαγές πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) όπου η θερμοκρασία αποδιάταξης κάθε φορά υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$T_m = 69.3 + 0.41(\%CG) - 650/L$ και

$T_m = T_m - \%mismatch (^{\circ}C) - 5^{\circ}C$

Επίσης για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν 90ng DNA, 15 pmoles εκκινητών, 2.5mM dNTPs, 10X PFU buffer, 2.5 units PFU ultra polymerase. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε περιοριστική πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο *Nco I* (New England Biolabs) ώστε να απομακρυνθεί το μεθυλιωμένο μητρικό DNA. Η πέψη πραγματοποιήθηκε και αποκλειστικά σε μητρικό DNA ίσης ποσότητας με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην PCR αντίδραση(αντίδραση ελέγχου, control) Επιδεκτικά κύτταρα DH5α μετασηματίστηκαν με τα προϊόντα της πέψης και επώαστηκαν στους 37⁰C για 16 ώρες περίπου. Στη συνέχεια οι αποικίες που προέρχονταν από το μετασηματισμό των βακτηρίων με το PCR προϊόν καλλιεργήθηκαν περαιτέρω έτσι ώστε να απομονωθεί το πλασμίδιό τους, να αλληλουχηθεί το γονίδιο της *SecA* και να ελεγχθεί αν πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της μεταλλαγής

5.2 Δοκιμασία γενετικής συμπληρωματικότητας

Υλικά:

- BL.21.19 δεκτικά κύτταρα
- LB υγρό θρεπτικό υλικό και αμπικιλίνη 100 μg/ml
- Τρυβλία με LB και αμπικιλίνη 100μg/ml
- 30°C επωαστήρας

Πρωτόκολλο :

Μετασηματίστηκαν πλασμίδια που παράγουν τις προς μελέτη πρωτεΐνες και επίσης ο μη ανασυνδυασμένος πλασμιδιακός φορέας σε BL.21.19 δεκτικά κύτταρα και εμβολιάστηκαν καλλιέργειες LB/Amp 5 ml με μοναδική αποικία από κάθε πιάτο. Επωάζω τις καλλιέργειες 12-14h στους 30°C. Μετρώ την οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών στα 600nm και προσέχω ώστε όλες να περιέχουν περίπου τον ίδιο αριθμό κυττάρων. Χρησιμοποιώ εν συνεχεία αυτές τις καλλιέργειες σαν αρχικό υλικό για να φτιάξω τέσσερις αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Σε 2 πιάτα LB/Amp κάνω spots των 15μl από κάθε αραιώση. Τέλος επωάζω για 14-16 ώρες το ένα πιάτο στους 30°C και το άλλο στους 42°C

5.3 Καθαρισμός των His-SecA πρωτεϊνών με χρωματογραφία συνάφειας Ni²⁺-NTA

Οι αγρίου τύπου και μεταλλαγμένες SecA φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο έναν εξαισιτιδινικό επίτοπο. Η His-SecA πρωτεΐνη είναι λειτουργική *in vivo* και *in vitro* πράγμα που υποδηλώνει ότι ο εξαισιτιδινικός επίτοπος δεν επηρεάζει δομικά ή λειτουργικά την πρωτεΐνη. Αντιθέτως, προσφέρει ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα όσον αφορά στον καθαρισμό της SecA πρωτεΐνης με τη μέθοδο της χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA. Με τη χρωματογραφική αυτή τεχνική οι His-SecA καθαρίζονται με μια γρήγορη και σχετικά απλή διαδικασία ενός σταδίου.

Οι ρητίνες που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των πρωτεϊνών περιέχουν αгарόζη - ως υλικό προσρόφησης - το οποίο συνδέεται με το Ni²⁺ μέσω του νιτριλοτριοξικού οξέως (NTA) το οποίο φέρει 3 καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις δέσμευσης υποκαταστάτη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος Ni²⁺, αφήνοντας 2 θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με τον εξαισιτιδινικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών (Σχήμα 6). Έτσι τρία Ni²⁺ αντιστοιχούν σε κάθε μόριο της πρωτεΐνης που φέρει 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο. Η κολώνα λοιπόν θα κατακρατήσει μόνο την φέρουσα τον επίτοπο πρωτεΐνη, καθώς και η μη ειδική πιθανή σύνδεση μεμονωμένων ιστιδινών από άλλες πρωτεΐνες δεν μπορεί να ανταγωνιστεί το ιμιδαζόλιο που χρησιμοποιείται στις εκπλύσεις της κολώνας (βλ § 5.3 υλικά & μέθοδοι)

Για να καθαρίσουμε λοιπόν τα μεταλλάγματα αλλά και την αγρίου τύπου SecA αρχικά μετασηματίσαμε τα πλασμίδια τα φέροντα τις μεταλλαγμένες SecA σε BL.21.19 κύτταρα.

Μεγαλώνουμε λοιπόν BL 21.19 κύτταρα φέροντα το πλασμίδιο με την επιθυμητή μετάλλαξη στη SecA πρωτεΐνη σε κατάλληλες συνθήκες και μετά την επαγωγή τους με IPTG, τη συλλογή και το σπάσιμο των κυττάρων καθαρίζουμε τις His πρωτεΐνες με την περιγραφόμενη Ni-NTA χρωματογραφία συνάφειας.

Υλικά:

- BL21.19 κυτταρικό στέλεχος (His-SecA υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή σε φορέα pET5)
- 1L LB+Amp(100μg/ml)

- τον κατάλληλο όγκο Ni^{2+} -NTA ρητίνης (QIAGEN) (π.χ η ικανότητα δέσμευσης της κολώνας είναι περίπου 2-5mg πρωτεΐνης/ml)
- SS34 κεφαλή φυγοκέντρου
- Υπερηχοβολητής 150, MSE

χημικά αντιδραστήρια
πρόδρομα διαλύματα:

- 1M Tris-HCl PH=8
- 4M KCl
- 1M NaCl
- 1M MgCl_2
- 1M DTT
- 1M ιμιδαζόλιο
- 100% γλυκερόλη
- 100mM PMSF
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα B (10XBB) (500mM Tris-HCl PH=8, 500mM KCl, 50mM MgCl_2)

Διαδικασία:

1. Εμβολιάζουμε 1L LB+Amp(100μg/ml) με 1ml από 12ωρη καλλιέργεια κυττάρων BL 21.19 μετασηματισμένων με το πλασμίδιο που φέρει την προς καθαρισμό πρωτεΐνη και επωάζουμε τα κύτταρα (37°C) μέχρι $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0.6-0.7$ οπότε προσθέτουμε IPTG (0.5 mM) και επωάζουμε για 3 ακόμη ώρες (30°C, υπό ανάδευση). (κρατάω δείγματα +/- επαγωγής για ανάλυση SDS PAGE)

2. Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση 10' στα 4500 rpm / 4°C

3. Επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε 60ml 1X Buffer B και προσθέτουμε PMSF σε τελική συγκέντρωση 2mM. (στο σημείο αυτό μπορούμε να φυλάξουμε τα κύτταρα στους -20°C)

4. Το σπάσιμο των κυττάρων γίνεται με υπέρηχους στον πάγο 6x30'' με διαλείμματα των 30'' ενδιάμεσα ώστε να αποφευχθεί η υπερθέρμανση των κυττάρων.

5. Η απομάκρυνση μεγάλων θραυσμάτων και άσπαστων κυττάρων γίνεται με φυγοκέντρηση σε 13000rpm για 30min.

6. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, αφαιρούμε ένα μικρό δείγμα (50μl) για SDS PAGE, και στο υπόλοιπο προσθέτουμε NaCl 1M και ιμιδαζόλιο 5mM τελική συγκέντρωση. Επίσης, επαναδιαλύουμε το μεμβρανικό ίζημα σε 1XBB και κρατάμε μικρό δείγμα για ανάλυση SDS PAGE.

7. Προεξισορροπούμε την Ni^{2+} -NTA ρητίνη με 10 όγκους 1XBB, 1M NaCl και 5mM ιμιδαζόλιο.

8. Στη συνέχεια φορτώνουμε την κολώνα με μέγιστο ρυθμό ροής 1ml/min

9. Συλλέγουμε το flow through και αφαιρούμε δείγμα (50μl) για SDS PAGE ανάλυση.

10. Ξεπλένουμε την κολώνα 2-3 φορές με 10 όγκους 1XBB, 1M NaCl και 20mM ιμιδαζόλιο.

11. Συλλέγουμε και τα ξεπλύματα και κρατάμε δείγματα για SDS PAGE ανάλυση.

12. Εκλούουμε την πρωτεΐνη με 5 όγκους 1XBB και 150mM ιμιδαζόλιο.

13. Συλλέγουμε κλάσματα της πρωτεΐνης σε όγκο μισό από αυτό της κολώνας.

14. Τρέχουμε ένα SDS PAGE πήκτωμα με δείγματα από όλα τα κλάσματα που έχουμε συλλέξει. Τα κλάσματα που περιέχουν την περισσότερη πρωτεΐνη αναμιγνύονται και υπόκεινται σε 12ωρη διαπίδυση σε 1XBB.

Αναφορά:

QIAGEN manual (1997)

5.4 Δραστηκότητα ΑΤΡασης

(Ο φώσφορος που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του ATP προσδιορίζεται με την χρωστική πράσινο του μαλαχίτη)

Υλικά:

√ 10X BB: 500mM Tris-HCl PH=8, 500mM KCl, 50mM $MgCl_2$, 1mM DTT
(προστίθεται πριν από την χρήση του αντιδραστηρίου από 1M stock διάλυμα)

√ Ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας: 6M urea, 50mM Tris-HCl PH=8, 1mM DTT

√ Αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA) [ελεύθερη από λιπαρά οξέα SIGMA]10mg/ml

✓ 0.1M ATP σε Tris-HCl PH=8

✓ ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (IMVs) από το *unc- KM9* στέλεχος της *E.coli* ή προτεολιποσώματα. (Τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια επεξεργάζονται με ουρία πριν τη χρήση για απομάκρυνση της ενδογενούς SecA).

✓ Πράσινο του μαλαχίτη (malachite green)

✓ Κιτρικό οξύ 37%(w/v)

✓ Πρωτεΐνες / Ένζυμα

Προπρωτεΐνη: χρησιμοποιείται η κύρια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης της *E.coli*. Η πρωτεΐνη αυτή φυλάσσεται στους -80°C , σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 30-60mg/ml.

SecA πρωτεΐνη: φυλάσσεται σε συγκέντρωση 0.8-1mg/ml σε buffer B, σε θερμοκρασία -80°C , και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση $\sim 40\text{mg/ml}$ ανά αντίδραση.

Σημείωση: όλα τα γυαλικά πρέπει να ξεπλένονται διεξοδικά, για απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων απορρυπαντικών τα οποία περιέχουν φώσφορο.

Πρωτόκολλο:

- Ετοιμάζουμε ένα πρόδρομο διάλυμα (βλ.πίνακα)
- Προσθέτουμε τον κατάλληλο όγκο proOmpA στα τοιχώματα του σωλήνα
- Προσθέτουμε SecA στα τοιχώματα του σωλήνα
- Προσθέτουμε το πρόδρομο διάλυμα και αναδεύουμε (vortex) για να αναμειχθούν τα συστατικά.
- Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μεμβρανών ($\sim 5\mu\text{g}$ of IMVs / 50 μl αντίδρασης)
- Επώαση των αντιδράσεων για 20min στους 37°C
- Τερματίζουμε την αντίδραση με μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο
- Προσθέτουμε στον όγκο της αντίδρασης (συνήθως 50 μl), 800 μl από το πράσινο του μαλαχίτη
- 2-3 λεπτά μετά προσθέτουμε 100 μl από το διάλυμα κιτρικού οξέος για αποφυγή περαιτέρω υδρόλυσης του ATP και για να διευκολυνθεί η ανάπτυξη του χρώματος.
- Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά
- Μετράμε την απορρόφηση των δειγμάτων στα 660nm

5.5 *In vitro* μετατόπιση της proOmpA προπρωτεΐνης στο εσωτερικό αναστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων

Η proOmpA που μετατοπίζεται στο εσωτερικό των κυστιδίων δεν είναι προσβάσιμη σε εξωγενώς προστιθέμενη πρωτεάση και μπορεί να ανιχνευθεί σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Υλικά:

- 10X BB: 500mM Tris-HCl pH=8, 500mM KCl, 50mM MgCl₂, 10mM DTT (προστίθεται πριν από τη χρήση του αντιδραστηρίου από 1M πρόδρομο διάλυμα)
- Διάλυμα ουρίας: 6M Ουρία, 50 mM Tris-HCl pH=8, 1mM DTT
- 0.1 M ATP σε 50 mM Tris-HCl pH=8,
- TCA (25% παγωμένο)
- Ακετόνη
- Βιοχημικά:

proOmpA:

SecA: ~1μg πρωτεΐνης ανά αντίδραση

IMVs ή SecYEG προτεολιποσώματα: συνήθως 4-12 mg/ml IMVs σε διάλυμα AH (50mM HEPES-KOH pH=7.5, 5mM MgSO₄, 1mM DTT(προστίθεται φρέσκο)).

Πρωτεάση (proteinase K): 10mg/ml διαλυμένη στο νερό

BSA: Αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA) [ελεύθερη από λιπαρά οξέα SIGMA]10mg/ml

1. Επώαση των αντιδράσεων για 20min στους 37 °C
2. Τερματισμός της αντίδρασης στον πάγο για 5 min
3. Προσθήκη 5μl πρωτεάσης K (10mg/ml) / vortex και επώαση 15min στον πάγο για να δράσει η πρωτεάση
4. Προσθήκη 55 μl παγωμένο TCA (25% w/v) / ανάδευση και επώαση 20 min στον πάγο
5. Φυγοκέντρηση 15000rpm /4°C σε φυγόκεντρο Eppendorf για 15min
6. Πετάμε το υπερκείμενο και ξεπλένω το ίζημα με 1ml παγωμένη ακετόνη (ανάδευση και εκ νέου φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 5)

7. Πετάμε το υπερκείμενο και αφήνω τα σωληνάκια για 5min στους 37 °C για να αφυδατωθεί το ίζημα
8. Προσθέτουμε 20-30μl 1X SDS PAGE sample buffer
9. Θερμαίνω τα δείγματα στους 95 °C για 5 min
10. Τρέχουμε τα δείγματα σε 15% αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης
11. Ακινητοποίηση των πολυπεπτιδίων της πηκτής για 15min σε διάλυμα 50%MeOH, 10% οξικό οξύ
12. Στεγνώνουμε την πηκτή (~40min)
Ανοσοστύπωση κατά Western

5.7 Δοκιμασίες μέτρησης συγγένειας της [³⁵S]-His SecA και των μεταλλαγμάτων με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG

Κατά τη δοκιμασία αυτή γίνεται χρήση ραδιοσημασμένης [³⁵S]-His SecA που συντίθεται με ταυτόχρονη *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση με το TnTR Coupled reticulocyte Lysate System (promega). Η συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης κυμαίνεται μεταξύ 0.01-0.05 nM. Για τη μέτρηση της συγγένειας της SecA με το μεμβρανικό σύμπλοκο αναμιγνύονται ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια IMVs (64μg/ml) που έχουν υποστεί επεξεργασία με ουρία για την απομάκρυνση ενδογενούς SecA πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά ετοιμάζονται 20 δείγματα τα οποία περιέχουν την ίδια ποσότητα ραδιοσημασμένης SecA και μεμβρανών και διαφορετικές ποσότητες κρύας SecA κυμαινόμενες από 0.5-2000 nM σε 1XBB με την προσθήκη 1mg/ml BSA σε όγκο 20 μl. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 4⁰C για 15' και επικάθονται σε ίσο όγκο διαλύματος 0.2M σακχαρόζης /1mg/ml BSA, τοποθετημένο σε ειδικά σωληνάκια υπερφυγοκέντρωσης τα οποία έχουν προεπωαστεί με BSA πριν τη χρήση τους. Ακολουθεί υπερφυγοκέντρωση στα 320000g σε υπερφυγόκεντρο TLX120 Optima σε ρότορα TLA120.2 για 30' στους 4⁰C οπότε και κατακρημνίζονται οι μεμβράνες. Το υπερκείμενο απομακρύνονται και το ίζημα ξεπλένεται καλά και επαναδιαλύτοποιείται με πολύ εκτεταμένο πιπετάρισμα και ηχοβολισμό. Τα διαλυτοποιημένα ιζήματα, αλλά και η συνολική ποσότητα ραδιενεργούς πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα φορτώνονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση της συσκευής Bio-Dot Microfilter. Η ραδιενέργεια σε κάθε κουκίδα στη μεμβράνη ποσοτικοποιείται με τη χρήση phosphoimager (Molecular Dynamics), ενώ τα δεδομένα επεξεργάζονται με το λογισμικό της μη γραμμικής ανέλιξης (non-linear regression) της Prism(Graph Pad) και υπολογίζονται οι σταθερές διάστασης KD.

5.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli (Laemmli buffer)

- 10x SDS Running buffer
- γυάλινα τζάμια, χτένες, spacers
- συσκευές ηλεκτροφορησης

Πρωτόκολλο:

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας πήκτωμα ακρυλαμίδης (38% acrylamide – 2% bis-acrylamide) και το στάνταρ ρυθμιστικό διάλυμα γλυκίνης pH 8.6 – 8.7(Laemmli 1970). Στο πήκτωμα φορτώνονται τα δείγματα αφού έχουν πρώτα διαλυθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli και βραστεί για 10 min.

5.3.2 Εκτίμηση της ποσότητας μιας πρωτεΐνης

Υλικά:

- Biorad Protein Assay Dye Reagent concentrate (Biorad)
- BSA 50 mg/ml

Πρωτόκολλο:

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Biorad (Bradford Protein Assay, Bradford 1976, Smith 1985)

5.9 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από αντισώματα

A. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Υλικά:

- Διάλυμα μεταφοράς: 50 mM Tris/HCl, 380 mM γλυκίνη, 0.1% SDS, 20% μεθανόλη
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0.45μ, Schleicher & Schuel)
- Χαρτί whatman

Διαδικασία:

1. Τρέχουμε τα πρωτεϊνικά δείγματα σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE gel) όπως συνήθως λαμβάνοντας υπόψη ότι με τη μέθοδο αυτή, που είναι πολύ ευαίσθητη, 0.1μg καθαρής πρωτεΐνης θα μου δώσουν αρκετά έντονο σήμα με το ECL αντιδραστήριο.

2. Συναρμολογούμε το “σάντουιτς” μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα σε διάλυμα μεταφοράς

3. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στα 300 mA ή O/N στους 4°C και στα 40mA.

Σημειώσεις:

Τα πιο κρίσιμα σημεία κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφορητικής μεταφοράς πρωτεϊνών είναι :

54

✓ Να γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών προς τη σωστή μεριά της νιτροκυτταρίνης γι' αυτό και η συναρμολόγηση του "σαντουιτς" μεταφοράς με τον τρόπο που δείχνει το σχήμα είναι απαραίτητη

✓ Η άμεση επαφή της πηκτής πολυακρυλαμίδης με την μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οπότε πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί ώστε να μην υπάρχουν φυσαλίδες στο ενδιάμεσό τους

✓ Να αποφεύγεται η υπερθέρμανση, γι' αυτό και συνιστάται η μεταφορά να λαμβάνει χώρα σε δωμάτιο 4°C και με παγωμένο αρχικά διάλυμα μεταφοράς

✓ Να σημειώνεται πάνω στη μεμβράνη η πλευρά όπου θα μεταφερθούν οι πρωτεΐνες

B. Western blot

Υλικά:

- TBS :20mM Tris/HCl PH=7.5, 150mM NaCl
- TTBS :20mM Tris/HCl PH=7.5, 150mM NaCl, 0.3% Tween-20
- Διάλυμα για την απομάκρυνση θορύβου (blocking solution): 1xTTBS 5%, σκόνη γάλακτος
- Διάλυμα αντισώματος: 1xTTBS, 1% σκόνη γάλακτος
- Hyperfilm Amersham-RPN2103
- ECL Kit, Pierce
- Δευτερογενές αντίσωμα: goat antirabbit conj. to horseradish peroxidase – Jackson Immunoresearch.

Διαδικασία:

1. Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, επωάζεται η μεμβράνη για 30' σε θερμοκρασία δωματίου στο διάλυμα απομάκρυνσης θορύβου ή O/N στους 4°C υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης

2. Η μεμβράνη κατόπιν ξεπλένεται σε διάλυμα 1xTTBS, 1x15min, 2x5min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης. Τα ξεπλύματα μπορούν να είναι και εκτενέστερα αν κριθεί απαραίτητο

3. Επώαση της μεμβράνης για 1h σε διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος (διάλυμα αντισώματος + την κατάλληλη αραίωση του χρησιμοποιούμενου κάθε φορά πρωτογενούς αντισώματος) σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης.

4. Η μεμβράνη κατόπιν ξεπλένεται σε διάλυμα 1xTTBS, 1x15min, 2x5min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης
5. Επώαση της μεμβράνης για 1h σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης
6. Η μεμβράνη κατόπιν ξεπλένεται σε διάλυμα 1xTTBS, 1x15min, 4x5min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης. Τα ξεπλύματα μπορούν να είναι και εκτενέστερα αν κριθεί απαραίτητο
7. Τέλος η μεμβράνη επωάζεται για 5 min σε διάλυμα 1XTBS. Στο μεταξύ αναμειγνύουμε ίσους όγκους από τα ECL αντιδραστήρια και τα αφήνουμε για εξισορρόπηση για 5λεπτά το μέγιστο σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Στεγνώνουμε ελαφρά τη μεμβράνη στον αέρα
9. Προσθέτουμε το μίγμα των ECL αντιδραστηρίων στη πλευρά της μεμβράνης όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες και αφήνουμε για επώαση 1min χωρίς ανάδευση
10. Στεγνώνουμε τις μεμβράνες, τις εισάγουμε σε πλαστικές θήκες και τις εκθέτουμε σε X-ray φιλμ που τοποθετούμε πάνω στο πλαστικό που περιέχει τη μεμβράνη μέσα σε σκοτεινό θάλαμο. Αρχικά κάνουμε μια έκθεση λίγων δευτερολέπτων π.χ 15'' και ανάλογα με το πόσο δυνατό είναι το σήμα που παίρνουμε προχωρούμε σε μικρότερη ή μεγαλύτερη έκθεση

Αναφορές:

1. Towbin et al., P.N.A.S, (1979), 76, 4350.

Bio-Rad Instruction manual, Mini trans-blot Electrophoretic transfer cell

5.10 Χρώση πρωτεϊνών με coomassie blue

Υλικά:

- Χρωστική Coomassie blue
- Destaining buffer

Πρωτόκολλο:

1. τοποθετούμε το πήκτωμα αμέσως μετά την περάτωση της ηλεκτροφορήσης σε βαφή coomassie blue brilliant και επωάζουμε για 30 – 40 min.
2. Απομακρύνουμε την χρωστική με Destaining buffer από το πήκτωμα και οι πρωτεΐνες διακρίνονται λόγω του χαρακτηριστικού μπλε χρώματος (Compton & Jones 1985)

Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια

Ab Solution (freshly made)

- TTBS 1x
- Dry milk powder 1%

Πηκτικό (ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης) 5X (50ml)

- Ficoll 400 6.25 g
- Bromophenol blu 0.1 g
- TBE 10X 3.35 ml
- Water milli-Q

Buffer B 10x

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

Blocking solution (freshly made)

- TTBS 1x
- Dry milk powder 5%

Coomassie blue stain (1 l)

- Coomassie blue R-250 1.0 g
- Methanol 400 ml
- Acetic Acid 100 ml

Store at room temperature, can be reused several times

Destaining buffer (1 l)

- Methanol 400 ml
- Acetic Acid 100ml

Store at room temperature, it cannot be reused

Laemmli buffer

- Glycerol 50 ml
- SDS 10 g
- Tris pH 6.8 30 ml
- β-mercaptoethanol 1 ml
- bromophenol blue 0.005 %

Stock solution can be stored at -20°C or at R.T if it is in use

Luria Bertani LB (1l)

- Tryptone 10g
- Yeast extract 5g
- NaCl 10g
- NaOH 1N to pH 7.2
- Water mill

Διάλυμα P1 (50 ml)

- Tris pH 8.0 50 mM
- EDTA 10 mM
- Water milli-Q

Διάλυμα P2 (50 ml)

- NaOH 200 mM
- SDS 1%

Διάλυμα P3 pH 5.5 (50 ml)

- Potassium acetate 3M
- Glacial acetic acid to pH 5.5
- Water milli-Q

Running buffer 10x (1 l)

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

TAE 10X pH 8.5 (1l)

- Trizma base 48.4 g
- Glacial acetic acid
- EDTA 05 M pH 8.5
- Water milli-Q

TBS 10x (1 l)

- Tris pH 7.5 1 M 200ml
- NaCl 87.4 g

TE buffer 10x (100 ml)

- Tris-Cl 1.58 g
- EDTA 0.37 g

TFBI

- Potassim acetate 30 mM
- CaCl₂ 10 mM
- MnCl₂ 50 mM

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

TFB2

- MOPS pH 6.5 10 mM
- CaCl₂ 75 mM
- RbCl 10mM
- Glycerol 15%
- KOH 1M to pH 6.5 *TTBS 10X (1 l)*
- Tris pH 7.5 1 M 200 ml
- NaCl 87.4 g
- Tween-20 30 ml

Dissolve reagents in 70 ml dH₂O. Adjust pH to 8.0 with HCl, bring final volume to 100 ml and autoclave. Dilute 1:10 before use

Βιβλιογραφία

- Baud, C., Karamanou, S., Sianidis, G., Vrontou, E., Politou, A. S., and Economou, A. (2002) *J Biol Chem* **277**(16), 13724-13731
- Baud, C., Papanikou, E., Karamanou, S., Sianidis, G., Kuhn, A., and Economou, A. (2005) *Protein Expr Purif* **40**(2), 336-339
- Berks, B. C., Palmer, T., and Sargent, F. (2005) *Curr Opin Microbiol* **8**(2), 174-181
- Breukink, E., Nouwen, N., van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J., and de Kruijff, B. (1995) *J Biol Chem* **270**(14), 7902-7907
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T. A., Kuhlbrandt, W., and Collinson, I. (2002) *Nature* **418**(6898), 662-665
- Brundage, L., Hendrick, J. P., Schiebel, E., Driessen, A. J., and Wickner, W. (1990) *Cell* **62**(4), 649-657
- Cao, T. B., and Saier, M. H., Jr. (2003) *Biochim Biophys Acta* **1609**(1), 115-125
Caruthers, J. M., Johnson, E. R., and McKay, D. B. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(24), 13080-13085
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) *Annu Rev Microbiol* **59**, 451-485
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., and Linder, P. (2006) *Gene* **367**, 17-37
- Cordin, O., Tanner, N. K., Doere, M., Linder, P., and Banroques, J. (2004) *Embo J* **23**(13), 2478-2487
- Driessen, A. J. (1993) *Biochemistry* **32**(48), 13190-13197
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., and Pugsley, A. P. (2006) *Mol Microbiol* **62**(2), 308-319
- Fak, J. J., Itkin, A., Ciobanu, D. D., Lin, E. C., Song, X. J., Chou, Y. T., Gierasch, L. M., and Hunt, J. F. (2004) *Biochemistry* **43**(23), 7307-7327
- Fekkes, P., van der Does, C., and Driessen, A. J. (1997) *Embo J* **16**(20), 6105-6113
- Gelis, I., Bonvin, A. M., Keramisanou, D., Koukaki, M., Gouridis, G., Karamanou, S., Economou, A., and Kalodimos, C. G. (2007) *Cell* **131**(4), 756-769
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., Donchenko, A. P., and Blinov, V. M. (1988) *FEBS Lett* **235**(1-2), 16-24

- Hamilton, H. L., Dominguez, N. M., Schwartz, K. J., Hackett, K. T., and Dillard, J. P. (2005) *Mol Microbiol* **55**(6), 1704-1721
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., and Wickner, W. (1990) *Cell* **63**(2), 269-279
- Holland, I. B., Schmitt, L., and Young, J. (2005) *Mol Membr Biol* **22**(1-2), 29-39
- Hunt, J. F., Weinkauff, S., Henry, L., Fak, J. J., McNicholas, P., Oliver, D. B., and Deisenhofer, J. (2002) *Science* **297**(5589), 2018-2026
- Karamanou, S., Gouridis, G., Papanikou, E., Sianidis, G., Gelis, I., Keramisanou, D., Vrontou, E., Kalodimos, C. G., and Economou, A. (2007) *Embo J* **26**(12), 2904-2914
- Karamanou, S., Sianidis, G., Gouridis, G., Pozidis, C., Papanikolau, Y., Papanikou, E., and Economou, A. (2005) *FEBS Lett* **579**(5), 1267-1271
- Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A. S., and Economou, A. (1999) *Mol Microbiol* **34**(5), 1133-1145
- Keramisanou, D., Biris, N., Gelis, I., Sianidis, G., Karamanou, S., Economou, A., and Kalodimos, C. G. (2006) *Nat Struct Mol Biol* **13**(7), 594-602
- Lill, R., Dowhan, W., and Wickner, W. (1990) *Cell* **60**(2), 271-280
- Luirink, J., and Sinning, I. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1694**(1-3), 17-35
- Malinverni, J. C., Werner, J., Kim, S., Sklar, J. G., Kahne, D., Misra, R., and Silhavy, T. J. (2006) *Mol Microbiol* **61**(1), 151-164
- Mogensen, J. E., and Otzen, D. E. (2005) *Mol Microbiol* **57**(2), 326-346
- Mori, H., and Ito, K. (2006) *J Biol Chem* **281**(47), 36249-36256
- Mori, H., Tsukazaki, T., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Johnson, A. E., Kimura, Y., Akiyama, Y., and Ito, K. (2003) *J Biol Chem*
- Oomen, C. J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., and Gros, P. (2004) *Embo J* **23**(6), 1257-1266
- Paetzel, M., Dalbey, R. E., and Strynadka, N. C. (2002) *J Biol Chem* **277**(11), 9512-9519
- Randall, L. L. (1992) *Science* **257**(5067), 241-245

- Randall, L. L., Hardy, S. J., Topping, T. B., Smith, V. F., Bruce, J. E., and Smith, R. D. (1998) *Protein Sci* **7**(11), 2384-2390
- Rogers, G. W., Jr., Komar, A. A., and Merrick, W. C. (2002) *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**, 307-331
- Saier, M. H., Jr. (2006) *J Membr Biol* **214**(2), 75-90
- Schiebel, E., Driessen, A. J., Hartl, F. U., and Wickner, W. (1991) *Cell* **64**(5), 927-939
- Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Repanas, K., Kyrpides, N., Politou, A. S., and Economou, A. (2001) *Embo J* **20**(5), 961-970
- Skillman, K. M., Barnard, T. J., Peterson, J. H., Ghirlando, R., and Bernstein, H. D. (2005) *Mol Microbiol* **58**(4), 945-958
- Ullers, R. S., Luirink, J., Harms, N., Schwager, F., Georgopoulos, C., and Genevax, P. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20), 7583-7588
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A. (2004) *Nature* **427**(6969), 36-44
- Vrontou, E., Karamanou, S., Baud, C., Sianidis, G., and Economou, A. (2004) *J Biol Chem* **279**(21), 22490-22497
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) *Embo J* **1**(8), 945-951
- Yen, M. R., Tseng, Y. H., Nguyen, E. H., Wu, L. F., and Saier, M. H., Jr. (2002) *Arch Microbiol* **177**(6), 441-450
- Yip, C. K., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. (2005) *Nat Struct Mol Biol* **12**(1), 75-81
- Zimmer, J., Li, W., and Rapoport, T. A. (2006) *J Mol Biol* **364**(3), 259-265