

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Ο μοριακός μηχανισμός της στόχευσης των προ-
πρωτεϊνών στα βακτήρια*

Αικατερίνη Χατζή

Επιβλέπων καθηγητής: Αναστάσιος Οικονόμου

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας

και

Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας-

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας

Ηράκλειο 2013

Στους γονείς μου Σάνα και Ηλία

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Αναστάσιο Οικονόμου, για την πνευματική καθοδήγηση, τη στήριξη και την εμφύσηση της επιστημονικής σκέψης. Ευχαριστώ τη Λίλυ Καραμάνου για τις επιστημονικές συμβουλές και τη διατήρηση του ομαλού και εκπαιδευτικού κλίματος εντος του εργαστηρίου. Ευχαριστώ τη Μαρίνα Κουκάκη για την καθοδήγηση ειδικά στα αρχικά στάδια της διδακτορικής διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα το φίλο και συνάδελφο Μάριο-Φραντζέσκο Σάρδη για τις ωραίες μας συζητήσεις, την πειραματική και ψυχολογική στήριξη. Ευχαριστώ τους Γεωργία Ορφανουδάκη, Αθηνά Πορτάλιου, Αλεξάνδρα Τσιριγωτάκη, Νίκο Φαμέλη και Κώστα Τσολή για το ομαδικό πνεύμα και την ωραία συνεργασία. Ευχαριστώ το Γιώργο Γκουρίδη που βοήθησε πολύ στην αρχή της διατριβής. Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν. Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Σάνα και Ηλία γιατί πάντα στηρίζουν και ενθαρρύνουν τις προσπάθειές μου.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Ευρετήριο Εικόνων | 5 |
| Ευρετήριο Πινάκων..... | 7 |
| Συντομογραφίες..... | 9 |
| Περίληψη..... | 11 |
| Summary..... | 14 |
| Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή..... | 17 |
| 1.1 Η έκκριση στο προκαρυωτικό κύτταρο..... | 17 |
| 1.2 Οι εκκριτικές προ-πρωτεΐνες που μεταφέρονται από το Sec σύστημα και οι ιδιότητές τους..... | 18 |
| 1.3 Συν- μεταφραστική έκκριση | 19 |
| 1.4 Μετά- μεταφραστική έκκριση | 20 |
| 1.5 Ο Trigger Factor | 21 |
| 1.6 Η SecB | 22 |
| 1.7 Η SecA | 22 |
| Οι αλληλεπιδράσεις της SecA..... | 23 |
| 1.7.1 SecA και ριβόσωμα..... | 23 |
| 1.7.2 SecA και SecY | 24 |
| 1.8 Η SecYEG | 24 |
| 1.9 Η ενζυμική αντίδραση της μετατόπισης..... | 27 |
| 1.10 Η συνεργασία των σαπερονών και η πιθανή σειρά που προσδένονται στο υπόστρωμα..... | 27 |
| 1.11 Αναδίπλωση στο πεπρίπλασμα ή έξοδος από το κύτταρο | 28 |
| 1.12 Η έξοδος των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα..... | 29 |
| 1.13 Οι εγγενώς αποδιπλωμένες πρωτεΐνες | 30 |
| 1.14 Ποιοτικός έλεγχος στο κυτταρόπλασμα | 30 |
| Κεφάλαιο 2-Αποτελέσματα | 33 |
| Τα σήματα στόχευσης του ώριμου μέρους των εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεταθετάση..... | 33 |
| 2.1 Το ελάχιστο μήκος του ώριμου τμήματος που απαιτείται για στόχευση .. | 33 |
| 2.2 Η μοριακή βάση των σημάτων στόχευσης του ώριμου τμήματος..... | 34 |
| 2.3 Η μοναδικότητα των σημάτων στόχευσης στις εκκριτικές πρωτεΐνες | 35 |
| 2.4 Η θέση των σημάτων στόχευσης σε σχέση με το πεπτίδιο σήμα | 36 |
| 2.5 Η καθολικότητα των υδρόφοβων νησίδων ως σήματα στόχευσης | 37 |
| 2.6 Η διαθεσιμότητα των υδρόφοβων νησίδων ανάλογα με την αναδίπλωση της πρωτεΐνης..... | 38 |
| 2.7 Η σταθερότητα των εκκριτικών πρωτεϊνών στο υδατικό περιβάλλον | 39 |
| 2.8 Η αναδίπλωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών | 41 |
| 2.9 Η αλληλεπίδραση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με σαπερόνες..... | 41 |
| 2.10 Η συμπεριφορά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα | 42 |
| 2.11 Σύγκριση της σταθερότητας της κυτταροπλασματικής PpiB και της ομόλογης της εκκρινόμενης PpiA | 44 |

| | |
|--|----|
| Κεφάλαιο 3-Αποτελέσματα..... | 45 |
| H περιοχή πρόσδεσης της προ-πρωτεΐνης στη SecA..... | 45 |
| 3.1 Οι υδρόφοβες νησίδες στην κυτταροπλασματική πλευρά της SecA και η σημασία μιας εξ'αυτών στην στόχευση των υποστρωμάτων | 45 |
| 3.2 Η κινητικότητα της περιοχής A8-Stem και η σημασία της για τη λειτουργία της SecA | 46 |
| Κεφάλαιο 4- Αποτελέσματα | 48 |
| H σημασία του πεπτιδίου σήματος στη στόχευση και στην έκκριση | 48 |
| 4.1 Αντικατάσταση του πεπτιδίου σήματος της αλκαλικής φωσφατάσης με άλλων πρωτεϊνών..... | 48 |
| 4.2 Μέτρηση της συγγένειας των υβριδικών πρωτεϊνών για την μεταθετάση | 50 |
| 4.3 Μέτρηση της ενέργειας ενεργοποίησης της μεταθετάσης παρουσία των προ-πρωτεϊνών ή του πεπτιδίου σήματος | 51 |
| Κεφάλαιο 5-Συζήτηση | 52 |
| Κεφάλαιο 6- Υλικά και μέθοδοι | 56 |
| 6.1 Μοριακές τεχνικές και τα γονίδια που δημιουργήθηκαν..... | 56 |
| 6.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης..... | 62 |
| 6.3 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης..... | 62 |
| 6.4 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων: Μέθοδος RbCl κατάλληλα τροποποιημένη..... | 62 |
| 6.5 Μετασχηματισμός επειδεκτικών κυττάρων..... | 63 |
| 6.6 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολύ-ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)..... | 63 |
| 6.7 Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie blue. | 63 |
| 6.8 Έκφραση και καθαρισμός της εκκριτικών πρωτεϊνών. | 64 |
| 6.9 Απομόνωση των μεταλλαγμάτων της SecA..... | 65 |
| 6.10 Καθαρισμός SecA με ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. | 66 |
| 6.11 Οι κυστεΐνες σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς. | 66 |
| 6.12 Προετοιμασία ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (IMVs) από κύτταρα BL21(DE3) που υπερεκφράζουν την His-SecYEG. | 67 |
| 6.13 Σήμανση [³⁵ S]-SecA και [³⁵ S]-προπρωτεϊνών και των παραγώγων τους. | 68 |
| 6.14 Μέτρηση της συγγένειας των προπρωτεϊνών για την μεταθετάση..... | 68 |
| 6.15 Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη..... | 69 |
| 6.16 Western blot. | 69 |
| 6.17 Δραστικότητα ATPασης της SecA. | 70 |
| 6.18 <i>In vitro</i> μετατόπιση προπρωτεϊνών στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (IMVs)..... | 72 |
| 6.19 <i>In vivo</i> μετατόπιση της proPhoA και των παραγώγων της. | 73 |
| 6.20 <i>In vitro</i> αναδίπλωση της αλκαλικής φωσφατάσης | 74 |
| 6.21 Ρυθμιστικά διαλύματα και αντιδραστήρια..... | 75 |
| Κεφάλαιο 7-Βιβλιογραφία..... | 79 |

Ευρετήριο Εικόνων

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1: Τα σημαντικότερα εκκριτικά συστήματα για εισαγωγή στις κυτταρικές μεμβράνες ή έκκριση στο περίπλασμα ή στον εξωκυττάριο χώρο (από το άρθρο ανασκόπησης (Paranikou et al, 2007)..... | 15 |
| Εικόνα 2: Τα χαρακτηριστικά των πεπτιδίων σημάτων..... | 16 |

| | |
|--|----|
| Εικόνα 3: Το Sec εκκριτικό σύστημα..... | 17 |
| Εικόνα 4: Οι δομές των βασικότερων μερών του Sec συστήματος (από το άρθρο ανασκόπησης (Chatzi et al, 2013))..... | 22 |
| Εικόνα 5: Σύμπλοκα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην έκκριση..... | 29 |
| Εικόνα 6: Μοντέλο για το μηχανισμό της μετα-μεταφραστικής έκκρισης..... | 28 |
| Εικόνα 7: Το μήκος των ώριμων τμημάτων όλων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του <i>Escherichia coli</i> | 33 |
| Εικόνα 8: Οι σταθερές διάστασης 3 εκκρινόμενων πρωτεϊνών (proPhoA, proPpiA, proAmy1) και των κομμένων παραγώγων τους (proPhoA(1-122), proPpiA(1-125), proAmy1(1-132) για την μεταθετάση. | 34 |
| Εικόνα 9: Η συγγένεια των κομμένων παραγώγων της proPhoA (1-122, 1-82, 1-79, 1-62, 1-50, 1-40, 1-30) για την μεταθετάση. | 35 |
| Εικόνα 10: Εξάλειψη των υδρόφοβων νησίδων μεταλλάσσοντας τα υδρόφοβα αμινοξέα σε θυμίνες ή αλανίνες και μέτρηση της συγγένειας για την μεταθετάση. | 35 |
| Εικόνα 11: Σταδιακή αφαίρεση των 100, 200 και 300 αμινοξέων μετά το πεπτιδίο σήμα και μέτρηση της συγγένειας των πρωτεϊνών για τη μεταθετάση. | 36 |
| Εικόνα 12: Οι μεταλλάξεις των υδρόφοβων νησίδων στην proPhoAWT | 36 |
| Εικόνα 13: Η συγγένεια υποστρωμάτων για τη μεταθετάση όπου μεταξύ του πεπτιδίου σήματος και του ώριμου τμήματος της proPhoAWT παρεμβλήθηκε η αλληλουχία PhoA(23-122) ή PhoA(23-122)/-P1-P2 από μια έως τρεις φορές. | 37 |
| Εικόνα 14: Ανάλυση του ποσοστού των πρωτεϊνών που έχουν υδρόφοβες νησίδες. | 37 |
| Εικόνα 15: Η λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και η συγγένειά της για τη μεταθετάση | 38 |
| Εικόνα 16: Μέτρηση ανταλλαγής υδρογόνου προς δευτέριο (μαύρες μπάρες) και στόχευση στη μεταθετάση (κόκκινες μπάρες) για την αλκαλική φωσφατάση. | 38 |
| Εικόνα 17: : Η συγγένεια (μM) των εκκρινόμενων πρωτεϊνών για την μεταθετάση σε t=0..... | 39 |
| Εικόνα 18: Μέτρηση της ικανότητας 20 διαφορετικών εκκριτικών υποστρωμάτων να παραμένουν σταθερά σε υδατικό διάλυμα | 40 |
| Εικόνα 19: Ανάλυση της σταθερότητας των εκκρινόμενων και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών..... | 40 |
| Εικόνα 20: Μέτρηση της διαλυτότητας, συγγένειας και ενεργοποίησης της ATPάσης από τα εκκριτικά υποστρώματα για 48 ώρες..... | 41 |
| Εικόνα 21: Μέτρηση της φυσικής ποσότητας και της ικανότητας να ενεργοποιούν την ATPάση, ασταθών υποστρωμάτων..... | 42 |
| Εικόνα 22: Οι υδρόφοβες νησίδες των κυτταροπλασματικών και των εκκρινόμενων πρωτεϊνών | 43 |
| Εικόνα 23: Οι υδρόφοβες νησίδες των κυτταροπλασματικών και των εκκρινόμενων πρωτεϊνών | 43 |
| Εικόνα 24: Μέτρηση της κατακρίμνησης (γκρι μπάρες) και της συγγένειας των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (πράσινες μπάρες) για την μεταθετάση. | 44 |
| Εικόνα 25: Η δομή της PpiB_Ecoli (μπλέ χρώμα, 2NUL-PDB code) και της PpiA_Ecoli (κόκκινο χρώμα, 1CLH-PDB code) | 45 |
| Εικόνα 26: :Κυτταροπλασματική αποικόνιση της SecA και των υδρόφοβων νησίδων της..... | 45 |
| Εικόνα 27: <i>In vivo</i> μέτρηση της έκκρισης της αλκαλικής φωσφατάσης παρουσία των μεταλλαγμάτων των SecA(A373) και SecA(L187)..... | 47 |
| Εικόνα 28: <i>In vivo</i> και <i>in vitro</i> έκκριση των υβριδικών πρωτεϊνών X(sp)PhoA... .. | 45 |

| | |
|---|----|
| Εικόνα 29: Μέτρηση της ενέργειας ενεργοποίησης της μεταθετάσης παρουσία . Α. Ολόκληρης της προ-πρωτεΐνης Β. Του πεπτιδίου σήματος μόνο | 51 |
|---|----|

Ευρετήριο Πινάκων

| | |
|--|----|
| Πίνακας 1: Κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις των βασικών πρωτεϊνών της έκκρισης | 31 |
| Πίνακας 2: Συγγένειες πρόσδεσης μεταξύ των γνωστών συμπλόκων της έκκρισης. | 31 |
| Πίνακας 3 Μέτρηση της συγγένειας των proPhoA και PhoA για τη μεταθετάση που έχει σχηματιστεί με μια από τις SecA (WT, N180C/M854C, M191C/R850C). | 46 |
| Πίνακας 4 : Τα πεπτίδια σήματα μπροστά από το ώριμο μέρος της αλκαλικής φωσφατάσης. Στον πίνακα φαίνεται το μήκος τους καθώς και ο διαχωρισμός του αμινοτελικού, υδρόφοβου και καρβοξυτελικού άκρου τους | 49 |
| Πίνακας 5: Η συγγένεια των πρωτεϊνών X(sp)PhoA για τη μεταθετάση..... | 51 |
| Πίνακας 6: Όλα τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET22b. | 56 |
| Πίνακας 7: Τα γονίδια που μεταλλάχθηκαν | 60 |

Συντομογραφίες

AAA+- ATPases Associated with diverse cellular Activities

ADP-Adenosine Diphosphate

ATP-Adenosine Triphosphate

BSA-Bovine Serum Albumin

ClpP- Caseinolytic Peptidase

ClpX- Caseinolytic Peptidase X

CTD- C-terminal Domain

DNA-Deoxyribonucleic Acid

DTT-Dithiotreitol

IPTG-Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

IRA2- Intramolecular Regulator of ATPase 2

LB-Lysogeny Broth

LON-ATP dependant protease La

LpP- Major outer membrane lipoprotein

mRNA- messenger Ribonucleic Acid

NBD-Nucleotide Binding Domain

NMR-Nuclear Magnetic Reasonance

NTA-Nitrilotriacetic Acid

OD-Optical Density

OsmB- Osmotically Inducible Lipoprotein B

PBD-Preprotein Binding Domain

PCR-Polymerase Chain Reaction

PhoA-Alkaline Phosphatase

PMF- Proton Motive Force

PMSF-Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride

PpiA- Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A

PRL-Protein Localization

Rs12-Ribisomal protein 12

SDS-PAGE-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEC-Size Exclusion Chromatography

TAT- Twin Arginine Translocation

TF-Triger Factor

YciG-Uncharacterized Protein YciG

Περίληψη

Περίπου 500 πρωτεΐνες του *Escherichia coli* εκκρίνονται μετα-μεταφραστικά από την μεταθετάση του κυττάρου (SecY-SecA). Οι εκκριτικές πρωτεΐνες αποτελούνται από το πεπτίδιο σήμα και το ώριμο μέρος. Τα δύο μέρη προσδένονται σε διακριτές θέσεις στη μεταθετάση. Στόχος της διατριβής είναι να βρούμε τα σήματα στόχευσης του ώριμου τμήματος για την μεταθετάση. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές εκκριτικές πρωτεΐνες καταλήξαμε ότι ~100 αμινοξέα είναι ικανά προκειμένου να στοχευθεί μια πρωτεΐνη στη μεταθετάση. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την αλκαλική φωσφατάση ως πρωτεΐνη μοντέλο, δημιουργήσαμε πρωτεΐνες-παράγωγά της- μικρότερες από 100 αμινοξέα. Η συγγένειά τους για τη μεταθετάση μειώνεται καθώς μειώνεται το μήκος τους. Επομένως ~100 αμινοξέα είναι αναγκαία για τη στόχευση. Οι μεγαλύτερες μειώσεις της συγγένειας συμπίπτουν με την αφαίρεση 2 υδρόφοβων νησίδων. Προκειμένου να εξετάσουμε αν οι νησίδες είναι σημαντικές για τη στόχευση, μεταλλάξαμε τα υδρόφοβα αμινοξέα δημιουργώντας αλληλουχίες ουδέτερης υδροφοβικότητας. Όταν 1. μεταλλάχθηκαν και οι δύο νησίδες και 2. το υπόστρωμα δεν έχει πεπτίδιο σήμα τότε χάνεται η συγγένεια της πρωτεΐνης για την μεταθετάση. Επομένως το ώριμο τμήμα πρέπει να έχει τουλάχιστον μια υδρόφοβη νησίδα προκειμένου να στοχευθεί. Οι πρωτεΐνες προκειμένου να είναι σταθερές στο κυτταρικό περιβάλλον και να μην κατακρημνίζονται, πρέπει να σχηματίσουν υδρόφοβο πυρήνα, να κρύψουν τα υδρόφοβα μέρη τους και επομένως να αναδιπλώσουν. Γνωρίζουμε οστόσο ότι μόνο οι αποδιπλωμένες πρωτεΐνες στοχεύονται και εκκρίνονται. Δημιουργείτε η απορία πώς οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες καταφέρνουν να χρησιμοποιούν τις υδρόφοβες νησίδες τους και να στοχεύονται. Δοκιμάσαμε τη σταθερότητα των εκκριτικών πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα. Το 50% παραμένει σταθερό και ικανό για στόχευση και έκκριση. Οι πρωτεΐνες προκειμένου να στοχευθούν πρέπει να είναι αποδιπλωμένες, επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες παραμένουν εγγενώς αποδιπλωμένες. Το υπόλοιπο 50% κατακρημνίζεται. Οστόσο το κύτταρο έχει πολλαπλές επιλογές για τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται. Τουλάχιστον 3 πρωτεΐνες (SecA, SecB, Trigger Factor) μπορούν να «σώσουν» τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες από την κατακρήμιση αλλά και να τις διατηρήσουν ικανές για μετατόπιση. Οι κυτταροπλασματικές, έχουν υδρόφοβες νησίδες παρόμοιες με αυτές των εκκρινόμενων και προσδένονται στην μεταθετάση. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι

το χρονικό περιθώριο που παραμένουν ικανές για στόχευση είναι μικρότερο από των εκκρινόμενων. Καταλήγοντας τα σήματα στόχευσης είναι 1. Οι υδρόφοβες νησίδες και 2. Η τάση των εκκρινόμενων να παραμένουν αποδιπλωμένες.

Εξετάζοντας τα σήματα στόχευσης από την πλευρά της SecA, παρατηρήσαμε ότι υπάρχουν υδρόφοβες νησίδες στην κυτταροπλασματική πλευρά της SecA. Όταν ακινητοποιήσαμε την καρβοξυτελική ουρά της SecA σε μια από τις νησίδες, η συγγένεια στόχευσης των υποστρωμάτων έγινε 10 φορές μικρότερη. Επομένως η συγκεκριμένη περιοχή αν και φαίνεται να μην είναι μοναδική, είναι σημαντική για την πρόσδεση υποστρωμάτων.

Όταν ελέγξαμε αν το πεπτίδιο σήμα επηρεάζει τη στόχευση αντικαθιστώντας το πεπτίδιο σήμα της αλκαλικής φωσφατάσης με 30 άλλα πεπτίδια σήματα παρατηρήσαμε ότι οι διαφορές στη συγγένεια ήταν μικρές. Αντίθετα το πεπτίδιο σήμα είναι καθοριστικό για την αποτελεσματικότητα της έκκρισης και για τη μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης του ολοενζύμου (SecY-SecA).

Summary

Almost 500 *Escherichia coli* proteins are secreted post-translationally through the bacterial translocase (SecA-SecYEG). Secretory proteins are comprised by the signal peptide and the mature domain. The two parts have targeting signals and bind on distinct sites on the translocase. The subject of the thesis is to resolve the nature of the targeting signals on the mature domain. Using several secretory proteins we found that ~100 amino acids are sufficient for targeting. Lowering the amino acids length, the affinity is reducing, implying that ~100 amino acids are necessary for targeting. The reduction coincides with the removal of the hydrophobic patches of the sequence. Mutagenizing the hydrophobic amino acids of the patches and making the sequence neutral the affinity is lowering. In the absence of a signal peptide the affinity is abolished. We conclude that for mature domain targeting, the substrate must have at least one hydrophobic patch. It is known that a protein is stable in a soluble environment when it buries its hydrophobic core by folding. A prerequisite for targeting is the protein to be unfolded. How do secretory proteins manage to expose their hydrophobic patches in a soluble environment? Testing the behavior of the secreted proteins in soluble environment we discovered that 50% remain soluble, targeting and translocation competent. A condition that we name natively unfolded. The other 50% precipitates mainly because of their signal sequence. The cell deals with the aggregating proteins by having several different chaperones (SecA, SecB, Trigger factor) that prevent their aggregation. The chaperones apart from preventing the aggregation they maintain the proteins into a translocation competent state. Next we tested if the cytoplasmic proteins become targeted. Cytoplasmic proteins have hydrophobic patches similar to the secreted and they become targeted to the translocase. The period of time they remain targeting competent is less compared to the secreted. Concluding the mature domain targeting signals are 1. The hydrophobic segments and 2. The non-native code. The secretory proteins have been evolved to stay unfolded and become targeted. The expense of staying unfolded –in some cases- is to aggregate, a cost that the cell takes in order the proteins to remain non-native.

Next we searched for the targeting signals on SecA. SecA has hydrophobic patches on its cytoplasmic side. We immobilized the c-tail on a hydrophobic patch the affinity was reduced 10 times. We identified a hydrophobic patch that participates in targeting

although it is not unique. We conclude that targeting is mediated through hydrophobic interactions.

To test if the signal peptide affects targeting, we exchanged the signal peptide of alkaline phosphatase with 23 other *E.coli* signal peptides. The targeting changed slightly but the secretion and the activation energy of the holoenzyme was highly affected.

Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή

1.1 Η έκκριση στο προκαρυωτικό κύτταρο

Σχεδόν οι μισές πρωτεΐνες του *Escherichia coli* εξέρχονται από το κυτταρόπλασμα για να καταλήξουν σε μια από τις δύο μεμβράνες του κυττάρου ή στο περίπλασμα ή στον εξωκυττάριο χώρο (Orfanoudaki et al, submitted). Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως είναι: διαμεμβρανικά κανάλια, μεταφορείς, υδρολυτικά ένζυμα, σαπερόνες κ.α (Papanikou et al, 2007). Το κύτταρο έχει 16 διαφορετικά εκκριτικά συστήματα (Economou et al, 2006)(εικόνα 1) εκ των οποίων μόνο ένα είναι απαραίτητο για τη ζωή, το Sec, το οποίο μελετάμε και στη συγκεκριμένη διατριβή(Chatzi et al, 2013; Kusters & Driessen, 2011). Ο λόγος ύπαρξης τόσων διαφορετικών εκκριτικών συστημάτων είναι η ποικιλία των υποστρωμάτων που πρέπει να μετατοπιστούν π.χ μαζί με κάποιο νουκλεοτίδιο(Christie & Cascales, 2005), αναδιπλωμένα(Robinson et al, 2011), αποδιπλωμένα ή μόνο παρουσία κάποιου ξενιστή (Grant et al, 2006; Mota & Cornelis, 2005).

Το Sec εκκριτικό σύστημα έχει να αντιμετωπίσει προκλήσεις όπως 1. Να διαχωρίσει τις εκκρινόμενες από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες 2. να τις μεταφέρει στη μεμβράνη 3. Να τις κρατήσει αποδιπλωμένες 4. Να τις μετατοπίσει διαμέσου της μεμβράνης 5. Να παράγει την ενέργεια που χρειάζεται για τη μετατόπιση.

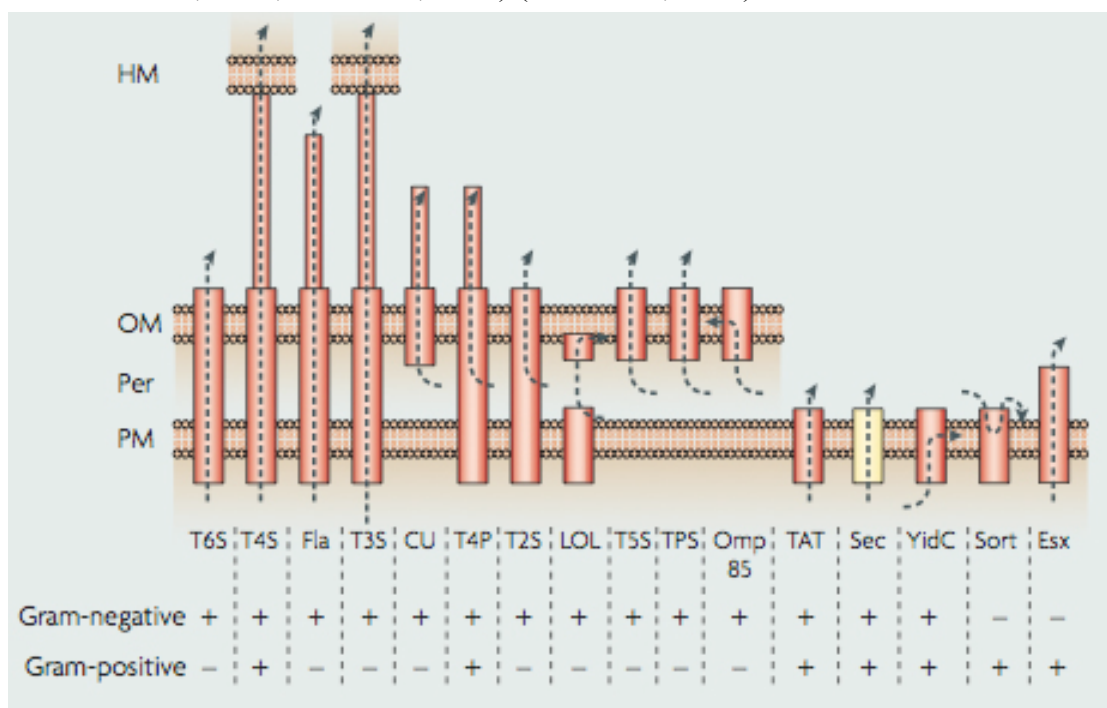
Το κυριότερο στοιχείο της έκκρισης από το Sec σύστημα είναι το διαμεμβρανικό κανάλι SecYEG. Διαμέσου αυτού, οι πρωτεΐνες διαπερνούν τη μεμβράνη ή εισέρχονται σε αυτήν (Collinson, 2005; Van den Berg et al, 2004). Οι τρόποι που μια προ-πρωτεΐνη μπορεί να φτάσει στο κανάλι είναι δύο 1. Συν-μεταφραστικά, ενώ συντίθεται από το ριβόσωμα, μέσω του SRP συμπλόκου (Mandon et al, 2003) ή 2. Μετά –μεταφραστικά, με τη βοήθεια ή όχι σαπερονών (Osborne et al, 2005) (εικόνα 3).

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς με τον έκκριση περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθείται από πρωτεΐνες που διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά επέκταση εκκρινόμενες είναι όλες οι πρωτεΐνες που αφήνουν το κυτταρόπλασμα και δεν ενσωματώνονται στην εσωτερική μεμβράνη.

1.2 Οι εκκριτικές προ-πρωτεΐνες που μεταφέρονται από το Sec σύστημα και οι ιδιότητές τους.

Οι εκκριτικές πρωτεΐνες αποτελούνται από πεπτιδίο σήμα και από το ώριμο μέρος (Sabatini et al, 1971). Το πεπτιδίο σήμα είναι απαραίτητο για την έκκριση και κόβεται από την πεπτιδάση τύπου 1, όταν η πρωτεΐνη περάσει στην περιπλαστική πλευρά της μεμβράνης (Auclair et al, 2011). Είναι συνήθως μεταξύ 20-30 αμινοξέων, δεν έχει κάποια συντηρημένη αλληλουχία, μόνο συντηρημένες φυσικοχημικές ιδιότητες και μπορεί να προβλεφθεί με πιθανότητα μεγαλύτερη από 90% (Petersen et al, 2011; Talmud et al, 1996). Αποτελείται από ένα θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο που ακολουθείται από έναν υδρόφοβο πυρήνα και από ένα καρβοξυτελικό άκρο που στο τέλος του έχει τη συντηρημένη θέση κοπής της πεπτιδάσης τύπου I (Hegde & Bernstein, 2006) (εικόνα 2). Το ώριμο μέρος αποτελείται συνήθως από 100-400 αμινοξέα (εικόνα 7) και δεν είναι γνωστό να έχει ιδιότητες που το διαφοροποιούν από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες (Orfanoudaki et al, in preparation). Προκειμένου να εκκριθεί πρέπει να παραμείνει αποδιπλωμένο (Knoblauch et al, 1999).

Η υδροφοβικότητα του πεπτιδίου σήματος καθορίζει αν η πρωτεΐνη θα εκκριθεί συν ή μετά μεταφραστικά. Όταν το πεπτιδίο σήμα έχει υψηλή υδροφοβικότητα τότε η ριβονουκλεοπρωτεΐνη SRP δεσμεύεται πάνω σε αυτό και στο ριβόσωμα με υψηλή συγγένεια 1-10 nM (πίνακας 2). Αν το πεπτιδίο σήμα είναι χαμηλότερης υδροφοβικότητας ξεφεύγει από τον SRP και εκκρίνεται μετά-μεταφραστικά (von Loeffelholz et al, 2013; Wild et al, 2004) (Janda et al, 2010).



Εικόνα 1: Τα σημαντικότερα εκκριτικά συστήματα για εισαγωγή στις κυτταρικές μεμβράνες ή έκκριση στο περίπλασμα ή στον εξωκυττάριο χώρο (από το άρθρο ανασκόπησης (Paranikou et al, 2007).

Το σχήμα αποτελεί μια απλοποιημένη έκδοση στην οποία δεν φαίνονται σαπερόνες και πεπτιδάσες των πεπτιδίων σημάτων. Τα βέλη δείχνουν την πορεία που ακολουθεί η εκκριτική πρωτεΐνη. Όταν ξεκινούν στο περίπλασμα αφορούν πρωτεΐνες που έχουν ήδη διαπεράσει την πρώτη μεμβράνη μέσω του Sec ή του TAT συστήματος. Σύστημα έκκρισης τύπου 2(T2S): οι πρωτεΐνες εκκρίνονται από το TAT ή το Sec και στη συνέχεια διαπερνούν και την εξωτερική μεμβράνη (Korotkov et al). Σύστημα έκκρισης τύπου 3(T3S):είναι ομόλογο του μαστιγίου και δημιουργείται παρουσία ξενιστή (Cornelis, 2006). Σύστημα έκκρισης τύπου 4(T4S): έχει εξελικτική ομοιότητα με το σύστημα σύζευξης και μεταφοράς DNA των βακτηρίων(Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Σύστημα έκκρισης τύπου 5(T5S): το υπόστρωμα μεταφέρεται αρχικά από το Sec και στη συνέχεια χρησιμοποιεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης για να διαπεράσει την εξωτερική μεμβράνη (αυτομεταφορείς) (Henderson et al, 2004). Σύστημα έκκρισης τύπου 6(T6S): δεν γνωρίζουμε ακόμα πολλές πληροφορίες (Silverman et al, 2012). LOL : Σύστημα τοποθέτησης λιπο πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη . CU: μονοπάτι της σαπερόνης Usher(Allen et al, 2009). Omp85 (Bam): μηχανισμός ένθεσης πρωτεϊνών σχήματος «β-βαρέλι»(Hagan et al) . TPS: σύστημα έκκριση 2 εταίρων. Fla: Μαστίγιο. Esx: εξειδικευμένο σύστημα έκκρισης που συναντάτε στα κατά Gram θετικά βακτήρια. Sort: σορτάση. YidC: εισαγάγει πρωτεΐνες στη μεμβράνη με ή χωρίς τη βοήθεια της SecYEG (Dalbey et al, 2011). Συντομογραφίες:OM: εξωτερική μεμβράνη, HM:μεμβράνη ξενιστή, Per:περίπλασμα, PM: πλασματική μεμβράνη.

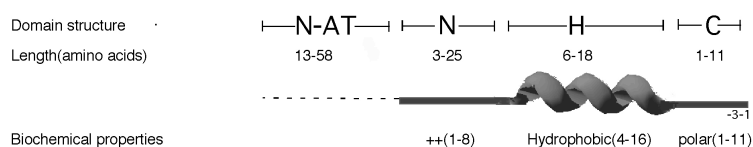
1.3 Συν- μεταφραστική έκκριση

Το SRP σύμπλοκο που είναι υπεύθυνο για την συν-μεταφραστική έκκριση, αποτελείται από την Ffh πρωτεΐνη και το 4.5S RNA. Το RNA πέρα από τη δομική υποστήριξη συμμετέχει στην ενεργοποίηση της υδρόλυσης του GTP (Bradshaw et al, 2009; Neher et al, 2008; Peluso et al, 2001; Zheng & Gierasch, 1997). Παρόλο που το προκαρυωτικό SRP δεν έχει την υπομονάδα που προκαλεί παύση της μετάφρασης, όπως έχει το ευκαρυωτικό, μπορεί λειτουργικά να το υποκαταστήσει *in vitro*, δείχνοντας έτσι τη συντήρηση της πρωτεΐνης μεταξύ των επικρατειών της ζωής(Powers & Walter, 1997). Το SRP προσδέεται πρωτίστως πάνω στην L23 μονάδα του ριβοσώματος (Lee & Beckwith, 1986; Schaffitzel et al, 2006), δηλαδή δίπλα από το σημείο που εξέρχεται η νεοσυντιθέμενη αλληλουχία. Όταν προσδέσει

τη νεοσυντιθέμενη αλληλουχία η GTPαση ενεργοποιείται και μεταφέρει το σύμπλοκο ριβόσωμα-νεοσυντιθέμενη αλυσίδα στον υποδοχέα του FtsY στη μεμβράνη του κυττάρου(von Loeffelholz et al, 2013) (εικόνα 4). Στη συνέχεια το ριβόσωμα προσδένεται στο SecYEG κανάλι χρησιμοποιώντας την ίδια επιφάνεια όπως και για τον FtsY. Είναι πιθανό το SRP να αλλάζει θέση και στη συνέχεια το ριβόσωμα να είναι ελεύθερο να προσδεθεί στη SecY (εικόνα 5) διαμέσου της οποίας θα περάσει η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα (Grudnik et al, 2009).

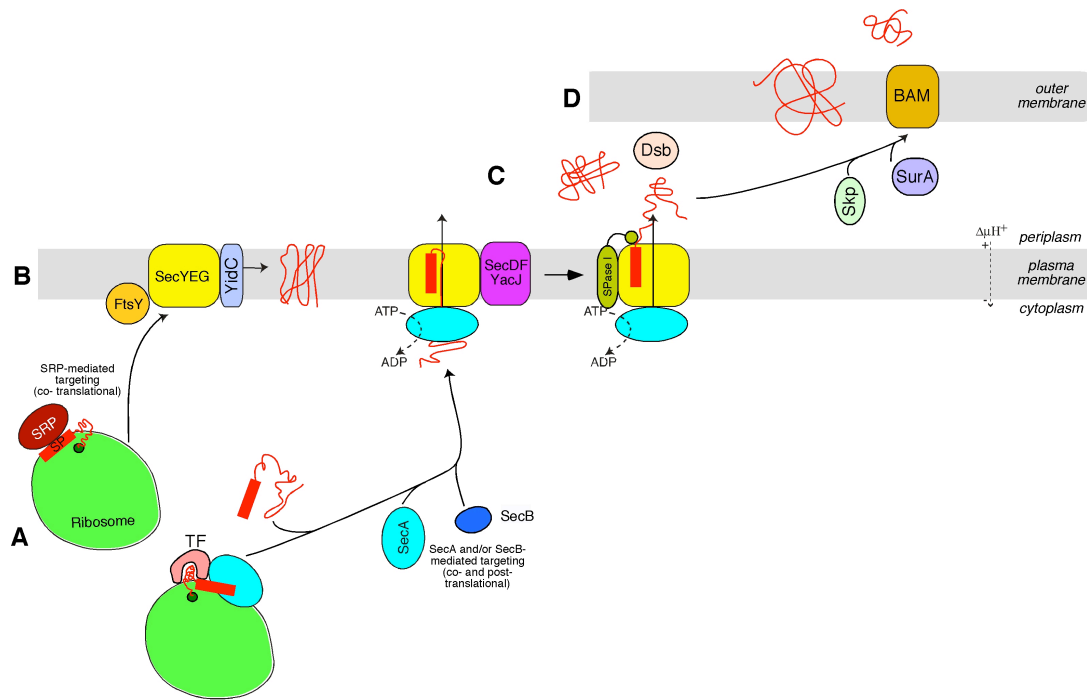
1.4 Μετά- μεταφραστική έκκριση

Η βασική πρωτεΐνη για την μετά –μεταφραστική έκκριση είναι η SecA (εικόνα 4C). Η SecA αναγνωρίζει υποστρώματα και υδρολύει ATP, προσφέροντας την απαραίτητη ενέργεια για τη μετατόπισή τους διάμεσο του SecYEG (Vrontou & Economou, 2004). Όταν μια εκκριτική πρωτεΐνη εξέλθει από το ριβόσωμα υπάρχουν 3 τρόποι για να καταλήξει μετά μεταφραστικά στην μεταθετάση 1. να τη μεταφέρει η σαπερόνη SecB 2. να τη μεταφέρει η SecA 3. να καταλήξει μόνο της χωρίς κάποια βοήθεια (εικόνα 3A). Παρακάτω θα αναλυθούν όλες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετά-μεταφραστική έκκριση. Η σειρά της παρουσίας τους είναι χρονολογική, από τη στιγμή που εξέρχονται από το ριβόσωμα έως να καταλήξουν στη SecY (εικόνα 4E).



Εικόνα 2: Τα χαρακτηριστικά των πεπτιδίων σημάτων.

425 πεπτίδια σήματα συγκεντρώθηκαν από τη βάση δεδομένων Uniprot και αναλύθηκαν. Το signal p. 3.0 χρησιμοποιήθηκε για να προβλεφθούν τα σύνορα μεταξύ N, H, και C περιοχών, καθώς και το σημείο κοπής από την πεπτιδάση τύπου I. Οι πρωτεΐνες-αυτομεταφορείς (εικόνα 1) έχουν μια αμινοτελική προέκταση (N-AT). Οι θέσεις -1 και -3 είναι συντηρημένες συνήθως από ένα μικρό υδρόφοβο αμινοξύ και αποτελούν το σημείο κοπής της πεπτιδάσης (G. Orfanoudaki, M. Papanastasiou, A. Economou δημοσίευτα δεδομένα)



Εικόνα 3: Το Sec εκκριτικό σύστημα

A. Όταν ένα μέρος διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ή ένα πεπτίδιο σήμα υψηλής υδροφοβικότητας εξέρχεται από το ριβόσωμα τότε προσδένεται από το SRP και ακολουθεί συν-μεταφραστική έκκριση. Κάποιες μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορεί να εκκριθούν απευθείας από τη YidC. Αν η πρωτεΐνη ξεγλιστρήσει από το SRP τότε μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον Trigger factor και στην συνέχεια μέσω της SecB ή μόνη της, να καταλήξει στη SecA. **B.** Όταν το σύμπλοκο SRP-νεοσυντιθέμενη αλυσίδα-ριβόσωμα φτάσει στον υποδοχέα FtsY της μεμβράνης, το υπόστρωμα παραδίδεται στη SecY όπου τις περισσότερες φορές εισέρχεται στη μεμβράνη με η χωρίς τη βοήθεια της YidC. Εναλλακτικά αν το υπόστρωμα καταλήξει στη SecA τότε μέσω πολλαπλών κύκλων υδρόλυσης μετατοπίζεται σε διαστήματα 20-30 αμινοξέων (Schiebel et al, 1991). Η πρωτεΐνη περνάει στην trans πλευρά της μεμβράνης και απελευθερώνεται όταν κοπεί και το πεπτίδιο σήμα της **C.** στο περίπλασμα οι πρωτεΐνες μπορούν να αναδιπλώσουν με ή χωρίς τη βοήθεια περιπλασμικών σαπερονών ή μπορούν να συνεχίσουν την έκκρισή τους ή την εισαγωγή τους στην εξωτερική μεμβράνη.

1.5 Ο Trigger Factor

Είναι μια διμερής σαπερόνη 48 kDa με επιμήκη δομή όπως φαίνεται στην εικόνα 4B (Kramer et al, 2002; Kristensen & Gajhede, 2003). Είναι η μόνη σαπερόνη του *E. coli* που μπορεί να λειτουργήσει πάνω στο ριβόσωμα (Hoffmann et al, 2010). Βρίσκεται σε διπλάσια συγκέντρωση από τα ριβοσώματα (πίνακας 1) και μπορεί να συναντηθεί πάνω στο ριβόσωμα ή στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 3). Δεν είναι τυπική

σαπερόνη του εκκριτικού συστήματος αφού αλληλεπιδρά και με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Έχει δειχθεί όμως ότι αλληλεπιδρά και με εκκρινόμενες ενώ φαίνεται να είναι σημαντικός κυρίως για τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (Oh et al, 2011). Απαρτίζεται από τρεις δομικά διακριτές περιοχές 1. Την αμινοτελική, με την οποία προσδένεται στο ριβόσωμα 2. Την κεντρική που έχει ενεργότητα πεπτιδυλ-προλυλ cis/trans ισομεράσης (Hesterkamp & Bukau, 1996; Scholz et al, 1997; Stoller et al, 1995) και 3. Την καρβοξυτελική που είναι σημαντική για την ενεργότητα σαπερόνης (Merz et al, 2006; Zeng et al, 2006). Όταν προσδένεται στο ριβόσωμα έχει προταθεί ότι μπορεί να λειτουργήσει 1. καθυστερώντας την αναδίπλωση (O'Brien et al, 2012) ή 2. βοηθώντας την αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης προσφέροντας μια υδρόφοβη κοιλότητα (Ferbitz et al, 2004). Στο κυτταρόπλασμα έχει αναφερθεί ότι αποδιπλώνει κακώς αναδιπλωμένα πεπτίδια (Bost & Belin, 1997) και ότι βοηθάει την αναδίπλωση μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης και την τοποθέτησή της πάνω στο ριβόσωμα (Martinez-Hackert & Hendrickson, 2009). Πιθανώς ο διαχωρισμός της λειτουργίας να έρχεται από τη φύση των διαφορετικών υποστρωμάτων ή από το αν ο trigger factor βρίσκεται πάνω στο ριβόσωμα ή όχι.

1.6 H SecB

Συναντάται σε μια μερίδα Gram αρνητικών βακτηρίων, είναι 20 kDa, σχηματίζει τετραμερή (Muren et al, 1999) (εικόνα 4D) και βοηθάει την έκκριση ορισμένων πρωτεϊνών (Baars et al, 2006; Ullers et al, 2004). Στα βακτήρια έχει διπλό ρόλο, από τη μια αποτρέπει την αναδίπλωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Bechtluft et al) και από την άλλη τις παραδίδει στη SecA που έχει προσδεθεί στη μεμβράνη (Randall et al, 2005). Η SecB αναγνωρίζει ένα συντηρημένο μοτίβο περίπου 9 αμινοξέων πλούσιο σε αρωματικά και βασικά αμινοξέα (Knoblauch et al, 1999; Randall & Hardy, 2002). Προσδένεται στα τελευταία 22 αμινοξέα του καρβοξυτελικού άκρου της SecA (Zhou & Xu, 2003). Σύμφωνα με το επικρατές μοντέλο, βέλτιστη μετατόπιση επιτυγχάνεται όταν 2 πρωτομερή της SecA προσδένουν ένα τετραμερές της SecB (Randall et al, 2005).

1.7 H SecA

Η SecA είναι η μόνη απαραίτητη για τη ζωή πρωτεΐνη στη μετά-μεταφραστική έκκριση πέρα από τη SecY. Η SecA προσδένεται στις εκκριτικές πρωτεΐνες, στη

SecY, στα λιπίδια, και στη SecB και μετατρέπει την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP σε μηχανικό έργο (Vrontou & Economou, 2004). Ανήκει στην υπερικογένεια 2 των DexH/D (όπου x οποιοδήποτε αμινοξύ) πρωτεϊνών στην οποία ανήκουν οι ελικάσες και τα ένζυμα τροποποίησης του RNA (Koonin & Gorbalenya, 1992; Solem et al, 2006; Vrontou & Economou, 2004). Η SecA αποτελείται από 4 υπομονάδες: 1. από την περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίου (NBD) 2. από τον εσωτερικό ρυθμιστή ATPάσης (IRA2) 3. από την περιοχή πρόσδεσης υποστρώματος (PBD) και 4. από την καρβοξυτελική περιοχή (CTD) (εικόνα 4C). Το νουκλεοτίδιο (ATP) προσδένεται μεταξύ των δύο πρώτων υπομονάδων και όταν υδρολύεται προκαλεί δομικές αλλαγές που μεταφέρονται και στις υπόλοιπες υπομονάδες (Hunt et al, 2002; Sianidis et al, 2001). Οι άλλες δύο υπομονάδες προσφέρουν ειδικότητα στη SecA. Στο PBD προσδένονται τα πεπτίδια σήματα και ελέγχεται η υδρόλυση του ATP (Gelis et al, 2007) ενώ το CTD κρατάει τις υπομονάδες NBD και IRA2 στη σωστή απόσταση αποτρέποντας την άσκοπη υδρόλυση του ATP (Mori & Ito, 2006). Το PBD πραγματοποιεί μια περιστροφική κίνηση $\sim 80^\circ$ άγνωστης λειτουργίας (Sardis & Economou, 2010). Η SecA του κυτταροπλάσματος βρίσκεται σε συγκέντρωση $\sim 7\mu\text{M}$ και έχει υψηλή συγγένεια για τον εαυτό της 0.76-14 nM και επομένως αναμένεται να βρίσκεται σε διμερή κατάσταση (εικόνα 5E) (Akita et al, 1991; Kusters et al, 2011; Wowor et al). Η ολιγομερική κατάσταση της SecA στη πάνω στη SecY καθώς και κατά τη διάρκεια της μετατόπισης είναι αμφιλεγόμενη (Sardis & Economou, 2010).

Οι αλληλεπιδράσεις της SecA

1.7.1 SecA και ριβόσωμα

Η SecA προσδένεται στην L23 υπομονάδα του ριβοσώματος δίπλα από το σημείο από το οποίο εξέρχονται οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (εικόνα 3A) (Huber et al, 2011). Επομένως η SecA θα μπορούσε να πιάνει τις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες εξερχόμενων πρωτεϊνών και να τις μεταφέρει στη μεμβράνη, παρόλο που κάτι τέτοιο δεν έχει δειχθεί. Είναι όμως βέβαιο ότι η SecA μπορεί να προσδέσει τα υποστρώματα μετά-μεταφραστικά και να τα μεταφέρει στη SecY για έκκριση (Huber et al, 2011).

1.7.2 SecA και SecY

Η SecA αλληλεπιδρά με τις κυτταροπλασματικές λούπες της SecY με υψηλή συγγένεια(~40 nM) (πίνακας 2)(Douville et al, 1995). Η δομή της SecA πάνω στη SecY λύθηκε για πρώτη φορά πριν μερικά χρόνια και αποκάλυψε ότι οι περιοχές NBD, IRA2, C-domain σχηματίζουν μια συνεχόμενη επιφάνεια με τον πόρο της SecY ο οποίος καλύπτεται από το PBD (εικόνα 5F) (Zimmer et al, 2008). Η SecA πραγματοποιεί πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης ATP που προκαλούν αναδιατάξεις που μεταφέρονται και στις υπόλοιπες υπομονάδες της SecA (Hunt et al, 2002; Keramisanou et al, 2006; Sianidis et al, 2001). Πειράματα μοριακή διασύνδεσης έχουν δείξει ότι η SecA πιάνει το υπόστρωμα σε μια κοιλότητα το οποίο στη συνέχεια μετακινείται προς τη SecY σαν μια αποδιπλωμένη πεπτιδική αλυσίδα (Zimmer & Rapoport, 2009)

1.8 Η SecYEG

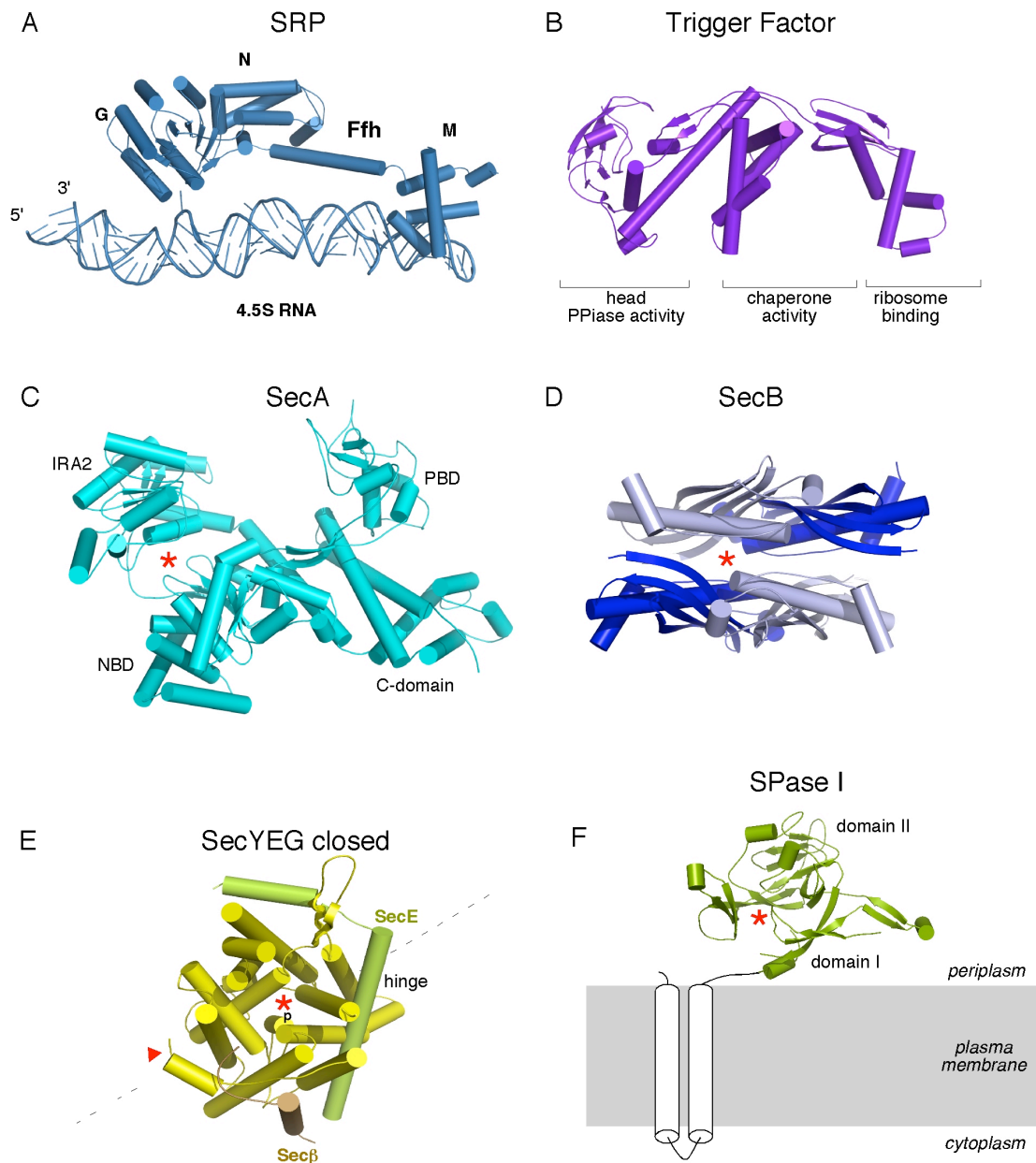
Είναι το διαμεμβρανικό κανάλι μέσα από το οποίο διέρχονται οι εκκριτικές πρωτεΐνες και αποτελείται από τις SecY, SecE και SecG (Brundage et al, 1990). Η SecY είναι μια πρωτεΐνη 48 kDa και είναι συντηρημένη και στις 3 επικράτειες της ζωής (Αρχαία, βακτήρια, Ευκαρυώτες) (εικόνα 4E) (Gumbart & Schulten, 2006; Pretz et al, 2006; Rapoport, 2007). Στο *E.coli* απαρτίζεται από 10 διαμεμβρανικές έλικες με έναν κεντρικό πόρο που παίρνουν σχήμα κλεψύδρας. Ο πόρος στενεύει στο μέσω του αποτρέποντας τη διάχυση ιόντων(Haider et al, 2006). Η SecE έχει δύο διαμεμβρανικές έλικες (Murphy & Beckwith, 1994)που περιβάλλουν τη SecY και βοηθούν τη σταθερότητα της. Απουσία της SecE, η SecY προτεολύεται ευκολότερα (Kihara et al, 1995). Η SecG απαρτίζεται από δύο διαμεμβρανικές έλικες και δεν είναι απαραίτητη για τη ζωή ούτε για τη μετατόπιση υποστρωμάτων(Nishiyama et al, 1996). Βοηθάει την πρόσδεση της SecA πάνω στη SecY καθώς και την ένθεση της SecA εντός της SecY που είναι μέρος του καταλυτικού της κύκλου(Nishizawa et al, 1989), (Economou & Wickner, 1994).

Υπάρχουν μεταλλάξεις στη SecY(αλλά και στις SecA, SecE και SecG) (Harris & Silhavy, 1999) και επιτρέπουν την μετατόπιση εκκριτικών πρωτεϊνών με μη λειτουργικά πεπτίδια σήματα (*prl* μεταλλάγματα)(Bondar et al, 2010; Bost & Belin, 1997). Ορισμένα *prl* μεταλλάγματα στη SecY επιτρέπουν ακόμα και την μετατόπιση

πρωτεϊνών χωρίς καθόλου πεπτίδια σήματα (Smith et al, 2005). Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλάξεις βρίσκονται στον κεντρικό πόρο του καναλιού (Derman et al, 1993; Nouwen et al, 1996; Osborne & Silhavy, 1993; Prinz et al, 1996). Η επικρατέστερη εξήγηση είναι ότι αυτές οι μεταλλάξεις χαλαρώνουν το κανάλι και μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης της μεταθετάσης χωρίς την παρουσία υποστρώματος (Duong & Wickner, 1999; Gouridis et al, 2009).

Μια μικρή α-έλικα που βρίσκεται στην περιπλαστική πλευρά του καναλιού ονομάζεται «πώμα» (plug) βοηθάει στην αδιαπερατότητα του καναλιού σε ιόντα (Saparov et al, 2007; Van den Berg et al, 2004). Παρόλο που στις κρυσταλλικές δομές το πώμα βρίσκεται στο κέντρο του πόρου και αν «κλειδώσει» στη θέση αυτή δεν μπορεί να γίνει μετατόπιση, η απαλοιφή του δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων (Bondar et al, 2010; Maillard et al, 2007; Robson et al, 2009).

Τέλος ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της SecY είναι ένα πλευρικό άνοιγμα που έχει ανάμεσα στις διαμεμβρανικές έλικες και μέσω του οποίου οι μεμβρανικές πρωτεΐνες κατευθύνονται εντός της μεμβράνης αντί να εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 4E) (Gumbart & Schulten, 2007; Plath et al, 1998; Van den Berg et al, 2004).



Εικόνα 4: Οι δομές των βασικότερων μερών του Sec συστήματος (από το άρθρο ανασκόπησης (Chatzi et al, 2013)).

A. Πλευρική αποϊκόνιση του SRP **B.** η δομή του Trigger Factor. Στο κυτταρόπλασμα είναι διμερές εδώ απεικονίζεται ως μονομερές για λόγους απλούστευσης **C** Το πρωτομερές της SecA και οι υπομονάδες του :IRA2, NBD, C-domain, PBD. Ο κόκκινος αστερίσκος δείχνει το σημείο στο οποίο προσδένεται το νουκλεοτίδιο. **D** Το τετραμερές της SecB. Ο κόκκινος αστερίσκος δείχνει μια ρηχή κοιλότητα στην οποία έχει προταθεί ότι προσδένεται το υπόστρωμα. **E.** Κυτταροπλασματική απεικόνιση της SecY. Το βέλος δίνει το πλευρικό άνοιγμα της SecY μέσα από το οποίο διέρχονται οι μεμβρανικές πρωτεΐνες για να καταλήξουν στη μεμβράνη. Ο αστερίσκος δείχνει τον αυλό από τον οποίο περνούν οι

πρωτεΐνες για να εξέλθουν στο περίπλασμα. Το πώμα συμβολίζεται ως (P) F. Η κυτταροπλασματική πλευρά της SPase I . Αποτελείται από δύο β-πτυχωτά φύλλα . Ο αστερίσκος δείχνει το καταλυτικό κέντρο της πρωτεάσης.

1.9 Η ενζυμική αντίδραση της μετατόπισης

Η αντίδραση της μετατόπισης μπορεί να διακριθεί σε 6 διακριτά και πειραματικά ανιχνεύσιμα βήματα (εικόνα 6)

Βήμα 1: Η SecA δεσμεύεται στην SecY και δημιουργείται το ολοένζυμο

Βήμα 2: Η προ-πρωτεΐνη στοχεύεται στην μεταθετάση με η χωρίς τη βοήθεια σαπερονών. Το πεπτιδίο σήμα και το ώριμο μέρος προσδένονται σε διαφορετικές θέσεις πάνω στην μεταθετάση(Gelis et al, 2007).

Βήμα 3: Το πεπτιδίο σήμα μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης της μεταθετάσης σε ένα στάδιο που ονομάζεται ενεργοποίηση(Gouridis et al, 2009).

Βήμα 4:Στη συνέχεια το ώριμο μέρος εγκλωβίζεται στο ολοένζυμο ένα στάδιο που χρειάζεται την παρουσία του πεπτιδίου σήματος (Gouridis et al, 2009).

Βήμα 5: Μια συντηρημένη γέφυρα άλατος στη βάση των δυο περιοχών όπου προσδένεται το νουκλεοτίδιο (Gate 1) σπάει και ξεκινούν οι πολλαπλοί κύκλοι υδρόλυσης και η μετατόπιση του υποστρώματος ανά 20-30 αμινοξέα(Karamanou et al, 2007; Schiebel et al, 1991). Το PMF βοηθάει σε όλη τη διάρκεια της μετατόπισης. Επίσης βοηθάει και στο να μην γλιστρήσει το υπόστρωμα προς τα πίσω(Arkowitz et al, 1993). Ο ρυθμός της μετατόπισης υπολογίζεται στα ~270 αα/λεπτό(Tomkiewicz et al, 2006)

Βήμα 6: Η πεπτιδάση του πεπτιδίου σήματος που βρίσκεται στην περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης το κόβει και η πρωτεΐνη απελευθερώνεται(Dalbey & Wickner, 1985). Στη συνέχεια μπορεί να αναδιπλώσει στο περίπλασμα η να συνεχίσει περεταιίρω την έξοδό της από το κύτταρο ή την είσοδό της στην εξωτερική μεμβράνη.

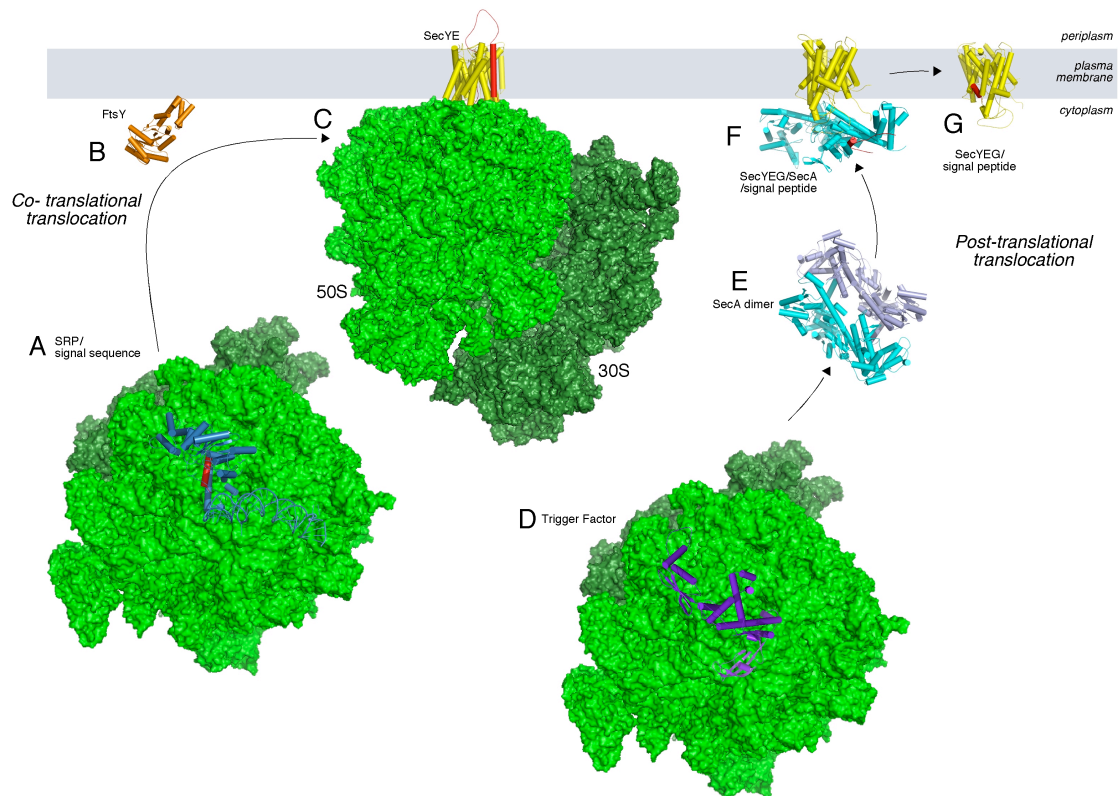
1.10 Η συνεργασία των σαπερονών και η πιθανή σειρά που προσδένονται στο υπόστρωμα

Οι SecB και TF προσδένονται στις εκκριτικές πρωτεΐνες και όταν ο TF απουσιάζει τότε η SecB βρίσκεται προσδεμένη σε περισσότερες εκκριτικές πρωτεΐνες (Hoffmann et al, 2010). Επιπλέον απουσία της SecB, οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης οδηγούνται σε συν-μετα-μεταφραστική έκκριση(Teter et al, 1999; Ullers et al, 2007).

Μια πιθανή σειρά των γεγονότων θα περιγραφεί παρακάτω. Οι SRP και TF μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα στο ριβόσωμα. Η SecA πιθανόν να ανταγωνίζεται τις δύο πρωτεΐνες μιας και προσδέεται και αυτή στην L23 υπομονάδα του ριβοσώματος. Ο TF βρίσκεται σε πολύ ψηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο και είναι πιθανό να είναι η πρώτη σαπερόνη που συναντάει τα υποστρώματα καθώς βγαίνουν. Αν είναι πολύ υδρόφοβη η αλληλουχία που ξεπροβάλλει, τότε προσδέεται από τον SRP, διαφορετικά πιθανόν να ξεγλιστρήσει και όταν έχουν συντεθεί 150 αμινοξέα μπορεί να προσδεθεί και η SecB σε αυτά. Η SecB μπορεί να τα παραδίδει απευθείας στη SecA που είναι πάνω στη SecY ή είναι ελεύθερη (Randall & Hardy, 2002).

1.11 Αναδίπλωση στο πεπρίπλασμα ή έξοδος από το κύτταρο

Στο περίπλασμα η πρωτεΐνη μπορεί να αναδιπλώνει με τη βοήθεια περιπλασμικών σαπερονών (Skr, ισομεράσες) (Justice et al, 2005) και οξειδοαναγωγασών (Dsb πρωτεΐνες) (Allen et al, 2009). Εναλλακτικά οι πρωτεΐνες μπορεί να συνεχίσουν την εισαγωγή τους στην εξωτερική μεμβράνη ή μπορούν να τη διαπεράσουν για να βρεθούν στον εξωκυτταρικό χώρο χρησιμοποιώντας κυτταρικές μηχανές όπως η BAM (β-barrel assembly mechanism) (Hagan et al) ή το LOL (lipoprotein outer membrane localization) (Okuda & Tokuda) σύστημα για τις λιπο πρωτεΐνες ή την έκκριση των πρωτεϊνών από το κύτταρο μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου 2 (εικόνα 4 I-IV) (Korotkov et al).



Εικόνα 5: Σύμπλοκα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην έκκριση.

A. Σύμπλοκο ριβόσωμα-SRP-πεπτιδίο σήμα. **B.** Ο Ftsy φαίνεται πάνω στη μεμβράνη παρόλο που είναι γνωστό ότι βρίσκεται και σε διαλυτή μορφή. Η άγκυρα στη μεμβράνη λείπει από τη συγκεκριμένη απεικόνιση. **C.** Η αλυσίδα που εξέρχεται από το ριβόσωμα έχει ήδη τοποθετηθεί στη SecY (τα δεδομένα έχουν ληφθεί από δομές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας). **D.** Μοντέλο του trigger factor πάνω στο ριβόσωμα. **E.** Διμερής μορφή της SecA από τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*. **F** Η *E.coli* δομή της SecA πάνω στη SecY μοντελοποιημένη από τη δομή της *Thermotoga maritima* που έχει κρυσταλλωθεί. Το πεπτιδίο σήμα της Lamb φαίνεται πάνω στη SecA (κόκκινος κύλινδρος). Τα δεδομένα έχουν προκύψει από την NMR δομή του πεπτιδίου σήματος πάνω στη SecA. **G.** Το πεπτιδίο σήμα πάνω στη SecYEG βασισμένο στη δομή του (Hizlan et al, 2012).

1.12 Η έξοδος των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα

Το κύτταρο έχει εξελίξει ένα εκκριτικό σύστημα από το οποίο αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να εξέρχονται. Το TAT (Twin Arginine) εκκριτικό σύστημα βρίσκεται και στις 3 επικράτειες της ζωής και μεταφέρει αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Desvaux et al, 2004), που συνήθως έχουν προσδέσει έναν συμπαράγοντα, στο περίπλασμα. Αποτελείται από 3 διαμεμβρανικές υπομονάδες τις : TAtA, TAtB και

TAtC, που σχηματίζουν τον πόρο από τον οποίο διέρχονται οι πρωτεΐνες (Martinez-Argudo & Blocker, 2010; Roehrich et al, 2013). Η απαραίτητη ενέργεια για τη μετατόπιση προσφέρεται από το PMF(Proton motive force). Το πεπτίδιο σήμα των πρωτεϊνών που πρόκειται να εκκριθούν από το TAT διαφέρει από το Sec ως προς το ότι έχει μεγαλύτερο αμινοτελικό κομμάτι και στο τέλος του φέρει ένα μοτίβο διπλής αργινίνης(Berks et al, 2000; Sargent et al, 2002). Το υδρόφοβο και το καρβοξυτελικό κομμάτι είναι πανομοιότυπα με των Sec πεπτιδίων σημάτων (Hegde & Bernstein, 2006). Δεν είναι πλήρως κατανοητό αν οι πρωτεΐνες εξέρχονται αναδιπλωμένες για λόγους που σχετίζονται με τη λειτουργία τους ή γιατί το κύτταρο δεν μπορεί να τις διατηρήσει αποδιπλωμένες στο κυτταρόπλασμα (Natale et al, 2008).

1.13 Οι εγγενώς αποδιπλωμένες πρωτεΐνες

Υπάρχουν πρωτεΐνες που ονομάζονται εγγενώς αποδιπλωμένες και χωρίζονται σε 2 κατηγορίες 1. Σε αυτές που σε όλο το μήκος τους διατηρούνται αποδιπλωμένες και 2. Σε αυτές που διατηρούνται 30-40% αποδιπλωμένες (Uversky, 2002). Οι πρωτεΐνες αυτές αντιβαίνουν στον κανόνα που θέλει όλες τις πρωτεΐνες να αναδιπλώνουν γρήγορα για να πάρουν την ενεργειακά χαμηλότερη κατάσταση. Το κύτταρο για να τις διατηρεί, σημαίνει ότι μπορεί να ανεχτεί τα ~5-15kj/mol υψηλότερης ενεργειακής κατάστασης στην οποία βρίσκονται. Ο πιο πιθανός λόγος που το κύτταρο τις έχει εξελίξει, είναι ότι έχουν μεγάλη επιφάνεια διαθέσιμη για αλληλεπιδράσεις και επομένως μπορούν να αλληλεπιδράσουν με πολλές πρωτεΐνες (Tompa, 2012). Η αλληλεπίδραση είναι συνήθως χαμηλής συγγένειας (Silverman et al, 2012). Η ύπαρξη των πρωτεϊνών αυτών δημιουργεί το ερώτημα γιατί δεν αποικοδομούνται από τους μηχανισμούς ελέγχου του κυττάρου. Δύο πιθανές απαντήσεις είναι ότι συνήθως βρίσκονται σε σύμπλοκο μαζί με κάποια άλλη πρωτεΐνη ή ότι δεν αποκαλύπτουν υδρόφοβα κομμάτια που αναγνωρίζονται από τις πρωτεάσες του κυττάρου (Breyton et al, 2002).

1.14 Ποιοτικός έλεγχος στο κυτταρόπλασμα

Το κυτταρόπλασμα των βακτηρίων έχει πρωτεάσες που αναγνωρίζουν κακώς αναδιπλωμένες ή κατεστραμμένες πρωτεΐνες και τις αποικοδομούν. Ονομάζονται AAA+ (ATPase associated with a variety of cellular activities) και δύο

αντιπροσωπευτικές πρωτεάσες είναι οι ClpX/ClpP (Joshi et al, 2004) και η Lon (Lee & Suzuki, 2008). Αποτελούνται από μια δομή σχήματος βαρελιού στο οποίο γίνεται η πρωτεόλυση και από μια υπομονάδα όπου υδρολύει ATP (Bechtluft et al, 2007). Οι πρωτεάσες αναγνωρίζουν κυρίως υδρόφοβα αμινοξέα τα οποία περιβάλλονται από αρωματικά (Tomkiewicz et al, 2006). Προκύπτει λοιπόν το ερώτημα πώς γίνεται η διάκριση ανάμεσα σε σαπερόνες και πρωτεάσες. Σαπερόνες όπως η DnaK αναγνωρίζουν μόνο υδρόφοβα αμινοξέα (Dalbey & Wickner, 1985) ενδεχομένως υπάρχει και επιπλέον πιο αυστηρός μηχανισμός ελέγχου που δεν είναι γνωστός. Όταν οι πρωτεάσες προσδέσουν το υπόστρωμά τους το αποδιπλώνουν με ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP και στη συνέχεια αυτό περνάει μέσα από το πρωτεολυτικό «βαρέλι».

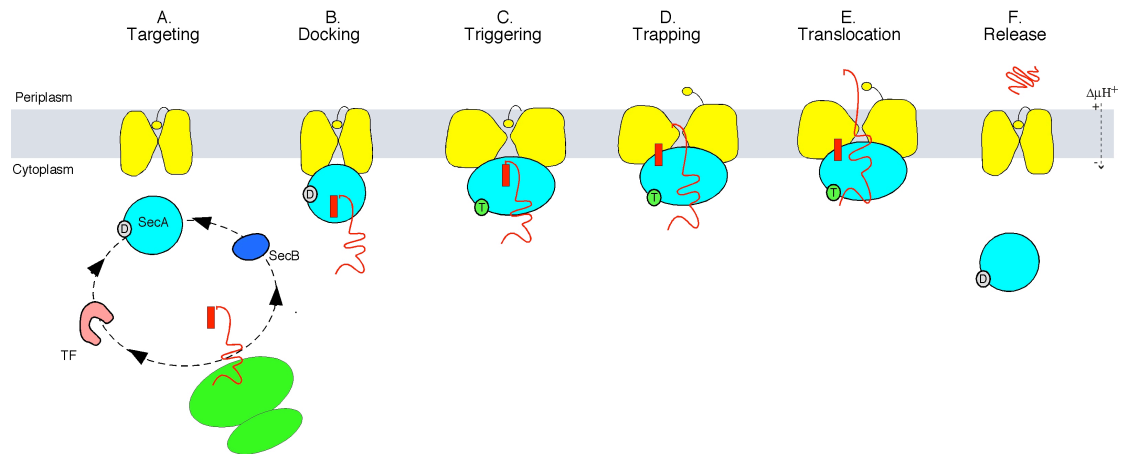
| Component | TF | SRP | SecB | SecA | Ribosomes | SecY | YidC | SecDF |
|--|------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Cellular concentration (μM) | 40–50 [63] | 0.4 [163] | 4–20 [111] | 5–7 [101] | 20 [54] | 0.8 [201] | 6–8 [202] | 0.08 [203] |

Πίνακας 1: Κυτταροπλασματικές συγκεντρώσεις των βασικών πρωτεϊνών της έκκρισης

| Component | TF | SRP | SecB | SecA | Full-length preprotein | SP preprotein | Mature preprotein |
|------------------------------|------------|-------------------|------------|-----------------------|------------------------|------------------|-------------------|
| Empty ribosome | 1 [204] | 0.100 [163] | – | NM | – | – | – |
| Ribosome: nascent preprotein | ~0.1 [204] | 0.001–0.010 [163] | – | NM | – | – | – |
| SecY | – | – | – | 0.04 [177] | 0 [111] | – | 0 [111] |
| SecY-bound SecA | – | – | 0.03 [111] | NA | 0.23–2.2 [111] | 0.2–3.2 [11, 79] | 0.6–4.5 [111] |
| SecA | – | – | 1.6 [111] | 0.0076–0.014 [89,205] | – | – | – |
| Full-length preprotein | NM | – | 0.01 [206] | 2.3–22 [111] | – | – | – |
| SP preprotein | – | – | NM* | 2–32 [11,79] | – | – | – |
| Mature preprotein | NM | – | NM | 6–45 [11] | – | – | – |

Πίνακας 2: Συγγένειες πρόσδεσης μεταξύ των γνωστών συμπλόκων της έκκρισης.

Η συγγένεια εκφράζεται σε micromoles. Οι συντομογραφίες σημαίνουν: NM: δεν έχει μετρηθεί, χρησιμοποιείται για αλληλεπιδράσεις που δεν είναι γνωστές. NM* υπάρχουν αντιφατικές αναφορές σχετικά με το αν η SecB προσδέεται στο πεπτίδιο σήμα ή όχι. NA: αδύνατες αλληλεπιδράσεις.



Εικόνα 6: Μοντέλο για το μηχανισμό της μετα-μεταφραστικής έκκρισης.

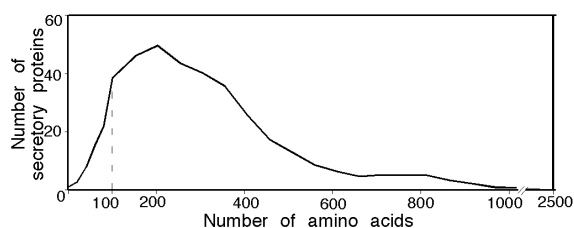
Τα έξι βήματα της έκκρισης περιγράφονται αναλυτικά στο κείμενο. Για λόγους απλούστευσης φαίνονται με κόκκινο χρώμα η προ πρωτεΐνη, με πράσινο το ριβόσωμα, με κίτρινο η SecY. D: ADP, T: ATP. Η αλλαγή στο σχήμα της SecA και της SecY αντικατοπτρίζει το στάδιο της ενεργοποίησης του ολοενζύμου. Η στοιχειομετρία SecA-SecY δείχνεται ως 1:1 για λόγους απλούστευσης.

Κεφάλαιο 2-Αποτελέσματα

Τα σήματα στόχευσης του ώριμου μέρους των εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεταθετάση

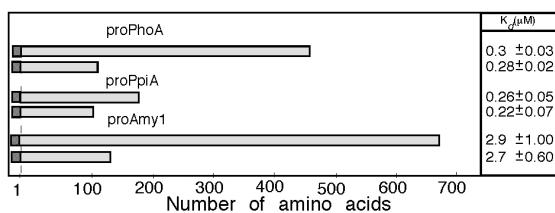
2.1 Το ελάχιστο μήκος του ώριμου τμήματος που απαιτείται για στόχευση

Το ώριμο τμήμα των προ-πρωτεϊνών έχει σήματα στόχευσης (Gouridis et al, 2009). Αναζητώντας την πληροφορία που είναι απαραίτητη για τη στόχευση αναλύσαμε το μήκος των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Το πιο μικρό, κοινό μέγεθος είναι τα 100 αμινοξέα (εικόνα 7). οι περισσότερες εκκριτικές πρωτεΐνες έχουν μεταξύ 100-400 αμινοξέα. Η προ-πρωτεΐνη που χρησιμοποιούμε σαν μοντέλο είναι η proPhoA και είναι 471 αμινοξέα. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν τα 100 αμινοξέα είναι αρκετά για στόχευση κόψαμε την proPhoA στο αμινοξύ 122 δημιουργώντας την prophoA(1-122). Η παρατήρηση ήταν ότι εξακολουθεί να στοχεύεται (εικόνα 8). Το αποτέλεσμα επαναλήφθηκε με δύο ακόμα εκκρινόμενες πρωτεΐνες που κόψαμε μετά το εκατοστό αμινοξύ του ώριμου τμήματος, την proPriA και την proAmy1 (εικόνα 8). Επομένως καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ~ 100 αμινοξέα είναι ικανά για να στοχευθεί μια πρωτεΐνη.



Εικόνα 7: Το μήκος των ώριμων τμημάτων όλων των εκκρινόμενων πρωτεϊνών του *Escherichia coli*

αναλύθηκε (από Orfanoudaki et al, unpublished data). Η μικρότερη πρωτεΐνη έχει μήκος 22 αμινοξέα (EcnA_Ecoli) και η μεγαλύτερη 2.340 αμινοξέα (YeeJ_Ecoli).



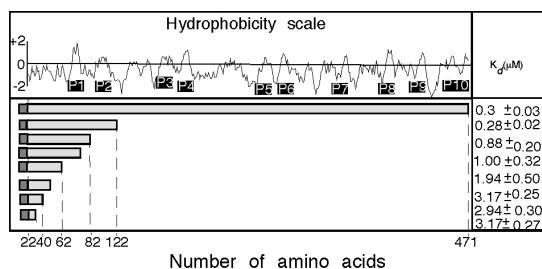
Εικόνα 8: Οι σταθερές διάστασης 3 εκκρινόμενων πρωτεϊνών (proPhoA, proPpiA, proAmy1) και των κομμένων παραγώγων τους (proPhoA(1-122), proPpiA(1-125), proAmy1(1-132) για την μεταθετάση.

Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια με υπερεκφρασμένη τη SecYEG, SecAWT και το εκάστοτε υπόστρωμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 4⁰C. Στη συνέχεια τα δείγματα υπερφυγοκεντρήθηκαν και μόνο το υπόστρωμα που προσδέθηκε στη μεταθετάση των μεμβρανών μετρήθηκε.

2.2 Η μοριακή βάση των σημάτων στόχευσης του ώριμου τμήματος

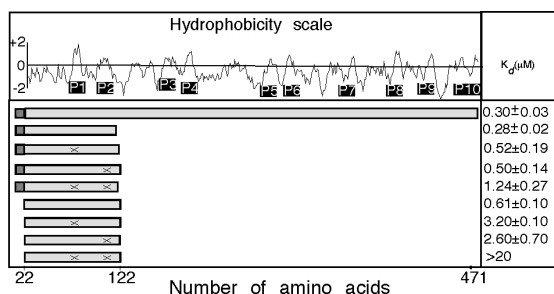
Για να βρούμε τη μοριακή βάση της στόχευσης κόψαμε περαιτέρω τα 100 αμινοξέα. Η συγγένεια του πεπτιδίου σήματος για την μεταθετάση είναι $\sim 3\mu\text{M}$ (Sardis et al, submitted) επομένως οτιδήποτε είναι περισσότερο από αυτό προκύπτει από την πρόσδεση του ώριμου τμήματος. Η συγγένεια του ώριμου τμήματος μειώνεται σταδιακά έως να μηδενιστεί για την proPhoA(1-40) (εικόνα 9). Μεγάλη μείωση της συγγένειας παρατηρούμε όταν αφαιρούνται τα αμινοξέα 82-122 και 78-62. Οι αλληλουχίες αυτές συμπίπτουν με δύο νησίδες υψηλής υδροφοβικότητας (εικόνα 9). Επομένως ~ 100 αμινοξέα είναι απαραίτητα για τη στόχευση.

Για να εξετάσουμε αν η υδροφοβικότητα είναι σημαντική για τη στόχευση τα αμινοξέα υψηλής υδροφοβικότητας που ανήκουν στη νησίδα 1 μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες ή θρεονίνες (proPhoA/-P1). Τα υδρόφοβα της νησίδας 2 μεταλλάχθηκαν σε αλανίνες δημιουργώντας την (proPhoA/-P2) και όταν μεταλλάχθηκαν και τα 2 μαζί η πρωτεΐνη ονομάζεται (proPhoA/-P1,-P2). Οι μεταλλάξεις των νησίδων πραγματοποιήθηκαν σε ολόκληρη την αλκαλική φωσφατάση καθώς και στην κομμένη εκδοχή της proPhoA(1-122). Στην proPhoA μόνο η διπλή μετάλλαξη μείωσε λίγο την συγγένεια στόχευσης (εικόνα 12). Αντίθετα όταν χρησιμοποιήσαμε την proPhoA(1-122) φάνηκε ότι οι υδρόφοβες νησίδες είναι σημαντικές για τη στόχευση της προ-πρωτεΐνης ενώ απουσία πεπτιδίου σήματος και νησίδων η πρωτεΐνη παύει να στοχεύεται (PhoA/-P1-P2). Τουλάχιστον μια υδρόφοβη νησίδα είναι απαραίτητη για τη στόχευση του ώριμου τμήματος.



Εικόνα 9: Η συγγένεια των κομμένων παραγώγων της proPhoA (1-122, 1-82, 1-79, 1-62, 1-50, 1-40, 1-30) για την μεταθετάση.

Στο πάνω μέρος της εικόνας φαίνεται η υδροφοβικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και οι 10 υδρόφοβες νησίδες που δημιουργούνται. Στην proPhoA(1-122) έχουν απομείνει δύο νησίδες εκ των οποίων η δεύτερη έχει αφαιρεθεί στην αλληλουχία proPhoA(1-82) και η πρώτη στην proPhoA(1-62).



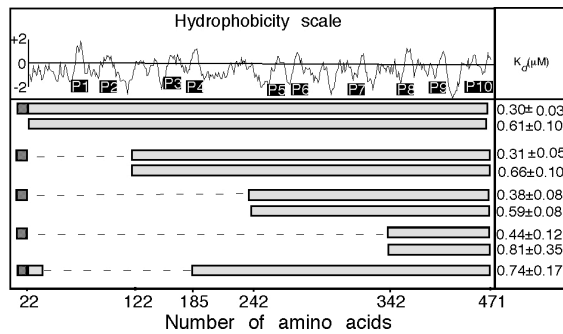
Εικόνα 10: Εξάλειψη των υδρόφοβων νησίδων μεταλλάσσοντας τα υδρόφοβα αμινοξέα σε θυμίνες ή αλανίνες και μέτρηση της συγγένειας για την μεταθετάση.

Οι πρωτεΐνες που φαίνονται στο σχήμα από πάνω προς τα κάτω είναι οι proPhoAWT, proPhoA(1-122)/-P1, proPhoA(1-122)/-P2, proPhoA(1-122)/-P1-P2, PhoA(23-122), PhoA(23-122)/-P1, PhoA(23-122)/-P2, PhoA(23-122)/-P1-P2

2.3 Η μοναδικότητα των σημάτων στόχευσης στις εκκριτικές πρωτεΐνες

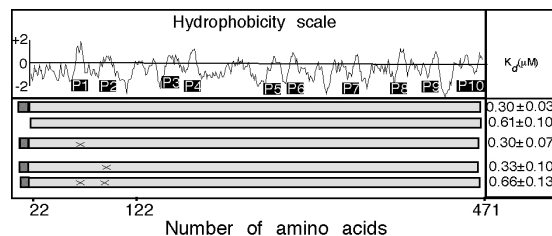
Η proPhoA έχει υδρόφοβες νησίδες σε όλο το μήκος της κατανεμημένες ως 2 ή 3 σε κάθε 100 αμινοξέα. Για να διαπιστώσουμε αν είναι σημαντική η υδροφοβικότητα ή η εν λόγω αμινοξική αλληλουχία αφαιρέσαμε τα 100 αμινοξέα μετά το πεπτίδιο σήμα.

Η συγγένεια της πρωτεΐνης για την μεταθετάση έμεινε αμείωτη και το ίδιο συνέβη όταν αφαιρέθηκαν τα επόμενα 100 και τα μεθεπόμενα 100 (εικόνα 11). Επομένως τα σήματα είναι πολλαπλά και ισοδύναμα.



Εικόνα 11: Σταδιακή αφαίρεση των 100, 200 και 300 αμινοξέων μετά το πεπτιδίο σήμα και μέτρηση της συγγένειας των πρωτεϊνών για τη μεταθετάση.

Οι πρωτεΐνες μετρήθηκαν με ή χωρίς πεπτιδίο σήμα. Επίσης μετρήθηκε η συγγένεια της proPhoA(Δ63-185) όπου αμέσως μετά το πεπτιδίο σήμα ακολουθούν 66 αμινοξέα χαμηλής υδροφοβικότητας.

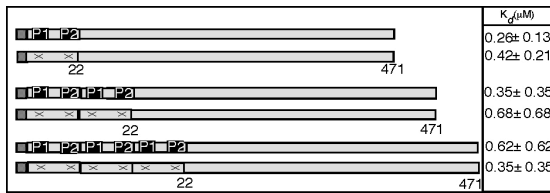


Εικόνα 12: Οι μεταλλάξεις των υδρόφοβων νησίδων στην proPhoAWT

Από πάνω προς τα κάτω οι πρωτεΐνες που φαίνονται είναι οι proPhoAWT, PhoAWT, proPhoA/-P1, proPhoA/-P2 και proPhoA/-P1-P2.

2.4 Η θέση των σημάτων στόχευσης σε σχέση με το πεπτιδίο σήμα

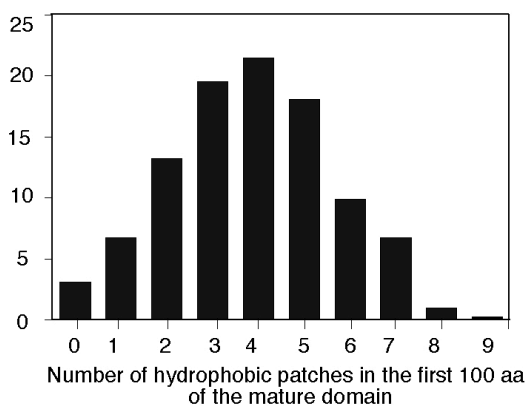
Σε κάθε περίπτωση η πρώτη υδρόφοβη νησίδα είναι εντός 100 αμινοξέων από το πεπτιδίο σήμα. Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η θέση αυτή έχει σημασία απομακρύνουμε την πρώτη νησίδα 100, 200 και 300 αμινοξέα μετά το πεπτιδίο σήμα παρεμβάλλοντας την αλληλουχία PhoA(23-122)/-P1-P2, που γνωρίζουμε ότι δεν έχει συγγένεια για τη μεταθετάση, από μια έως τρεις φορές. Σε κάθε περίπτωση χάθηκε η συνεισφορά από το πεπτιδίο σήμα στη συγγένεια (εικόνα 13). Επιπροσθέτως όταν μετρήθηκε η συγγένεια των υποστρωμάτων παρουσία της SecA(L8Q) που έχει απωλέσει τη συγγένειά της για το πεπτιδίο σήμα (Gouridis et al, 2009), η συγγένεια των παραγώγων αυτών της αλκαλικής φωσφατάσης παραμένει ίδια. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το ώριμο τμήμα εξαιτίας των πολλαπλών σημάτων βρίσκεται σε πλεονεκτική θέση έναντι του πεπτιδίου σήματος και προσδένεται πρώτο, έτσι προκύπτει η συγγένεια ίση με του ώριμου τμήματος.



Εικόνα 13: Η συγγένεια υποστρωμάτων για τη μεταθετάση όπου μεταξύ του πεπτιδίου σήματος και του ώριμου τμήματος της proPhoAWT παρεμβλήθηκε η αλληλουχία PhoA(23-122) ή PhoA(23-122)/-P1-P2 από μια έως τρεις φορές.

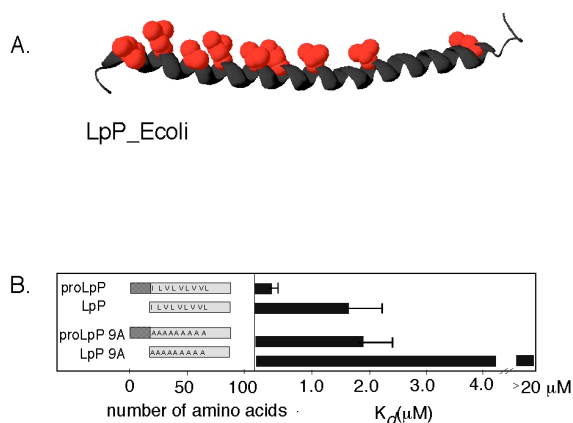
2.5 Η καθολικότητα των υδρόφοβων νησίδων ως σήματα στόχευσης

Οι υδρόφοβες νησίδες είναι απαραίτητες για τη στόχευση του ώριμου μέρους στην μεταθετάση, για το λόγο αυτό αναλύσαμε αν όλες οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν υδρόφοβες νησίδες στα 100 πρώτα αμινοξέα του ώριμου τμήματος. Το 98% των πρωτεϊνών έχει (εικόνα 16), αλλά το υπόλοιπο 2% όχι. Επομένως είτε στοχεύετε μέσω του πεπτιδίου σήματος είτε χρησιμοποιεί κάποιο άλλο σήμα για στόχευση. Η proLpP έχει 78 αμινοξέα που σχηματίζουν μια α έλικα και ανήκει στο 2%. Τα υδρόφοβα κατανέμονται έτσι ώστε να σχηματίζουν μια υδρόφοβη επιφάνεια αφού όλα βρίσκονται προς την ίδια πλευρά (εικόνα 17). Μεταλλάσσοντας τα υδρόφοβα σε αλανίνες η συγγένεια της πρωτεΐνης μειώθηκε και του ώριμου μέρους μηδενίστηκε. Επομένως και η proLpP χρησιμοποιεί υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις προκειμένου να στοχευθεί (εικόνα 17). Πέρα από τη γραμμική υδροφοβικότητα και η τρισδιάστατη είναι ικανή για να στοχεύσει μια πρωτεΐνη.



Εικόνα 14: Ανάλυση του ποσοστού των πρωτεϊνών που έχουν υδρόφοβες νησίδες.

Στο ραβδόγραμμα φαίνεται πόσες υδρόφοβες νησίδες (άξονας X) έχουν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες (άξονας Y) στα 100 πρώτα αμινοξέα του ώριμου τμήματος (Orfanoudaki et al, unpublished data).

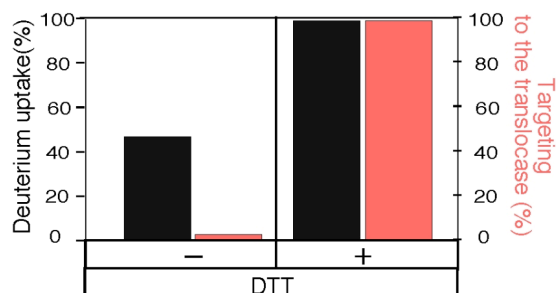


Εικόνα 15: Η λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και η συγγενείά της για τη μεταθετάση

A. Η λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (περιπλαστική πλευρά) Lpp_Ecoli. Με κόκκινο φαίνονται τα υδρόφοβα αμινοξέα που σχηματίζουν μια υδρόφοβη επιφάνεια **B.** Μέτρηση της συγγένειας για την μεταθετάση της αγρίου τύπου LpP με ή χωρίς πεπτίδιο σήμα και των μεταλλαγμένων παραγώγων της όπου τα 9 υδρόφοβα αμινοξέα έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνες.

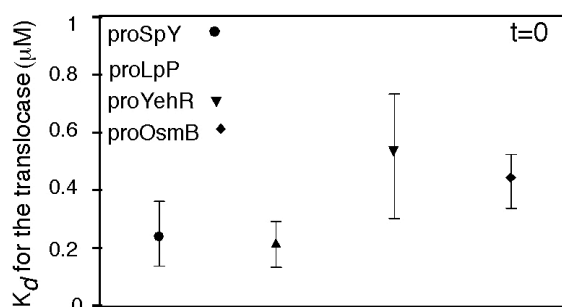
2.6 Η διαθεσιμότητα των υδρόφοβων νησίδων ανάλογα με την αναδίπλωση της πρωτεΐνης

Οι υδρόφοβες νησίδες για να είναι διαθέσιμες πρέπει να είναι εκτεθειμένες. Όταν η proPhoA είναι αναδιπλωμένη η ανταλλαγή υδρογόνου σε δευτέριο είναι μειωμένη (Papanastasiou et al, unpublished data). Όταν αποδιπλώνει με την προσθήκη αναγωγικού μέσου (DTT), γίνονται διαθέσιμα και τότε μόνο μπορεί να προσδεθεί στην μεταθετάση (εικόνα 16, κόκκινες μπάρες). Όλες οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν στοχεύονται όταν από το αποδιατακτικό μέσο στο οποίο βρίσκονται αποθηκευμένες, προστίθενται κατευθείαν στην αντίδραση που έχει τη μεταθετάση ($t=0$) (εικόνα 17)



Εικόνα 16: Μέτρηση ανταλλαγής υδρογόνου προς δευτέριο (μαύρες μπάρες) και στόχευση στη μεταθετάση (κόκκινες μπάρες) για την αλκαλική φωσφατάση.

Οι δύο τεχνικές πραγματοποιήθηκαν απουσία και παρουσία DTT.



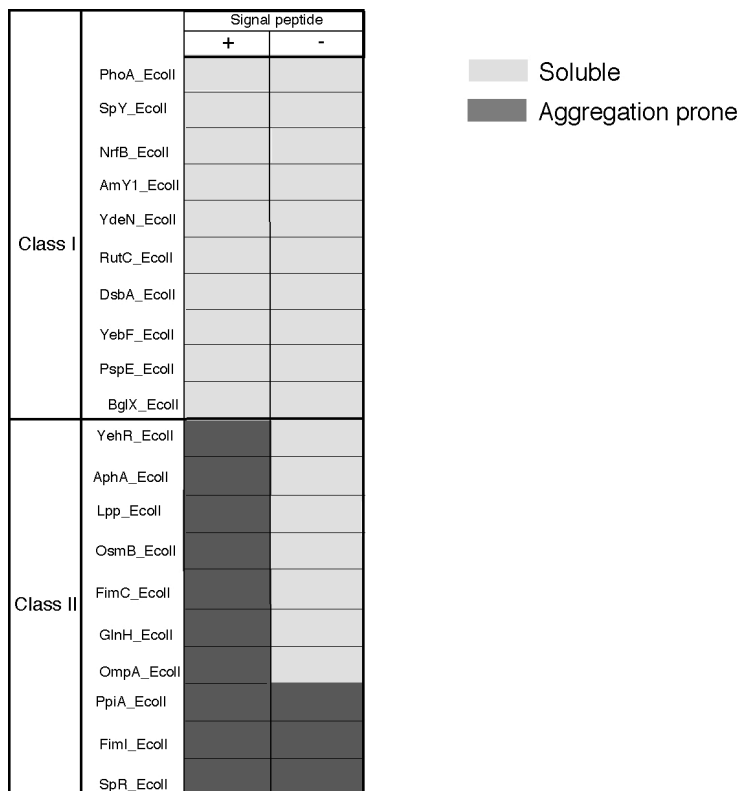
Εικόνα 17: Η συγγένεια (μM) των εκκρινόμενων πρωτεϊνών για την μεταθετάση σε $t=0$

που σημαίνει ότι η προ-πρωτεΐνη μεταφέρθηκε από διάλυμα 6M ουρία σε διάλυμα 0.2M ουρία όπου εμπεριείχε τη μεταθετάση, χωρίς να μεσολαβήσει κάποια ενδιάμεση επώαση.

2.7 Η σταθερότητα των εκκριτικών πρωτεϊνών στο υδατικό περιβάλλον

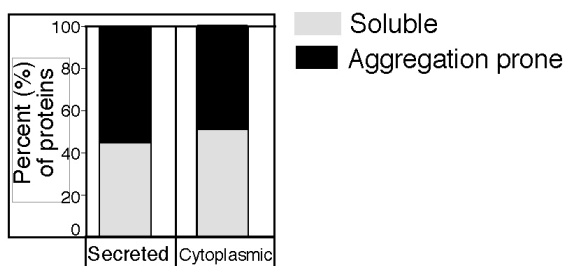
Σύμφωνα με την επικρατέστερη άποψη οι πρωτεΐνες σταθεροποιούνται σε υδατικό διάλυμα, όταν καταφέρουν να κρύψουν τα υδρόφοβα μέρη τους σχηματίζοντας πυρήνα και επομένως αναδιπλώνοντας. Δημιουργείται το ερώτημα πώς οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες καταφέρνουν να εκθέσουν τα υδρόφοβα μέρη τους στη μεταθετάση. Εξετάσαμε πως συμπεριφέρονται σε υδατικό διάλυμα οι εκκριτικές πρωτεΐνες και η σταθερότητά τους μετρήθηκε. Το 50% των προ-πρωτεϊνών παραμένουν σταθερές σε υδατικό διάλυμα (κλάση I). Το υπόλοιπο 50% κατακρίνεται με κάθε πρωτεΐνη να έχει διαφορετική κινητική για την κατακρίμηση (κλάση II). Όταν το πεπτιδίο σήμα αφαιρεθεί τότε η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνεται κατά 35% (εικόνα 18). Απουσία του πεπτιδίου σήματος το 25% του δείγματος κατακρημνίζεται. Αυτή η παρατήρηση στηρίζεται και από προηγούμενη μελέτη (Niwa et al, 2009) όπου παρόμοια πειράματα είχαν πραγματοποιηθεί για 3.173 πρωτεΐνες του *E.coli* ραδιενεργά συντεθειμένες και περίπου το 50% ήταν σταθερές σε υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια αναπτύξαμε έναν αλγόριθμο ο οποίος εκπαιδεύτηκε με τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών από το συγκεκριμένο άρθρο (Niwa et al, 2009) και χρησιμοποιήθηκε για να προβλέψει τη διαλυτότητα των 20 πρωτεϊνών που χρησιμοποιήσαμε. Η πρόβλεψη ήταν σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα 89 %. Ο αλγόριθμος στη συνέχεια

χρησιμοποιήθηκε για να προβλέψει τη σταθερότητα όλων των εκκρινόμενων και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα ήταν ότι το ~50% παραμένει σταθερό και από τις δύο κατηγορίες πρωτεϊνών (εικόνα 19).



Εικόνα 18: Μέτρηση της ικανότητας 20 διαφορετικών εκκριτικών υποστρωμάτων να παραμένουν σταθερά σε υδατικό διάλυμα

(50mM Tris, 50 mM NaCl). Τα υποστρώματα αραιώνονται έτσι ώστε η συγκέντρωση της ουρίας να γίνει μικρότερη από 0.2 M στη συνέχεια φυγοκεντρούνται (20.000g, 1min) και μετρίεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που παρέμεινε στο υπερκείμενο.

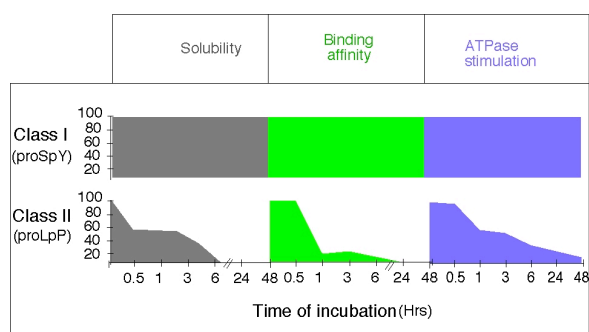


Εικόνα 19: Ανάλυση της σταθερότητας των εκκρινόμενων και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών

με βάση αλγόριθμο που αναπτύχθηκε από πειραματικά δεδομένα κατακρήμισης πρωτεϊνών από (Niwa et al, 2009).

2.8 Η αναδίπλωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες που παραμένουν διαλυτές διατηρούν την ικανότητά τους να προσδένονται στην μεταθετάση και να ενεργοποιούν πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης ATP για τουλάχιστον 48 ώρες (εικόνα 20). Οι πρωτεΐνες που έχουν την τάση να κάνουν συσσωματώματα φαίνεται να χάνουν την ικανότητα τους να προσδένονται και να ενεργοποιούν την υδρόλυση του ATP, το οποίο όμως προέρχεται από το ότι έχουν κατακρημνιστεί (εικόνα 20). Γνωρίζουμε ότι η κατάσταση στην οποία η πρωτεΐνη αναγνωρίζεται από την μεταθετάση είναι ενδιάμεση μεταξύ πλήρους αποδίπλωσης και πλήρους αναδίπλωσης, δηλαδή δεν διατηρεί κάποια στοιχεία δευτεροταγούς δομής και έχει μεγαλύτερη ακτίνα από την πλήρως αποδιπλωμένη (Sardis et al. Submitted).



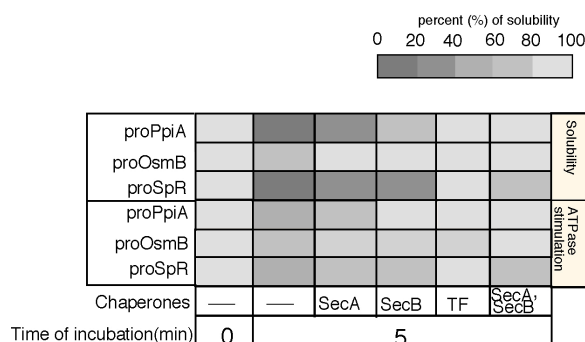
Εικόνα 20: Μέτρηση της διαλυτότητας, συγγένειας και ενεργοποίησης της ΑΤΡασης από τα εκκριτικά υποστρώματα για 48 ώρες

Το πρώτο γράφημα αντιπροσωπεύει τις πρωτεΐνες της κλάσης I όπου παραμένουν διαλυτές και το δεύτερο της κλάσης II που κατακρημνίζονται. Από την κλάση I δείχνεται ενδεικτικά η proSpY. Από την κλάση II ενδεικτικά δείχνεται η proLpP.

2.9 Η αλληλεπίδραση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με σαπερόνες

Προκειμένου να προσομοιώσουμε τι θα μπορούσε να συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα με τις πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται, ελέγξαμε αν οι πρωτεΐνες SecA, SecB και Trigger factor μπορούν να «σώσουν» τις εκκριτικές πρωτεΐνες από την κατακρήμνιση. Οι εκκριτικές πρωτεΐνες επώαστηκαν σε 0.2 M ουρία με την παρουσία καθεμιάς από τις σαπερόνες. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (20.000g, 1min) απομονώθηκε το διαλυτό τους μέρος και εξετάστηκε 1. η ποσότητά του (εικόνα 21) και 2. αν παραμένει ικανό για μετατόπιση (εικόνα 21) (translocation competent). Η SecA και οι δύο σαπερόνες βοηθούσαν τις πρωτεΐνες να μην

κατακρημνιστούν αλλά και να παραμείνουν ικανές για μετατόπιση (εικόνα 21). Επομένως στο κύτταρο οι εκκριτικές πρωτεΐνες έχουν τουλάχιστον 3 πρωτεΐνες που τις βοηθούν να αποφύγουν τα συσσωματώματα.

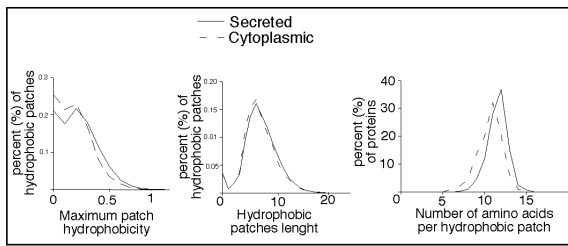


Εικόνα 21: Μέτρηση της φυσικής ποσότητας ασταθών υποστρωμάτων και της ικανότητας τους να ενεργοποιούν την ΑΤΡάση.

Η εκάστοτε εκκριτική πρωτεΐνη (0.4μM) επώαστηκε με τις πρωτεΐνες/σαπερόνες SecA (0.4μM), SecB(1.6 μM) και TF(0.8 μM) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση (20.000g) και είτε μετρήθηκε η φυσική ποσότητα της πρωτεΐνης που παρέμεινε διαλυτή είτε μετρήθηκε η ικανότητα του υποστρώματος να ενεργοποιεί την ΑΤΡάση της μεταθετάσης.

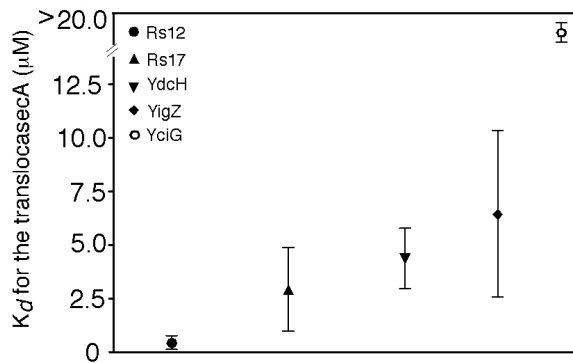
2.10 Η συμπεριφορά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα

Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες έχουν υδρόφοβες νησίδες παραπλήσιες με αυτές των εκκρινόμενων ως προς τον αριθμό, το μέγεθος και την υδροφοβικότητα (εικόνα 22). Πράγματι στοχεύονται στην μεταθετάση σε $t=0$ με την προϋπόθεση να έχουν τουλάχιστον μια υδρόφοβη νησίδα (εικόνα 23). Έτσι για την YciG που είναι ιδιαίτερα υδρόφιλη και δεν έχει υδρόφοβες νησίδες, δεν μετρήθηκε συγγένεια για την μεταθετάση. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες παραμένουν σταθερές σε υδατικό διάλυμα οστώσο χάνουν τη συγγενεία τους για την μεταθετάση σε χρόνο $t>0$. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι αρχίζουν να αποκτούν τη δευτεροταγή τους δομή σύντομα όταν βρεθούν σε υδατικό διάλυμα.



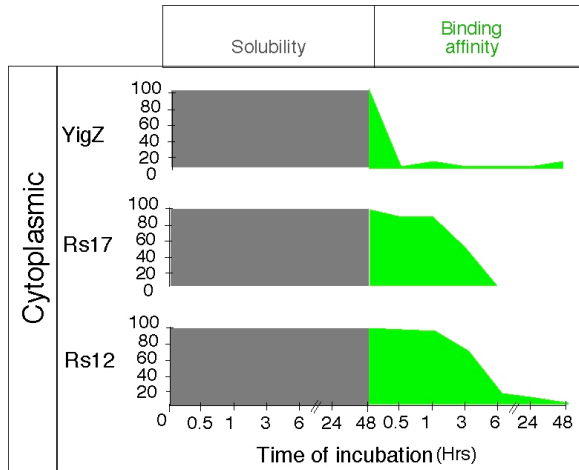
Εικόνα 22: Οι υδρόφοβες νησίδες των κυτταροπλασματικών και των εκκρινόμενων πρωτεϊνών

συγκρινόμενες ως προς 1. Το μήκος των υδρόφοβων αμινοξέων 2.τον αριθμό και 3. Τη συνολική υδοφοβικότητα



Εικόνα 23: Οι υδρόφοβες νησίδες των κυτταροπλασματικών και των εκκρινόμενων πρωτεϊνών

Η συγγένεια (μM) των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών για την μεταθετάση σε $t=0$ (ο χρόνος αναφέρεται στη διάρκεια που μεσολαβεί από τη στιγμή που εξέρχεται από ουρία έως και να συναντήσει την μεταθετάση)

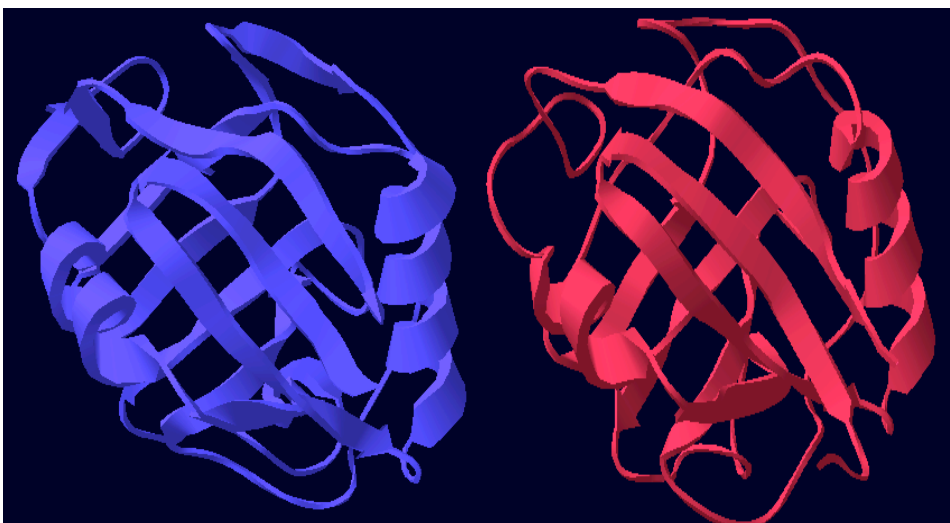


Εικόνα 24: Μέτρηση της κατακρήμνισης (γκρι μπάρες) και της συγγένειας των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (πράσινες μπάρες) για την μεταθετάση.

Η μέτρηση έγινε για το χρονικό διάστημα 0-48 ώρες από την απομάκρυνση από την ουρία(6M).

2.11 Σύγκριση της σταθερότητας της κυτταροπλασματικής PpiB και της ομόλογης της εκκρινόμενης PpiA

Η proPpiA και η PpiB είναι πρωτεΐνες του *E.coli* όπου έχουν την ίδια ενζυμική ενεργότητα (ισομεράσες της προλίνης) (Hayano et al, 1991), μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία, παραπλήσιες δομές (εικόνα 25) και η διαφορά τους είναι ότι η μια βρίσκεται στο περίπλασμα και η άλλη στο κυτταρόπλασμα. Προκειμένου να συγκρίνουμε την εξελικτική αλλαγή των δύο πρωτεϊνών προσθέσαμε το πεπτίδιο σήμα της proPpiA στην PpiB, δημιουργώντας την proPpiB και ελέγξαμε την ικανότητα της πρωτεΐνης να παραμένει στο διάλυμα. Ενώ η proPpiB παραμένει στο διάλυμα η proPpiA κατακρημνίζεται σε ποσοστό ~80 % από το πρώτο λεπτό.



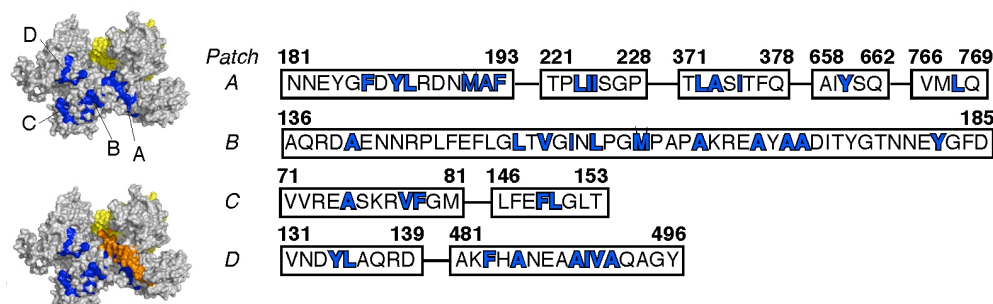
Εικόνα 25: Η δομή της Prib_Ecoli (μπλε χρώμα, 2NUL-PDB code) και της Prib_A_Ecoli (κόκκινο χρώμα, 1CLH-PDB code)

Κεφάλαιο 3-Αποτελέσματα

Η περιοχή πρόσδεσης της προ-πρωτεΐνης στη SecA

3.1 Οι υδρόφοβες νησίδες στην κυτταροπλασματική πλευρά της SecA και η σημασία μιας εξ'αυτών στην στόχευση των υποστρωμάτων

Η περιοχή της SecA όπου το PBD (preprotein binding domain) συναντάει το NBD (nucleotide binding domain) ονομάζεται α8-stem (α8 έλικα-μίσχος). Πάνω από την περιοχή αυτή περνάει η καρβοξυτελική ουρά της SecA (Hunt et al, 2002) ενώ δίπλα σε αυτήν βρίσκεται η περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου σήματος (Gelis et al, 2007). Προκειμένου να εξετάσουμε αν η καρβοξυτελική ουρά πρέπει να φύγει από τη θέση της προκειμένου να είναι λειτουργική η SecA ή όχι την ακινητοποιήσαμε με ομοιοπολική διασύνδεση (εικόνα 26). Δημιουργήσαμε τις πρωτεΐνες (N180C/M854C, M191C/R850C). Οι παραπάνω πρωτεΐνες προσδένουν το υπόστρωμα με πολύ χαμηλότερη συγγένεια από ότι η αγρίου τύπου πρωτεΐνη και επίσης όσο παραμένουν οξειδωμένες δεν μπορούν να μετατοπίσουν υποστρώματα. Επομένως η περιοχή αυτή αποτελεί μια από τις πιθανές θέσεις που πρωτο-προσδένεται το υπόστρωμα.



Εικόνα 26: Κυτταροπλασματική απεικόνιση της SecA και των υδρόφοβων νησίδων της

(Από Sardis et al, unpublished data). Στο αριστερό μέρος της εικόνας φαίνονται οι 4 υδρόφοβες νησίδες (μπλε χρώμα) που σχηματίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της SecA στον τρισδιάστατο χώρο. Με κίτρινο χρώμα φαίνεται η περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου σήματος και με πορτοκαλί χρώμα (κάτω εικόνα) το σημείο στο οποίο προσδένεται η καρβοξυτελική ουρά της SecA. Στο δεξί μέρος της εικόνας φαίνονται οι αμινοξικές αλληλουχίες που απαρτίζουν τις νησίδες. Με μπλε χρώμα φαίνονται τα υδρόφοβα αμινοξέα.

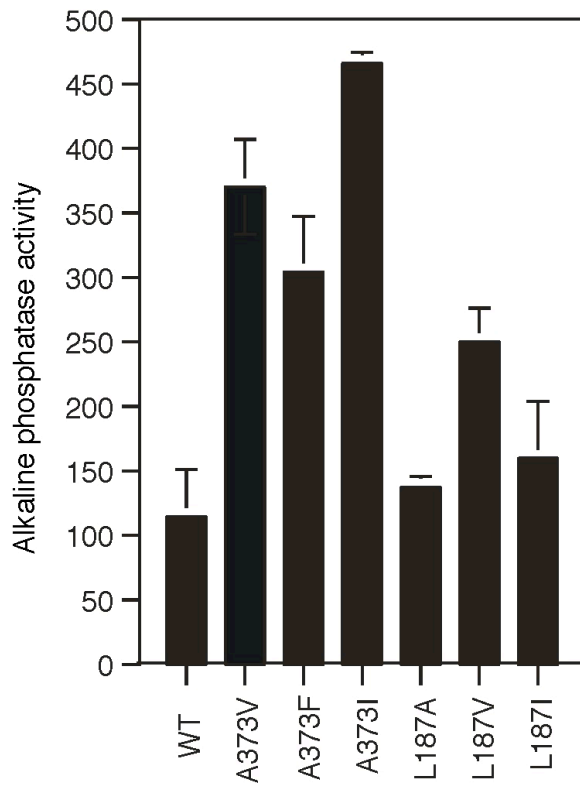
| | SecYEG-SecA* | | |
|---------|--------------|--------------|--------------|
| | WT* | N180C/M854C* | M191C/R850C* |
| proPhoA | 0.3±0.03 | 2.6±0.5 | 3.5±0.7 |
| PhoA | 0.6±0.1 | 6.4±1.7 | 14.6±5.8 |

Πίνακας 3 Μέτρηση της συγγένειας των proPhoA και PhoA για τη μεταθετάση που έχει σχηματιστεί με μια από τις SecA (WT, N180C/M854C, M191C/R850C).

Τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια είχαν υπερεκφρασμένη την SecYEG.

3.2 Η κινητικότητα της περιοχής A8-Stem και η σημασία της για τη λειτουργία της SecA

Η σωστή απόσταση μεταξύ της α8 έλικας και του μίσχου είναι κρίσιμη για τη σωστή λειτουργία της SecA. Όταν μειωθεί η μεταξύ τους απόσταση με μεταλλάξεις των αμινοξέων στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης τους, τότε η SecA αποκτά *prl* φαινότυπο. Η απόσταση μειώθηκε εξαιτίας της μεταλλαγής αμινοξέων σε πιο ογκώδη. Ο *prl* φαινότυπος που σημαίνει ότι έχει χαθεί το σωστό σήμα από το πεπτιδιο σήμα για ενεργοποίηση και η SecA βρίσκεται ήδη ενεργοποιημένη από την επαφή της με την SecYEG της μεμβράνης (εικόνα 27). Προφανώς η συγκεκριμένη περιοχή συμμετέχει στη διάδοση του σήματος της ενεργοποίησης του ολοενζύμου που έρχεται από το πεπτιδιο σήμα.



Εικόνα 27: *In vivo* μέτρηση της έκκρισης της αλκαλικής φωσφατάσης παρουσία των μεταλλαγμάτων των SecA(A373) και SecA(L187).

Κεφάλαιο 4- Αποτελέσματα

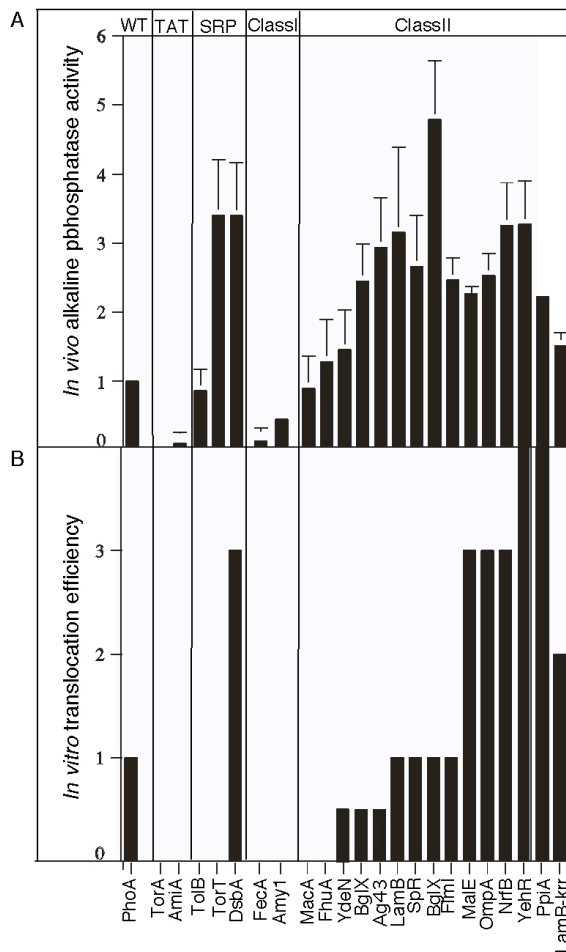
Η σημασία του πεπτιδίου σήματος στη στόχευση και στην έκκριση

4.1 Αντικατάσταση του πεπτιδίου σήματος της αλκαλικής φωσφατάσης με άλλων πρωτεϊνών του *E. coli*

Προκειμένου να κατανοήσουμε πώς το πεπτίδιο σήμα επηρεάζει τη στόχευση και την έκκριση επιλέξαμε 23 πεπτίδια σήματα πρωτεϊνών του *Escherichia coli* (πίνακας 4). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία 18 από αυτά είναι SecA εξαρτώμενα, τρία SRP και δύο TAT. Τα πεπτίδια σήματα προστέθηκαν μπροστά από το ώριμο μέρος της PhoA δημιουργώντας τις υβριδικές πρωτεΐνες X(sp)PhoA. Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των πρωτεϊνών να εκκρίνονται *in vivo*. Επειδή όλες οι πρωτεΐνες είναι παράγωγα της αλκαλικής φωσφατάσης έχουν ενζυμική ενεργότητα, με τον τρόπο αυτό μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και να συγκριθεί η ποσότητά τους που εκκρίνεται στο περίπλασμα. Οι πρωτεΐνες με TAT πεπτίδιο είχαν μηδενική έως ελάχιστη έκκριση. Οι πρωτεΐνες με SRP πεπτίδιο σήμα εκκρίνονται το ίδιο ή και καλύτερα από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Δύο από τις υπόλοιπες δεν εκκρίνονται σχεδόν καθόλου (κλάση I) και οι υπόλοιπες εκκρίνονται το ίδιο ή περισσότερο από την αγρίου τύπου πρωτεΐνη (κλάση II) (εικόνα 28). Οι παραπάνω κλάσεις διαφοροποιούνται λίγο *in vitro*. Οι βασικές αιτίες διαφοροποίησης θα μπορούσαν να είναι ότι 1) *in vitro* δεν υπάρχουν σαπερόνες και 2) ο βαθμός αναδίπλωσης της προ-πρωτεΐνης όταν συναντά την μεταθετάση, μπορεί να είναι διαφορετικός *in vitro* και *in vivo* και είναι γνωστό πως η αναδίπλωση αποτρέπει την έκκριση.

Πίνακας 4 : Τα πεπτιδια σήματα μπροστά από το ώριμο μέρος της αλκαλικής φωσφατάσης. Στον πίνακα φαίνεται το μήκος τους καθώς και ο διαχωρισμός του αμινοτελικού, υδρόφοβου και καρβοξυτελικού άκρου τους .

| | Protein name | Signal peptide | | | length(aa) |
|---------|--------------|--------------------------------------|----------------------|-------------|------------|
| | | N' terminus | Hydrophobic core | C' terminus | |
| TAT | PhoA | WKQST | LALALLLELE | TPVTKA | 21 |
| | TORa | MININDLFOASRRR | FLAQIQGLTYAGMLGPSLLT | PPRAT A | 39 |
| | AMIA | NSTFKPLKTLTSRRQVLK | AGLAALTLQGM | SOAIA | 34 |
| SRP | TOLB(S) | MKGALR | VAFSFLILWA | SVLHA | 21 |
| | TORT(S) | NR | VLLFLLSLFML | PAFS | 18 |
| | DSBA(S) | MKKIW | LALAGLVAF | SASA | 19 |
| Class I | FECA | MTPLRVRFKTTP LVNTR | LSLLPLAGL | SFSafa | 33 |
| | AMY1 | MK | LAACFLTLPGF | AVA | 17 |
| | MACA | MKKRKTVKKR | YVIALVIVAGLITLW | RILNA | 31 |
| | YDEN | MKSALKKSVVSTIS | LILASGMAEFA | AHA | 34 |
| | FHUA | MARSKTAQPKHSLRK | JAVVAVTAVSGMSVY | AQA | 33 |
| | ECPD | MFFNTKHHT | ALCEVTCMAE | SSSSIA | 25 |
| | AG43 | MKPHLNYCYRLVWV HMTGAFVASELAPARGKR | GGVAVALSLAV | TSLPULA | 52 |
| | LAMB | MMITLFRK | LPLAVAVAGVM | SAQAMA | 23 |
| | LAMB-KFR | MMITLFRRK | LPLAVAVAGVM | SAQAMA | 28 |
| | Class II | SPR | MVKSQPIRLYLIR | GIPAVAVI | LSA |
| BGLX | | MKWLCS | VGIASLAL | QPALA | 20 |
| FIMI | | MKRRK | LFLASLPMF | ALA | 19 |
| MALE | | MKIKTGAR | ILALSALTMME | SASALA | 26 |
| OMPA | | MKKT | AIAIVALAGFA | TVQAQ | 21 |
| NRFB | | MSVLRB | LLTAGVLASGLLWSLNGI | TATPAQAQ | 32 |
| YEHR | | MKAFNK | LPSLVASVLF | SLAG | 22 |
| PPIA | | MEKST | LAAMAAVFALSAL | SPAAMA | 24 |



Εικόνα 28: *In vivo* και *in vitro* έκκριση των υβριδικών πρωτεϊνών X(sp)PhoA

που έχουν το ώριμο τμήμα της αλκαλικής φωσφατάσης και πεπτίδια σήματα από διαφορετικές πρωτεΐνες του *E.coli* που περιγράφονται στον πίνακα 4. *In vivo* έκκριση: Κύτταρα BL21.19 μετασχηματισμένα με τα γονίδια που εκφράζουν τις υβριδικές πρωτεΐνες μεγάλωσαν μέχρι OD:0.6 και στη συνέχεια μετρήθηκε η αλκαλική φωσφατάση που εκκρίθηκε στο περίπλασμα. Β. *In vitro* έκκριση; χρησιμοποιήθηκαν ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια με υπερεκφρασμένη τη SecYEG, SecA, ATP και υπόστρωμα η αντίδραση επώαστηκε στους 37°C για 10 λεπτά.

4.2 Μέτρηση της συγγένειας των υβριδικών πρωτεϊνών για την μεταθετάση

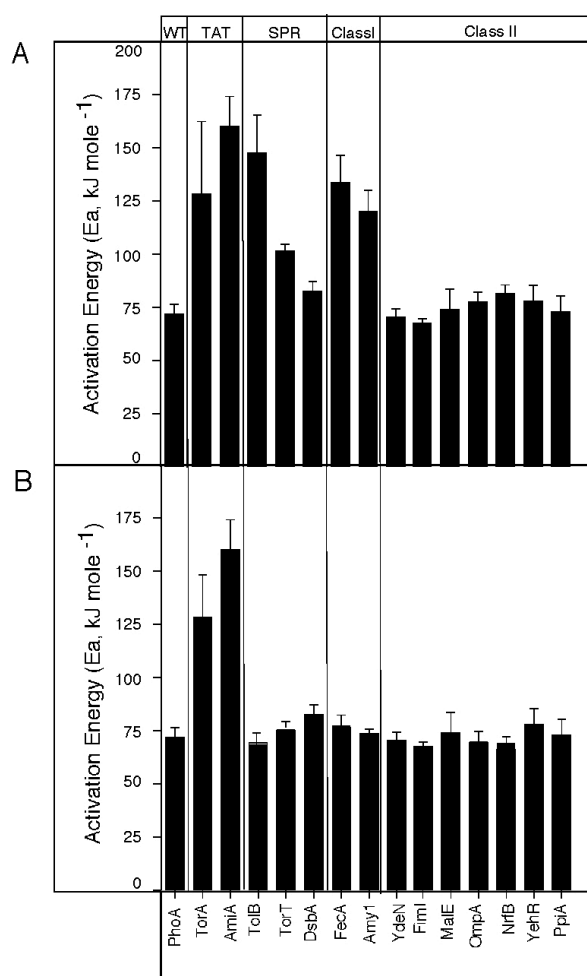
Στα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι μια εκκριτική πρωτεΐνη με λειτουργικά πεπτίδια σήματα δεν εκκρίνεται. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι το σωστό ταίριασμα μεταξύ ώριμου μέρους και πεπτιδίου σήματος είναι απαραίτητο. Προσπαθώντας να κατανοήσουμε τη μοριακή βάση της ασυμβατότητας, αρχικά μετρήσαμε τη συγγένεια των υβριδικών πρωτεϊνών για τη μεταθετάση. Το αποτέλεσμα ήταν ότι όλες οι πρωτεΐνες στοχεύονται με μικρές αλλαγές στη συγγένεια όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.

| | Protein | Affinity(μM) |
|----------|---------|--------------|
| TAT | PhoA | 0.3 ± 0.03 |
| | TorA | 1.7 ± 0.5 |
| | AmiA | 1 ± 0.45 |
| SRP | TolB | 0.49 ± 0.1 |
| | DsbA | 0.5 ± 0.15 |
| Class I | FecA | 0.5 ± 0.18 |
| | Amy1 | 0.8 ± 0.26 |
| Class II | YdeN | 0.6 ± 0.19 |
| | FimI | 0.65 ± 0.2 |
| | NrfB | 1 ± 0.33 |
| | YehR | 0.05 ± 0.01 |
| | PpiA | 0.8 ± 0.35 |

Πίνακας 5: Η συγγένεια των πρωτεϊνών X(sp)PhoA για τη μεταθετάση

4.3 Μέτρηση της ενέργειας ενεργοποίησης της μεταθετάσης παρουσία των προ-πρωτεϊνών ή του πεπτιδίου σήματος

Στη συνέχεια μετρήσαμε την ενέργεια ενεργοποίησης της μεταθετάσης παρουσία των υβριδικών πρωτεϊνών. Όλες οι πρωτεΐνες μπορούσαν να κατεβάσουν την ενέργεια ενεργοποίησης του ολοενζύμου εκτός από αυτές που δεν εκκρίνονται (εικόνα 29A). Η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης έρχεται από το πεπτιδίο σήμα, για το λόγο αυτό τα πεπτιδία συντέθηκαν χημικά και προστέθηκαν μόνο αυτά αντί για ολόκληρη την πρωτεΐνη (Εικόνα 29B). Στην περίπτωση αυτή όλα τα πεπτιδία σήματα μπορούσαν να κατεβάσουν την ενέργεια ενεργοποίησης εκτός από τα TAT. Επομένως το κακό ταίριασμα μεταξύ του ώριμου τμήματος και του πεπτιδίου σήματος εμποδίζει τη μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης.



Εικόνα 29: Μέτρηση της ενέργειας ενεργοποίησης της μεταθετάσης παρουσία . A. Ολόκληρης της προ-πρωτεΐνης B. Του πεπτιδίου σήματος μόνο

Κεφάλαιο 5-Συζήτηση

Το *E.coli* κύτταρο έχει συνολικά ~4500 και εκκρίνει μετά-μεταφραστικά ~500 (Orfanoudaki et al, submitted). Αυτό σημαίνει ότι 1) Πρέπει να τις στοχεύσει στη μεταθετάση και 2) Να τις κρατήσει αποδιπλωμένες έτσι ώστε να διέλθουν από το κανάλι (SecYEG), το οποίο μπορούν να διαπεράσουν ταυτόχρονα μέχρι δύο α έλικες (Bonardi et al, 2011). Από τότε που ανακαλύφθηκε το πεπτίδιο σήμα ο ρόλος που του επιδόθηκε ήταν ότι στοχεύει την προ-πρωτεΐνη στη μεταθετάση. Επιπλέον επειδή η μελέτη της έκκρισης γινόταν με προ-πρωτεΐνη μοντέλο την proOmpA, που ενθέεται στην εξωτερική μεμβράνη και είναι ιδιαίτερα ασταθής, είχε επικρατήσει η άποψη ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες χρειάζονται τη σαπερόνη SecB για να διατηρηθούν σταθερές και για να στοχευθούν στη μεμβράνη. Με αφορμή το ότι 1)το ώριμο τμήμα των προ-πρωτεϊνών έχει σήματα στόχευσης (Gouridis et al, 2009) 2)τα υποστρώματα της SecB είναι όχι παραπάνω από 20 (Baars et al, 2006) και 3)η SecB δεν είναι απαραίτητη για τη ζωή, ξεκινήσαμε να ψάχνουμε ποιος είναι ο κώδικας της στόχευσης στην μεταθετάση. Περίπου 100 αμινοξέα είναι αναγκαία και ικανά για τη στόχευση. Ο κανόνας των 100 αμινοξέων παρατηρήθηκε και στις 3 πρωτεΐνες που εξετάσαμε και θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει τη μεγάλη πιθανότητα μια πρωτεΐνη να έχει τουλάχιστον 2 υδρόφοβες νησίδες σε αυτό το μήκος. Με κατάτμηση των 100 αμινοξέων βρήκαμε ότι τα σήματα στόχευσης είναι ένα πολύ κοινό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών, οι υδρόφοβες νησίδες. Συνάδει η παρατήρηση αυτή με την ως τώρα γνωστή βιολογία της μετατόπισης των πρωτεϊνών; Μια πρωτεΐνη –η SecA- έχει να αναγνωρίσει περισσότερα από 500 διαφορετικά υποστρώματα τα οποία έχουν διαφορετικές λειτουργίες δεν μοιράζονται συντηρημένες αλληλουχίες επομένως τα σήματα στόχευσης δεν θα περιμέναμε να είναι πιο «εξειδικευμένες» αλληλουχίες.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι τα σήματα στόχευσης βρίσκονται σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης και είναι ισοδύναμα. Η παρατήρηση εγείρει το ερώτημα πως το υπόστρωμα βρίσκει τελικά τον προσανατολισμό του και μετατοπίζεται από το αμινοτελικό άκρο προς το καρβοξυτελικό.

Οι υδρόφοβες νησίδες είναι ισοδύναμες μόνο όταν το πεπτίδιο σήμα απουσιάζει. Όταν το πεπτίδιο σήμα τοποθετηθεί στη θέση δέσμευσης του τότε οι πρώτες υδρόφοβες νησίδες ευνοούνται για πρόσδεση έναντι όλων των υπολοίπων. Είναι πιθανό κατά τη διάρκεια της στόχευσης το υπόστρωμα να δοκιμάζει διαφορετικούς

πιθανούς συνδυασμούς και τελικά να βρίσκει την τελική του θέση όταν το πεπτίδιο σήμα προσδεθεί στη θέση του. Τελικά η ελευθερία κινήσεων μειώνεται. Με τον τρόπο αυτό αν και θεωρητικά είναι όλα ισοδύναμα, τα δύο πρώτα ευνοούνται.

Τι συμβαίνει στο υδατικό διάλυμα; Πώς τα υδρόφοβα σήματα παρουσιάζονται στην μεταθετάση; Είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες προκειμένου να μην αποικοδομηθούν από τις πρωτεάσες του κυττάρου πρέπει να κρύψουν τα υδρόφοβα μέρη τους. Οι εκκριτικές πρωτεΐνες σε υδατικό διάλυμα χωρίς αποδιατακτικό παράγοντα, παραμένουν χωρίς να σχηματίζουν δευτεροταγή δομή σε μια πιο συμπαγή δομή από την πλήρως αποδιπλωμένη. Επομένως θα μπορούσαμε να σκεφτούμε ότι βρίσκονται σε μια δομή που είναι αρκετά ευέλικτη και καταφέρνει να κρύβει τα υδρόφοβά της έτσι ώστε να μη γίνονται αντιληπτά από τις πρωτεάσες αλλά ταυτόχρονα τα εμφανίζει για αρκετό χρονικό διάστημα έτσι ώστε να προσδέεται στην μεταθετάση. Τις προ-πρωτεΐνες αυτές τις ονομάζουμε εγγενώς αποδιπλωμένες. Μπορούν όλες οι εκκριτικές πρωτεΐνες να μένουν στην κατάσταση αυτή; Από τις εκκριτικές πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν το 50% μπορεί να παραμείνει εγγενώς αποδιπλωμένο, το υπόλοιπο 50% κατακρημνίζεται και στις μισές περιπτώσεις αιτία της κατακρήμνισης είναι το πεπτίδιο σήμα. Ενώ το ώριμο μέρος του 75% των εκκρινόμενων πρωτεϊνών παραμένει σταθερό και εγγενώς αποδιπλωμένο το 25% κατακρημνίζεται. Επομένως το πεπτίδιο σήμα φαίνεται να λειτουργεί σαν ενισχυτής της αστάθειας πιθανόν λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας του.

Από το παράδειγμα των ομόλογων πρωτεϊνών που έχουν ίδια δομή και λειτουργία αλλά η μεν βρίσκεται στο περίπλασμα και είναι ασταθής και η δε στο κυτταρόπλασμα και είναι σταθερή, μπορούμε να υποθέσουμε ότι στο κύτταρο υπάρχει εξελικτική πίεση οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες να διατηρούνται εγγενώς αποδιπλωμένες. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπως της PpiA μεταλλαγές για μην αναδιπλώνει γρήγορα την οδηγούν στην κατακρημνιση. Το 25% που το πρόβλημα έρχεται από το πεπτίδιο σήμα προφανώς δεν μπορεί να τοποθετήσει σωστά το ιδιαίτερα υδρόφοβο αυτό κομμάτι και ταυτόχρονα να παραμείνει εγγενώς αποδιπλωμένο. Το πεπτίδιο σήμα είναι απαραίτητο για την έκκριση της πρωτεΐνης η οποία αναγκάζεται να το φέρει ακόμα και αν κοστίζει στη σταθερότητά της.

Τι συμβαίνει με τις πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται; Οι πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται έχουν τουλάχιστον τρεις επιλογές άλλων πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να τις «σώσουν». Οι 2 είναι σαπερόνες (SecB και TF) η τρίτη είναι η

SecA . Η SecA αν και λιγότερο αποτελεσματική στην «διάσωση» των πρωτεϊνών είναι και η μόνη απαραίτητη για τη ζωή πρωτεΐνη (μαζί με το SecYEG) στην μετά-μεταφραστική έκκριση.

Οι πρωτεΐνες αυτές εκτός από το ότι σώζουν την φυσική ποσότητα των πρωτεϊνών, τις διατηρούν και ικανές για μετατόπιση. Ακόμα και ο TF για τον οποίο έχει προταθεί ότι μια από τις λειτουργίες του είναι να ενισχύει την αναδίπλωση, διατηρεί τις εκκριτικές πρωτεΐνες σε αποδιπλωμένη κατάσταση και επομένως ικανές για μετατόπιση. Το εκκριτικό σύστημα έχει πολλαπλές επιλογές για να διασφαλίσει ότι και οι ασταθείς πρωτεΐνες θα εκκριθούν. Με τον τρόπο αυτό αντισταθμίζει την αβεβαιότητα που εισάγει το πεπτιδίο σήμα.

Τι συμβαίνει με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες; Προσδένονται και αυτές στην μεταθετάση ή έχουν κάποιο τρόπο να ξεγλιστρούν; Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσδένονται στην μεταθετάση αν έχουν υδρόφοβες νησίδες. Μετά από λίγες ώρες χάνουν την ικανότητά τους να προσδένονται πιθανόν λόγω του ότι αναδιπλώνουν. Δυνητικά αν μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη είχε αργή κινητική αναδίπλωσης θα προσδενόταν στην μεταθετάση. Επίσης υπάρχει και η πιθανότητα ο διαχωρισμός να γίνεται σε επίπεδο σαπερονών και ο TF που είναι η πρώτη σαπερόνη που έρχεται σε επαφή με τις νέο-εξερχόμενες πρωτεΐνες να μεταφέρει τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες σε σαπερόνες όπου προάγουν την αναδίπλωση όπως είναι οι DnaK/DnaJ και η Gro-EL/Gro-ES. Η γρήγορη κινητική αναδίπλωσης θα μπορούσε ίσως στο κύτταρο να αποτρέπει τις κυτταροπλασματικές από το να φτάνουν στην μεταθετάση.

Στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεταθετάσης, πάνω στη SecA, υπάρχουν υδρόφοβες νησίδες που έχειδειχθεί ότι επηρεάζουν τη στόχευση (Sardis et al, submitted). Μια από τις νησίδες αυτές σχηματίζεται στον τρισδιάστατο χώρο από το α8 –stem. Η νησίδα αυτή αν καλυφθεί από την καρβοξυτελική ουρά της SecA τότε η συγγένεια για τα υποστρώματα μειώνεται περίπου 10 φορές (Sardis et al, submitted). Το γεγονός ότι δεν εξαλείφεται σημαίνει ότι δεν είναι η μοναδική περιοχή στην οποία μπορεί να προσδεθεί το υπόστρωμα αλλά είναι σίγουρα μια από τις υπονήφιες περιοχές. Επομένως η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Προκειμένου να καταλάβουμε ποια είναι η συνεισφορά του πεπτιδίου σήματος ως σήμα στόχευσης για τις πρωτεΐνες αντικαταστήσαμε το πεπτιδίο σήμα της αλκαλικής φωσφατάσης με 30 διαφορετικά πεπτιδία σήματα. Η στόχευση των

πρωτεϊνών αυτών στην μεταθετάση δεν επηρεάζεται σημαντικά από την ύπαρξη ενός διαφορετικού πεπτιδίου σήματος που για την proPhoA που είναι 471 αμινοξέα είναι αναμενόμενο μιας και τα σήματα στόχευσης που έρχονται από το ώριμο μέρος είναι πολύ περισσότερα. Για μια μικρότερη πρωτεΐνη ενδεχομένως να επηρέαζε περισσότερο. Αν το ταίριασμα μεταξύ του πεπτιδίου σήματος και του ώριμου μέρους δεν είναι σωστό τότε η ενέργεια ενεργοποίησης του ολοενζύμου δεν κατεβαίνει και επομένως δεν γίνεται έκκριση. Αν το πεπτίδιο σήμα προστεθεί in trans τότε το πρόβλημα αυτό παρακάμπτεται . Επομένως η ομοιοπολική σύνδεση των δύο μερών δημιουργεί πρόβλημα στην έκκριση. Το πεπτίδιο σήμα και το ώριμο τμήμα φαίνεται να έχουν συνεξελιχθεί και το σωστό ταίριασμα τους ελέγχει αν θα πραγματοποιηθεί έκκριση καθώς και σε τι ποσότητες.

Κεφάλαιο 6- Υλικά και μέθοδοι

Οι περισσότερες τεχνικές που περιγράφονται παρακάτω βασίζονται στα εγχειρίδια:

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning, Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K., Current Protocols in Molecular Biology.

6.1 Μοριακές τεχνικές και τα γονίδια που δημιουργήθηκαν

Πίνακας 6: Όλα τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET22b.

Στο 3' τέλος του γονιδίου μετά την περιοριστική θέση, *XhoI*, υπάρχει η αλληλουχία που κωδικοποιεί 6 ιστιδίνες και το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης.

| Name | Forward primer | Reverse primer | template | Recipient | Restriction enzymes(5'-3') |
|---------|----------------|----------------|----------|-----------|----------------------------|
| proBglX | X732 | X733 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| BglX | X734 | X733 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proAphA | X735 | X736 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| AphA | X737 | X736 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proPpiA | X741 | X742 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| PpiA | X743 | X742 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proAmy1 | X744 | X745 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| Amy1 | X746 | X745 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proYdeN | X747 | X748 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| YdeN | X749 | X748 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proPspE | X753 | X754 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| PspE | X755 | X754 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proOsmB | X756 | X757 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| OsmB | X758 | X757 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| proFimC | X762 | X763 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |
| FimC | X764 | X763 | JM109 | pET22b | <i>NdeI-XhoI</i> |

| | | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|---------|---------------------|------------------|
| proDsbA | X765 | X766 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| DsbA | X767 | X766 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proSpR | X768 | X769 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| SpR | X770 | X769 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proYehR | X771 | X772 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| YehR | X773 | X772 | JM109 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proOmpA | X191 | X191 | BL21.19 | pET22b | NdeI- BamHI |
| OmpA | X191 | X1269 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proNrfB | X836 | X968 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| NrfB | X969 | X968 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proFimI | X830 | X972 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| FimI | X973 | X972 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proGlnH | X974 | X975 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| GlnH | X976 | X975 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proOsmB | X756 | X757 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| OsmB | X758 | X757 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proPhoAKL(Δ 23-249) | 1068 | X561 | BL21.19 | pET22b | HindIII- XhoI |
| proPhoAKL(Δ 63-185) | 1069 | X561 | BL21.19 | pET22b | HindIII- XhoI |
| proRutC | X1089 | X1090 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| RutC | X1091 | X1090 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)YigZ | X1094 | X1093 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| YigZ | X1092 | X1093 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)Ydch | X1112 | X1111 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| Ydch | X1110 | X1111 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)YciG | X1106 | X1105 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| YciG | X1104 | X1105 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)PurE | X1100 | X1099 | BL21.19 | PhoA(sp)/p | HindIII- |

| | | | | | |
|-----------------|-------|-------|---------|---------------------|------------------|
| | | | | ET22b | XhoI |
| PurE | X1098 | X1099 | BL21.19 | | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)CaN | X1103 | X1102 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| CaN | X1101 | X1102 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA(sp)CaiE | X1097 | X1096 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| CaiE | X1095 | X1096 | BL21.19 | | NdeI-XhoI |
| phoA(sp)Rs17 | X1127 | X1126 | BL21.19 | PhoA(sp)/p ET22b | HindIII- XhoI |
| Rs17 | X1125 | X1126 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| proSpY | X1128 | X1129 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| SpY | X1130 | X1129 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA (N250-471) | X1174 | X561 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PhoA (N350-471) | X1185 | X561 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PpiB | X850 | X851 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PpiA(sp)PpiB | X1255 | X851 | BL21.19 | PpiA/pET2 2b | HindIII- XhoI |
| proPpiA | X741 | X742 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| PpiA | X743 | X742 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| FimC(sp)PhoA | X762 | X819 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| FimI (sp)PhoA | X830 | X831 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| YdeN(sp)PhoA | X747 | X821 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| Amy1(sp)PhoA | X744 | X822 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| LamB(sp)PhoA | X454 | | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| FecA(sp)PhoA | X826 | X827 | BL21.19 | PhoA/pET2 | NdeI- |

| | | | | | |
|--------------|------|------|---------|-----------------|------------------|
| | | | | 2b | HindIII |
| MacA(sp)PhoA | X832 | X833 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| MalE(sp)PhoA | X834 | X835 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| FhuA(sp)PhoA | X828 | X829 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| NrfB(sp)PhoA | X836 | X837 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| NapA(sp)PhoA | X846 | X847 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| PpiA(sp)PhoA | X741 | X848 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| Ag43(sp)PhoA | X822 | X823 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| EcpD(sp)PhoA | X824 | X825 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| TorA(sp)PhoA | X840 | X841 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| EcpD(sp)PhoA | X824 | X825 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| TolB(sp)PhoA | X857 | X858 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| SfmC(sp)PhoA | X859 | X860 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| DsbA(sp)PhoA | X765 | X854 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| SpR(sp)PhoA | X768 | X839 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| AmiA(sp)PhoA | X842 | X843 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| TorT(sp)PhoA | X855 | X856 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |

| | | | | | |
|--------------|-------|-------|---------|-----------------|------------------|
| OmpA(sp)PhoA | X191 | X853 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| YehR(sp)PhoA | X771 | X838 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| Cueo(sp)PhoA | X844 | X845 | BL21.19 | PhoA/pET2 2b | NdeI- HindIII |
| SpR(C27A) | X1071 | X769 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| YehR(C23A) | X1072 | X772 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| LpP(C21A) | X1078 | X1082 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |
| OsmB(C24A) | X1077 | X757 | BL21.19 | pET22b | NdeI-XhoI |

Πίνακας 7: Τα γονίδια που μεταλλάχθηκαν

Τα γονίδια μεταλλάχθηκαν χρησιμοποιώντας εκκινιτές και DNA πολυμεράση (*Taq* polymerase, Thermo scientific) που αντιγράφουν ολόκληρο το πλασμίδιο σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τα μητρικά μόρια απομακρύνονται, με το περιοριστικό ένζυμο (*DpnI*) που κόβει το μεθυλιωμένο DNA. Στη συνέχεια με το προιον της αντίδρασης μετασχηματίζονται επιλεκτικά κύτταρα *E.coli* DH5α. Τα νέα κύτταρα έχουν το μεταλλαγμένο γονίδιο.

| Name | Forward primer | Reverse primer | template |
|-------------------|----------------|----------------|------------------------------|
| proSpR(C27A) | X1054 | X1055 | pET22b/ proSPR |
| proYehR(C23A) | X1052 | X1053 | pET22b/ proYehR |
| proLpP(C21A) | X1075 | X1076 | pET22b/ proLpP |
| proOsmB(C24A) | X1048 | X1049 | pET22b/ proOsmB |
| proLpP(C21A)/I27A | X1188 | X1189 | pET22b/ proLpP(C21A) |
| proLpP(C21A)/L30A | X1190 | X1191 | pET22b/ proLpP(C21A)/I27A |
| proLpP(C21A)/V34A | X1192 | X1193 | pET22b/proLpP(C21 |

| | | | |
|--|-------|-------|---|
| | | | A)/I27A/L30A |
| proLpP(C21A)/L37A | X1194 | X1195 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A |
| proLpP(C21A)/V41A | X1196 | X1197 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A/L37A |
| proLpP(C21A)/L44A | X1198 | X1199 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A/L37A/V41A |
| proLpP(C21A)/V48A | X1200 | X1201 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A/L37A/V41A/L44A |
| proLpP(C21A)/V55A | X1202 | X1203 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A/L37A/V41A/L44A/V48A |
| proLpP(C21A)/L69A | X1204 | X1205 | pET22b/proLpP(C21A)/I27A/L30A/V34A/L37A/V41A/L44A/V48A/V55A |
| SecA(L187I) | X640 | X641 | pET22b/SecAwt |
| SecA(L187V) | X638 | X639 | pET22b/SecAwt |
| SecA(A373I) | X636 | X637 | pET22b/SecAwt |
| SecA(A373F) | X634 | X635 | pET22b/SecAwt |
| proPhoA(⁶⁷ IIL ⁶⁹ / ⁶⁷ ATA ⁶⁹) | X1058 | X1059 | proPhoA/pET22b |
| proPhoA(⁶⁷ IIL ⁶⁹ / ⁶⁷ ATA ⁶⁹) / (⁷⁰ LI ⁷¹ / ⁷⁰ TA ⁷¹) | X1060 | X1061 | proPhoA(⁶⁷ IIL ⁶⁹ / ⁶⁷ ATA ⁶⁹) / pET22b |
| proPhoA(⁹³ FF ⁹⁴ / ⁹³ AA ⁹⁴) | X1062 | X1063 | proPhoA(⁶⁷ IILLI ⁷¹ / |

| | | | |
|--|-------|-------|--|
| | | | ⁶⁷ ΑΤΑΤΑ ⁷¹)/pET22b or proPhoA/pET22b |
| proPhoA(⁹³ FF ⁹⁴ / ⁹³ AA ⁹⁴)/ (¹⁰⁰ LPL ¹⁰² / ¹⁰⁰ APA ¹⁰²) | X1064 | X1065 | proPhoA(⁶⁷ ILLI ⁷¹ / ⁶⁷ ΑΤΑΤΑ ⁷¹ / ⁹³ FF ⁹⁴ / ⁹³ AA ⁹⁴)/pET22b or proPhoA(⁹³ FF ⁹⁴ / ⁹³ A A ⁹⁴) /pET22b |

6.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Διαλύουμε την ενδεδειγμένη ποσότητα αγαρόζης 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. Οι ζώνες του DNA οπτικοποιούνται με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

6.3 Εξαγωγή DNA από πήκτωμα αγαρόζης.

Για την απομόνωση πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο QIAEX II Agarose Gel Extracion, QIAGEN.

6.4 Παραγωγή δεκτικών κυττάρων: Μέθοδος RbCl κατάλληλα τροποποιημένη.

Εμβολιάζουμε 2.5 ml LB με μοναδική αποικία από στερεό θρεπτικό υλικό Psi-Broth (5g/L Bacto-yeast Extract, 20g/L Bacto tryptone, 5g/L Magnesium Sulfate pH=7.6) και επωάζουμε τα κύτταρα υπό ανάδευση, στην κατάλληλη θερμοκρασία, ολονύχτια. Στην συνέχεια εμβολιάζουμε 250 ml Psi-Broth με τα 2.5 ml της ολονύχτιας καλλιέργειας (1:100) και επωάζουμε τα κύτταρα μέχρι $O.D_{600} = 0.4 - 0.6$. Συλλέγουμε

τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 5 min στα 4500 rpm / 4°C. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 100 ml παγωμένου TFB1 (30mM CH₃CO₂K, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15%v/v Glycerol, pH=5.8 adjusted with diluted (0.01M acetic acid). Επωάζουμε τα κύτταρα για 5 min στον πάγο. Συλλέγουμε τα κύτταρα με φυγοκέντρηση για 5 min στα 4500 rpm / 4°C. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 10 ml παγωμένου TFB2 (10mM MPOS, 75mM CaCl₂, 10mM RbCl). 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.

6.5 Μετασχηματισμός επειδεκτικών κυττάρων.

Ψύχουμε στον πάγο τους αποστειρωμένους σωλήνες πολύ-προπυλενίου. Τοποθετούμε τα δεκτικά κύτταρα στο πάγο από τους -80°C μέχρι να ξεπαγώσουν. Μεταφέρουμε περίπου 100 μl δεκτικών κυττάρων στους αποστειρωμένους σωλήνες πολύ-προπυλενίου. Προσθέτουμε 2-10 ng DNA στα 100 μl δεκτικών κυττάρων . Τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο για μισή ώρα. Επωάζουμε τα κύτταρα για 60 min / 42 °C και αμέσως τα τοποθετούμε στον πάγο για 2 min. Προσθέτουμε 900 μl υγρού θρεπτικού LB και επωάζουμε για 60 min τα κύτταρα υπό ανάδευση. Επιστρώνουμε τα κύτταρα σε LB τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό και τα επωάζουμε για 16 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία

Βιοχημικές μέθοδοι.

6.6 Ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολύ-ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας πήκτωμα ακρυλαμίδης (38% acrylamide – 2% bis-acrylamide) και το ρυθμιστικό διάλυμα (3g/l Tris, 1g/L SDS pH 8 – 8.3 (Laemmli). Στο πήκτωμα φορτώνονται τα δείγματα αφού έχουν πρώτα διαλυθεί σε διάλυμα (300mM Tris-HCl pH=6.8, 10% w/v SDS, 50% v/v glycerol) και επωάζονται στους 100°C για 10 min.

6.7 Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie blue.

Τοποθετούμε το πήκτωμα αμέσως μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης σε βαφή Coomassie blue R250 (1g/L Coomassie blue R250, 40% v/v methanol, 10%v/v acetic acid) και επωάζουμε για 10 min με ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου.

Απομακρύνουμε την χρωστική με Destaining buffer (40% v/v methanol, 10% v/v acetic acid). Με αυτό τον τρόπο χρωματίζονται μόνο οι ζώνες που περιέχουν πρωτεΐνες (Compton & Jones).

6.8 Έκφραση και καθαρισμός της εκκριτικών πρωτεϊνών.

Οι pET22b πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν την proPhoA και τα παράγωγα της μετασηματίστηκαν σε κύτταρα *E.coli* BL21.19. Εμβολιάσαμε μια μεμονωμένη αποικία σε LB θρεπτικό που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/μl) η οποία μεγάλωσε ολονύκτια στους 30°C. Αραιώσαμε την ολονύχτια βακτηριακή καλλιέργεια πενήντα φορές σε φρέσκο LB θρεπτικό που περιέχει αμπικιλίνη (100μg/μl) και επώασαμε στους 30°C έως ότου η οπτική πυκνότητα $OD_{600nm} \approx 0.8$. Πραγματοποιήσαμε επαγωγή των πρωτεϊνών με IPTG (0.1mM) για 16 ώρες και στην συνέχεια συλλέξαμε τα βακτηριακά κύτταρα με φυγοκέντρηση (10.000xg; 4°C; 10min).

Ακολουθώντας τις συνθήκες έκφρασης που μόλις περιγράψαμε, απομονώνονται οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στα έγκλειστα σωμάτια, τα οποία στην συνέχεια απομονώθηκαν έτσι ώστε να καθαριστούν οι πρωτεΐνες με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας (Janknecht et al, 1991).

Συγκεκριμένα το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5% glycerol) με ανάδευση στους 4°C και προστέθηκε PMSF (2.5 mM) και DNase (50μg/μl). Στην συνέχεια τα κύτταρα διασπάστηκαν (πλάτος δόνησης 25-30 microns, το δείγμα ψυχόταν σε λουτρό ξυρού πάγου σε αιθανόλη έτσι ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται κάτω από τους 8°C) και τα έγκλειστα σωμάτια απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση (50.000xg; 4°C; 30min). Το υπερκείμενο φυλάχθηκε ενώ το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 8 M urea, 5% glycerol). Στο επαναδιαλυμένο ίζημα προστέθηκε PMSF (2.5mM) και φυγοκεντρήθηκε (50.000xg; 22°C; 30min). Το επαναδιαλυμένο σε ουρία ίζημα φυλάχθηκε και το νέο ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 8 M urea, 5% glycerol). Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE πηκτής ακρυλαμίδης, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει στο διαλυτοποιημένο σε ουρία ίζημα για να χρησιμοποιηθεί η ενδεδειγμένη ποσότητα ρητίνης Ni²⁺-NTA (1 ml ρητίνης Ni²⁺-NTA προσδένει 4mg πρωτεΐνης). Η ρητίνη εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 6M urea, 5% glycerol). Το επαναδιαλυτοποιημένο σε ουρία ίζημα αραιώθηκε με

ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 5% glycerol) έτσι ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση ουρίας 6M, προστέθηκε σε αυτό β-mercaptoethanol (5mM) και φορτώθηκε στην εξισορροπημένη ρητίνη. Η ρητίνη πλύθηκε αρχικά με 10 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 6M urea, 5% glycerol) και την συνέχεια με 15 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 6 M urea, 5% glycerol). Η έκλυση της δεσμευμένης στην ρητίνη πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με 10 όγκους ρητίνης ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 6 M urea, 100 mM imidazol 5% glycerol). Τα δείγματα της έκλυσης αναλύθηκαν σε 12% SDS-PAGE πηκτής ακρυλαμίδης, έτσι ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός καθαρότητας των πρωτεϊνών. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μοριακή διαπίδωση σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 6 M urea, 1 mM EDTA, 10% glycerol). Τα δείγματα συγκεντρώθηκαν με την χρήση συγκεντρωτή (Amicon Millipore).

6.9 Απομόνωση των μεταλλαγμάτων της SecA

BL21.19 κύτταρα που είχαν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια για τις πρωτεΐνες που μπορούν να σχηματίσουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Μεγάλωσαν σε θρεπτικό υλικό LB (Lysogeny Broth), στους 30°C μέχρι η οπτική τους πυκνότητα να γίνει $OD_{600}=0.5$. Η έκφραση των γονιδίων έγινε με την προσθήκη 0.1 mM IPTG για 3 ώρες. Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (13.000xg, 4°C, 15 λεπτά) και διαλυτοποιήθηκαν σε 1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10% v/v γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο, 2mM PMSF (αναστολέας πρωτεασών) και 100μg/mL Dnase I. Τα κύτταρα λύθηκαν σε ένα δοχείο πίεσης French (8000psi, 3-5 φορές) και τα κυτταρικά θραύσματα απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση (13.000xg). Οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας νικελίου από το υπερκείμενο. Το νικέλιο βρίσκεται ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια αγαρόζης μέσω νιτριλο-τριοξικού οξέως (NTA). Αρχικά το υπερκείμενο περνάει από την στήλη μόνο με την επίδραση της βαρύτητας με την ροή να μην ξεπερνάει το 1mL/min. Συλλέγουμε το υλικό που περνάει από την κολώνα και στην συνέχεια την πλένουμε με 10 όγκους διαλύματος 1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10% v/v γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο και στην συνέχεια με 15 όγκους 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10% v/v γλυκερόλη, 5mM ιμιδαζόλιο. Τέλος η καθαρή πρωτεΐνη εκλύεται με 5 όγκους διαλύματος 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10% v/v γλυκερόλη,

100mM ιμιδαζόλιο. Στην συνέχεια τα δείγματα από όλα τα στάδια καθαρισμού αναλύονταν με χρωματογραφία αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης με SDS (SDS-PAGE). Τα κλάσματα της έκλουσης που περιέχουν την καθαρή πρωτεΐνη υπόκεινται σε διαπίδυση ενάντια σε διάλυμα 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 5mM EDTA, 10% v/v γλυκερόλη και στην συνέχεια σε 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50% v/v γλυκερόλη και φυλάσσεται στους -20°C. Στις περιπτώσεις που τα κλάσματα έπρεπε να συγκεντρωθούν χρησιμοποιήσαμε τα Amicon Ultra 3K στα 3000xg.

6.10 Καθαρισμός SecA με ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς.

Τα μεταλλάγματα με ακινητοποιημένη την καρβοξυτελική ουρά τους καθαρίστηκαν περαιτέρω σε μια παρασκευαστική κολώνα μοριακού αποκλεισμού Hi-Load Superdex 200 26/60 (GE Healthcare), με ροή 1mL/min στους 4°C προκειμένου να καταλήξουμε με SecA με ομοιογενή ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό. Το διάλυμα απομόνωσης περιείχε 1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl. Κλάσματα 2mL συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν με χρωματογραφία αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης με SDS (SDS-PAGE). Τα κλάσματα που περιείχαν SecA με ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν σε διαπίδυση σε διάλυμα 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 5mM EDTA, 10% v/v γλυκερόλη και στην συνέχεια σε 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50% v/v γλυκερόλη και φυλάσσεται στους -20°C. Στις περιπτώσεις που τα κλάσματα έπρεπε να συγκεντρωθούν χρησιμοποιήσαμε τα Amicon Ultra 3K στα 3000xg. Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford (Biorad).

6.11 Οι κυστεΐνες σχηματίζουν ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς.

Οι πρωτεΐνες οξειδώνονται ενδομοριακά αυθόρμητα. Ο σχηματισμός του ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού προκαλεί την μετακίνηση της SecA σε φαινομενικά μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με την SecA που δεν περιέχει δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο σχηματισμός των δισουλφιδικών δεσμών αντιστρέφεται με την προσθήκη αναγωγικού μέσου (DTT) και οι πρωτεΐνες μετακινούνται στο σωστό μοριακό τους βάρος

6.12 Προετοιμασία ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (IMVs) από κύτταρα BL21(DE3) που υπερεκφράζουν την His-SecYEG.

Κύτταρα *E.coli* BL21(DE3) που μεγάλωσαν ολονυκτία στους 37°C σε δοχεία που περιείχαν 600mL LB, 100μg/mL ampicillin χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 30L, 100μg/mL ampicillin. Η καλλιέργεια έγινε σε αναδευόμενο ζυμωτήρα μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει τα $OD_{600}=0.6$. Η έκφραση των γονιδίων έγινε με την προσθήκη 0.2mM IPTG για 3 ώρες (στο τέλος η οπτική πυκνότητα θα είναι περίπου $OD_{600}=1.5$). Η συλλογή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (5.000xg, Beckman JLA8.1000, 4°C, 10 λεπτά). Τα κύτταρα διαλυτοποιήθηκαν σε 50mM Tris-HCl pH=8.0, 20% v/v γλυκερόλη, 10μg/mL Dnase I, 50μg/mL Rnase, 1mM PMSF, στους 4°C. Τα κύτταρα λύθηκαν σε ένα δοχείο πίεσης French (8000psi, 3-5 φορές) και φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000xg (Sorval Heraeus 64450), για 10 λεπτά για να απομακρυνθούν όσα κύτταρα δεν είχαν λυθεί. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στα 95.000xg στους 4°C σε ένα στροφίο φυγοκέντρου σταθερής γωνίας (Sorval T647.5). Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50mM Tris-HCl pH=8.0 χρησιμοποιώντας έναν ομογενοποιητή Dounce. Το ομογενοποιημένο υλικό (2mL) που προέκυψε τοποθετήθηκε πάνω σε μια διαβάθμιση συγκέντρωσης σουκρόζης (1,9-1,7-1,5-1,3-1,1 M, 6mL κάθε στρώμα) και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 84.000xg σε ένα στροφίο φυγοκέντρου μεταβλητής γωνίας (Sorval AH629/36) για 16 ώρες στους 4°C (φυγοκέντρηση ισορροπίας). Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, σε κάθε διαβάθμιση σουκρόζης διακρίνουμε 5 ζώνες που σκεδάζουν το φως διαφορετικά. Τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια της εσωτερικής μεμβράνης (από εδώ και πέρα IMVs) συγκεντρώνονται από την δεύτερη ζώνη που σχηματίζεται από την κορυφή της διαβάθμισης (μια διαυγής καφέ ζώνη) (Nikaido). Στην συνέχεια αραιώνονται σε 50mM Tris-HCl pH=8.0, 20% v/v γλυκερόλη και φυγοκεντρώνονται στα 95.000xg στους 4°C σε ένα στροφίο φυγοκέντρου σταθερής γωνίας (Sorval T647.5) για να απομακρύνουμε την σουκρόζη. Το ίζημα ομογενοποιείται σε διάλυμα 6M Ουρίας, 50mM Tris-HCl pH=8.0 και επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Τα δείγματα φορτώνονται σε ίσο όγκο διαλύματος 0.2M σουκρόζης, 50mM Tris-HCl pH=8.0 φυγοκεντρώνονται στα 95.000xg στους 4°C σε ένα στροφίο φυγοκέντρου σταθερής γωνίας (Sorval T647.5) για να απομακρύνουμε την ουρία. Τα IMVs τελικά επαναδιαλυτοποιούνται σε 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl₂ και ομογενοποιούνται σε έναν εξωθητή λιπιδίων LiposoFast-Basic 100nm, Avestin και

αποθηκεύεται σε μικρά κλάσματα στους -80°C (Chang et al; Cunningham & Wickner; Lill et al; Lill et al; Rhoads et al).

6.13 Σήμανση [^{35}S]-SecA και [^{35}S]-προπρωτεϊνών και των παραγώγων τους.

Η σήμανση έγινε χρησιμοποιώντας το σύστημα *in vitro* μεταγραφής/μετάφρασης TNT Quick (Promega), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. 1μg απομονωμένου κυκλικού πλασμιδίου που φέρει υποκινητή T7 πριν από το γονίδιο ενδιαφέροντος προστίθενται σε 40μL αντιδραστηρίου TNT Quick. Επιπλέον, προσθέτουμε 3μL [^{35}S]-μεθειονίνης (10μCi) και επωάζουμε το μίγμα στους 30°C για 90 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της σήμανσης ανταλλάσσουμε το ρυθμιστικό διάλυμα της πρωτεΐνης με διάλυμα 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl_2 για τις SecA και 6M ουρίας, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA για τις προπρωτεΐνες με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε ρητίνη G50. Τέλος τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία.

6.14 Μέτρηση της συγγένειας των προπρωτεϊνών για την μεταθετάση.

Τα μεταλλάγματα της SecA ή SecAWT (400nM) και IMVs με SecYEG αγρίου τύπου (400nM SecY) αναμίχθηκαν και επωάστηκαν σε πάγο για 10 λεπτά σε τελικό όγκο 20μL με ρυθμιστικό διάλυμα 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl_2 . Οι προπρωτεΐνες αραιώθηκαν έτσι ώστε να δημιουργηθεί μια διαβάθμιση συγκεντρώσεων 0-10000nM. Η ουρία στην τελική αντίδραση δεν ξεπερνούσε τα 0.2M. Η ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε (2μL) για την ιχνηλάτηση της ποσότητας της προπρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με την μεταθετάση σε κάθε βήμα της διαβάθμισης. Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο και στην συνέχεια η συνολική αντίδραση προστέθηκε πάνω σε ένα διάλυμα 0.2M σουκρόζη, 50mM Tris-HCl pH=8.0, 10μg/mL BSA και φυγοκεντρήθηκε στα 300.000xg για 30 λεπτά στους 4°C . Το υλικό που είχε προσδεθεί στις μεμβράνες διαλυτοποιήθηκε σε 50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl_2 και ακινητοποιήθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρησιμοποιώντας μια αντλία πολλαπλών κενών (Biorad). Η ένταση των [^{35}S]-προπρωτεϊνών οπτικοποιήθηκαν

χρησιμοποιώντας το Phosphoimager (Storm, GE) και πολιτικοποιήθηκαν με το ImageJ. Τέλος έγινε η αναγωγή σε ποσότητα μη-ραδιενεργά σημασμένης προσδεμένης προπρωτεΐνης με βάση το γεγονός ότι κάθε σήμα αντιπροσωπεύει μια συγκέντρωση μη-ραδιενεργά σημασμένης προπρωτεΐνης + 2μL [³⁵S]-προπρωτεΐνης. Η ποσότητα της προσδεμένης προπρωτεΐνης (άξονας Y) σχεδιάστηκε σε συνάρτηση της συνολικής ποσότητας προπρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε (άξονας X). Τέλος τα δεδομένα αναλύθηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση και η σταθερά διάστασης K_D υπολογίστηκε με το λογισμικό Prism (GraphPad).

6.15 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:

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. Συναρμολογούμε την συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα σε διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στα 300 mA ή ολονυκτία στους 4°C και στα 40mA.

6.16 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.

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. 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. Επώση 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. Η μεμβράνη κατόπιν ξεπλένεται σε διάλυμα 1xTTBS, 1x15min, 2x5min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης. Επώση της μεμβράνης για 1h σε διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης. 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. 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. Στεγνώνουμε ελαφρά τη μεμβράνη στον αέρα. Προσθέτουμε το μίγμα των ECL αντιδραστηρίων στη πλευρά της μεμβράνης όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες και αφήνουμε για επώση 1min χωρίς ανάδευση. Στη συνέχεια εκθέτουμε τη μεμβράνη στο μηχάνημα image quant Las 4000(GE healthcare)

6.17 Δραστικότητα ATPάσης της SecA.

Η SecA παρουσιάζει 3 διακριτές δράσεις ATPάσης. Όταν βρίσκεται μόνη της σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα υδρολύει ATP με πολύ χαμηλό ρυθμό (Βασική δραστικότητα). Όταν προσθέτουμε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία περιέχουν το σύμπλοκο SecYEG ο ρυθμός υδρόλυσης αυξάνεται περίπου 1.5 φορές (Μεμβρανική δραστικότητα) σε σχέση με βασική δραστικότητα. Εάν προσθέσουμε ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια, τα οποία περιέχουν το σύμπλοκο SecYEG και proPhoA, που χρησιμοποιείται ως μοντέλο υπόστρωμα, η δραστικότητα της ATPάσης αυξάνεται δραματικά (δραστικότητα Μετατόπισης), ~7 φορές σε σχέση με την Μεμβρανική δραστικότητα. Ο προσδιορισμός της ποσότητας του φωσφόρου που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του ATP από την SecA προσδιορίζεται με την

χρωστική πράσινο του μαλαχίτη. Για την μέτρηση της δραστηριότητας της SecA ως ATPάση, όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα B (50mM Tris-HCl pH=8.0, 50mM KCl, 5mM MgCl₂ και 1mM DTT) με 1mg/ml BSA και 1mM ATP (ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50μl). Για μια πλήρη αντίδραση (δραστηριότητα Μετατόπισης) προσθέτουμε 2μg SecA (0.4μM), ανεστραμμένα μεμβρανικά κυτίδια που περιέχουν το σύμπλοκο SecYEG (η κατάλληλη ποσότητα πρέπει να δίνει Μεμβρανική δραστηριότητα ίση με 1.5 φορές την Βασική δραστηριότητα ATPάσης και proPhoA (3μM). Η proPhoA βρίσκεται διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα 6M ουρίας, οπότε μια αντίστοιχη ποσότητα ουρίας πρέπει να προστεθεί σε κάθε αντίδραση στην οποία δεν υπάρχει υπόστρωμα. Ωστόσο, η συγκέντρωση της ουρίας στην τελική αντίδραση δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 0.2M, διότι υπάρχει ο κίνδυνος να επηρεαστεί η λειτουργικότητα της SecA. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C για 10 λεπτά και τερματίζεται με την τοποθέτηση της αντίδρασης στους 4°C. Στην συνέχεια προσθέτουμε 100μl, 37% w/v κιτρικό οξύ και αφήνουμε τα δείγματα 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, τοποθετούμε 250μl σε πλάκες 96 θέσεων, και μετράμε την οπτική απορρόφηση στα 660nm.

Υλικά:

- Υδροχλωρικό πράσινο του μαλαχίτη (Malachite green hydrochloride (Sigma M9636))

- Ammonium Molybdate tetrahydrate (Sigma A7302)

- 37% κιτρικό οξύ

προετοιμασία του malachite green πρόδρομου διαλύματος (1L) MGSS:

διάλυμα 1: διαλύουμε 340mg του malachite green reagent σε 75ml dH₂O

διάλυμα 2: διαλύουμε 10.5 gr ammonium molybdate σε 250ml HCl 4N.

- αναμιγνύουμε τα διαλύματα 1 και 2 και προσθέτουμε dH₂O ως το 1L.

Αφήνουμε το διάλυμα να διαυγάσει στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση για τουλάχιστο μία ώρα. Κατόπι το φιλτράρουμε από διηθητικό χαρτί Whatman (No 3). Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C σε πλαστικό μπουκάλι και είναι σταθερό για τουλάχιστο 2 μήνες. προετοιμασία του malachite green αντιδραστήριου (MGR): φτιάχνουμε φρέσκο αντιδραστήριο προσθέτοντας 250μl 20% Triton X-100 σε 50ml του MGR αντιδραστήριου. Το αντιδραστήριο φυλάσσεται στους 4°C σε πλαστικό μπουκάλι και είναι σταθερό για 2 περίπου εβδομάδες πρότυπα διαλύματα φωσφόρου (το πρότυπο διάλυμα φωσφόρου της Sigma (661-9) περιέχει 650 nmoles Pi/ml)

| NmolesPi / 50 μ l | Phosphorus stock solution | 50mM Tris-HCl, PH=8 |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|
| 0.65 | 20 | 980 |
| 1.3 | 40 | 960 |
| 2.6 | 80 | 920 |
| 5.2 | 160 | 840 |
| 8.45 | 260 | 740 |
| 10.4 | 320 | 680 |
| 13 | 400 | 600 |
| 16.25 | 500 | 500 |

6.18 *In vitro* μετατόπιση προπρωτεϊνών στο εσωτερικό ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (IMVs).

Τα υποστρώματα που μετατοπίζονται στο εσωτερικό των κυστιδίων δεν είναι προσβάσιμα σε εξωγενώς προστιθέμενη πρωτεάση και μπορούν να ανιχνευθούν με ανοσοαποτύπωση σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.

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:

proPhoA:

SecA: ~2 μ g πρωτεΐνης ανά αντίδραση

SecB: ~1 μ g πρωτεΐνης ανά αντίδραση

IMVs: 0.8 μ M IMVs σε διάλυμα AH (50mM HEPES-KOH pH=7.5, 5mM MgSO₄, 1mM DTT(προστίθεται φρέσκο)). Πρωτεάση (proteinase K): 10mg/ml διαλυμένη στο νερό

| | | |
|--|-----------|------------------|
| | αντίδραση | αρνητικό control |
|--|-----------|------------------|

| | | |
|--------------------|-------|-------|
| 10XBB | 5μl | 5 μl |
| BSA(10mg/ml) | 2 μl | 2 μl |
| SecB (1 μg/μl) | 1 μl | 1 μl |
| SecA (1 μg/μl) | 2 μl | 2 μl |
| IMVs | 2 μl | 2 μl |
| ATP (0.1M) | 1 μl | – |
| proPhoA | X μl | X μl |
| ddH ₂ O | | |
| | 50 μl | 50 μl |

Οι αντιδράσεις επωάζονται για 12min στους 37 °C. Η αντίδραση μετατόπισης τερματίζεται με την μεταφορά στον πάγο για 5 min. Στην συνέχεια προσθέτουμε 5μL πρωτεΐνωση K (10mg/mL), αναδεύουμε και επωάζουμε 15min στον πάγο. Η πρωτεόλυση τερματίζεται με την προσθήκη 100μL παγωμένο TCA (25% w/v) αναδεύουμε και επωάζουμε για 20 min στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13.000xg στους 4°C για 20min. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1mL παγωμένης ακετόνης με προσοχή για να μην αποκολληθεί το ίζημα που έχει σχηματιστεί. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13.000xg στους 4°C για 20min και επανάληψη του προηγούμενου βήματος άλλη μια φορά. Τέλος απομακρύνουμε το υπερκείμενο και τοποθετούμε τους μικροσωλήνες με τα ιζήματα στους 37°C. Μόλις εξατμιστούν όλα τα κατάλοιπα ακετόνης προσθέτουμε 15μL διαλύματος 250mM Tris-HCl pH=6.8, 3mM β-mercaptoethanol, 40% v/v glycerol, 8% w/v SDS). Κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 13%, που περιείχε 6M Urea. Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot) και επώαστηκαν ολονυκτία με διάλυμα κατάλληλων αντισωμάτων για την ανίχνευση των προπρωτεϊνών που μετατοπίστηκαν στον αυλό των IMVs.

6.19 *In vivo* μετατόπιση της proPhoA και των παραγώγων της.

Εμβολιάζουμε το LB θρεπτικό που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό με μια απομονωμένη αποικία και την επωάζουμε ολονύχτια. Αραιώνουμε 100 φορές την ολονύχτια καλλιέργεια σε 5 ml θρεπτικού LB και την επωάζουμε στην κατάλληλη θερμοκρασία μέχρι την οπτική πυκνότητα $OD_{600nm}=0.2-0.3$. Προσθέτουμε τον κατάλληλο επαγωγέα: tetracycline (0.04 μg/μl) για τα *secA* γονίδια που είναι

κλωνοποιημένα στον pASK-IBA7-plus πλασμίδιο, IPTG (0.1 mM) για τα *secYEG* γονίδια που είναι κλωνοποιημένα σε pET πλασμίδια η καθόλου επαγωγή. Μετά την επαγωγή αφήνουμε τα κύτταρα να αναπτυχθούν για 30 επιπλέον λεπτά. Μεταφέρουμε 1.3 ml καλλιέργειας σε σωλήνες Eppendorf και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 5.000 rpm και επαναδιαλύουμε το κυτταρικό ίζημα σε 1 ml 1 M Tris pH:8. Χρησιμοποιούμε 260 μl για να μετρήσουμε την οπτική πυκνότητα OD_{600nm} (στην εξίσωση **OD_{600nm}**) και 500 μl στα οποία προσθέτουμε 12.5 μl διαλύματος p-Nitrophenyl phosphate (1 M). Επωάζουμε στους 37°C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (στην εξίσωση **incubation time**) μέχρι την ανάπτυξη κίτρινου χρώματος. Τερματίζουμε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μl K₂HPO₄ (1M) και διαλυτοποιούμε τα κύτταρα με 5 μl 20% Triton X-100. Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα (13.000 rpm; 2min) και μετράμε την οπτική πυκνότητα του υπερκείμενου OD_{420nm} (στην εξίσωση **OD_{420nm}**). Υπολογίζουμε τις μονάδες υδρόλυσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση: $(1000 \times OD_{420 \text{ nm}} \times \text{dilution factor}) / (\text{incubation time} \times OD_{600\text{nm}})$.

6.20 *In vitro* αναδίπλωση της αλακαλικής φωσφατάσης

Χρησιμοποιούμε την proPhoA και τα παράγωγα της στο ρυθμιστικό διάλυμα που βρίσκονται μετά την απομάκρυνση της ουρίας, όπως έχει περιγραφεί. Εισάγουμε την ενδεδειγμένη ποσότητα πρωτεΐνης απευθείας σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (1 M Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 5 mM ZnCl₂). Προσθέτουμε pNPP και επωάζουμε στους 37°C για χρονικό διάστημα (στην εξίσωση **time_[min]**) μέχρι την εμφάνιση κίτρινου χρώματος. Τερματίζουμε την αντίδραση με την προσθήκη διαλύματος AP-stop (σχηματίζεται αναμειγνύοντας 1 όγκο 0.5 M EDTA pH, 8.0 με 4 όγκους 2.5 M K₂HPO₄) και μετρούμε την οπτική πυκνότητα του p-nitrophenol στα 420 nm (στην εξίσωση **A₄₂₀**). Τέλος προσδιορίζουμε τις μονάδες υδρόλυσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση $(1000 \times A_{420}) / \text{time}_{[\text{min}]}$.

6.21 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 (1L)

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

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές

Destaining buffer (1L)

- Methanol 400 ml
- Acetic Acid 100ml

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολλές φορές

Laemmli buffer

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

Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου η στους -20°C .

Lysogeny Broth LB (1L)

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

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 (1L)

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

TAE 10X pH 8.5 (1L)

- Trizma base 48.4 g
- Glacial acetic acid
- EDTA 0.5 M pH 8.5
- Water milli-Q

TBS 10x (1L)

- 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

TFB1

- Potassium 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 (1L)

- Tris pH 7.5 1 M 200 ml
- NaCl 87.4 g
- Tween-20 30 ml

Κεφάλαιο 7-Βιβλιογραφία

- Akita M, Shinkai A, Matsuyama S, Mizushima S (1991) SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem Biophys Res Commun* **174**: 211-216
- Allen WJ, Phan G, Waksman G (2009) Structural biology of periplasmic chaperones. *Adv Protein Chem Struct Biol* **78**: 51-97
- Alvarez-Martinez CE, Christie PJ (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 775-808
- Arkowitz RA, Joly JC, Wickner W (1993) Translocation Can Drive the Unfolding of a Preprotein Domain. *Embo Journal* **12**: 243-253
- Auclair SM, Bhanu MK, Kendall DA (2011) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci* **21**: 13-25
- Baars L, Ytterberg AJ, Drew D, Wagner S, Thilo C, van Wijk KJ, de Gier JW (2006) Defining the role of the *Escherichia coli* chaperone SecB using comparative proteomics. *J Biol Chem* **281**: 10024-10034
- Bechtluft P, Kedrov A, Slotboom DJ, Nouwen N, Tans SJ, Driessen AJ Tight hydrophobic contacts with the SecB chaperone prevent folding of substrate proteins. *Biochemistry* **49**: 2380-2388
- Bechtluft P, van Leeuwen RG, Tyreman M, Tomkiewicz D, Nouwen N, Tepper HL, Driessen AJ, Tans SJ (2007) Direct observation of chaperone-induced changes in a protein folding pathway. *Science* **318**: 1458-1461
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* **35**: 260-274
- Bonardi F, Halza E, Walko M, Du Plessis F, Nouwen N, Feringa BL, Driessen AJ (2011) Probing the SecYEG translocation pore size with preproteins conjugated with sizable rigid spherical molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 7775-7780
- Bondar AN, del Val C, Freitas JA, Tobias DJ, White SH (2010) Dynamics of SecY translocons with translocation-defective mutations. *Structure* **18**: 847-857
- Bost S, Belin D (1997) prl mutations in the *Escherichia coli* secG gene. *J Biol Chem* **272**: 4087-4093
- Bradshaw N, Neher SB, Booth DS, Walter P (2009) Signal sequences activate the catalytic switch of SRP RNA. *Science* **323**: 127-130

- Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W, Collinson I (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* **418**: 662-665
- Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJ, Wickner W (1990) The purified *E. coli* integral membrane protein SecY/E is sufficient for reconstitution of SecA-dependent precursor protein translocation. *Cell* **62**: 649-657
- Chang CN, Blobel G, Model P (1978) Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent fl pre-coat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 361-365
- Chatzi KE, Sardis MF, Karamanou S, Economou A (2013) Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem J* **449**: 25-37
- Christie PJ, Cascales E (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**: 51-61
- Collinson I (2005) The structure of the bacterial protein translocation complex SecYEG. *Biochem Soc Trans* **33**: 1225-1230
- Compton SJ, Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**: 369-374
- Cornelis GR (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825
- Cunningham K, Wickner W (1989) Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8630-8634
- Dalbey RE, Wang P, Kuhn A (2011) Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **80**: 161-187
- Dalbey RE, Wickner W (1985) Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem* **260**: 15925-15931
- Derman AI, Puziss JW, Bassford PJ, Jr., Beckwith J (1993) A signal sequence is not required for protein export in *prlA* mutants of *Escherichia coli*. *EMBO J* **12**: 879-888
- Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR (2004) Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**: 111-124
- Douville K, Price A, Eichler J, Economou A, Wickner W (1995) SecYEG and SecA are the stoichiometric components of preprotein translocase. *J Biol Chem* **270**: 20106-20111
- Duong F, Wickner W (1999) The *PrlA* and *PrlG* phenotypes are caused by a loosened association among the translocase SecYEG subunits. *EMBO J* **18**: 3263-3270

- Economou A, Christie PJ, Fernandez RC, Palmer T, Plano GV, Pugsley AP (2006) Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* **62**: 308-319
- Economou A, Wickner W (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**: 835-843
- Ferbitz L, Maier T, Patzelt H, Bukau B, Deuerling E, Ban N (2004) Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature* **431**: 590-596
- Gelis I, Bonvin AM, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG (2007) Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell* **131**: 756-769
- Gouridis G, Karamanou S, Gelis I, Kalodimos CG, Economou A (2009) Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature* **462**: 363-U132
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 425-449
- Grudnik P, Bange G, Sinning I (2009) Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol Chem* **390**: 775-782
- Gumbart J, Schulten K (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J* **90**: 2356-2367
- Gumbart J, Schulten K (2007) Structural determinants of lateral gate opening in the protein translocon. *Biochemistry* **46**: 11147-11157
- Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D beta-Barrel membrane protein assembly by the Bam complex. *Annu Rev Biochem* **80**: 189-210
- Haider S, Hall BA, Sansom MS (2006) Simulations of a protein translocation pore: SecY. *Biochemistry* **45**: 13018-13024
- Harris CR, Silhavy TJ (1999) Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J Bacteriol* **181**: 3438-3444
- Hayano T, Takahashi N, Kato S, Maki N, Suzuki M (1991) Two distinct forms of peptidylprolyl-cis-trans-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of Escherichia coli cells. *Biochemistry* **30**: 3041-3048
- Hegde RS, Bernstein HD (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* **31**: 563-571
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744

- Hesterkamp T, Bukau B (1996) Identification of the prolyl isomerase domain of Escherichia coli trigger factor. *FEBS Lett* **385**: 67-71
- Hizlan D, Robson A, Whitehouse S, Gold VA, Vonck J, Mills D, Kuhlbrandt W, Collinson I (2012) Structure of the SecY Complex Unlocked by a Preprotein Mimic. *Cell Rep* **1**: 21-28
- Hoffmann A, Bukau B, Kramer G (2010) Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 650-661
- Huber D, Rajagopalan N, Preissler S, Rocco MA, Merz F, Kramer G, Bukau B (2011) SecA Interacts with Ribosomes in Order to Facilitate Posttranslational Translocation in Bacteria. *Molecular Cell* **41**: 343-353
- Hunt JF, Weinkauf S, Henry L, Fak JJ, McNicholas P, Oliver DB, Deisenhofer J (2002) Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* **297**: 2018-2026
- Janda CY, Li J, Oubridge C, Hernandez H, Robinson CV, Nagai K (2010) Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature* **465**: 507-510
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 8972-8976
- Joshi SA, Hersch GL, Baker TA, Sauer RT (2004) Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 404-411
- Justice SS, Hunstad DA, Harper JR, Duguay AR, Pinkner JS, Bann J, Frieden C, Silhavy TJ, Hultgren SJ (2005) Periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases are not essential for viability, but SurA is required for pilus biogenesis in Escherichia coli. *J Bacteriol* **187**: 7680-7686
- Karamanou S, Gouridis G, Papanikou E, Sianidis G, Gelis I, Keramisanou D, Vrontou E, Kalodimos CG, Economou A (2007) Preprotein-controlled catalysis in the helicase motor of SecA. *Embo Journal* **26**: 2904-2914
- Keramisanou D, Biris N, Gelis I, Sianidis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG (2006) Disorder-order folding transitions underlie catalysis in the helicase motor of SecA. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 594-602
- Kihara A, Akiyama Y, Ito K (1995) FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4532-4536
- Knoblauch NT, Rudiger S, Schonfeld HJ, Driessen AJ, Schneider-Mergener J, Bukau B (1999) Substrate specificity of the SecB chaperone. *J Biol Chem* **274**: 34219-34225

- Koonin EV, Gorbalenya AE (1992) Autogenous translation regulation by Escherichia coli ATPase SecA may be mediated by an intrinsic RNA helicase activity of this protein. *FEBS Lett* **298**: 6-8
- Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WG The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**: 336-351
- Kramer G, Rauch T, Rist W, Vorderwulbecke S, Patzelt H, Schulze-Specking A, Ban N, Deuerling E, Bukau B (2002) L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome. *Nature* **419**: 171-174
- Kristensen O, Gajhede M (2003) Chaperone binding at the ribosomal exit tunnel. *Structure* **11**: 1547-1556
- Kusters I, Driessen AJ (2011) SecA, a remarkable nanomachine. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2053-2066
- Kusters I, van den Bogaart G, Kedrov A, Krasnikov V, Fulyani F, Poolman B, Driessen AJ (2011) Quaternary structure of SecA in solution and bound to SecYEG probed at the single molecule level. *Structure* **19**: 430-439
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lee C, Beckwith J (1986) Cotranslational and posttranslational protein translocation in prokaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol* **2**: 315-336
- Lee I, Suzuki CK (2008) Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 727-735
- Lill R, Cunningham K, Brundage LA, Ito K, Oliver D, Wickner W (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of Escherichia coli. *Embo J* **8**: 961-966
- Lill R, Dowhan W, Wickner W (1990) The ATPase activity of SecA is regulated by acidic phospholipids, SecY, and the leader and mature domains of precursor proteins. *Cell* **60**: 271-280
- Maillard AP, Lalani S, Silva F, Belin D, Duong F (2007) Deregulation of the SecYEG translocation channel upon removal of the plug domain. *J Biol Chem* **282**: 1281-1287
- Mandon EC, Jiang Y, Gilmore R (2003) Dual recognition of the ribosome and the signal recognition particle by the SRP receptor during protein targeting to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **162**: 575-585
- Martinez-Argudo I, Blocker AJ (2010) The Shigella T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors. *Mol Microbiol* **78**: 1365-1378

- Martinez-Hackert E, Hendrickson WA (2009) Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone. *Cell* **138**: 923-934
- Merz F, Hoffmann A, Rutkowska A, Zachmann-Brand B, Bukau B, Deuerling E (2006) The C-terminal domain of Escherichia coli trigger factor represents the central module of its chaperone activity. *J Biol Chem* **281**: 31963-31971
- Mori H, Ito K (2006) Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16159-16164
- Mota LJ, Cornelis GR (2005) The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* **37**: 234-249
- Muren EM, Suciu D, Topping TB, Kumamoto CA, Randall LL (1999) Mutational alterations in the homotetrameric chaperone SecB that implicate the structure as dimer of dimers. *J Biol Chem* **274**: 19397-19402
- Murphy CK, Beckwith J (1994) Residues essential for the function of SecE, a membrane component of the Escherichia coli secretion apparatus, are located in a conserved cytoplasmic region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2557-2561
- Natale P, Bruser T, Driessen AJ (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1735-1756
- Neher SB, Bradshaw N, Floor SN, Gross JD, Walter P (2008) SRP RNA controls a conformational switch regulating the SRP-SRP receptor interaction. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 916-923
- Nikaido H (1994) Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol* **235**: 225-234
- Nishiyama K, Suzuki T, Tokuda H (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* **85**: 71-81
- Nishizawa M, Emura M, Yamada H, Chairul MS, Hayashi Y, Tokuda H (1989) Isolation of a New Cycloartanoid Triterpene from Leaves of Lansium-Domesticum Novel Skin-Tumor Promotion Inhibitors. *Tetrahedron Lett* **30**: 5615-5618
- Niwa T, Ying BW, Saito K, Jin W, Takada S, Ueda T, Taguchi H (2009) Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4201-4206
- Nouwen N, de Kruijff B, Tommassen J (1996) prlA suppressors in Escherichia coli relieve the proton electrochemical gradient dependency of translocation of wild-type precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5953-5957
- O'Brien EP, Christodoulou J, Vendruscolo M, Dobson CM (2012) Trigger factor slows co-translational folding through kinetic trapping while sterically protecting the nascent chain from aberrant cytosolic interactions. *J Am Chem Soc* **134**: 10920-10932

- Oh E, Becker AH, Sandikci A, Huber D, Chaba R, Gloge F, Nichols RJ, Typas A, Gross CA, Kramer G, Weissman JS, Bukau B (2011) Selective Ribosome Profiling Reveals the Cotranslational Chaperone Action of Trigger Factor In Vivo. *Cell* **147**: 1295-1308
- Okuda S, Tokuda H Lipoprotein sorting in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **65**: 239-259
- Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 529-550
- Osborne RS, Silhavy TJ (1993) PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J* **12**: 3391-3398
- Papanikou E, Karamanou S, Economou A (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**: 839-851
- Peluso P, Shan SO, Nock S, Herschlag D, Walter P (2001) Role of SRP RNA in the GTPase cycles of Ffh and FtsY. *Biochemistry* **40**: 15224-15233
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**: 785-786
- Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**: 795-807
- Powers T, Walter P (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the Escherichia coli signal recognition particle and its receptor. *EMBO J* **16**: 4880-4886
- Pretz MG, Albers SV, Schuurman-Wolters G, Tampe R, Driessen AJ, van der Does C (2006) Thermodynamics of the ATPase cycle of GlcV, the nucleotide-binding domain of the glucose ABC transporter of Sulfolobus solfataricus. *Biochemistry* **45**: 15056-15067
- Prinz WA, Spiess C, Ehrmann M, Schierle C, Beckwith J (1996) Targeting of signal sequenceless proteins for export in Escherichia coli with altered protein translocase. *EMBO J* **15**: 5209-5217
- Randall LL, Crane JM, Lilly AA, Liu G, Mao C, Patel CN, Hardy SJ (2005) Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: implications for function in export. *J Mol Biol* **348**: 479-489
- Randall LL, Hardy SJ (2002) SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cell Mol Life Sci* **59**: 1617-1623
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663-669

- Rhoads DB, Tai PC, Davis BD (1984) Energy-requiring translocation of the OmpA protein and alkaline phosphatase of *Escherichia coli* into inner membrane vesicles. *J Bacteriol* **159**: 63-70
- Robinson C, Matos CF, Beck D, Ren C, Lawrence J, Vasisht N, Mendel S (2011) Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1808**: 876-884
- Robson A, Carr B, Sessions RB, Collinson I (2009) Synthetic peptides identify a second periplasmic site for the plug of the SecYEG protein translocation complex. *FEBS Lett* **583**: 207-212
- Roehrich AD, Guillosoou E, Blocker AJ, Martinez-Argudo I (2013) *Shigella* IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol Microbiol* **87**: 690-706
- Sabatini DD, Blobel G, Nonomura Y, Adelman MR (1971) Ribosome-membrane interaction: Structural aspects and functional implications. *Adv Cytopharmacol* **1**: 119-129
- Saparov SM, Erlandson K, Cannon K, Schaletzky J, Schulman S, Rapoport TA, Pohl P (2007) Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules. *Mol Cell* **26**: 501-509
- Sardis MF, Economou A (2010) SecA: a tale of two protomers. *Mol Microbiol* **76**: 1070-1081
- Sargent F, Berks BC, Palmer T (2002) Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol* **178**: 77-84
- Schaffitzel C, Oswald M, Berger I, Ishikawa T, Abrahams JP, Koerten HK, Koning RI, Ban N (2006) Structure of the *E. coli* signal recognition particle bound to a translating ribosome. *Nature* **444**: 503-506
- Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU, Wickner W (1991) Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* **64**: 927-939
- Scholz C, Stoller G, Zarnt T, Fischer G, Schmid FX (1997) Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding. *EMBO J* **16**: 54-58
- Sianidis G, Karamanou S, Vrontou E, Boulias K, Repanas K, Kyripides N, Politou AS, Economou A (2001) Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J* **20**: 961-970
- Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD (2012) Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annu Rev Microbiol* **66**: 453-472

- Smith MA, Clemons WM, Jr., DeMars CJ, Flower AM (2005) Modeling the effects of prl mutations on the Escherichia coli SecY complex. *J Bacteriol* **187**: 6454-6465
- Solem A, Zingler N, Pyle AM (2006) A DEAD protein that activates intron self-splicing without unwinding RNA. *Mol Cell* **24**: 611-617
- Stoller G, Rucknagel KP, Nierhaus KH, Schmid FX, Fischer G, Rahfeld JU (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J* **14**: 4939-4948
- Talmud P, Lins L, Brasseur R (1996) Prediction of signal peptide functional properties: a study of the orientation and angle of insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng* **9**: 317-321
- Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* **97**: 755-765
- Tomkiewicz D, Nouwen N, van Leeuwen R, Tans S, Driessen AJ (2006) SecA supports a constant rate of preprotein translocation. *J Biol Chem* **281**: 15709-15713
- Tompa P (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem Sci* **37**: 509-516
- Ullers RS, Ang D, Schwager F, Georgopoulos C, Genevaux P (2007) Trigger factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in Escherichia coli. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 3101-3106
- Ullers RS, Luirink J, Harms N, Schwager F, Georgopoulos C, Genevaux P (2004) SecB is a bona fide generalized chaperone in Escherichia coli. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 7583-7588
- Uversky VN (2002) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* **11**: 739-756
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**: 36-44
- von Loeffelholz O, Knoops K, Ariosa A, Zhang X, Karuppasamy M, Huard K, Schoehn G, Berger I, Shan SO, Schaffitzel C (2013) Structural basis of signal sequence surveillance and selection by the SRP-FtsY complex. *Nat Struct Mol Biol*
- Vrontou E, Economou A (2004) Structure and function of SecA, the preprotein translocase nanomotor. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 67-80
- Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R (2004) SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1049-1053

Wowor AJ, Yu D, Kendall DA, Cole JL Energetics of SecA dimerization. *J Mol Biol* **408**: 87-98

Zeng LL, Yu L, Li ZY, Perrett S, Zhou JM (2006) Effect of C-terminal truncation on the molecular chaperone function and dimerization of Escherichia coli trigger factor. *Biochimie* **88**: 613-619

Zheng N, Gierasch LM (1997) Domain interactions in E. coli SRP: stabilization of M domain by RNA is required for effective signal sequence modulation of NG domain. *Mol Cell* **1**: 79-87

Zhou J, Xu Z (2003) Structural determinants of SecB recognition by SecA in bacterial protein translocation. *Nat Struct Biol* **10**: 942-947

Zimmer J, Nam YS, Rapoport TA (2008) Structure of a complex of the ATPase SecA and the protein-translocation channel. *Nature* **455**: 936-U932

Zimmer J, Rapoport TA (2009) Conformational Flexibility and Peptide Interaction of the Translocation ATPase SecA. *Journal of Molecular Biology* **394**: 606-612



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ**
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΕΣΠΑ
2007-2013**
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ