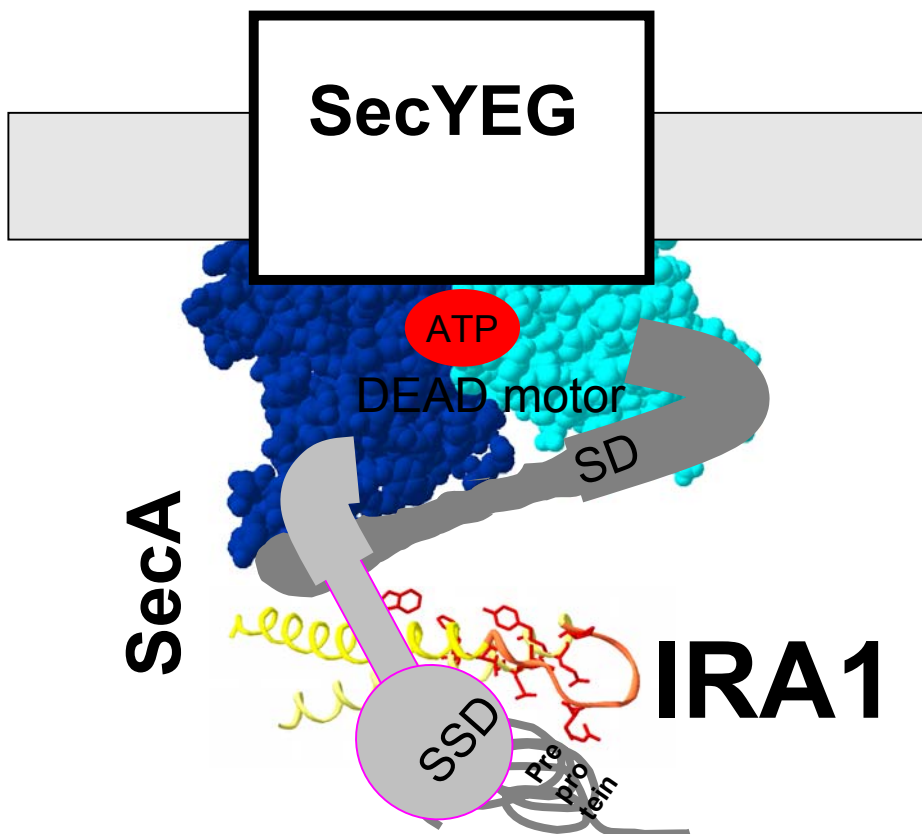


ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ  
ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ  
ΜΕΣΩ ΤΟΥ IRA1 ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΔΙΑΚΟΠΤΗ ΤΗΣ  
SecA ΑΤΡΑΣΗΣ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΒΡΟΝΤΟΥ



**Στην Φούλη**

## Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κύριο Τάσο Οικονόμου που με δέχθηκε στο εργαστήριο του και ήταν πάντα παρών σε κάθε πρόβλημα που είχα να αντιμετωπίσω. Αποτέλεσε πηγή έμπνευσης και πρότυπο για αδιάκοπη βελτίωση και κίνητρο για να συνεχίσω την ολοκλήρωση του διδακτορικού μου.

Πολύτιμη ήταν επίσης η βοήθεια στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής της Λίλης Καραμάνου η οποία ακούραστα με βοήθησε σε κάθε μου απορία και πρόβλημα και μου δίδαξε ότι γνωρίζω σήμερα. Επιπλέον η Λίλη Καραμάνου έβαλε τις βάσεις για την ανάλυση του μοριακού μηχανισμού δράσης του IRA1 διακόπτη και πραγματοποίησε ένα σημαντικό μέρος των πειραμάτων που αναφέρονται στην παρούσα διατριβή και αφορούν κυρίως τα πειράματα με το φλουρίμετρο.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μπάμπη Ποζίδη για την πολύτιμη βοήθεια του όσον αφορά τις αρχές, αλλά και τις τεχνικές λεπτομέρειες του καθαρισμού των πρωτεϊνών, αλλά και τον Γιάννη Παπανικολάου γιατί μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις του για την δομική ανάλυση των πρωτεϊνών.

Στο σημείο αυτό δεν μπορώ να ξεχάσω την βοήθεια της Κυρίας Πολίτου όσον αφορά τα πειράματα του κυκλικού διχρωϊσμού αλλά και του Δήμου Μπόλη που με βοήθησε να τα πραγματοποιήσω. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Dr.Kuhn που με δέχθηκε στο εργαστήριο του στην Στουτγκάρδη για να πραγματοποιήσω τις μελέτες αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με την συσκευή IASYS, αλλά και τον Tilman Roos για την βοήθεια του τον καιρό που ήμουν εκεί.

Ακολουθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Κυρίου Θηραίο και Γεωργάτο, για το ενδιαφέρον που έδειξαν για την πρόοδο μου. Επίσης πολύ χρήσιμες ήταν οι συμβουλές από τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, Κυρία Αλεξανδράκη, και Κυρίου Θηραίο, Παπαμαθαιάκη, Τοκατλίδη, Τζαμαρία, Μπουριώτη, Πετράτο και Κοκκινίδη.

Δεν μπορώ να ξεχάσω βέβαια και την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε με την Catherine Baud αλλά και τον Γιώργο Σιανίδη και θα ήθελα να ευχηθώ καλή συνέχεια στα νεότερα μέλη του εργαστηρίου την Σάννυ την Muriam και την Έφη.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια και τον Πατέρα μου για την αδιάκοπη χρηματική του υποστήριξη.

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>1</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>7</b>
<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	
1.1. Πρωτεϊνικέςμηχανές-Πρωτεΐνες κινητήρες	17
1.2. Η έκκριση των πρωτεϊνών είναι μία αντίδραση τριών σταδίων	20
1.2.A. Μεταφορά-στόχευση εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη	21
1.2.A.I. Πεπτιδία σηματοδότες (Signal peptides)	21
1.2.A.II. Ρόλος της “ώριμης περιοχής” της πολυπεπτιδικής αλυσίδας	21
1.2.A.III. Ρόλος κυτταροπλασματικών συνοδών πρωτεϊνών στη μεταφορά των εκκρινόμενων υποστρωμάτων στη μεμβράνη	21
1.2.A.III.α. Μεταφορά-στόχευση στη μεμβράνη, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SRP (Signal recognition particle) και του υποδοχέα της SR (SRP receptor)	21
1.2.A.III.β. Μεταφορά-στόχευση με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SecB	24
1.2.B. Διαπέραση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από την μεμβρανική διπλοστοιβάδα	28
1.2.B.I. Δαπάνη ενέργειας κατά την μετατόπιση πρωτεϊνών από τις μεμβράνες	28
1.2.B.II. Το εκκριτικό Sec μονοπάτι. Από τα γονίδια στις πρωτεΐνες και την ανασύσταση <i>in vitro</i>	31
1.2.Γ. SecA-ATPάση-Αλληλεπίδρασεις με τους διάφορους υποκαταστάτες	31
1.2.Γ.I. Αλληλεπίδραση SecA με ATP	33
1.2.Γ.II. Αλληλεπίδραση SecA με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα	36
1.2.Γ.II.α. Πεπτιδία σηματοδότες (Signalpeptides)	36
1.2.Γ.II.β. “ώριμη” περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας	40
1.2.Γ.III. Αλληλεπίδραση SecA με ανιονικά φωσφολιπίδια	42
1.2.Γ.IV. Αλληλεπίδραση SecA με λιπίδια που έχουν την τάση δημιουργίας μη ελασματοειδούς δομής (Nonlamellar-prone Lipids) στη μεμβράνη	43
1.2.Δ. Βασικές πρωτεΐνες της βακτηριακής μεταθέτασης στην <i>E. coli</i>	45
1.2.Δ.I. Το SecYEG/Sec61 κανάλι της μεταθετάσης	47
1.2.Δ.II. Σύμπλοκο SecYEG	48
1.2.E. Ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια	50
1.2.Z. SecA-ATPάση. Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της πρωτεΐνης στην κρυσταλλογραφική της διαμόρφωση	52

1.2.Z.I.	Διερεύνηση των αλλαγών της διαμόρφωσης της SecA πρωτεΐνης απουσία και παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες	66
1.2.Z.II.	Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού της SecA	75
1.2.H.	<i>Η μηχανή της μεταθετάσης επί το έργο</i>	86

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1.	Τεχνικές ανασυνδυασμού του DNA	94
2.2.	Εκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών	95
2.2.A.	<i>Συλλογή κυττάρων για αποθήκευση (Cell nuggets)</i>	95
2.2.B.	<i>Απομόνωση των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών από BL21.19 κύτταρα</i>	96
2.2.Γ.	<i>Απομόνωση των διάφορων C34IRA1 πρωτεϊνών από BL21.19 κύτταρα</i>	96
2.2.Δ.	<i>Απομόνωση των διάφορων παραγώγων του C34 από BL21.19 κύτταρα</i>	96
2.2.E.	<i>Προσπάθεια απομόνωσης του MBPC755-834 παραγώγου του C34 από BL21.19 κύτταρα</i>	96
2.2.Z.	<i>Απομόνωση του N68 από BL21.19 κύτταρα</i>	97
2.2.H.	<i>Απομόνωση της proOmpA από έγκλειστα σωμάτια (Inclusion bodies) κυττάρων W3110IQ</i>	97
2.2.Θ.	<i>Απομόνωση της SecB από BL21 κύτταρα</i>	97
2.3.	Ανίχνευση της καθαρότητας μιας πρωτεΐνης, του μεγέθους της, της αλληλουχίας των αμινοξέων της και της ολιγομερικής της κατάστασης	98
2.3.A.	<i>Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE)</i>	98
2.3.B.	<i>Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης</i>	98
2.3.Γ.	<i>Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών. Ηλεκτροφορητική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης-Westernblots</i>	99
2.3.Δ.	<i>Αμινοτελική αλληλούχιση πρωτεϊνών</i>	99
2.3.E.	<i>Τρέξιμο των πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (NATIVE-PAGE)</i>	99
2.3.Z.	<i>Τρέξιμο των πρωτεϊνών σε μπλε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BlueNATIVEPAGE)</i>	99
2.3.H.	<i>Ανάλυση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού</i>	99
2.3.Θ.	<i>Ανάλυση της ολιγομερικής δομής της πρωτεΐνης μετά από χημική διασύνδεση (Chemicalcrosslinking)</i>	100
2.3.I.	<i>Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση</i>	100
2.4.	Φασματοσκοπικές μέθοδοι για την μελέτη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών σε διάλυμα.	100
2.4.A.	<i>Φασματοσκοπία απορρόφησης</i>	100
2.4.B.	<i>Φθορισμός</i>	100
2.4.Γ.	<i>Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular dichroism, CD)</i>	104
2.5.	Χρησιμοποίηση ακτίνων –X για την μελέτη της	

	διαμόρφωσης των πρωτεϊνών σε διάλυμα	102
<b>2.6.</b>	Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών και λιπιδίων μέσω του συντονισμού του επιφανειακού plasmon (Surface Plasmon Resonance)	102
<b>2.7.</b>	Παρασκευή ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων	103
<b>2.7.A.</b>	Απομάκρυνση της SecA από τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια της εσωτερικής μεμβράνης	103
<b>2.7.B.</b>	Διαλυτοποίηση και καθαρισμός του SecY <sub>HIS</sub> EG συμπλόκου από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια	104
<b>2.7.Γ.</b>	Ανασύσταση του συμπλόκου SecY <sub>HIS</sub> EG σε πρωτεολιποσώματα	104
<b>2.8.</b>	Ενζυματικές δοκιμασίες μέτρησης της δραστηριότητας των πρωτεϊνών	104
<b>2.8.A.</b>	Μέτρηση της δραστηριότητας ATPάσης της SecA	104
<b>2.8.B.</b>	Δοκιμασία <i>in vitro</i> της μετατόπισης της proOmpA μέσα από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (IMVs) ή ανασυστάμενα με το σύμπλοκο SecYEG πρωτεολιποσώματα	105
<b>2.9.</b>	Μετρήσεις της συγγένειας της SecA και των SecAIRA1 πρωτεϊνών με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG	105

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

<b>3.1.</b>	Σημειακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη	108
<b>3.2.</b>	Λειτουργική ανάλυση	93
<b>3.2.A.</b>	Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την κατάλυση της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες	93
<b>3.2.B.</b>	Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την αποδοτική υδρόλυση ATP από την SecA	96
<b>3.2.Γ.</b>	Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει τον ρυθμό ανακύκλωσης νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα	98
<b>3.2.Δ.</b>	Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση του DEAD κινητήρα από το ADP	101
<b>3.2.Ε.</b>	Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση και της C-περιοχής της SecA από το ADP	106
<b>3.2.Ζ.</b>	Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την δέσμευση του DEAD κινητήρα για το πεπτιδίο σηματοδότη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και την θέση SecYEG στη μεμβράνη	112
<b>3.3.</b>	Φυσική ανάλυση	
<b>3.3.A.</b>	Η C-περιοχή της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα	115
<b>3.3.B.</b>	Στους 37 <sup>0</sup> C η ρύθμιση του DEAD κινητήρα από την C-περιοχή περιορίζεται	119
<b>3.3.Γ.</b>	Η IRA1 περιοχή της C-περιοχής της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα	121
<b>3.3.Δ.</b>	Οι SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν υφίστανται την ενδόθερμη	

	<i>μετάπτωση της SecAWT κατά την μετάβαση από τους 4<sup>0</sup>C στους 37<sup>0</sup>C.</i>	<b>126</b>
<b>3.3.E.</b>	<i>Φυσική βάση της διαμόρφωσης και της λειτουργίας του DEAD κινητήρα από τον IRA1 διακόπτη</i>	<b>129</b>
<b>3.3.Z.</b>	<i>Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών και υποπεριοχών της SecA</i>	<b>131</b>
<b>3.3.Z.I.</b>	<i>Η C-περιοχή της SecA επικοινωνεί με τις NBD, IRA2 και SSD-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα</i>	<b>131</b>
<b>3.3.Z.II.</b>	<i>Οι NBD και IRA2-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα επικοινωνούν μεταξύ τους</i>	<b>132</b>
<b>3.3.H.</b>	<i>Οι SecAIRA1 μεταλλαγές διαταράσσουν την επικοινωνία της C-περιοχής τους με τις NBD και IRA2 υπομονάδες του DEAD κινητήρα</i>	<b>134</b>
<b>3.3.Θ.</b>	<i>Επίδραση των SecAIRA1 μεταλλαγών στην επικοινωνία της C-περιοχής με την SSD-περιοχή του DEAD κινητήρα</i>	<b>135</b>
<b>3.3.I.</b>	<i>Η IRA1-περιοχή λειτουργεί μόνο παρουσία της C-περιοχής της SecA</i>	<b>136</b>
<b>3.3.K.</b>	<i>Η IRA1-περιοχή ελέγχει την διαμόρφωση των περιοχών SD, WD και της CT-περιοχής</i>	<b>142</b>
<b>3.3.Λ.</b>	<i>Η IRA1-περιοχή ελέγχει τον διμερισμό της SecA</i>	<b>150</b>
<b>3.4.</b>	<b>Δομική ανάλυση</b>	<b>160</b>
<b>3.4.A.</b>	<i>Σημιακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη</i>	<b>160</b>
<b>3.4.B.</b>	<i>Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της IRA1-περιοχής και των υπολοίπων περιοχών της SecA</i>	<b>169</b>
<b>3.4.Γ.</b>	<i>Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων περιοχών της SecA</i>	<b>176</b>
	<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	<b>186</b>
	<b><u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	<b>224</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κύτταρο είναι ένα εργοστάσιο παραγωγής πρωτεϊνικών μορίων. Το 30% των παραγόμενων πρωτεϊνών εντοπίζονται στον εξωκυτταροπλασματικό χώρο, διαδεικνύοντας την εκκριτική διαδικασία ως εντελώς απαραίτητη για την ζωή του κυττάρου. Στα βακτήρια, το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται στην παρούσα διατριβή για την μελέτη της διαδικασίας της έκκρισης, εντοπίζεται πληθώρα εκκριτικών μηχανών (μεταθετάσες). Οι μεταθετάσες με κατανάλωση ενέργειας από την υδρόλυση νουκλεοτιδίων ή από την βαθμίδωση του δυναμικού των πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης, επιτελούν την μεταφορά των πρωτεϊνών διαμέσου της λιπιδικής διπλοστοιβάδας προς στο εξωτερικό του κυττάρου. Από τις παραπάνω εκκριτικές μηχανές μόνο η Sec, είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία του βακτηριακού κυττάρου, καθώς εκκρίνει τις περισσότερες πρωτεΐνες και γι' αυτό μελετάται διεξοδικότερα στην παρούσα ανάλυση.

Ο βασικός πυρήνας της Sec μεταθετάσης αποτελείται από τους ολιγομερείς SecYEG σχηματισμούς που μοιάζουν με πόρους στην μεμβράνη και την περιφερειακή πρωτεΐνη SecA. Μολονότι η SecA είναι ένα ένζυμο που "μετακινείται" σταδιακά κατά μήκος των εκκρινόμενων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων, παρουσιάζει ομολογία με τις ελικάσες των νουκλεϊκών οξέων. Πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνει ένα αμινοτελικό καταλυτικό πυρήνα, που παρουσιάζει ομολογία με τον αντίστοιχο καταλυτικό πυρήνα των ελικασών (N-περιοχή), από τον οποίο εκβάλλουν δύο μη ομόλογες με τις ελικάσες περιοχές που συντελούν στην εξειδίκευση της πρωτεΐνης. Και ενώ η αμινοτελική περιοχή επιτελεί σχεδόν όλες τις χημικές δραστηριότητες της SecA (δέσμευση και υδρόλυση ATP, δέσμευση του Πεπτιδίου Σηματοδότη του υποστρώματος και δέσμευση στην μεμβράνη στην θέση που εντοπίζεται το σύμπλοκο SecYEG), οι επονομαζόμενες περιοχές εξειδίκευσης, βοηθούν τις ελικάσες να αποκτήσουν τον συγκεκριμένο τους ρόλο και αναθέτουν συγκεκριμένα στην SecA πρωτεΐνη την δράση της στην διαδικασία έκκρισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Αυτές είναι: η περιοχή εξειδίκευσης του υποστρώματος SSD (Substrate Specificity Domain), όπου προτείνεται ότι δεσμεύεται το υπόστρωμα και η καρβοξυτελική περιοχή (C-domain), που έχουμε διαπιστώσει ότι ρυθμίζει την δραστικότητα ATPάσης της N-περιοχής. Η C-περιοχή, μέσω απευθείας αλληλεπίδραση με την N-καταλυτική περιοχή, καταστέλλει την δραστικότητα ATPάσης της SecA όταν η τελευταία εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και δεν υπάρχει ανάγκη κατανάλωσης ενέργειας. Αντίστοιχα, η ATPάση της SecA ενεργοποιείται απουσία ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ των N-/C-περιοχών της χωρίς να πραγματοποιείται καμία δέσμευση από τα υποστρώματα της εκκριτικής διαδικασίας. Στην περίπτωση αυτή επιτυγχάνεται μίμηση της συμπεριφοράς της SecA στην μεμβράνη κατά την διάρκεια της έκκρισης των πρωτεϊνών, όταν τα επίπεδα υδρόλυσης του ATP πρέπει να είναι αυξημένα. Η δέσμευση της C-περιοχής στην N-περιοχή αποδίδεται στην πρώτη υποπεριοχή της C-περιοχής, την περιοχή SD (Scaffold Domain). Έχουμε όμως επιπλέον διαπιστώσει ότι και η υποπεριοχή IRA1 (Intramolecular Regulator of ATP hydrolysis 1), μία συντηρημένη δομή έλικας-λούπας-έλικας στην C-περιοχή απαιτείται επίσης για την ρυθμιστική δράση της τελευταίας. Η SecA πρωτεΐνη με μία μικρή έλλειψη στην IRA1 υποπεριοχή μετατρέπεται σε υπερενεργοποιημένη ATPάση η οποία παρόλα αυτά είναι ανίκανη να συντελέσει στην διαδικασία έκκρισης των πρωτεϊνών.

Στην προσπάθεια μας λοιπόν να προσεγγίσουμε το αναπάντητο ερώτημα της μετατροπής της χημικής ενέργειας σε μηχανικό έργο στις ελικάσες, που πιθανότατα περιλαμβάνει ενδοεπικοινωνία μεταξύ της καταλυτικής περιοχής και των περιοχών που τους προσδίδουν εξειδίκευση, εστιαστήκαμε στον μηχανισμό ανίχνευσης της λειτουργίας της IRA1 υποπεριοχής, που αναμένεται να αποτελεί τον απαραίτητο μοριακό διακόπτη που συνδέει την υδρόλυση του ATP με την διαδικασία έκκρισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Με μία ποικιλία βιοχημικών δεδομένων που, ενισχύονται και από την πρόσφατη κρυσταλλογραφική ανάλυση της SecA από τα βακτήρια *Bacillus subtilis* και *Mycobacterium tuberculosis*, διαπιστώνουμε ότι η IRA1 υποπεριοχή, διαμέσου απευθείας ή μεγάλου βεληνεκούς αλληλεπιδράσεων σχεδόν με όλες τις υποπεριοχές της SecA, "αισθάνεται" τις αλλαγές στην διαμόρφωση αυτών των περιοχών από την δέσμευση των διαφόρων υποστρωμάτων της διαδικασίας της έκκρισης. Εν συνεχεία η IRA1 υποπεριοχή μεταδίδει αλλαγές στην διαμόρφωση της N-καταλυτικής περιοχής και ρυθμίζει έτσι τις χημικές της δραστηριότητες.

Προτείνουμε τελικά ότι η ενδομοριακή ρύθμιση της SecA από την IRA1-υποπεριοχή, εφαρμόζεται μέσω των πλευρικών "ταλαντώσεων" της τελευταίας από και προς την έλικα της SD-περιοχής, η οποία και δεσμεύεται απευθείας στην N-καταλυτική περιοχή. Μέσω αυτών των "ταλαντώσεων" η IRA1-υποπεριοχή επιδρά στην διαμόρφωση της SD-περιοχής και ρυθμίζει την δέσμευση και απελευθέρωση της από την N-περιοχή. Παρομοίως η διαμοριακή



ρύθμιση της SecA από το εκκρινόμενο πρωτεϊνικό υπόστρωμα, κατά την εκκριτική διαδικασία, αναμένεται να περιλαμβάνει παρόμοιες "ταλαντώσεις" της IRA1-υποπεριοχής από και προς την SSD-περιοχή. Και αυτό γιατί η IRA1-υποπεριοχή εντοπίζεται μεταξύ των SD και SSD περιοχών και είναι ο μοναδικός σύνδεσμος μεταξύ τους. Γενικότερα, ανάλογες δομές έλικας-λούπας-έλικας στις ελικάσες ενδέχεται να συνδέουν τις περιοχές εξειδίκευσης που παρουσιάζουν και να συσχετίζουν την καταλυτική τους δραστικότητα με το μηχανικό έργο που επιτελούν στα εξειδικευμένα υποστρώματα τους.

## Abstract

The cell constitutively synthesizes proteins. 30% of the proteome is extracytoplasmic rendering secretion as a basic process of the cell life. In Bacteria, the experimental system that we use in this thesis, exist a variety of secretory machines (translocases). Transocases with the expenditure of energy, either in the form of ATP or in the form of gradient of protons in the membrane, secretes proteins through the lipid bilayer towards the extracellular space. From all the above secretory machines, only Sec translocase is essential for life, since it secretes the majority of the extracytoplasmic proteins and that is why it is studied in more detail in this analysis.

The basic core of Sec translocase consists of the SecYEG oligomeric pore-like structures in the membrane and the peripheral protein SecA. Although SecA is a processive enzyme “moving” along preprotein secreted substrates, it shares homology with nucleic acid helicases. More specifically it contains a helicase amino terminal catalytic core (N-domain) with two nonhomologous specificity domains protruding from it. While the N-domain performs almost all the chemistries of SecA (ATP binding and hydrolysis, binding of the Signal Petide of the substrate and binding to the membrane at SecYEG), the so called specificity domains help helicases acquire their specific role and in particular assign SecA its task in protein secretion. These are: the Substrate Specificity Domain, SSD, where the preprotein substrate is postulated to bind and the Carboxy terminal C-domain that we have found it regulates the ATPase activity of the N-catalytic domain. The C-domain, through direct binding to the N-catalytic domain, suppresses SecA ATPase when it stays in the cytoplasm and there's no need for energy consumption. Respectively in the absence of a tight association between the N-/C-domains, SecA ATPase is activated without any binding from ligands, mimicking the SecA behaviour in the membrane during translocation, when ATP hydrolysis is needed for secretion to happen. The binding of the C-domain to the N-domain is attributed to the first C-domain substructure of the Scaffold Domain, SD, but we have found also that IRA1 (Intermolecular Regulator of ATP hydrolysis 1) a conserved Helix-Loup-Helix structure in the C-domain is required for its regulatory role. SecA with a short IRA1 deletion becomes a hyperactivated ATPase that is nevertheless incompetent for translocation.

Trying to answer the unresolved question of energy conversion to mechanical work in helicases, that most probably involves cross-talk between the catalytic and specificity domains, we focused on IRA1 mechanism, that is expected to act as a molecular switch essential for coupling ATP hydrolysis to translocation work. A variety of biochemical data supported also by the recently solved structures of SecA from *Bacillus subtilis* and *Mycobacterium tuberculosis*, suggest that through direct or long range conformational communication with almost all SecA subdomains, IRA1 “senses” all the ligands of the translocation reaction. Consequently IRA1 transmits conformational changes to the N-catalytic domain, regulating its properties.

We propose that IRA1 intramolecular regulation is exerted through lateral “oscillations” of IRA1 to and from the helix of the SD that binds directly to the catalytic domain. Through these “oscillations” IRA1 affects SD's conformation and controls its binding and release from the N-domain. Likewise intermolecular regulation of SecA by the preprotein substrates is expected to involve similar “oscillations” of IRA1 to and from the SSD since IRA1 is positioned between the SD and the SSD, and it's the only physical link connecting them. Analogous H-L-H substructures in helicases in general, could potentially connect their specificity domains and couple catalysis to mechanical work.

# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Πρωτεϊνικέςμηχανές-Πρωτεΐνες κινητήρες

**Σχήμα 1:** Σχηματική αναπαράσταση της εκκριτικής διαδικασίας

**Σχήμα 2:** Βακτηριακές εκκριτικές μηχανές

**Σχήμα 3:** Σχηματική αναπαράσταση των συστατικών του βακτηριακού Sec μονοπατιού

### 1.2. Η έκκριση των πρωτεϊνών είναι μία αντίδραση τριών σταδίων

**Σχήμα 4:** Αναπαράσταση των βημάτων ενός γενικευμένου μονοπατιού μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες

#### 1.2.A. *Μεταφορά–στόχευση εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη*

1.2.A.I. Πεπτίδια σηματοδότες (Signal peptides)

1.2.A.II. Ρόλος της “ώριμης περιοχής” της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

1.2.A.III. Ρόλος κυτταροπλασματικών συνοδών πρωτεϊνών στη μεταφορά των εκκρινόμενων υποστρωμάτων στη μεμβράνη

1.2.A.III.α. Μεταφορά-στόχευση στη μεμβράνη, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SRP (Signal recognition particle) και του υποδοχέα της SR (SRP receptor)

**Σχήμα 5:** Μοντέλο μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες

**Σχήμα 6:** Πίνακες όπου αναγράφονται τα συστατικά του SRP και του υποδοχέα του SRP στα θηλαστικά και στα βακτήρια

**Σχήμα 7:** Μοντέλο της μετατόπισης πρωτεϊνών όπως καταλύεται από το ευκαρυωτικό SRP

**Σχήμα 8:** Μοντέλο της καθοδήγησης του συμπλόκου ριβοσώματος-νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνικών αλυσίδων RNC στη μεμβράνη

### 1.2.A.III.β. Μεταφορά-στόχευση με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SecB

**Σχήμα 9:** Μοντέλο μετα,εταφραστικής μεταφοράς πρωτεϊνών από μεμβράνες

**Σχήμα 10:** Μοντέλο για την μεταφορά των προπρωτεϊνών στη μεμβράνη από την SecB

**Σχήμα 11:** Απεικόνιση του τετραμερούς της SecB με μορφή ταινίας σε όψεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 90°

**Σχήμα 12:** Απεικόνιση του μονομερούς της SecB με την μορφή ταινίας

**Σχήμα 13:** Κρυσταλλική δομή της SecB από την *H.Influenza* σε πλευρική όψη (a) και μπροστινή όψη (b)

**Σχήμα 14:** Προτεινόμενη θέση δέσμευσης της SecA στη SecB

### 1.2.B.II. Το εκκριτικό Sec μονοπάτι. Από τα γονίδια στις πρωτεΐνες και την ανασύσταση *in vitro*

#### 1.2.Γ. SecA-ATPάση-Αλληλεπιδράσεις με τους διάφορους υποκαταστάτες

**Σχήμα 15:** Ανασύσταση της διαδικασίας μετατόπισης πρωτεϊνών *in vitro*

**Σχήμα 16:** SecA και υποκαταστάτες

**Σχήμα 17:** Η SecA είναι ένζυμο που ρυθμίζεται τοπολογικά

#### 1.2.Γ.I. Αλληλεπίδραση SecA με ATP

**Σχήμα 18:** Διάγραμμα κορδέλας του ενεργού κέντρου της δομής της *bsSecA* που περιέχει δεσμευμένο Mg-ADP

**Σχήμα 19:** Μοριακές επαφές μεταξύ της SecA και του υποκαταστάτη Mg-ADP

#### 1.2.Γ.II. Αλληλεπίδραση SecA με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα

##### 1.2.Γ.II.α. Πεπτιδία σηματοδότες (Signalpeptides)

**Σχήμα 20:** Δομή του πεπτιδίου σηματοδότη των διαφόρων προπρωτεϊνών

**Σχήμα 21:** Μεθοδολογία ανίχνευσης της περιοχής δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη

**Σχήμα 22:** Δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη προξενεί μία σειρά από αλλαγές στην NBD-περιοχή αλλά και στην SSD-υποπεριοχή της

#### 1.2.Γ.IV. Αλληλεπίδραση SecA με λιπίδια που έχουν την τάση δημιουργίας μη ελασματοειδούς δομής (Nonlamellar-prone Lipids) στη μεμβράνη

**Σχήμα 23:** Δομική αναπαράσταση της διεύθεσης των φωσfolιπιδίων σε μεμβράνες

### 1.2.Δ.Ι. Το SecYEG/Sec61 κανάλι της μεταθετάσης

**Σχήμα 24:** Μοντέλα μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες σε αντιπροσώπους βακτηρίων (*E.coli*) ευκαρυωτικών οργανισμών (*S.cerevisiae*) και αρχαιοβακτηρίων (*M.jannaschii*)

### 1.2.Δ.II. Σύμπλοκο SecYEG

**Σχήμα 25:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της SecYEG στην διπλή μεμβράνη

### 1.2.Ε. Ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια

**Σχήμα 26:** Μονοπάτια μετατόπισης ή ενσωμάτωσης πρωτεϊνών κατά μήκος ή στο εσωτερικό της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων

### 1.2.Ζ. SecA-ATPάση. Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της πρωτεΐνης στην κρυσταλλογραφική της διαμόρφωση

**Σχήμα 27:** Μοντέλο οργάνωσης των διαφόρων περιοχών στο πρωτομέρες της SecA

**Σχήμα 28:** Σχηματική αναπαράσταση της SecA, του N68 και των δραστηριοτήτων ATPάσης που παρουσιάζουν στους 37°C

**Σχήμα 29:** Ιδιότητες SecAΔIRA1

**Σχήμα 30:** Χάρτης της SecA όπου αναγράφονται τα συντηρημένα μοτίβα τα οποία καθορίζονται όπως περιγράφεται από τους Bailey and Gribskov

**Σχήμα 31:** Στρατηγική με την οποία η SecA διαιρέθηκε σε μικρότερες περιοχές με διακριτές λειτουργίες

**Σχήμα 32:** Σχηματικό μοντέλο περιοχών στη SecA

**Σχήμα 33:** Κινητικές περιοχές SecA και ελικασίων

**Σχήμα 34:** Κρυσταλλική δομή της SecA από το *B.subtilis* χρωματισμένη ανάλογα με την οργάνωση των διάφορων περιοχών

**Σχήμα 35:** Περιοχή δέσμευσης του νουκλεοτιδίου

**Σχήμα 36:** Δομικά γνωρίσματα της αμινοτελικής περιοχής της SecA

**Σχήμα 37:** Η SecA διμερίζεται μέσω της C-περιοχής της

**Σχήμα 38:** Κρυσταλλική δομή της ATPάσης της SecA από το *M. tuberculosis*

### 1.2.Ζ.Ι. Διερεύνηση των αλλαγών της διαμόρφωσης της SecA πρωτεΐνης απουσία και παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες

**Σχήμα 39** Φθορισμός της SecA έναντι της θερμοκρασίας

**Σχήμα 40:** Σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της SecA παρουσία ADP

**Σχήμα 41:** Φθορισμός τρυπτοφανών στην *E.coli*, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων ADP

**Σχήμα 42:** Το ADP προκαλεί αύξηση στην θερμοκρασία που λιώνει τόσο η SecA όσο και το N68

## 1.2.Z.II. Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού της SecA

- Σχήμα 43:** Μεταφορά ενέργειας φθορισμού μεταξύ της CMmal- και της FMmal- σηματοδοτημένης SecA
- Σχήμα 44:** Μοντέλα δράσης των ελικασών
- Σχήμα 45:** Καθορισμός του σχήματος της SecA σε διάλυμα
- Σχήμα 46:** Αναπαράσταση του διμερούς της SecA όπως προκύπτει μετά από εφαρμογή κρυσταλλογραφικής συμμετρίας
- Σχήμα 47:** Σχηματισμός διμερούς από την SecA ATPάση
- Σχήμα 48:** Απεικόνιση του σχήματος του τετραμερούς N68 από δεδομένα με την μέθοδο SAXS
- Σχήμα 49:** Ανασύσταση της *mtSecA* μετά από ανάλυση μοναδικών κομματιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία
- Σχήμα 50:** Απεικόνιση δομών της SecA παρουσία λιπιδικών μονοστοιβάδων *E. coli*

## 1.2.H. Η μηχανή της μεταθετάσης επί το έργο

- Σχήμα 51:** Στάδια κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών μέσω του βακτηριακού Sec μονοπατιού
- Σχήμα 52:** Κυκλικό μοντέλο εισαγωγής και εξαγωγής της SecA στη μεμβράνη καθώς δεσμεύεται και υδρολύεται ATP αντίστοιχα

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Σημειακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη

- Σχήμα 53:** Χάρτης της SecA, στον οποίο αναγράφονται οι διάφορες περιοχές από τις οποίες αποτελείται ο DEAD (N68) κινητήρας, ενώ σημειώνεται και το IRA1 στοιχείο της C-περιοχής
- Σχήμα 54:** Δομή της IRA1–περιοχής από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της *bsSecA*
- Σχήμα 55:** Κεντρική τοποθέτηση του IRA1 ρυθμιστικού στοιχείου στην κρυσταλλογραφική δομή της διμερούς *bsSecA* (A). Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων δομών της *bsSecA* (B).
- Σχήμα 56:** Κρυσταλλογραφική και σχηματική αναπαράσταση της διμερούς *bsSecA* A) και *mtSecA*
- Σχήμα 57:** Η IRA1-περιοχή επικοινωνεί σχεδόν μ' όλες τις περιοχές της SecA, αλλά διαθέτει και περιοχές που βλέπουν στον διαλύτη, όπως η H1

### 3.2. Λειτουργική ανάλυση

#### 3.2.A. Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την κατάλυση της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες

- Σχήμα 58:** Γενετική συμπληρωματικότητα
- Σχήμα 59:** Φάσμα υπεριώδους κυκλικού διχρωϊσμού της SecA και δύο τυχαίων IRA1

μεταλλαγών, της SecAW775A και της SecAL785R

**Σχήμα 60:** A) Σχηματική ανάλυση της πειραματικής διαδικασίας μετατόπισης πρωτεϊνών *in vitro*. B) Μετατόπιση πρωτεϊνών *in vitro*

**3.2.B.** *Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την αποδοτική υδρόλυση ATP από την SecA*

**Πίνακας I:**Κινητικές σταθερές στάσιμης κατάστασης (Steady-state Kinetic constants) της δραστικότητας ATPάσης των SecAIRA1 μεταλλαγών

**Σχήμα 61:**Δραστικότητα ATPάσης των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών

**3.2.Γ.** *Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει τον ρυθμό ανακύκλωσης νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα*

**Σχήμα 62:**Μέτρηση της αλλαγής του φθορισμού του φθορίζοντος ATP παραγωγού MANT-ADP παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων SecA (A), N68 (B) και SecAIRA1 (Γ), σε σχέση με τον φθορισμό του απουσία πρωτεΐνης τόσο στους 4°C (ανοιχτοί κύκλοι) όσο και στους 37°C (κλειστοί κύκλοι)

**Πίνακας II:**Σταθερές πρόσδεσης (Binding constants) της SecA και παραγώγων της για το MANT-ADP

**3.2.Δ.** *Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση του DEAD κινητήρα από το ADP*

**Πίνακας III:**Θερμοκρασίες θερμικής αποδιάταξης (melting points) των SecAIRA1 μεταλλαγών

**Σχήμα 63:** Καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της SecAIRA1 πρωτεΐνης απουσία και παρουσία ADP

**Σχήμα 64:** Καμπύλη θερμικής αποδιάταξης των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών απουσία και παρουσία ADP

**Σχήμα 65:** Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού υπεριώδους (far-UV CD) για τις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες στους 4, 15, 24 και 37°C

**3.2.Ε.** *Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση και της C-περιοχής της SecA από το ADP*

**Σχήμα 66:** Απεικόνιση τρυπτοφανών στην ecSecA

**Σχήμα 67:** Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της SecAWT και του N68, που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες

**Σχήμα 68:** Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες

**Πίνακας IV:**Σημεία μετάπτωσης (apparent T<sub>m</sub>) της θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών, η οποία παρακολουθείται μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών σε διάλυμα Mg<sup>2+</sup> +/-ADP

**3.2.Ζ.** *Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την δέσμευση του DEAD κινητήρα για το πεπτιδίο σηματοδότη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και την θέση SecYEG στη μεμβράνη*

**Σχήμα 69:** Δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες

**Σχήμα 70:** Καμπύλες δέσμευσης της SecA, N68, C34 και της SecAΔIRA1 πρωτεΐνης στο σύμπλοκο SecYEG

**Πίνακας V:** Σταθερές διάστασης (Dissociation Constants) της SecA και των διάφορων μεταλλαγμένων παραγώγων της για το SecYEG σύμπλοκο

### 3.3. Φυσική ανάλυση

#### 3.3.A. *Η C-περιοχή της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα*

**Σχήμα 71:** Περιοριστική θρυψινόλυση της SecA και του N68 στους 4°C

**Σχήμα 72:** Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης της SecAWT απουσία (A) και παρουσία ADP (B) με θρυψίνη στους 4°C στην κρυσταλλογραφική δομή της bsSecA

**Σχήμα 73:** Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης του N68 απουσία (A) και παρουσία ADP (B) με θρυψίνη στους 4°C στην κρυσταλλογραφική δομή του N68 της bsSecA

#### 3.3.B. *Στους 37°C η ρύθμιση του DEAD κινητήρα από την C-περιοχή περιορίζεται*

**Σχήμα 74:** Περιοριστική θρυψινόλυση της SecA και του N68 στους 37°C

**Σχήμα 75:** Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης της SecA (A) και του N68 (B) απουσία και παρουσία ADP με θρυψίνη (37°C) στην κρυσταλλογραφική δομή της bsSecA

#### 3.3.Γ. *Η IRA1 περιοχή της C-περιοχής της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα*

**Σχήμα 76:** Περιοριστική θρυψινόλυση των SecAIRA1 πρωτεϊνών

**Σχήμα 77:** Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης των SecAIRA1 πρωτεϊνών απουσία (A) και παρουσία ADP (B) με θρυψίνη (4°C) στην κρυσταλλογραφική δομή της bsSecA

**Σχήμα 78:** Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και των υπολοίπων SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4°C

#### 3.3.Δ. *Οι SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν υφίστανται την ενδόθερμη μετάπτωση της SecAWT κατά την μετάβαση από τους 4°C στους 37°C.*

**Σχήμα 79:** Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και τριών αντιπροσωπευτικών SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4°C και στους 37°C.

#### 3.3.E. *Φυσική βάση της διαμόρφωσης και της λειτουργίας του DEAD κινητήρα από τον IRA1 διακόπτη*

**Σχήμα 80:** Ανασύσταση διμερούς SecA από καθαρισμένα N68 και C34IRA1 πεπτίδια

**Σχήμα 81:** Καταστολή της ATPάσης της N-περιοχής από τα C34IRA1 πεπτίδια



### **3.3.Z.** *Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών και υποπεριοχών της SecA*

#### **3.3.Z.I.** *Η C-περιοχή της SecA επικοινωνεί με τις NBD, IRA2 και SSD-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα*

**Σχήμα 82:** Αναπαράσταση της κρυσταλλογραφικής δομής της *bsSecA* με την μορφή σφαιρών

**Σχήμα 83:** Έλεγχος της δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ της C-περιοχής της SecA και των διάφορων υποπεριοχών του N68

#### **3.3.Z.II.** *Οι NBD και IRA2-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα επικοινωνούν μεταξύ τους*

**Σχήμα 84:** Ανασύσταση της περιοχής του DEAD κινητήρα από ποικιλία αμινοτελικών πεπτιδίων του, με την δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που πρωτοαναφέρθηκε στο σχήμα 32

#### **3.3.H.** *Οι SecAIRA1 μεταλλαγές διαταράσσουν την επικοινωνία της C-περιοχής τους με τις NBD και IRA2 υπομονάδες του DEAD κινητήρα*

**Σχήμα 85:** Αλληλεπίδραση των C34IRA1 πεπτιδίων με τις διάφορες υποπεριοχές του DEAD κινητήρα

#### **3.3.Θ.** *Επίδραση των SecAIRA1 μεταλλαγών στην επικοινωνία της C-περιοχής με την SSD-περιοχή του DEAD κινητήρα*

#### **3.3.I.** *Η IRA1-περιοχή λειτουργεί μόνο παρουσία της C-περιοχής της SecA*

**Σχήμα 86:** Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της C-περιοχής της *bsSecA* (Hunt et al., 2002) και κατ' αναλογία της *ecSecA*, στην οποία διακρίνονται οι τέσσερις περιοχές της

**Σχήμα 87:** Χάρτης των διαφόρων παραγώγων του C34.

**Σχήμα 88:** Μελέτη της δευτεροταγούς δομής των διαφόρων παραγώγων του C34 με την μελέτη των φασμάτων με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (Far-UV CD).

**Σχήμα 89:** Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των παραγώγων του C34 με τον DEAD κινητήρα.

**Σχήμα 90:** Διερεύνηση της καταστολής της ATPάσης του DEAD κινητήρα από τα διάφορα παράγωγα του C34.

**Σχήμα 91:** Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των διαφόρων παραγώγων του C34 με ολόκληρο τον DEAD κινητήρα και τις διάφορες υποπεριοχές του.

**Σχήμα 92:** Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των διαφόρων παραγώγων του C34 με τον DEAD κινητήρα με χρωματογραφία αποκλεισμού.

**Σχήμα 93:** Διερεύνηση της επίδρασης των διαφόρων παραγώγων του C34 στην ATPάση του DEAD κινητήρα.

#### **3.3.K.** *Η IRA1-περιοχή ελέγχει την διαμόρφωση των περιοχών SD, WD και της CT-περιοχής*

**Σχήμα 94:** Θερμικό φάσμα C34 και παραγώγων

**Πίνακας VI:** Θερμική αποδιάταξη των διαφόρων παραγώγων του C34 (σε διάλυμα  $Mg^{2+}$ ), που παρακολουθείται μέσω του φθορισμού των τρυπτοφανών τους

- Σχήμα 95:** Περιοριστική πρωτεόλυση των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων
- Σχήμα 96:** Μελέτη της δευτεροταγούς δομής των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων με την μελέτη των φασμάτων με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (Far-UV CD)
- Σχήμα 97:** Θερμικό φάσμα C34 και C34IRA1 παραγώγων
- Πίνακας VII:** Αναγραφή των σημείων μετάπτωσης της θερμικής αποδιάταξης, παρακολουθούμενης μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών, για τα διάφορα C34IRA1 μεταλλαγμένα πεπτιδία (σε διάλυμα  $Mg^{2+}$ )
- Σχήμα 98:** Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της SecAWT και της SecAR792A, που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες
- Σχήμα 99:** Απεικόνιση των υποπεριοχών του C34 πεπτιδίου (C-περιοχή) και της αλληλουχίας του στην *E.coli*
- Πίνακας VIII:** Σημεία μετάπτωσης (apparent Tm) της θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών, η οποία παρακολουθείται μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών σε διάλυμα EDTA
- Σχήμα 100:** Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του E802AC34 της *ecSecA* κατ' αναλογία με την δομή της *bsSecA*
- Σχήμα 101:** Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του E802AC34 της *ecSecA* κατ' αναλογία με την δομή της *bsSecA*

### 3.3.Α. Η IRA1-περιοχή ελέγχει τον διμερισμό της SecA

- Σχήμα 102:** Μελέτη των διαφόρων παραγώγων της C34-περιοχής με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντοπισμό
- Σχήμα 103:** Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διαφόρων παραγώγων της C34-περιοχής με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση
- Σχήμα 104:** Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διαφόρων παραγώγων της C34-περιοχής
- Σχήμα 105:** Μελέτη του ολιγομερισμού των διαφόρων παραγώγων της C34-περιοχής μετά από χημική διασύνδεση με DSP.
- Σχήμα 106:** Ρόλος της IRA1-περιοχής στον ολιγομερισμό της C34-περιοχής της SecA
- Σχήμα 107:** Πιθανές επιδράσεις της μεταλλαγής E802A της IRA1-περιοχής στον διμερισμό της SecA
- Σχήμα 108:** Ρόλος της IRA1-περιοχής στον ολιγομερισμό της SecA
- Σχήμα 109:** Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών

## 3.4. Δομική ανάλυση

### 3.4.A. Σημειακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη

- Σχήμα 110:** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων του IRA1 που υφίστανται σημειακές μεταλλαγές στην *ecSecA*, τόσο στην δομή της *bs* (i) *mtSecA* (iii), με τις διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης τόσο του πρώτου [SecA(α)], όσο και του δεύτερου μονομερούς [SecA(β)].
- Σχήμα 111:** Οι διάφορες IRA1 μεταλλαγές διαιρούνται σε τέσσερις τάξεις με βάση τις κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις τους με τέσσερις περιοχές της SecA.
- Πίνακας IX:** Στον πίνακα σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων της IRA1-περιοχής, που μεταλλάχθηκαν στην παρούσα διατριβή, με τις διάφορες περιοχές στην διμερή SecA

### 3.4.B. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της IRA1-περιοχής και των υπολοίπων περιοχών της SecA

- Σχήμα 112:** Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις διάφορες περιοχές στο ίδιο μονομερές SecA(α) αλλά και με περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς SecA(β).

Πίνακας Χ: Στον πίνακα σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις της IRA1-περιοχής με τις διάφορες περιοχές στην διμερή SecA.

**Σχήμα 113:** Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις διάφορες περιοχές στο ίδιο μονομερές SecA(α) αλλά και με περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς SecA(β)

### 3.4.Γ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών της SecA

**Σχήμα 114:** Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του μονομερούς της *bs* και της *mtSecA*

**Σχήμα 115:** Απεικόνιση του κρυσταλλογραφικού διμερούς της *bsSecA* (A), και του κρυσταλλογραφικού διμερούς της *mtSecA* (B), με χρωματισμό των διαφόρων περιοχών όπως έχει γίνει στο σχήμα 35 (ΕΙΣΑΓΩΓΗ) και στο σχήμα 57.

**Σχήμα 116:** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων περιοχών της μονομερούς *bsSecA* (α-στ) και της μονομερούς *mtSecA* (ι) όπως προκύπτουν από την μελέτη των κρυσταλλογραφικών δομών τους (Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003).

**Σχήμα 117:** Χρωματική απεικόνιση των περιοχών των δύο μονομερών στην *bsSecA* (A) και *mtSecA* (B) που έρχονται σε επαφή κατά τον διμερισμό.

**Σχήμα 118:** Μεγένθυση των σκιασμένων περιοχών διμερισμού της *bsSecA* (A) και της *mtSecA* (B) από το προηγούμενο σχήμα 119. Στα (Γ) και (Δ) γίνεται σχηματική αναπαράσταση των παραπάνω σχημάτων.

**Σχήμα 119:** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων περιοχών της διμερούς *bsSecA*, όπως προκύπτουν από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής (Hunt et al., 2002), η οποία αποτελείται από α και β πρωτομερή.

**Σχήμα 120:** Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων περιοχών της διμερούς *mtSecA*, όπως προκύπτουν από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής (Sharma et al., 2003), η οποία αποτελείται από α και β πρωτομερή.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

**Σχήμα 121:** Ο IRA1 διακόπτης μαζί με το δεύτερο μισό της έλικας της SD-περιοχής με την οποία αλληλεπιδρά (διακρίνονται τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα) σχηματίζει δεσμίδα τριών ελίκων.

**Σχήμα 122:** Επικοινωνία της SD(α) με την IRA1(α)-περιοχή.

**Σχήμα 123:** Η SSD-περιοχή περιβάλλει την IRA1-περιοχή.

**Σχήμα 124:** Υποθετικό μοντέλο της δέσμευσης του προπρωτεϊνικού υποστρώματος μεταξύ των δύο “μοχλών” του DEAD κινητήρα, της SSD και της C-περιοχής.

**Σχήμα 125:** SSD και IRA1 περιοχές

**Σχήμα 126:** Επικοινωνία της SD(β) υποπεριοχής και με τα δύο IRA1 στοιχεία της διμερούς SecA

**Σχήμα 127:** Διευθέτηση της έλικας της SD(β) υποπεριοχής

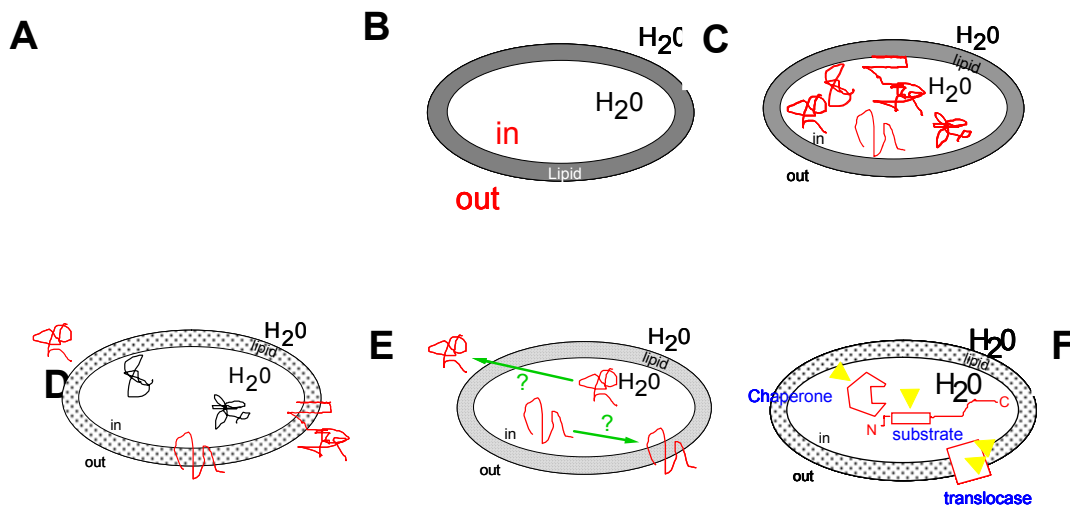
**Σχήμα 128:** Μοντέλο ταλάντωσης του IRA1 διακόπτη προς και από την έλικα της SD-υποπεριοχής.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

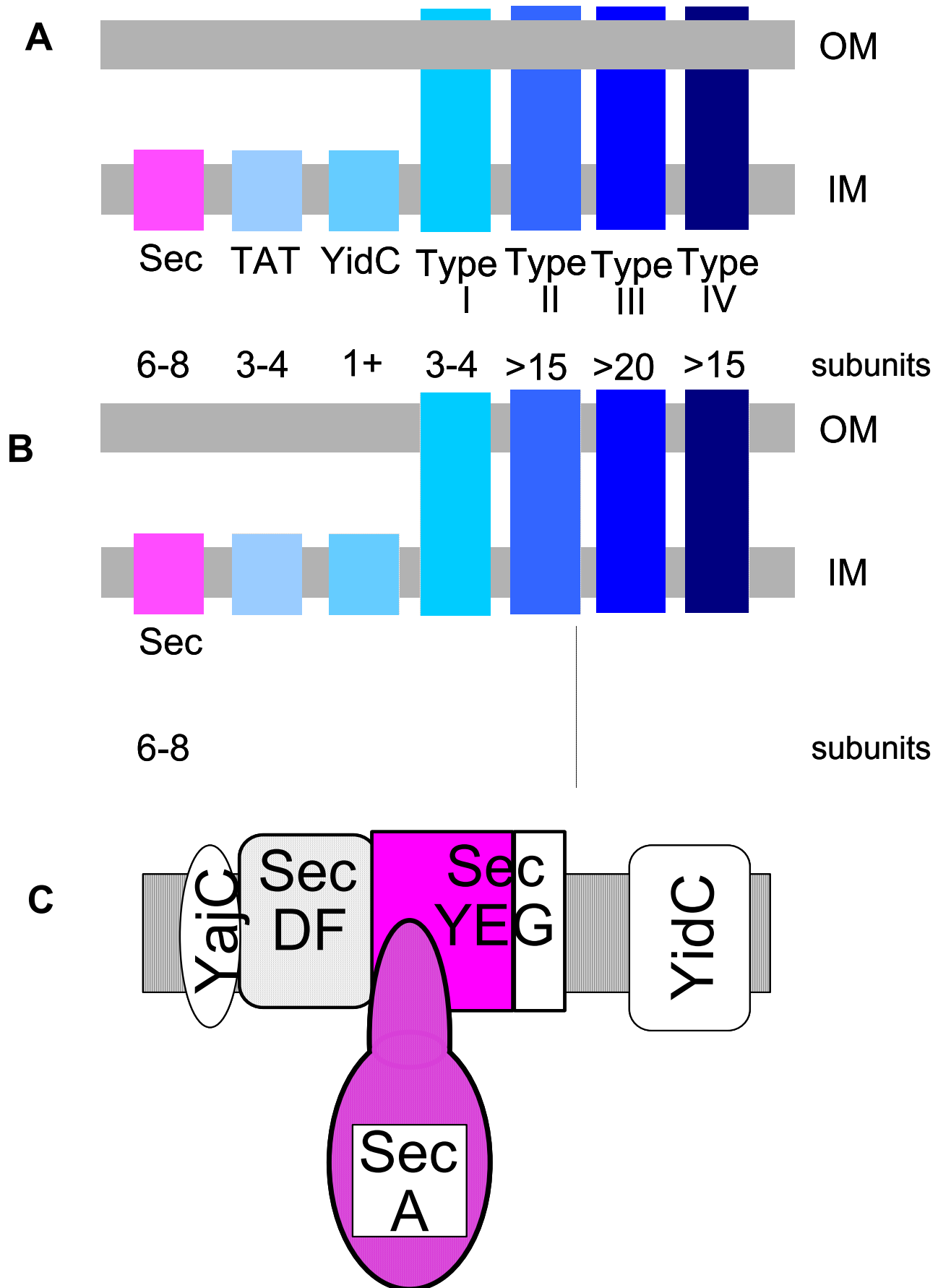
## 1.1. Πρωτεϊνικές μηχανές-Πρωτεΐνες κινητήρες.

Γνωρίζουμε ότι το κύτταρο (σχήμα 1B) ορίζεται από μία λιπιδική διπλοστοιβάδα που το διαχωρίζει και το προστατεύει από το εξωτερικό του περιβάλλον (σχήμα 1A). Στο εσωτερικό του συνθέτει μία σειρά πρωτεϊνών (σχήμα 1C) από τις οποίες το 30% καταλήγει στο εξωτερικό περιβάλλον (σχήμα 1D). Η μεταφορά/έκκριση αυτών των πρωτεϊνών από το κύτταρο είναι απαραίτητη για τη ζωή. Οι πρωτεΐνες όμως είναι μεγάλα μόρια με φορτία και υδρόφοβες περιοχές που φυσιολογικά αναδιπλώνονται σε χιλιοστά του δευτερολέπτου ή δευτερόλεπτα. Πως λοιπόν μεταφέρονται μέσα από την λιπιδική διπλοστοιβάδα (σχήμα 1E); Πρώτα απ' όλα διαθέτουν μία αλληλουχία σινιάλο στο αμινοτελικό τους άκρο που τις ταυτοποιεί ως εκκριτικές πρωτεΐνες και τις διαφοροποιεί από τις πρωτεΐνες που μένουν στο κύτταρο (σχήμα 1F). Εν συνεχεία με τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών του κυττάρου αναστέλλεται η γρήγορη απόκτηση της τριτοταγούς διαμόρφωσης τους που μπλοκάρει την διάσχιση της μεμβράνης, ενώ η μεταθεσή τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια μοριακών μηχανών (αντλίες, κανάλια) που δαπανούν ενέργεια (π.χ υδρόλυση ATP) για να προωθήσουν τις πρωτεΐνες μέσα από τη μεμβράνη (σχήμα 1F).

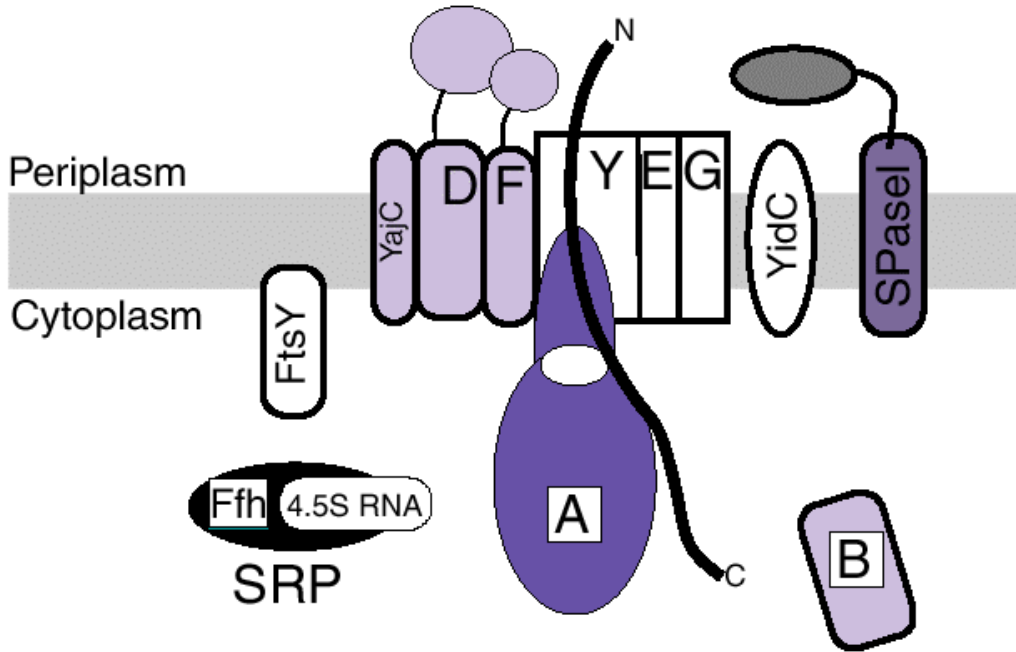


Σχήμα 1 : Σχηματική αναπαράσταση της εκκριτικής διαδικασίας. Το κύτταρο ορίζεται από την λιπιδική διπλοστοιβάδα. Στο εσωτερικό του συντίθεται σωρεία πρωτεϊνών που εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον με την βοήθεια μοριακών μηχανών μεταθετάσης (translocases).

Το ευκαρυωτικό κύτταρο περιέχει μία μεγάλη ποικιλία συστημάτων μετάθεσης. Έτσι η πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων πραγματοποιείται από μεγάλα, αλλά πολύ ειδικά σύμπλοκα πυρηνικού πόρου (Gölich and Matlej, 1996). Η έκκριση πρωτεϊνών από την άλλη ξεκινά με την σύγχρονη με τη μετάφραση μετατόπιση κατά μήκος της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) των πρωτεϊνών αυτών από σύμπλοκα ριβοσώματος-νεοσυντιθέμενης αλυσίδας που δεσμεύονται σ' ένα πρωτεϊνικό κανάλι που καλείται translocon (Walter and Lingappa, 1986; Walter and Johnson, 1994; Raparport et al., 1996). Αφού οι πρωτεΐνες μεταφερθούν στην κοιλότητα του ER, ταξινομούνται μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος κυστιδιακής μεταφοράς που συνδέει το ενδοπλασματικό δίκτυο με το σύστημα Golgi, με τ' άλλα συστατικά του ενδομεμβρανικού συστήματος, και με την πλασματική μεμβράνη (Palade, 1975; Rothman and Wieland, 1994; Schekman and Orci, 1996). Οι πρωτεΐνες που φέρουν οργανοειδικά σήματα στόχευσης, εισάγονται από εξιδεικευμένα συστήματα μετατόπισης πρωτεϊνών. Τέτοια συστήματα εντοπίζονται στα υπεροξυσώματα (Subramani, 1996; Erdmann et al., 1997), αλλά και στα μιτοχόνδρια (Schatz, 1996; Neupert, 1997;), και στους χλωροπλάστες (Schnell, 1995; Heins and Soll, 1998). Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες διαθέτουν επίσης συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών στην εσωτερική τους μεμβράνη που αποτελούν απομεινάρια της βακτηριακής προέλευσης τους (Schatz and Dobberstein, 1996; Settles and Martiensen, 1998). Μοριακές μηχανές μεταθετάσης όμως εντοπίζονται και στα βακτήρια (σχήμα 2A). Απ' όλες αυτές τις μεταθετάσεις μόνο η Sec (Wickner et al., 1991) είναι απαραίτητη για τη ζωή του βακτηριακού κυττάρου (σχήμα 2B), καθώς εκκρίνει το σύνολο σχεδόν των πρωτεϊνών του



Σχήμα 2: Βακτηριακές εκκριτικές μηχανές. Α) Απαρίθμηση των διαφόρων τύπων βακτηριακών εκκριτικών μηχανών, του αριθμού των υπομονάδων τους και του εντοπισμού τους σε μία ή δύο μεμβράνες. Β) Το Sec είναι το μοναδικό σύστημα έκκρισης που είναι απαραίτητο στα βακτήρια. C) Βασικά συστατικά (μωβ χρώμα) και μη, του Sec μονοπατιού.



Σχήμα 3: (Economidou 2000). Σχηματική αναπαράσταση των συστατικών του βακτηριακού Sec μονοπατιού. Οι πρωτεΐνες που απαιτούνται για την έκκριση σημειώνονται με κεφαλαία γράμματα, A, Y, E, G, D, και F για τις SecA, SecY, SecE, SecG, SecD και SecF αντίστοιχα. Φαίνονται ακόμα η πρωτεΐνη συνοδός SecB, το SRP που αποτελείται από δύο υπομονάδες, το 4.5S RNA και την GTPase Ffh, και τον υποδοχέα του στη μεμβράνη FtsY, την πεπτιδάση οδηγό SPase1, και την YidC που βαπτομονώνεται σαν σύμπλοκο με τον πυρήνα της μεταθετάσης, αλλά μπορεί να λειτουργεί και σαν ανεξάρτητος εξαγωγέας μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το παραπάνω μονοπάτι είναι χαρακτηριστικό των Gram αρνητικών βακτηρίων.

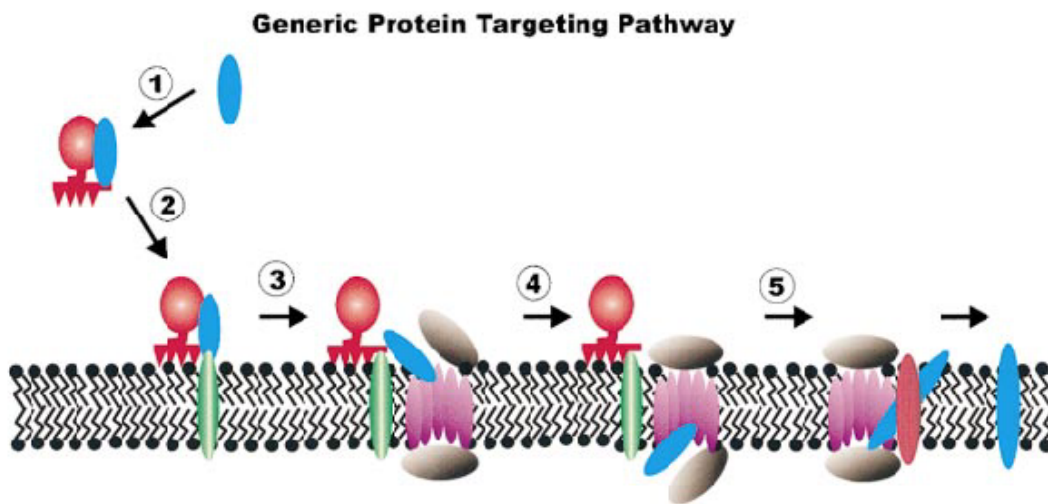
του κυττάρου. Η Sec μεταθετάση (σχήμα 2C, 3) περιλαμβάνει τις υπομονάδες SecA, που είναι η ATPάση του συστήματος, το διαμεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG που αποτελεί το κανάλι μέσα από το οποίο διέρχονται οι πρωτεΐνες από την μεμβράνη, τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες SecDFYajC καθώς και την YidC απαραίτητη για την μεταφορά από την μεμβράνη μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες καθοδηγούνται στη μεμβράνη από πρωτεΐνες συνοδούς όπως είναι η τετραμερής SecB, που είναι εντελώς εξειδικευμένη για την έκκριση (η SecB χρησιμοποιείται στα Gram αρνητικά βακτήρια ενώ στα Gram θετικά χρησιμοποιούνται άλλοι παράγοντες, όπως η CsaA πρωτεΐνη), ή από το SRP (Signal Recognition Particle) και τον μεμβρανοσυνδεδεμένο υποδοχέα του SR (SRP-Receptor) (σχήμα 6). Μετά την μετατόπιση τα πρωτεϊνικά υποστρώματα υφίστανται ωρίμανση κατά την οποία συμβαίνει και αποκοπή του πεπτιδίου σηματοδότη από την πεπτιδάση οδηγό Leader Peptidase1 (SPase1) στην *trans* πλευρά της μεμβράνης. Στα Gram θετικά βακτήρια υπάρχουν αρκετές διαφορετικές πεπτιδάσες οδηγοί. Οι εντελώς απαραίτητες υπομονάδες του συστήματος είναι η SecA και το σύμπλοκο SecYE (σχήμα 2C) για τις οποίες θα γίνει και μεγαλύτερος λόγος παρακάτω. Στην περίπτωση των Gram αρνητικών βακτηρίων αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης, οι πρωτεΐνες είτε μένουν στο περίπλασμα, είτε μεταφέρονται στην εξωτερική μεμβράνη (Pugsley, 1993; Duong et al., 1997; Danese and Silhavy, 1998). Στην περίπτωση αυτή μιλάμε για το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (general secretory pathway), αλλά ο βακτηριακός κυτταρικός φάκελος διαθέτει μία πληθώρα συστημάτων μετατόπισης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (σχήμα 2A), εξειδικευμένων για την έκκριση συγκεκριμένων τάξεων πρωτεϊνών. Έτσι όπως θα αναφέρουμε παρακάτω έχει περιγραφεί ένα σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών που δεσμεύουν οξειδοαναγωγικούς συμπαραγόντες (Berks et al., 2000). Τα Gram αρνητικά βακτήρια συχνά εκκρίνουν ένζυμα αποικοδόμησης, ή στην περίπτωση των παθογόνων βακτηρίων εκκρίνονται ιογόνοι παράγοντες και τοξίνες μέσω μονοπατιών που μπορεί να διασχίζουν και τις δύο μεμβράνες, εσωτερική και εξωτερική (Binet et al., 1997; Hueck, 1998).

## 1.2. Η έκκριση των πρωτεϊνών είναι μία αντίδραση τριών σταδίων.

Οι κυτταρικές διαδικασίες είναι περίπλοκες χημικές αντιδράσεις, πολλών σταδίων, όπου κάθε βήμα προσδιορίζει τους βαθμούς ελευθερίας που επιτρέπονται στα επόμενα στάδια της αντίδρασης. Ένας από τους πρωταρχικούς στόχους των γενετικών και βιοχημικών αναλύσεων, είναι η ανάλυση των παραπάνω αντιδράσεων, σε καθορισμένες διαδοχικές απλούστερες υποαντιδράσεις, οι οποίες και μπορούν να μελετηθούν ευκολότερα. Έτσι, με τη βοήθεια των παραπάνω εργαλείων, το μονοπάτι Sec μπορεί να περιγραφεί σε τρία διακριτά στάδια (Economidou 1999):

- I) Μεταφορά- στόχευση εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη
- II) Διαπέραση της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας από τις εκκριτικές πρωτεΐνες
- III) Ωρίμανση-απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Μία συνοπτική περιγραφή της μεταφοράς των πρωτεϊνών μέσα από τη μεμβράνη αποτυπώνεται με μία σειρά βημάτων που παρουσιάζονται στο σχήμα 4 (Andrews, 2000). Κατά το πρώτο βήμα το υπόστρωμα (μπλε χρώμα) αναγνωρίζεται από μία πρωτεΐνη που



Σχήμα 4: (Andrews, 2000). Αναπαράσταση των βημάτων ενός γενικευμένου μονοπατιού μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες (περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο).

δεσμεύει το πεπτιδίο σηματοδότη (κόκκινο χρώμα) μετά το τέλος ή κατά τη διάρκεια της μετάφρασης στο κυτταρόπλασμα. Εάν η αναγνώριση συμβαίνει ταυτόχρονα με τη μετάφραση, τότε το υπόστρωμα αναγνωρίζεται σαν σύμπλοκο ριβοσώματος-πολυπεπτιδίου. Για απλούστευση πάντως στο σχήμα δεν φαίνονται τα ριβοσώματα. Σ' ένα δεύτερο βήμα το υπόστρωμα κατευθύνεται προς την κατάλληλη μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης μ' έναν ειδικό υποδοχέα στη μεμβράνη (πράσινο χρώμα). Είναι δυνατόν και η δέσμευση στα λιπίδια να συντελεί στην δέσμευση στη μεμβράνη. Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια μεταφοράς του υποστρώματος στη μεμβράνη και/ή κατά τη μεταφορά στη μεταθετάση (μοβ χρώμα), το πεπτιδίο σηματοδότης υφίσταται μία δεύτερη διαδικασία αναγνώρισης. Στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών τα βήματα 1-3 συντελούνται στην μεταθετάση της εξωτερικής τους μεμβράνης, αλλά διαλυτές πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη μεταφορά των υποστρωμάτων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης. Σ' ένα τρίτο στάδιο τα υποστρώματα μεταφέρονται από την πρωτεΐνη που δεσμεύει το πεπτιδίο σηματοδότη στην μεταθετάση μ'έναν μηχανισμό που δεν είναι πλήρως γνωστός στις περισσότερες μεμβράνες, αλλά σε κάθε περίπτωση διατηρείται ο φραγμός διαπερατότητας της μεμβράνης (γκρι χρώμα), όπως το ίδιο συμβαίνει και κατά διαδικασία μεταφοράς του υποστρώματος μέσα από τη μεμβράνη. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διακινούνται μέσα από τη μεμβράνη μ' ένα επίσης όχι απόλυτα διευκρινισμένο μηχανισμό. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες από την άλλη, σ' ένα πέμπτο στάδιο, ενδέχεται να κατευθύνονται στη μεμβράνη είτε με τις ίδιες πρωτεΐνες όπως



και τα εκκρινόμενα υποστρώματα, είτε μέσω μιας σειράς υποδοχέων που δουλεύουν παράλληλα. Παρόλα αυτά όμως οι δύο παραπάνω τύποι υποστρωμάτων φαίνεται ότι διέρχονται από πολλές μεμβράνες μέσα από τις ίδιες πρωτεΐνες πόρους. Αντίθετα η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων διαθέτει διαφορετικές μεταθετάσες για τις διαμεμβρανικές και τις πλήρως διερχόμενες από τη μεμβράνη πρωτεΐνες. Τέλος επιπρόσθετα στάδια αναγνώρισης και επιπλέον πρωτεΐνες (καφέ χρώμα) εμπλέκονται στην μεταφορά πρωτεϊνών έξω από τον υδατικό πόρο της μεταθετάσης και μέσα στην λιπιδική διπλοστοιβάδα.

## **1.2.A. Μεταφορά- στόχευση εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη**

### **1.2.A.I. Πεπτίδια σηματοδότες (Signal peptides)**

Αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο αλληλεπίδρασης της SecA με πεπτίδια σηματοδότες.

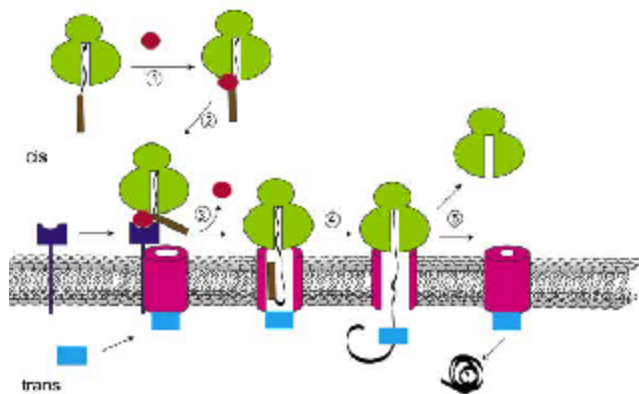
### **1.2.A.II. Ρόλος της “ώριμης” περιοχής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας**

Αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο αλληλεπίδρασης της SecA με την ώριμη περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

### **1.2.A.III. Ρόλος κυτταροπλασματικών συνοδών πρωτεϊνών στην μεταφορά των εκκρινόμενων υποστρωμάτων στη μεμβράνη**

#### **1.2.A.III.a. Μεταφορά-στόχευση στη μεμβράνη, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SRP (Signal recognition particle) και του υποδοχέα της SR (SRP receptor)**

Η Sec μεταθετάση αποτελεί τόπο συνάντησης πολλαπλών μονοπατιών μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Μ' αυτά τα μονοπάτια, σωρεία διαφορετικών τάξεων πρωτεϊνών έρχονται στη μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης με πολλαπλούς υποδοχείς. Στους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν διαπιστωθεί δύο συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών στη Sec μεταθετάση. Το ένα απ' αυτά συμβαίνει σύγχρονα με τη μετάφραση και είναι το SRP μονοπάτι, ενώ το άλλο συμβαίνει με το πέρας της μετάφρασης και δεν χρειάζεται SRP (Johnson and van Waes, 1999). Το SRP μονοπάτι παρουσιάζει μεγάλη συντηρητικότητα και απαντάται σ' όλα τα κύτταρα (Keenan et al., 2001). Έτσι στα ευβακτήρια χρησιμοποιείται για την καθοδήγηση μεμβρανικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη, προκειμένου να αποφευχθεί η έκθεση των υδρόφοβων υποστρωμάτων στο κυτταρόπλασμα. Στους χλωροπλάστες, μία ομόλογη SRP πρωτεΐνη συμμετέχει στην καθοδήγηση των υδρόφοβων συστατικών του φωτοσυνθετικού συμπλόκου κατακράτησης φωτός της θυλακοειδούς μεμβράνης, τόσο σύγχρονα όσο και μετά τη μετάφραση. Τέλος στα θηλαστικά το SRP μονοπάτι είναι το κύριο μονοπάτι μεταφοράς στο Sec61 κανάλι τόσο των νεοσυντιθέμενων εκκριτικών όσο και των νεοσυντιθέμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών. Συνοπτικά η σύγχρονη με τη μετάφραση καθοδήγηση των νεοσυντιθέμενων εκκριτικών αλυσίδων στη μεμβράνη φαίνεται στο σχήμα 5 (Schnell and Hebert, 2003) .



Η παραπάνω διαδικασία, έχει μελετηθεί αναλυτικότερα στα θηλαστικά (Walter and Johnson, 1994), όπου το SRP είναι μία ριβονουκλεοπρωτεΐνη που αποτελείται από έξι πρωτεΐνες και ένα 7S μόριο RNA που περιέχει 300 βάσεις (σχήμα 6). Η πρωτεϊνική υπομονάδα των 54 kDa (SRP54), που είναι ομόλογη με την πρωτεΐνη Ffh των βακτηρίων, είναι μία GTPάση, που αναγνωρίζοντας το υδρόφοβο πεπτιδίο σηματοδότη της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, καθοδηγεί το σύμπλοκο της με το ριβόσωμα στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (σχήμα 7). Αυτό συμβαίνει διότι στη μεμβράνη η υπομονάδα SRP54 του SRP συνδέεται με μία άλλη GTPάση, την SRα, που συνιστά την περιφερειακή υπομονάδα του συνδεδεμένου στη μεμβράνη ετεροδιμερούς υποδοχέα του SRP. Η υπομονάδα SRβ του SRP υποδοχέα αποτελεί την διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ER. Η παραπάνω αλληλεπίδραση διεγείρει την δέσμευση GTP (T) και στις δύο παραπάνω πρωτεΐνες, και εν συνεχεία επάγει την απελευθέρωση του SRP και τη μεταφορά της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στο κανάλι της μεταθετάσης. Ακολουθώς η υδρόλυση του GTP

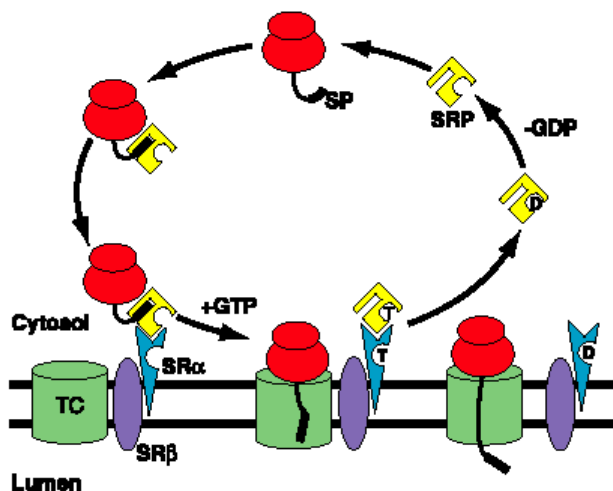
Σχήμα5: (Andrews, 2000). Μοντέλο μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, ταυτόχρονα με τη μεταφραστική διαδικασία. 1) Δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας (καφέ μπάρα) από διαλυτό υποδοχέα (κόκκινη μπάλα) με το που προεκβάλλει από το ριβόσωμα (διπλή πράσινη μπάλα). 2) Το σύμπλοκο ριβοσώματος νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, RNC, αγκυροβολεί στη μεμβράνη μέσω της δέσμευσης του διαλυτού υποδοχέα του πεπτιδίου σηματοδότη σ' ένα συγγενή μεμβρανικό υποδοχέα (σκούρα μπλέ διαμεμβρανική πρωτεΐνη). 3) Το RNC σύμπλοκο μεταφέρεται στη μεταθετάση (ροζ μεμβρανικό κανάλι) και ο υποδοχέας του πεπτιδίου σηματοδότη απελευθερώνεται στο cis διαμέρισμα. Από την άλλη η δέσμευση του RNC στη μεταθετάση ανοίγει το κανάλι, ενώ συμβάλει και στη διατήρηση του φραγμού στη διαπερατότητα της μεμβράνης. 4) Η μετατόπιση προχωρεί ταυτόχρονα με τη μετάφραση μέχρι να ολοκληρωθεί η σύνθεση της πρωτεΐνης. 5) Το ριβόσωμα απελευθερώνεται από τη μεταθετάση και το κανάλι ξανακλείνει.

SRP receptor	
Mammalian	Bacterial
SRα*	FtsY*
SRβ*	-

Signal Recognition Particle	
Mammalian	Bacterial
SRP68/72	-
SRP54*	Ffh*
SRP19	-
SRP9/14	-
7S RNA	4.5S RNA

Σχήμα 6: (Johnson and van Waes, 1999). Πίνακες όπου αναγράφονται τα συστατικά του SRP και του υποδοχέα του SRP στα θηλαστικά

διευκολύνει την ανακύκλωση του SRP στο κυτταρόπλασμα. Αξίζει να σημειώσουμε εδώ ότι οι ενζυματικές ιδιότητες τόσο του SRP όσο και του υποδοχέα του SR επηρεάζονται και από άλλα συστατικά, όπως για παράδειγμα το ριβόσωμα. Έτσι έχει δείχθει ότι η δέσμευση GTP από το SRP διεγείρεται από το ριβόσωμα (Bacher et al., 1996), όπως και η υδρόλυση GTP από την SRβ υπομονάδα του SRP υποδοχέα, που είναι επίσης GTPάση (Bacher et al., 1999). Πρόσφατα δε αποτελέσματα από τους Legate et al., 2000 πρότειναν ότι η SRβ πρέπει να έχει δεσμευμένο GTP για να αλληλεπιδρά με την SRα, γεγονός που υποδηλώνει την έμμεση επιρροή και της SRα από το ριβόσωμα. Από την άλλη η δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στο SRP εμποδίζει τη δέσμευση, και την υδρόλυση GTP. Επομένως λόγω της δέσμευσης με το ριβόσωμα το SRP δεσμεύει GTP, αλλά λόγω του πεπτιδίου σηματοδότη αναστέλλεται η υδρόλυση του, μέχρις ότου έρθει στη μεμβράνη και αλληλεπιδράσει με τον SR



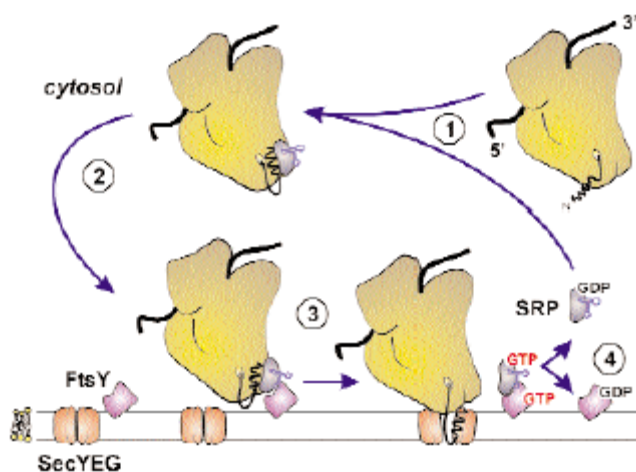
Σχήμα 7: (Keenan et al., 2001). Μοντέλο της μετατόπισης πρωτεϊνών όπως καταλύεται από το ευκαρυωτικό SRP. Μία νεοσυντιθέμενη αλυσίδα συνδεδεμένη στο ριβόσωμα (κόκκινο), περιέχει ένα πεπτιδίο σηματοδότη (SP) που αναγνωρίζεται από το SRP (κίτρινο). Το SRP οδηγεί το RNC σύμπλοκο στο κανάλι της μεταθετάσης (TC) που εγκλείεται στη μεμβράνη του ER, με μία διαδικασία που απαιτεί GTP (αναλυτικότερα στο κείμενο).

υποδοχέα του. Επιπλέον οι Song et al., 2000 πρότειναν ότι και το ίδιο το κανάλι της μεταθετάσης πρέπει να ρυθμίζει τον κύκλο υδρόλυσης του GTP από το σύμπλοκο SRP-SR.

Όπως είπαμε προηγουμένως, τα βακτήρια διαθέτουν ένα παρόμοιο σύστημα SRP με αυτό των ευκαρυωτικών οργανισμών που είναι όμως πιο απλουστευμένο (Herskovits et al., 2000). Συγκεκριμένα στην *E.coli* το σύμπλοκο SRP συνίσταται μόνο από μία GTPάση 48 kDa που παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομολογία με την υπομονάδα SRP54 του SRP των θηλαστικών, και καλείται Ffh (fifty-

four-homolog), καθώς και από το 4.5S RNA (100 βάσεις) που παρουσιάζει την ίδια σχεδόν δομή με την περιοχή IV του ευκαρυωτικού SRP RNA στην οποία δεσμεύεται το SRP54. Από την άλλη ο βακτηριακός υποδοχέας του SRP είναι ο FtsY που είναι ομόλογος με την υπομονάδα SRα του

ευκαρυωτικού υποδοχέα. Εξάλλου τόσο η Ffh όσο και ο FtsY μπορούν να αντικαταστήσουν την SRP54 και την SRα αντίστοιχα, σε δοκιμασίες μετατόπισης *in vitro* ευκαρυωτικών υποστρωμάτων (Powers et al., 1997), τονίζοντας την λειτουργική συντηρητικότητα των δύο συστημάτων. Δεδομένου δε ότι οι διάφορες αλληλεπιδράσεις του SRP και του υποδοχέα του SR με το ριβόσωμα και με την μεμβρανική μεταθετάση, θεωρούνται σημαντικές για το μονοπάτι καθοδήγησης το σύγχρονο με τη μετάφραση (Bacher et al., 1996, 1999; Song et al., 2000), είναι πολύ πιθανό ότι το SRP-SR σύμπλοκο λειτουργεί αυτόνομα, ή οι αλληλεπιδράσεις του με τα παραπάνω συστατικά είναι πολύ συντηρημένες. Το σίγουρο είναι ότι ο βασικός μηχανισμός δράσης του SRP-SR διατηρείται από τα βακτήρια μέχρι τα θηλαστικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα συστατικά του SRP στα βακτήρια είναι απαραίτητα για την αύξηση του κυττάρου. Η αρχική πάντως τοποθέτηση ότι η Ffh και η FtsY (υποδοχέας της Ffh) παίζουν ρόλο στην έκκριση πρωτεϊνών στα βακτήρια συνάντησε χλιαρή υποδοχή, καθώς καμία από τις παραπάνω πρωτεΐνες δεν ανιχνεύθηκε στις διάφορες προσπάθειες εύρεσης μεταλλαγών (genetic screens) που μπλοκάρουν την διαδικασία της έκκρισης (Beckwith et al., 1991; Bassford et al., 1991). Αργότερα βέβαια διαπιστώθηκε ότι έλλειψη είτε του 4.5S RNA, είτε του Ffh εμποδίζει την ενσωμάτωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη (Macfarlane et al., 1995; de Gier et al., 1996; Ulbrandt et al., 1997; Tian et al., 2000), ενώ περιορίζει ελάχιστα την έκκριση των διαλυτών περιπλασματικών πρωτεϊνών (Poritz et al., 1990; Luirink et al., 1994; Phillips et al., 1992). Παρόμοια έλλειψη της FtsY, εμποδίζει την εισαγωγή στη μεμβράνη μεμβρανικών πρωτεϊνών (Seluanov et al., 1997). Η παραπάνω λοιπόν αποτυχία στον εντοπισμό των συστατικών του SRP ως απαραίτητων για την έκκριση τα βακτήρια, οφείλεται στην ικανότητα του προκαρυωτικού μεταμεταφραστικού μονοπατιού μεταφοράς των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, να μεταφέρει σχετικά ικανοποιητικά πρωτεΐνες στη μεμβράνη που διαφορετικά θα χρειαζόνταν το σύμπλοκο SRP με τον υποδοχέα του SR. Επιπλέον οι Valent et al., 1995 έδειξαν με πειράματα χημικής διασύνδεσης ότι το SRP αλληλεπιδρά με πεπτιδία σηματοδότες τόσο από εκκριτικές όσο και από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ανάλογα με την υδροφοβικότητα του πεπτιδίου σηματοδότη που καθορίζει και την ικανότητα του να προωθεί την μετατόπιση των πρωτεϊνών *in vivo*. Επίσης οι Lee et al., 2001 με αντικατάσταση του πεπτιδίου σηματοδότη εκκριτικών πρωτεϊνών που καθοδηγούνται στη μεμβράνη μέσω της SecB πρωτεΐνης συνοδού (βλέπε παρακάτω), από το διαμεμβρανικό τμήμα μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης όπως η AcrB, διαπίστωσαν ότι η καθοδήγηση τους στη μεμβράνη δεν εξαρτάται από την SecB, αλλά εξαρτάται από το SRP. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και με ηπιότερες αλλαγές του πεπτιδίου σηματοδότη που



Σχήμα 8: (Driessen et al., 2001). Μοντέλο της καθοδήγησης του συμπλόκου ριβοσώματος-νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνικών αλυσίδων, RNC, στη μεμβράνη.

απλά αυξάνουν την υδροφοβικότητα του πεπτιδίου σηματοδότη των παραπάνω εκκριτικών πρωτεϊνών. Προτείνεται λοιπόν ότι διαφορετικές τάξεις πρωτεϊνών στην *E.coli* οδηγούνται στη μεμβράνη με διαφορετικά μονοπάτια, επειδή το βακτηριακό SRP δεσμεύεται σ' ένα περισσότερο περιορισμένο εύρος πεπτιδίων σηματοδοτών απ' ό,τι το ευκαρυωτικό SRP. Το σίγουρο είναι πάντως ότι και το SeB και το SRP μονοπάτι συγκλίνουν στην βακτηριακή μεταθετάση που περιέχει τουλάχιστον SecA, SecY και SecG (Valent et al., 1998).

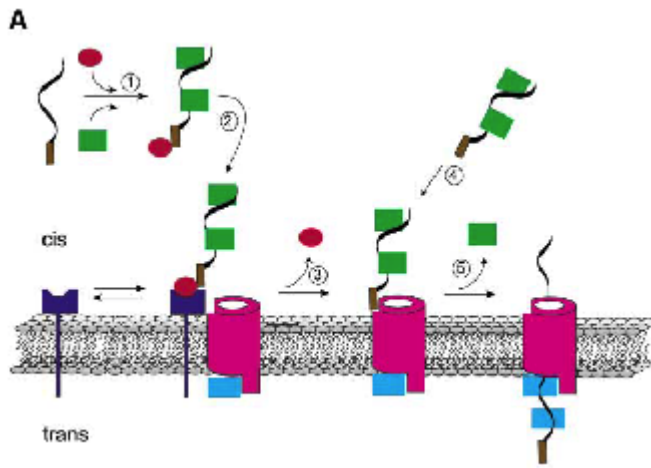
Ένα συνοπτικό μοντέλο για την καθοδήγηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη του βακτηρίου από το SRP

απεικονίζεται στο σχήμα 8. Έτσι η σύνθεση των εκκριτικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών ξεκινά σε ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος (στάδιο 1) που έρχονται στη μεμβράνη καθώς το SRP που προσδένεται στο πεπτιδίο σηματοδότη, ή στο υδρόφοβο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης, με το που προεκβάλουν από το ριβόσωμα, αλληλεπιδρά με τον μεμβρανοσυνδεόμενο υποδοχέα του FtsY (στάδιο 2). Είναι πολύ πιθανό να μην απαιτείται το ριβόσωμα για την καθοδήγηση των πρωτεϊνών από το SRP στη μεμβράνη, όπως στους χλωροπλάστες (μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη μετά την μετάφραση τους), και η όλη διαδικασία να πραγματοποιείται μετά το τέλος της μετάφρασης στα βακτήρια.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μετά την μετάφραση, καθοδήγηση των εκκριτικών πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη καθοδήγηση στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Το ευκαρυωτικό μεταμεταφραστικό μονοπάτι έχει μελετηθεί κυρίως στη ζύμη όπου και αποτελεί ένα κυρίαρχο τρόπο στόχευσης στο Sec61 κανάλι. Συγκεκριμένα σ' αυτό το μονοπάτι το σύμπλοκο Sec61 αλληλεπιδρά μ' ένα δεύτερο ολιγομερικό πρωτεϊνικό κανάλι που είναι το σύμπλοκο Sec62/63 (Raparport et al., 1999). Το τελευταίο κανάλι διαθέτει μια κυτταροπλασματική θέση υποδοχέα για το πεπτιδίο σηματοδότη και την δέσμευση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Μετά τη δέσμευση το πεπτιδίο σηματοδότη μεταφέρεται από το κανάλι Sec62/63 στον υποδοχέα του πεπτιδίου σηματοδότη του καναλιού Sec61, διαμέσω του οποίου συνεχίζεται η μετατόπιση των πρωτεϊνών μέσα από τη μεμβράνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα υποστρώματα διατηρούνται σε αποδιαταγμένη κατάσταση κατάλληλη για μετατόπιση με την βοήθεια κυτταροπλασματικών συνοδών πρωτεϊνών (Chirico et al., 1988). Επίσης σημειώνεται ότι το σύμπλοκο Sec62/63 μέσω της υπομονάδας Sec63, συντονίζει τη δράση της πρωτεΐνης BiP (Brodsky and Schekman, 1993) που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφύλαξη της εξόδου του Sec61 καναλιού στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου.

### 1.2.A.III.β. Μεταφορά-στόχευση με τη βοήθεια της πρωτεΐνης SecB

Η μεταμεταφραστική καθοδήγηση των εκκριτικών πρωτεϊνών στο κανάλι SecYEG της μεμβράνης, στα βακτήρια, αποτελεί το πιο σύνθετο μοντέλο μεταφοράς τους και πραγματοποιείται μέσω της πρωτεΐνης SecA, που αποτελεί τον κινητήρα του συστήματος και της συνοδού πρωτεΐνης SecB που είναι εξειδικευμένη για την έκκριση. Η SecA αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο σηματοδότη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στη μεμβράνη (Lill et al., 1990), και σ' αυτή την αλληλεπίδραση της με το υπόστρωμα βοηθιείται από την SecB που δεσμεύεται και στη SecA και στην "ώριμη" περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Hartl et al., 1990). Η SecB απομακρύνεται από το σύμπλοκο με την SecA και το υπόστρωμα με το που ξεκινά η διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών και η λειτουργία της θα αναφερθεί αναλυτικότερα παρακάτω. Συνοπτικά η μεταμεταφραστική

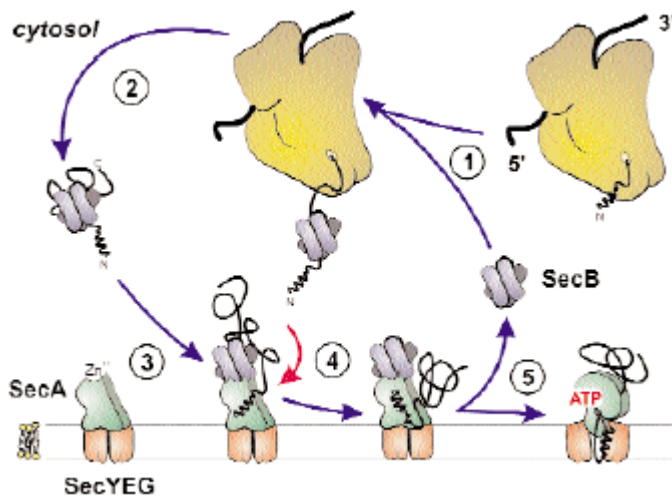


καθοδήγηση των εκκριτικών πρωτεϊνών από την SecB στη βακτηριακή μεμβράνη φαίνεται στο σχήμα 9.

Η SecB είναι μία όξινη ομοτετραμερής πρωτεΐνη 17 kDa, που μπορεί και αλληλεπιδρά τόσο με μία ποικιλία εκκριτικών πρωτεϊνών, όσο και με την SecA πρωτεΐνη, ενώ προτείνεται το ακόλουθο μοντέλο για το ρόλο της στη μεταφορά των διαφόρων υποστρωμάτων στη μεμβράνη (σχήμα 10) (Driessen et al., 2001). Συγκεκριμένα η SecB αναγνωρίζει την ώριμη περιοχή των εκκριτικών πρωτεϊνών (και

Σχήμα 9: (Andrews, 2000). Μοντέλο μεταμεταφραστικής μεταφοράς πρωτεϊνών από μεμβράνες. 1) Δέσμευση στο πεπτιδίο σηματοδότη (καφέ μπάρα) της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας ενός διαλυτού υποδοχέα (κόκκινη μπάρα). 2) Αγκυροβόληση του διαλυτού συμπλόκου στόχευσης στη μεμβράνη σ' ένα μεμβρανικό υποδοχέα (σκούρα μπλε διαμεμβρανική πρωτεΐνη) που συνδέεται με το κανάλι της μεταθετάσης (ροζ μεμβρανικό κανάλι). 3) Μεταφορά του πεπτιδίου σηματοδότη στο κανάλι της μεταθετάσης. 4) Εναλλακτικά το πεπτιδίο σηματοδότης φτάνει στη μεταθετάση χωρίς την βοήθεια διαλυτού υποδοχέα. 5) Η δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη ανοίγει το κανάλι και η μεταφορά προχωρά με τη βοήθεια συνοδών πρωτεϊνών (ανοιχτό μπλε χρώμα) στο trans διαμέρισμα. Οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε σχεδόν αποδιαταγμένη μορφή.

όχι το πεπτιδίο σηματοδότη τους) (Kumamoto et al., 1993) οπότε και δημιουργείται σύμπλοκο SecB-προπρωτεΐνης αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης τους στο κυτταρόπλασμα (στάδιο 1). Το σύμπλοκο αυτό διατηρεί την πρωτεΐνη σε μορφή κατάλληλη για μετατόπιση (στάδιο 2).



Σχήμα 10: (Driessen et al., 2001). Μοντέλο για την μεταφορά των προπρωτεϊνών στη μεμβράνη από την SecB.

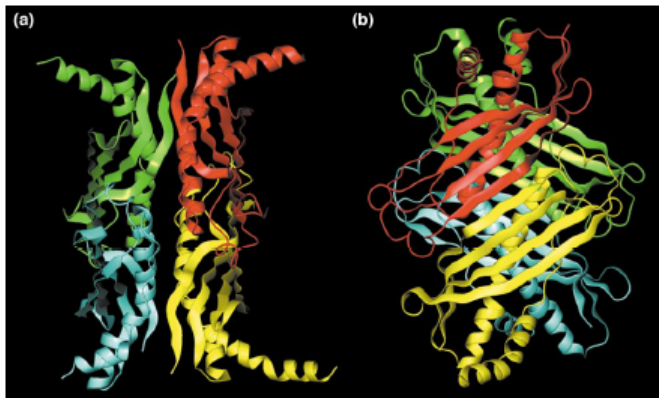
Εν συνέχεια το παραπάνω σύμπλοκο δεσμεύεται στην SecA, που είναι με τη σειρά της δεσμευμένη στη μεμβράνη στο SecYEG κανάλι, με μεγάλη συγγένεια ( $K_d=10-30$  nM) (στάδιο 3) και έτσι η προπρωτεΐνη καταλήγει στη μεταθετάση. Συγκεκριμένα η αύξηση της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου SecB-προπρωτεΐνης με την SecA, καθώς η SecA αναγνωρίζει και το πεπτιδίο σηματοδότη της προπρωτεΐνης, έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά της προπρωτεΐνης στη SecA και την παράλληλη απελευθέρωση της από την SecB (στάδιο 4) (Fekkes et

al., 1997). Η απελευθέρωση της SecB από την μεμβράνη και την SecA, πραγματοποιείται κατά την έναρξη της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών με την δέσμευση ATP από την SecA (στάδιο 6) (Fekkes et al., 1997).

Η συγγένεια τώρα της SecA για την SecB οφείλεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (στα τελευταία 22 αμινοξέα), όπου δεσμεύονται και τα λιπίδια (Breukink et al., 1995; Fekkes et al., 1997). Η περιοχή αυτή είναι πολύ συντηρημένη σ' όλα τα βακτήρια, περιέχει πολλές αργίνινες και λυσίνες καθώς και συντηρημένες ιστιδίνες και κυστεΐνες που συντελούν στη δέσμευση στη SecA ενός δισθενούς ιόντος ψευδαργύρου, απαραίτητου για την λειτουργική αλληλεπίδραση SecB με SecA (Fekkes et al., 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι η SecB μπορεί να

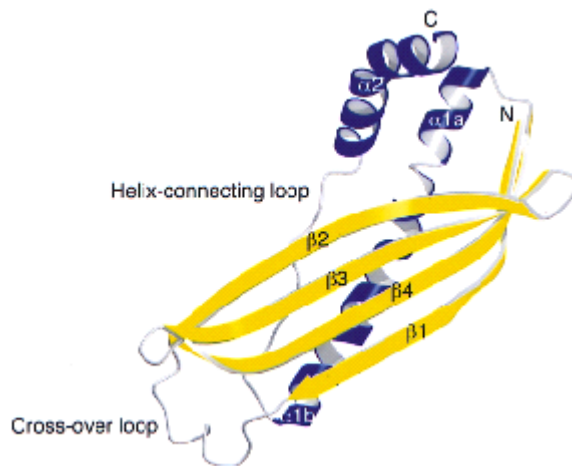
αλληλεπιδράσει και με την SecA που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, αν και με χαμηλή συγγένεια ( $K_d=1.6 \mu M$ ) (den Blaauwen et al., 1997) οπότε και παραμένει στο κυτταρόπλασμα μέχρις ότου διατεθούν κάποια κανάλια στη μεμβράνη για την διαδικασία της μετατόπισης.

Πως όμως η SecB μπορεί να δεσμευτεί σε πληθώρα πρωτεϊνών *in vitro* (Kumamoto et al., 1993) αλλά είναι εντελώς επιλεκτική *in vivo* για τις εκκριτικές πρωτεΐνες (Hardy et al., 1991); Και επιπλέον πως η SecB διαχωρίζει τη δέσμευση της σε δύο διαφορετικούς υποκαταστάτες, την SecA, και τις εκκρινόμενες προπρωτεΐνες, και επιτελεί τις δύο λειτουργίες της πρωτεΐνης συνοδού και της πρωτεΐνης πιλότου, που φέρει τα ποικίλα υποστρώματα για έκκριση στη μεμβράνη; Απάντηση στα ερωτήματα αυτά δίνεται με την βοήθεια της τριτοταγούς δομής της SecB από τους Xu et al., 2000. Οι ερευνητές αυτοί μπόρεσαν να ξεπεράσουν το πρόβλημα κρυστάλλωσης της SecB, χρησιμοποιώντας σαν πηγή της SecB όχι το βακτήριο *E.coli* αλλά την *Haemophilus influenzae*.



Σχήμα 11: (Xu et al., 2000). Απεικόνιση του τετραμερούς της SecB με μορφή ταινίας (Ribbon drawing) σε όψεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά  $90^\circ$ . Κάθε υπομονάδα του τετραμερούς απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα.

Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι το τετραμερές της SecB οργανώνεται σαν ένα διμερές διμερών (σχήμα 11) και εμφανίζει ορθογώνιο σχήμα με απλή  $\alpha+\beta$  πτύχωση (πιο αναλυτικά η δομή του μονομερούς της SecB στο σχήμα 12). Τα δύο μονομερή ζευγαρώνουν μέσω της αλυσίδας  $\beta 1$  και της έλικας  $\alpha 1$ , για να σχηματίσουν το διμερές που συνιστά μία  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια οκτώ αλυσίδων (κάθε μονομερές περιλαμβάνει μία  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων αλυσίδων). Το διμερές σταθεροποιείται με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των



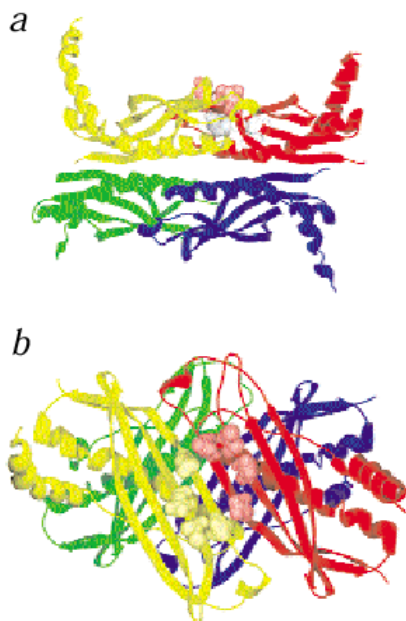
Σχήμα 12: (Xu et al., 2000). Απεικόνιση του μονομερούς της SecB με τη μορφή ταινίας. Οι  $\alpha$ -έλικες απεικονίζονται σαν μπλε κορδέλες, οι  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες σαν κίτρινα βέλη, ενώ άλλα δευτεροταγή στοιχεία σαν γκρι γραμμές.

δύο αντιπαράλληλων  $\beta 1$  αλυσίδων, όπως και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Τα δύο διμερή εν συνεχεία, συνδέονται προς σχηματισμό του τετραμερούς, με τις τέσσερις μακριές  $\alpha 1$  έλικες να σχηματίζουν σάντουιτς μεταξύ δύο αντιπαράλληλων  $\beta$ -πτυχωτών επιφανειών. Η μεσόφαση του διμερούς-διμερούς περιλαμβάνει πολικές αλληλεπιδράσεις που αφορούν τις πλευρικές αλυσίδες και των τεσσάρων  $\alpha 1$ -ελίκων. Η παραπάνω τεταρτοταγής δομή της SecB συμφωνεί με την παρατηρούμενη δυναμική ισορροπία διμερούς-τετραμερούς της ίδιας πρωτεΐνης σε διάλυμα (Muren et al., 1999). Η δομή έχει κρυσταλλωθεί απουσία υποστρώματος, αλλά παρόλα αυτά είναι ορατές τέσσερις αλκαλικές πλευρικά του τετραμερούς. Συγκεκριμένα σε κάθε πλευρά του μορίου εντοπίζονται δύο αλκαλικές που σχηματίζονται από την έλικα  $\alpha 2$ , την αλυσίδα  $\beta 2$  την cross-over λούπα, ενώ σαν βάση διαθέτουν την λούπα που συνδέει τις έλικες. Οι δύο αλκαλικές στην

ίδια μεριά του τετραμερούς συγχωνεύονται για να σχηματίσουν ένα μακρύ ( $70\text{\AA}$ ) επιφανειακό κανάλι (δύο κανάλια σε κάθε τετραμερές), που διασχίζει την μεσόφαση των διμερών του τετραμερούς. Το κανάλι αυτό διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά για να δεσμεύσει ένα μεγάλο

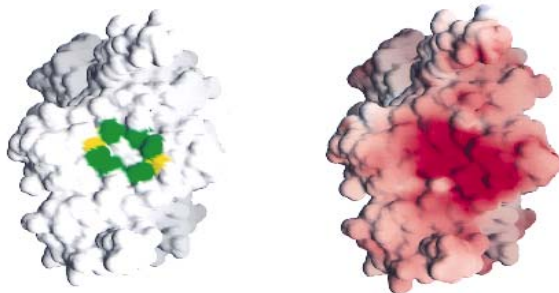
εύρος υποστρωμάτων και να εξηγήσει τα ποικίλα βιοχημικά και βιοφυσικά πειράματα που αφορούν την δέσμευση υποστρωμάτων από την SecB.

Εκτός από την δέσμευση του υποστρώματος, η SecB δεσμεύεται και στην SecA που αλληλεπιδρά με την SecYEG και μ' αυτόν τον τρόπο καθοδηγεί την προπρωτεΐνη στο



Σχήμα 13: (Xu et al., 2000). Κρυσταλλική δομή της SecB από την *H. Influeza* σε πλευρική όψη a) και μπροστινή όψη b). a) Τα αμινοξέα της SecB από την *H. Influeza* (D27, E31, E86 και I84) που αντιστοιχούν στα αμινοξέα της SecB από την *E.coli* που εμπλέκονται στη δέσμευση της SecA χρωματίζονται με ανοιχτό κόκκινο χρώμα. Αντίστοιχα τα τα αμινοξέα της SecB από την *H. Influeza* (F83, C85, V87 και Q89) που όταν μεταλλαγούν στην SecB της *E.coli* διαταράσσουν την δέσμευση των προπρωτεϊνών απεικονίζονται με άσπρο χρώμα. b) Τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη δέσμευση της SecA σημειώνονται σε δύο υπομονάδες (με ανοιχτό κόκκινο και κίτρινο) και φαίνεται η συγκρότησή τους στην επιφάνεια του μορίου.

μεμβρανική SecB, όσο και η ίδια η απελευθέρωση της SecB στηρίζονται στην καταλυτική δράση της SecA και στην πρόσληψη ATP από αυτήν (Fekkes et al., 1997), με άγνωστο μέχρις στιγμής μηχανισμό. Επιπλέον, με την



δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη της προπρωτεΐνης που φέρει η SecB, στη SecA, αυξάνεται και η αλληλεπίδραση SecA-SecB οπότε και θα μπορούσε να εξηγηθεί η απελευθέρωση της προπρωτεΐνης από την SecB αφού η τελευταία διαθέτει ρυθμούς πρόσληψης και απελευθέρωσης υποστρώματος (Fekkes et al.,

κάνάλι διαμέσω του οποίου διασχίζει την μεμβράνη. Έχει διαπιστωθεί μία σειρά συντηρημένων αμινοξέων στη SecB της *E.coli* (D20, E24, L75 και E77), που είναι σημαντικά για την υψηλής συγγένειας αλληλεπίδραση με την SecA (Fekkes et al., 1998). Τα ίδια αμινοξέα στην κρυσταλλική δομή της SecB της *H.influeza* συγκεντρώνονται σε μία επίπεδη υδατοδιαλυτή και όξινη επιφάνεια που εμφανίζεται και στις δύο μεριές του μορίου (σχήμα 14). Επιπλέον η περιοχή αυτή είναι κατάλληλη για την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση της SecB με την θετικά φορτισμένη περιοχή δέσμευσης της SecB στη SecA. Επιπρόσθετα στην δέσμευση της SecA εμπλέκεται και το καρβοξυτελικό άκρο της SecB, που δεν αναλύθηκε με μεγάλη ακρίβεια στη δομή των Xu et al ., 2000, και φαίνεται να προεκβάλλει από την δομή με την μορφή μακριών "βραχιόνων" (σχήμα 13α). Είναι πολύ πιθανό ότι αυτοί οι βραχίονες αγκαλιάζουν την SecA στη θέση δέσμευσης της SecB, διευκολύνοντας την μετέπειτα μεταφορά της προπρωτεΐνης.

Η συμμετρία που παρουσιάζει το μόριο της

SecB μπορεί να εξηγήσει την δέσμευση σ' αυτό του διμερούς μορίου της SecA. Έτσι κάθε υπομονάδα της SecA δεσμεύεται στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια που συνιστά κάθε διμερές της SecB. Η στοιχειομετρία του τεταρτοταγές συμπλόκου SecA-SecB-υπόστρωμα είναι 2:4:1. Από την άλλη, έχει προταθεί ότι το ενεργό κανάλι μέσα από το οποίο διέρχεται η προπρωτεΐνη, συνίσταται από διμερή SecA που δεσμεύεται σε τετραμερές σύμπλοκο SecYEG (Manting et al., 2000). Επομένως μπορεί να θεωρηθεί ότι κάθε SecYEG κανάλι δέχεται μία προπρωτεΐνη από ένα ζευγάρι SecA-SecB. Από την μία μεριά λοιπόν οι βιοχημικές και δομικές μελέτες, υποδηλώνουν ότι η SecB χρησιμοποιεί ολόκληρη την επιφάνεια της για τις αλληλεπιδράσεις της τόσο με την υπόστρωμα, όσο και με την SecA. Και από την άλλη είναι γνωστό, ότι η απελευθέρωση της προπρωτεΐνης από την

Σχήμα 14: (Xu et al., 2000). Προτεινόμενη θέση δέσμευσης της SecA. Αριστερά απεικονίζεται η υδατοδιαλυτή επιφάνεια του τετραμερούς, όπου η επιφάνεια που εμπεριέχει τα αμινοξέα D27, E31 και E36 χρωματίζεται πράσινη, ενώ η επιφάνεια που περιέχει την I84 είναι κίτρινη (τέσσερα σημαντικά αμινοξέα για την αλληλεπίδραση της SecB με την SecA). Δεξιά απεικονίζεται η ίδια επιφάνεια με βάση το ηλεκτροστατικό της δυναμικό (όσο πιο κόκκινο το χρώμα τόσο αυξάνει ο αριθμός των όξινων αμινοξέων).

1995; Topping et al., 1997) . Μόνο όμως η εύρεση της δομής της SecB με προπρωτεΐνη και SecA δεσμευμένη σε SecYEG θα μπορούσε να απαντήσει αναμφισβήτητα το παραπάνω ερώτημα. Το μόνο που μπορεί να ειπωθεί μέχρι στιγμής, από το γεγονός ότι μεταλλαγές που εμπλέκονται τόσο στη δέσμευση της προπρωτεΐνης όσο και της SecA χαρτογραφούνται σε διαφορετικές επιφάνειες μιας εκτεθειμένης στο διάλυμα β-αλυσίδας, που συναντά τις α-έλικες που συγκροτούν την μεσόφαση του διμερούς-διμερούς, είναι ότι η SecA με το που δεσμεύεται στη SecB προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση αυτής της β αλυσίδας. Η αλλαγή αυτή γίνεται αντιληπτή από αμινοξέα στην αντίθετη μεριά της ίδιας αλυσίδας, και τελικά αναπαράγεται στη μακριά α-έλικα στη μεσόφαση του διμερούς-διμερούς και κατά συνέπεια μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίηση του καναλιού δέσμευσης της προπρωτεΐνης, και σε ελάττωση της συγγένειας της SecB για το υπόστρωμα.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι ενώ η SecB μοιάζει με τις γενικής δράσης συνοδές πρωτεΐνες GroEL και DnaK ως προς την θέση δέσμευσης του υποστρώματος (υδροφοβη κυρίως επιφάνεια), διαφέρει στο ότι δεν παρουσιάζει καμμία ενζυμική δραστηριότητα με την οποία να ρυθμίζει τις θέσεις δέσμευσης για τα δύο διαφορετικά υποστρώματα που διαθέτει (οι θέσεις δέσμευσης του υποστρώματος στην περίπτωση των GroEL και DnaK ρυθμίζονται από την δραστηριότητα ATPάσης που διαθέτουν). Αντίθετα στην περίπτωση της SecB τόσο η συγγένεια για το υπόστρωμα όσο και η συγγένεια για τη SecA, τροποποιούνται από την SecA, τον επόμενο στόχο στο μονοπάτι της μετατόπισης των πρωτεϊνών και γι' αυτό αποτελεί μία εξειδικευμένη συνοδό πρωτεΐνη της έκκρισης.

## **1.2.B. Διαπέραση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από τη μεμβρανική διπλοστοιβάδα**

### **1.2.B.I. Δαπάνη ενέργειας κατά την μετατόπιση των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες.**

Η ενέργεια που δαπανάται κατά την πρωτεϊνική μετατόπιση προμηθεύεται με διαφορετικούς μηχανισμούς στους διάφορους οργανισμούς. Στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενέργεια προσφέρεται από τις ATPάσες (Wickner, 1994). Παράλληλα τα βακτήρια χρησιμοποιούν και την ηλεκτροχημική δύναμη της βαθμίδωσης πρωτονίων κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (proton motive force, PMF) προκειμένου να μεταφέρουν πρωτεΐνες κατά μήκος της μεμβράνης. Στα βακτήρια η SecA είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που μέσω της υδρόλυσης του ATP που προκαλεί, εισάγεται και εξάγεται από τη μεμβράνη, σπρώχνοντας ταυτόχρονα τις μεταφερόμενες πρωτεΐνες κατά μήκος της μεμβράνης (βλέπε επόμενο κεφάλαιο).

Στη ζύμη μία ομόλογη πρωτεΐνη της Hsp70, η Kar2p, που δεν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλλά στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου, είναι πιθανό ότι υδρολύει ATP για την μετατόπιση των πρωτεϊνών μέσα από την μεμβράνη του ER (Brodsky et al., 1995). Ομοίως έχει προταθεί ότι δρα στα θηλαστικά η ομόλογη πρωτεΐνη της Kar2p, που είναι η BiP. Παράλληλα όμως, έχει προταθεί από τους Gorlich and Rapoport, 1993, ότι δεν χρειάζεται ATPάση, ούτε PMF στα κύτταρα των θηλαστικών για τη διαδικασία της μετατόπισης, αλλά η ίδια η διαδικασία της μετάφρασης πιθανά οδηγεί την νεοσυντιθέμενη αλυσίδα από το μεμβρανοσυνδεδεμένο ριβόσωμα, διαμέσου της μεμβράνης, στην κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου.

Στα αρχαία από την άλλη μεριά, δεν έχει εντοπιστεί ούτε ομόλογη πρωτεΐνη της SecA πρωτεΐνης, ούτε της Hsp70. Οι πιθανότητες είναι, ή ότι τα αρχαία χρησιμοποιούν κάποια άλλη ATPάση, ή ότι χρησιμοποιούν μόνο PMF. Βέβαια στα βακτήρια η μετατόπιση των πρωτεϊνών δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία μόνο PMF, αλλά έχει εντοπιστεί ένα μονοπάτι εισόδου πρωτεϊνών στα θηλακοειδή των χλωροπλαστών που στηρίζεται αποκλειστικά και μόνο στη βαθμίδωση του pH κατά μήκος της μεμβράνης. Κατά την αντίδραση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων και τελικά συγκεντρώνονται OH<sup>-</sup> στο εσωτερικό του κυττάρου και H<sup>+</sup> στο εξωτερικό. Με την δράση της F1Fo ATPάσης εν συνεχεία γίνεται φωσφορυλίωση και παραγωγή ATP στο εσωτερικό του κυττάρου. Τελικά στη μεμβράνη μένει μία διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων που αποτελεί το PMF. Εναλλακτικά η μετατόπιση των πρωτεϊνών στα αρχαία μπορεί να πραγματοποιείται



ταυτόχρονα με τη μετάφραση και επομένως μπορεί να μην απαιτείται έξωθεν ενέργεια, όπως προτάθηκε προηγουμένως για την ταυτόχρονη με τη μετάφραση, μετατόπιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

Αναλυτικότερα θα αναφερθούμε στην ενεργοποίηση της μεταθέσεως στα βακτήρια. Από τα τρία στάδια που λαμβάνουν χώρα κατά την έκκριση πρωτεϊνών, τόσο το στάδιο της καθοδήγησης τους στη μεμβράνη (στάδιο I), όσο και το στάδιο της διάσχισης της μεμβράνης (στάδιο II), έχουν αποδεδειγμένη ανάγκη μεταβολικής ενέργειας, ενώ δεν έχει παρατηρηθεί κάτι ανάλογο κατά τη διαδικασία ωρίμανσης και απελευθέρωσης της πρωτεΐνης. Έτσι κατά το στάδιο I της μετατόπισης, και μόνο όταν η καθοδήγηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται μέσω του SRP, τόσο το συστατικό Ffh του SRP όσο και ο υποδοχέας του FtsY, σαν GTPάσες που είναι, χρησιμοποιούν GTP προκειμένου να συντονίσουν και να ρυθμίσουν τις δραστηριότητες τους και να καθοδηγήσουν τελικά την πρωτεΐνη στην μεταθέση (βλέπε προηγούμενο κεφάλαιο και Keenan et al., 2001; Lu et al., 2001; de Gier and Lührink 2001). Όταν αντίθετα η καθοδήγηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη γίνεται με τη βοήθεια της SecE δεν δαπανάται ενέργεια ούτε για την δέσμευση του υποστρώματος, αλλά ούτε για την καθοδήγηση του στη μεμβράνη (προηγούμενο κεφάλαιο και Hartl et al., 1990).

Στο δεύτερο στάδιο της μετατόπισης πρωτεϊνών χρησιμοποιείται ενέργεια και με τη μορφή ATP (Chen and Tai 1985), αλλά και διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων (Yamada et al., 1989b), που δρουν σε διακριτά στάδια της διαδικασίας. Η υδρόλυση του ATP είναι απαραίτητη για την έναρξη της μετατόπισης, και πραγματοποιείται από την SecA πρωτεΐνη (Oliver, 1993). Η SecA υδρολύει 3 μόρια ATP ανά λεπτό ανά θέση δέσμευσης υποστρώματος όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ κατά την διαδικασία της μετατόπισης στη μεμβράνη ο ρυθμός υδρόλυσης φτάνει τα 13 μόρια ATP ανά λεπτό ανά θέση δέσμευσης υποστρώματος, και είναι απόλυτα εξαρτώμενος από την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο SecYEG και με το υπόστρωμα (Sianidis et al., 2001). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δέσμευση και η υδρόλυση του ATP από την SecA προκαλεί μία σειρά αλλαγών στην διαμόρφωση της (Economou and Wickner 1994), που μαζί με τις αλλαγές που προκαλούν στην διαμόρφωση της SecA οι υπόλοιποι υποκαταστάτες της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες, συνοψίζουν τις διάφορες λειτουργικές φάσεις από τις οποίες περνά η πρωτεΐνη προκειμένου να συντελέσει στη διεκπεραίωση της παραπάνω διαδικασίας της μετατόπισης.

Η SecA καταναλώνει 20 μόρια ATP ανά μεταφερόμενο υπόστρωμα 70 αμινοξέων (Bassilana et al., 1992), ενώ στην περίπτωση μεγάλων υποστρωμάτων όπως η πρωτεΐνη proOmpA (πρωτεΐνη μοντέλο για την *in vitro* διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες που περιέχει 280 αμινοξέα (Chen and Tai 1985; Wickner et al., 1991) και η οποία ενδέχεται να αποκτά κάποια δευτεροταγή και τριτοταγή δομή πριν την διαδικασία της μετατόπισης (Lecker et al., 1990) δαπανώνται μέχρι και 3000 μόρια ATP ανά μεταφερόμενο υπόστρωμα (Schiebel et al., 1991). Το τεράστιο αυτό ποσό ενέργειας υποδηλώνει ή ότι η αντίδραση της μετατόπισης της proOmpA *in vitro* είναι αρύθμιστη (γλύστρημα προς τα πίσω της μεταφερόμενης πρωτεΐνης, Schiebel et al., 1991; Bassilana et al., 1992), ή ότι ενέργεια δαπανάται και για άλλες διαδικασίες πέραν της κατάλυσης όπως η αναστολή της αναδίπλωσης του υποστρώματος. Καταρχήν απουσία απ' ευθείας ποσοτικοποίησης της δαπάνης ATP για ένα κύκλο εισαγωγής SecA και προπρωτεΐνης στη μεμβράνη, δεν μπορεί κανείς να αποκλείσει την έμμεση δράση της εισχώρησης της SecA στη μεμβράνη στην μεταφορά της εκκρινόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε αντίθεση με το άμεσο μοντέλο της λειτουργίας της SecA που προτείνουν οι Economou and Wickner 1994; βλέπε επόμενο κεφάλαιο. Μία πιθανότητα λοιπόν είναι η SecA που έχει εισχωρήσει στη μεμβράνη να προετοιμάζει την μεταθέση να αποκτήσει την διαμόρφωση που απαιτείται για τη διαδικασία της μετατόπισης, και κατά συνέπεια μικρά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας να μετακινούνται μέσα από το κανάλι της μεταθέσεως μέσω θερμικής κίνησης. Εξάλλου περιορισμένη προς τα εμπρός μετακίνηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή γλύστρημα προς την αντίθετη κατεύθυνση των ενδιάμεσων μετατόπισης έχει καταγραφεί από τους Schiebel et al., 1991; Arkowitz et al., 1993), απουσία υδρόλυσης ATP (μετά από προσθήκη μη υδρολυόμενων ATP αναλόγων, που προκαλεί όμως εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη, ή απελευθέρωση SecA και παρουσία PMF στη δεύτερη περίπτωση). Λιγότερη ενέργεια ATP καταναλώνεται όταν οι μεμβράνες διαθέτουν διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων (Yamada et al., 1989b; Shiozuka et al., 1990; Schiebel et al., 1991; Driessen, 1992). Όμως η βαθμίδωση πρωτονίων από μόνη της δεν μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες (Yamada et al., 1989b; Schiebel et al., 1991; Shiozuka et al., 1990), που όπως είπαμε απαιτεί την δράση της SecA την εξαρτώμενη από το ATP και το υπόστρωμα (Yamada et al., 1989b). Αυτό που προσφέρει το PMF είναι η βελτίωση της

απόδοσης της διαδικασίας μετατόπισης, από τέσσερις έως δέκα φορές (Yamada et al., 1989b; Driessen and Wickner 1991). Η ίδια δε συμβολή στη διαδικασία της μετατόπισης πετυχαίνεται και με αυξημένα ποσά SecA πρωτεΐνης (Yamada et al., 1989a). Από την άλλη μεριά αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η διαμεμβρανική βαθμίδωση πρωτονίων και μόνο (απουσία ATP, και μόνο αν η SecA έχει προηγουμένως ανενεργοποιηθεί από αντισώματα και εφόσον το υπόστρωμα έχει απομακρυνθεί από την SecA), μπορεί να ολοκληρώσει την μεταφορά πρωτεϊνών που έχουν ήδη διακινήσει το 60-80% του συνολικού τους μήκους (Tani et al., 1989; Schiebel et al., 1991). Ενώ οι Driessen et al., 1992 έδειξαν ότι το PMF παρέχει κατεύθυνση στην διανυσματική διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών, αφού όταν η υδρόλυση του ATP απελευθερώσει την προπρωτεΐνη και εφαρμοστεί αντίστροφο PMF τα ενδιάμεσα μετατόπισης που διασχίζουν την μεμβράνη κινούνται αντίστροφα.

Είναι πιθανό ότι το PMF επηρεάζει ταυτόχρονα πολλά μεμβρανικά συστατικά της αντίδρασης, ενώ μπορεί να επηρεάζει κατευθείαν και το ρυθμό υδρόλυσης του ATP από την SecA, ελαττώνοντας την συγγένεια της για το ATP κατά 100 φορές (Chen and Tai 1985; Geller et al., 1986; Yamane et al., 1987; Shiozuka et al., 1990). Ακόμα οι Tani et al., 1990; Schiebel et al., 1991; Tani and Mizushima, 1991; Kato and Mizushima, 1993 έδειξαν ότι μόνο μέσω PMF μπορεί να πραγματοποιηθεί η μετατόπιση πρωτεϊνών που διαθέτουν ανώμαλες δομές, όπως δισουλφιδικούς δεσμούς ή μη πεπτιδικές αλληλουχίες στην ώριμη περιοχή τους. Αλλά και οι Cao et al., 1995 έδειξαν ότι η μετατόπιση αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων σε μεμβρανικές πρωτεΐνες επάγεται από το PMF. Επομένως το PMF μπορεί να βοηθάει και στην τοπολογία των μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Από την άλλη μεριά, το PMF μπορεί να καταστείλει τουλάχιστον μερικώς τον κρουοεαίσθητο φαινότυπο μιας μεταλλαγμένης SecA *in vitro* (Suzuki et al., 1998), όπως επίσης και το πρόβλημα στη μετατόπιση που δημιουργείται σε μεμβράνες που δεν έχουν SecE (Hanada et al., 1996). Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι η έλλειψη SecD και SecF αποσυνδέει την παραγωγή του PMF (Arkowitz and Wickner, 1994). Ο μηχανισμός δράσης του PMF μπορεί να μην είναι γνωστός, ενδέχεται όμως να δρα αποδιατάσσοντας το υπόστρωμα όπως πρότειναν οι Arkowitz et al., 1993, κάτι που έχει ήδη διατυπωθεί για την μιτοχονδριακή μεταθετάση (Huang et al., 2002). Επειδή η ανάγκη για PMF εξαρτάται από την μεταφερόμενη προπρωτεΐνη (Yamada et al., 1989; Ernst et al., 1994), ενώ και μεταλλαγές στο πεπτιδίο σηματοδότη ή μετά απ' αυτό, οδηγούν σε αλλαγή της εξάρτησης της προπρωτεΐνης από το PMF, θεωρείται πιθανό ότι το PMF διεγείρει την διαδικασία εισαγωγής του πεπτιδίου σηματοδότη στη μεμβράνη. Αφού όμως έχουν εντοπιστεί ως καταστολείς βλαβών στο πεπτιδίο σηματοδότη, μεταλλαγμένες SecY πρωτεΐνες, PrfA, που όχι μόνο ξεπερνούν την ανάγκη φυσιολογικού πεπτιδίου σηματοδότη, αλλά προσδίδουν και στις αγρίου τύπου προπρωτεΐνες ανεξαρτησία από το PMF, και όλα αυτά χαλαρώνοντας όπως προτείνεται την εκκριτική μηχανή, εναλλακτικά το PMF μπορεί να δρα κατευθείαν στην SecY, αλλάζοντας τη διαμόρφωση της, Nouwen et al., 1996. Από την άλλη οι Brundage et al., 1990 αναφέρουν ότι το PMF διεγείρει τη μετατόπιση πρωτεϊνών σε πρωτεολιποσώματα που περιέχουν μόνο SecYEG και επομένως προτείνουν ότι δρα αλλάζοντας την διαμόρφωση του SecYEG ή την ολιγομερική του κατάσταση. Τέλος οι Nishiyama et al., προσπάθησαν να εντοπίσουν τον ρόλο του PMF στην διαδικασία εισαγωγής και εξαγωγής της SecA από τη μεμβράνη μιας και το PMF είχε ήδη βρεθεί να επάγει την εισχώρηση της SecA στη μεμβράνη αλλά σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ATP (Economou et al., 1995), ενώ δεν ήταν γνωστό το πως η κρύα SecA προκαλεί εξαγωγή από τη μεμβράνη της ραδιενεργούς SecA που βρίσκεται στο εσωτερικό της. Διαπίστωσαν λοιπόν ότι το PMF διεγείρει τον κύκλο της SecA, και επομένως την διαδικασία της μετατόπισης, με το να επιταχύνει την εξαγωγή της SecA από την μεμβράνη χωρίς την ανάγκη υδρόλυσης ATP, ή ανταλλαγής με εξωγενή SecA. Κατά συνέπεια παρουσία PMF, ελαττώνεται το ποσό της SecA που απαιτείται για αποτελεσματική μετατόπιση πρωτεϊνών. Μπορεί η εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη να αποτελεί στάδιο κλειδί (rate limiting step) στη μεταφορά των πρωτεϊνών από τη μεμβράνη, αλλά το ίδιο συμβαίνει και με την εξαγωγή της SecA που επιταχυνόμενη από το PMF επιταχύνει την όλη αντίδραση.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα συστατικά παραγωγής ενέργειας της αντίδρασης μετατόπισης, SecA/ATP και PMF, υπόκεινται κατά κάποιο τρόπο σε συντονισμένη ρύθμιση, αφού περίσσεια SecA επιτρέπει την μετατόπιση προπρωτεΐνης που διαφορετικά εξαρτάται αποκλειστικά από το PMF (Yamada et al., 1989). Επιπλέον η μετατόπιση πρωτεϊνών που οδηγείται από το PMF (μετά την αδρανοποίηση της SecA), επιβραδύνεται όταν η SecA ξαναπροστίθεται στο σύστημα απουσία ATP (Schiebel et al., 1991).

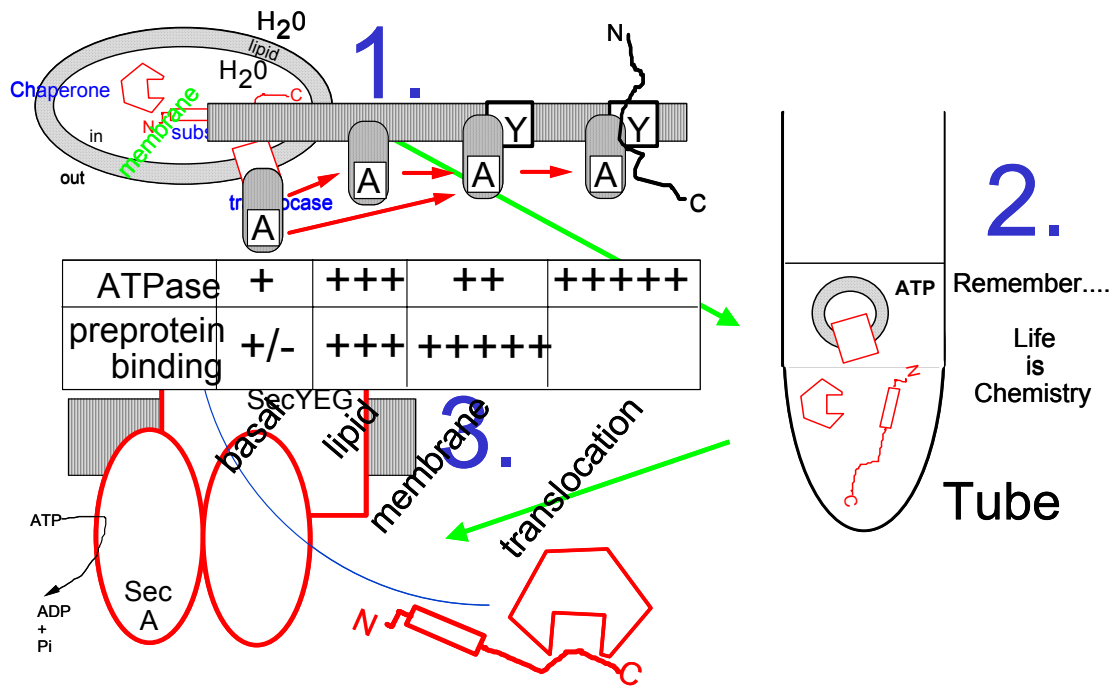
## 1.2.B.II. Το εκκριτικό Sec μονοπάτι. Από τα γονίδια στις πρωτεΐνες και την ανασύσταση *in vitro*.

Ένας συνδυασμός βακτηριακής γενετικής και καθαρισμού ενζύμων χρησιμοποιήθηκε πρικήμενος να αποκαλυφθούν τα γονίδια/πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο Sec μονοπάτι. Έτσι τα περισσότερα από τα απαραίτητα γονίδια του sec μονοπατιού είναι σήμερα γνωστά (Economou 2000, Driessen et al., 2001). Η πρώτη προσπάθεια εύρεσης συστατικών του εκκριτικού μονοπατιού, που χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία στην *E. coli* (Bieker et al., 1990) και στην ζύμη (Deshaies and Schekman, 1987), στηρίχθηκε στην αναζήτηση κατά συνθήκη θνησιγόνων μεταλλαγών (conditional lethal mutations) που προκαλούν μία γενικευμένη βλάβη στην διαδικασία μετατόπισης των πρωτεϊνών. Μ' αυτή τη μέθοδο, οι προκύπτουσες μεταλλαγές όρισαν τα sec γονίδια της *E. coli* και ένα μέρος των SEC γονιδίων της ζύμης συμπεριλαμβανομένου του SEC61. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε μια πρωτεΐνη σύντηξης από την προπρωτεΐνη και την LacZ η οποία ανάλογα με το αν μένει στο κυτταρόπλασμα (απουσία έκκρισης) ή παγιδεύεται στη μεμβράνη (κατά την έκκριση) παρουσιάζει αυξημένα ή ελαττωμένα επίπεδα δραστικότητας της LacZ και κατά συνέπεια επιβίωση σε υλικό με μοναδική πηγή άνθρακα τη λακτόζη (απομόνωση υπολειπόμενων κατά συνθήκη θνησιγόνων μεταλλαγών) ή όχι. Σε μία δεύτερη προσπάθεια, που εφαρμόστηκε με επιτυχία πάλι στην *E. coli*, αναζητήθηκαν καταστολείς μεταλλαγών του πεπτιδίου σηματοδότη (που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο των εκκριτικών πρωτεϊνών τις οποίες και χαρακτηρίζει) που μπλοκάρουν την διαδικασία μετατόπισης των εκκριτικών πρωτεϊνών. Σε τρεις περιπτώσεις αυτές οι κατασταλτικές μεταλλαγές, που καλούνται *prl* (protein localization), βρέθηκαν ότι είναι αλληλόμορφα γνωστών sec γονιδίων, *prlA*(secY), *prlD*(secA), και *prlG*(secE) (Bieker et al., 1990; Bieker-Brady and Silhavy, 1992) ενώ σε μία από τις πρώτες προσπάθειες αυτής της στρατηγικής οι Emr and Hanley-Way πρότειναν ότι και τα ριβοσώματα παίζουν βασικό ρόλο στην έκκριση των πρωτεϊνών. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατά συνθήκη θνησιγόνες μεταλλαγές που εντοπίστηκαν με τις παραπάνω μεθόδους, είναι ευαίσθητες είτε σε υψηλές, είτε σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά περιορίζονται στα πρώτα μόνο 170 αμινοξέα της πρωτεΐνης, και ως εκ τούτου δεν ήταν αρκετές για εκτεταμένο χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης. Έτσι σε μία τρίτη στρατηγική που στηρίζεται στη γνώση της αύξησης της έκφρασης του secA γονιδίου όταν υπάρχει πρόβλημα έκκρισης, η χρησιμοποίηση *secA-lacZ* ως γονιδίου αναφοράς οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα LacZ όταν υπάρχει πρόβλημα στην έκκριση. Έτσι απομονώθηκαν πάλι τα παραπάνω εκκριτικά γονίδια (Riggs et al., 1988) και ανιχνεύθηκαν πιθανές λειτουργικές περιοχές στη SecA από τη συγκέντρωση μεταλλαγών σε διακριτές θέσεις (Jarosik and Oliver, 1991). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν μεταλλαγές με συνέπειες στην έκκριση, στις αλληλουχίες 196-252, 352-367, 626-653 και 783-808. Οι αλληλουχίες αυτές αντιστοιχούν όπως θα δούμε αργότερα από την ανάλυση της δομής της SecA στις περιοχές NBD(NBF-I), SSD2[PPXD(C)], SD και IRA1, που αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα την θέση δέσμευσης ATP, την προτεινόμενη θέση δέσμευσης του υποστρώματος και την καρβοξυτελική περιοχή. Έτσι ανιχνεύθηκαν οι πρωτεΐνες SecA, SecY, SecE, SecG, SecD και SecF (σχήμα 15) και ο ρόλος τους στην έκκριση πιστοποιήθηκε μετά τον καθαρισμό τους και την επακόλουθη χρησιμοποίησή τους σε πειράματα *in vitro* ανασύστασης της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων (Cabelli et al., 1991).

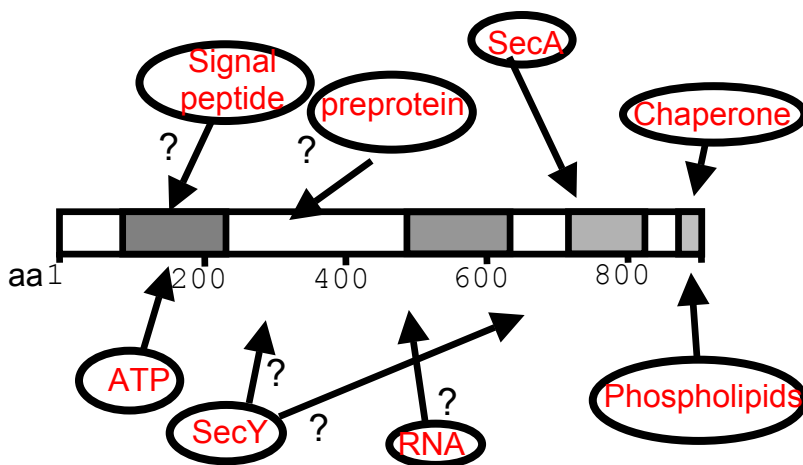
## 1.2.Γ. SecA-ATPάση-Αλληλεπιδράσεις με τους διάφορους υποκαταστάτες.

Αντίθετα από την παγκοσμιότητα της SecY, η SecA είναι συστατικό της μεταθετάσης μόνο στα βακτήρια. Παρά την εμφάνιση της αργά στο προσκήνιο της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών (δεν έχει εντοπιστεί στα αρχαία), αποτελεί κεντρικό και σε μεγαλύτερη αφθονία συστατικό του βακτηριακού εκκριτικού μονοπατιού (Driessen et al., 1993), καθώς παρουσία της πραγματοποιείται μεταφορά μεγάλων υδρόφιλων πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, μετά το πέρας της μεταφραστικής διαδικασίας. Η SecA επιτελεί πέντε βασικές λειτουργίες. 1) είναι ο φυσικός σύνδεσμος όλων των συστατικών της αντίδρασης μετατόπισης καθώς αλληλεπιδρά με την προπρωτεΐνη, με την συνοδό πρωτεΐνη SecB, το σύμπλοκο SecYEG, τα

λιπίδια, το mRNA της SecA, άλλο μόριο SecA, αλλά και με το ATP (σχήμα 16; Ulbrandt et al., 1992; Oliver et al., 1993; Arkowitz and Bassilana, 1994; Breukink et al., 1995;



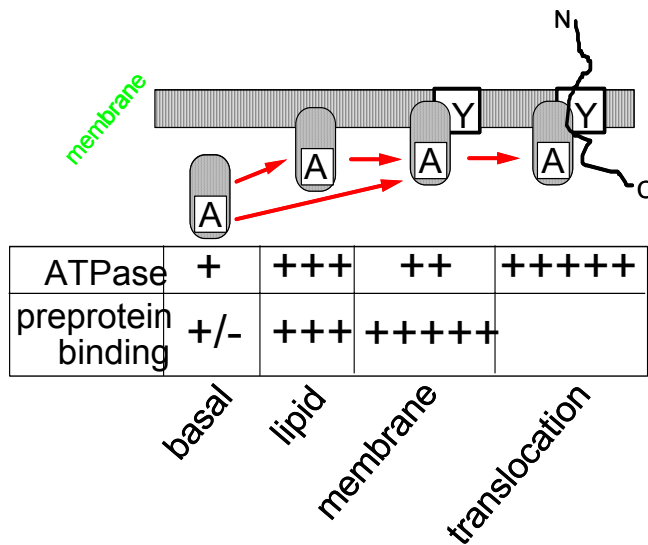
Σχήμα 15: Ανασύσταση της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών *in vitro*. 1. Στο κύτταρο εκκριτικές πρωτεΐνες με αμινοτελικά πεπτιδία σηματοδότες εκκρίνονται με τη βοήθεια ειδικών μεταθετάσων της μεμβράνης, ενώ διατηρούν την αποδιαταγμένη τους μορφή την αναγκαία για τη μετατόπιση, μέσω της αλληλεπίδρασης τους με πρωτεΐνες συνοδούς στο κυτταρόπλασμα. 2. Στο δοκιμαστικό σωλήνα μπορεί να αναπαραχθεί η παραπάνω διαδικασία της μετατόπισης, αν σε ανασυστάμενα με μεταθετάση (π.χ με την SecYEG) πρωτεολιποσώματα προστεθεί υπόστρωμα με πεπτιδίο σηματοδότη, ATP και συνοδές πρωτεΐνες. 3. Η πρωτεΐνη συνοδός διατηρεί το υπόστρωμα στην αποδιαταγμένη διαμόρφωση που είναι κατάλληλη για την μεταφορά από το κανάλι της μεταθετάσης SecYEG, με δαπάνη ATP από την SecA πρωτεΐνη κινητήρα.



Σχήμα 16: SecA και υποκαταστάτες. Η SecA πρωτεΐνη αλληλεπιδρά μ' ένα πλήθος υποστρωμάτων των οποίων οι θέσεις δέσμευσης, είτε έχουν προσδιοριστεί, είτε έχουν προταθεί να βρίσκονται στις παραπάνω θέσεις (?).

Fekkes et al., 1997). 2) Λειτουργεί σαν πρωταρχικός υποδοχέας της μεταθετάσης για τα εκκρινόμενα υποστρώματα και τις πρωτεΐνες συνοδούς τους (όπως θα δούμε σύντομα SecB-υπόστρωματος έχουν μεγάλη συγγένεια για την δεσμευμένη στη SecYEG θέση SecA; Wickner and Leonard, 1996) τα οποία και καθοδηγεί στο εκκριτικό κανάλι. 3) Πιθανά συνιστά βασική δομική μονάδα του εκκριτικού αγωγού (Joly and Wickner, 1993; van der Does et

al., 1996; Chen et al., 1996; Snyder et al., 1997) και μάλλον μαζί με την SecYEG προστατεύει τα πολικά τμήματα των υποστρωμάτων από τα φωσφολιπίδια (Joly and Wickner, 1993). 4) Είναι ένζυμο που ρυθμίζεται τοπολογικά και αυξάνει την ATPάση του καθώς μεταβαίνει από το κυτταρόπλασμα, όπου μιλάμε για την Βασική (Basal) ATPάση της SecA, στη λιπιδική διπλοστοιβάδα, Λιπιδική (Lipid) ATPάση, στη μεμβράνη στη SecYEG



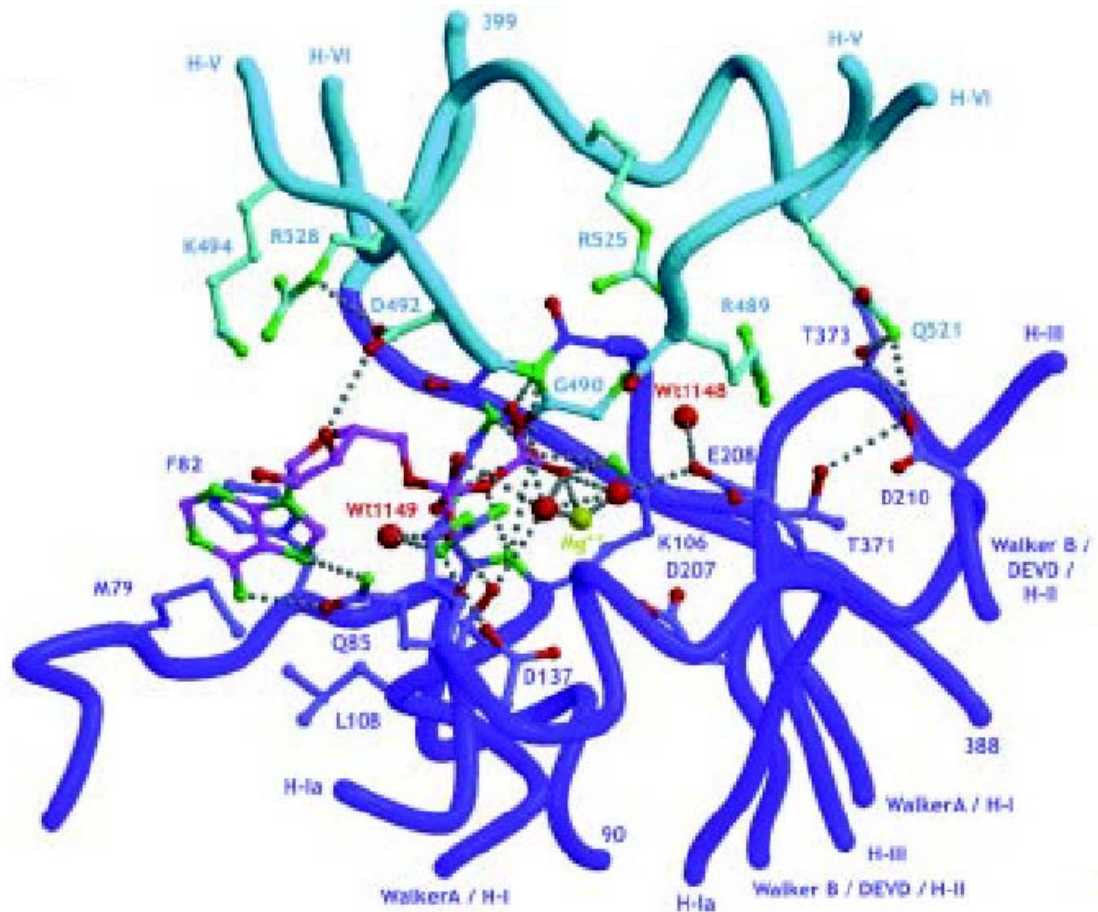
Σχήμα 17: Η SecA είναι ένζυμο που ρυθμίζεται τοπολογικά.

θέση, όπου μιλάμε για την Μεμβρανική (Membrane) ATPάση, ενώ συμμετέχει και στην μετατόπιση του εκκρινόμενου υποστρώματος, οπότε και μιλάμε για ATPάση μετατόπισης (Translocation ATPase). Κατά την παραπάνω μετάβαση από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη, αυξάνεται αντίστοιχα και η συγγένεια της SecA για το υπόστρωμα (σχήμα 17). 5) Παράγει το απαραίτητο μηχανικό έργο για την μετατόπιση του υποστρώματος, μετατρέποντας την ελεύθερη ενέργεια του ATP σε μηχανική (Economou and Wickner, 1994). 6) Αισθάνεται και ρυθμίζει την εκκριτική κατάσταση του κυττάρου ρυθμίζοντας την μετάφραση του mRNA του, είτε μέσω δέσμευσης σ' αυτό (Oliver, 1993; Mori and Ito, 2001; Βλέπε

και Κεφάλαιο ρύθμισης των sec γονιδίων), είτε μέσω της δραστηριότητας ελικάσης που διαθέτει (Park et al., 1997). 7) Μετακινείται μεταξύ περιφερειακής μεμβρανικής και διαλυτής κυτταροπλασματικής κατάστασης (Cabelli et al., 1991) και 8) υφίσταται μετρήσιμες αλλαγές στη διαμόρφωση της. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να μετρηθούν ως διαφορετικές θερμικές ή πρωτεολυτικές σταθερότητες, ανάλογα με την κατάσταση δεσμευμένου νουκλεοτιδίου στην οποία βρίσκονται (Den Blaauwen et al., 1996). Εξάλλου εξαιτίας του σχηματισμού πρωτεολυτικά σταθερών τμημάτων SecA που είναι ευαίσθητα στην διατάραξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, θεωρήθηκε ότι η πρωτεΐνη εισέρχεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, στην θέση SecYEG, σαν τμήμα της αντίδρασης μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες (Economou and Wickner, 1994; Economou et al., 1995; Eichler and Wickner, 1997). Λεπτομερέστερη μελέτη της SecA πρωτεΐνης πραγματοποιείται σε επόμενο κεφάλαιο.

### 1.2.Γ.Ι. Αλληλεπίδραση SecA με ATP.

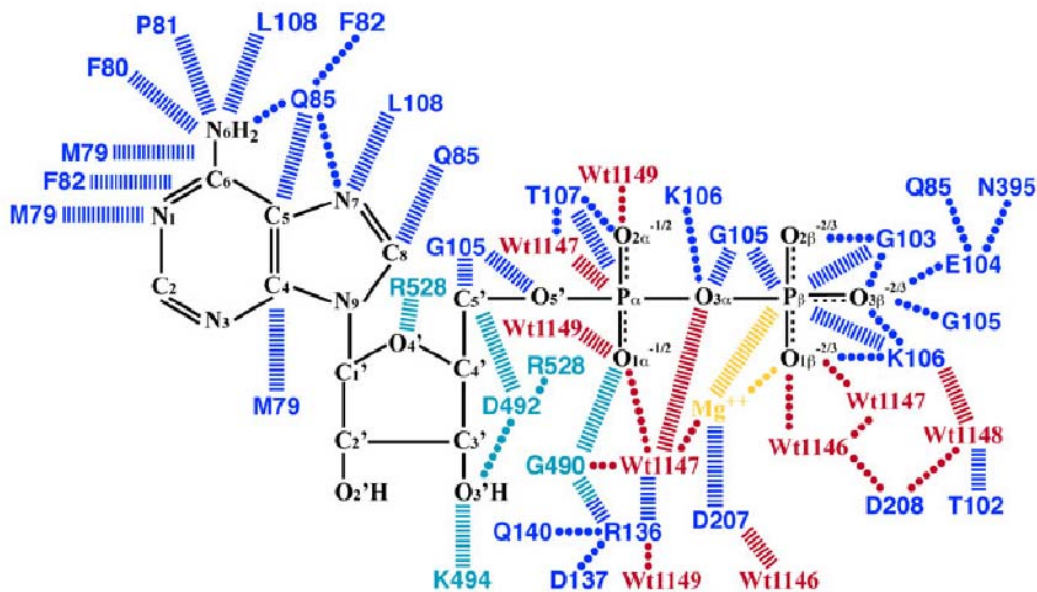
Από την δομή της SecA από το *B.subtilis* (Hunt et al., 2002) προκύπτει ότι η δέσμευση ATP στη SecA πραγματοποιείται εντός της μεσόφασης που σχηματίζεται από τις περιοχές NBD-IRA2 ή (NBF1-NBF11), ενώ διαπιστώθηκε ακόμα η δομική ομοιότητα των παραπάνω περιοχών με τις ελικάσες των οικογενειών SF-I και SF-II. Οι περισσότερες αλληλεπιδράσεις με το νουκλεοτίδιο προέρχονται από τα μοτίβα των ελικασών τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως και παρουσιάζονται στο σχήμα 18. Συγκεκριμένα η δέσμευση του νουκλεοτιδίου αδενίνης από το NBD (NBF-I) πραγματοποιείται με παρόμοια γεωμετρία με την F1 ATPάση (σχήμα 67?). Η συνεναιτική αλληλουχία Walker A (μοτίβο I στις ελικάσες) σχηματίζει την ελικοειδή δομή της "P-λούπας" που δεσμεύει τους φωσφόρους α και β του νουκλεοτιδίου, ενώ η αλληλουχία Walker B (μοτίβο II στις ελικάσες) σχηματίζει μία υδρόφοβη β αλυσίδα που καταλήγει στο αμινοξύ D207 που έρχεται σε επαφή με τον συμπαραγόνα  $Mg^{2+}$  (σχήμα 18 και 19). Αυτό το ασπαρτικό οξύ (D) είναι το πρώτο αμινοξύ της αλληλουχίας DEAD (DEVD στην SecA) που εντοπίζεται σε μία υποοικογένεια των SF-II ελικασών αλλά όχι στην F1 (σχήμα 66?). Το E208 στην DEAD αλληλουχία αποτελεί τον πρώτο υποψήφιο για τον ρόλο της καταλυτικής βάσης κατά την υδρόλυση του ATP, αφού σχηματίζει δεσμό-H με το νερό 1148 που τοποθετείται έτσι ώστε να προσβάλλει υδρολυτικά τον γ-φώσφορο του ATP (σχήμα 18). Τα αμινοξέα που έρχονται σε επαφή με τη βάση του νουκλεοτιδίου προέρχονται κυρίως από το αμινοτελικό άκρο της έλικας 4 του NBD (NBF-I) σε μία περιοχή που δεν αποτελεί μοτίβο ελικάσης, αλλά είναι συντηρημένη στις DEAD ελικάσες (σχήμα 66?). Οι υπόλοιπες απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με το νουκλεοτίδιο πραγματοποιούνται με τα μοτίβα των ελικασών V και VI, τα οποία τοποθετούνται σε διαφορετική περιοχή του IRA2 (NBF-II) απ'



Σχήμα 18: (Hunt et al., 2002). Στερεοδιάγραμμα κορδέλας του ενεργού κέντρου της δομής της *bsSecA* που περιέχει δεσμευμένο Mg-ADP. Στο διάγραμμα αυτό υποδηλώνονται οι θέσεις των μοτίβων των ελικασών (Walker A/H-I, H-Ia, Walker B/DEVD/H-II, H-III, H-V, H-VI). Ο σκελετός της ανθρακικής αλυσίδας, όπως και τα περισσότερα άτομα των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και των υποκαταστατών, χρωματίζονται ανάλογα με την περιοχή προέλευσής τους, αλλά τα άτομα οξυγόνου, χρωματίζονται κόκκινα, τα άτομα αζώτου ανοιχτά πράσινα, και τα ιόντα  $Mg^{2+}$  κίτρινα. Οι δεσμοί υδρογόνου σημειώνονται με διακεκομμένη γκρι γραμμή.

ότι τα τοπολογικά ισοδύναμα των αλληλουχιών Walker A και Walker B (σχήμα 64?). Συγκεκριμένα τα αμινοξέα G490, D492 και K494 του μοτίβου V έρχονται σε επαφή με τον α-φώσφορο και την ριβόζη, ενώ το αμινοξύ R528 στο καρβοξυτελικό άκρο του μοτίβου VI έρχεται σε επαφή με τη ριβόζη και το αμινοξύ D492 (σχήμα 18 και 19). Από την άλλη το αμινοξύ Q521 στο μοτίβο VI σχηματίζει ένα συνεργατικό δίκτυο υδρογονοδεσμών με τρία αμινοξέα του NBD (NBF-I): Το D210 στο καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας DEAD στο μοτίβο II, και το T371 και T373 στο μοτίβο III. Το αμινοξύ R521 “δάκτυλος αργινίνης” στο μοτίβο VI έρχεται σε επαφή με τον γ-φώσφορο του νουκλεοτιδίου όταν δεσμεύεται ATP (σχήμα 18). Μία τέτοια αλληλεπίδραση παρατηρείται στην PcrA ελικάση (Velankar et al., 1999), αλλά δεν είναι δυνατή στη δομή της MJ0669 που δεν υπάρχει νουκλεοτίδιο (Story et al., 2001), στην οποία μία περιστροφή της NBD-περιοχής (NBF-I) περί την IRA2 (NBF-II) περιοχή δημιουργεί ένα μεγάλο άνοιγμα στη ρωγμή-σχισμή δέσμευσης του νουκλεοτιδίου (σχήμα 62?, βλέπε πρώτη σειρά και πρώτη δομή).

Μέχρι στιγμής οι αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA που έχουν παρατηρηθεί παρουσία νουκλεοτιδίων αφορούν την δέσμευση στην υψηλής συγγένειας θέση κάθε νουκλεοτιδίου. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις κατάλληλες για κορεσμό μόνο της υψηλής συγγένειας θέσης του νουκλεοτιδίου, ενώ έχουν προταθεί και μοντέλα για το πως μέσω αυτών των εξαρτόμενων από το νουκλεοτίδιο διαμορφώσεων, η μονομερής SecA μετατρέπει την ενέργεια του ATP σε μηχανική. Έτσι προτείνεται ότι η δέσμευση ATP στη SecA προκαλεί εκτεταμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης με περιορισμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των N- και C-περιοχών, η οποία διευκολύνεται στην εισαγωγή της στη μεμβράνη. Αντίθετα όταν γίνει υδρόλυση του ATP και παραχθεί ADP, η SecA αποκτά συμπαγή διαμόρφωση, με εκτεταμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των N- και C-περιοχών, που συντελεί



Σχήμα 19: (Hunt et al., 2002). Μοριακές επαφές μεταξύ της SecA και του υποκαταστάτη Mg-ADP. Τα δεσμευμένα άτομα του νερού που γειτνιάζουν με το ενεργό κέντρο σημειώνονται ως "wt". Οι αλληλεπιδράσεις αναλύονται θέτοντας όριο απόστασης μεταξύ των ατόμων τα 3.80Å, για αλληλεπιδράσεις Van der Waals, και 3.30Å για τους δεσμούς-H. Οι χρωματισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ανάλογοι μ' αυτούς του σχήματος 63.

στην εξαγωγή της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη (Economidou, 1998). Οι συνεχείς κύκλοι όμως εισαγωγής και εξαγωγής της πρωτεΐνης στη μεμβράνη είναι απαραίτητοι για την εν εξελίξει μεταφορά του υποστρώματος μέσα από τη μεμβράνη. Η SecA όμως λειτουργεί πιθανότατα σαν διμερές (βλέπε Κεφάλαιο-Διερεύνησης της κατάστασης ολιγομερισμού της SecA). Επομένως για την διερεύνηση του μηχανισμού της και του τρόπου με τον οποίο μετατρέπει την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP σε μηχανική κατά τη μεταφορά της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη, είναι απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης των νουκλεοτιδίων στην ολιγομερική κατάσταση της SecA. Οι den Blaauwen et al., 1996 διαπίστωσαν (βλέπε Κεφάλαιο-Αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA παρουσία διαφόρων υποκαταστατών και Κεφάλαιο-Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού της SecA), ότι παρουσία πολύ υψηλών συγκεντρώσεων ADP (ώστε να καλύπτεται και η χαμηλής συγγένειας θέση δέσμευσης για ATP, αν υπάρχει; δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί αν υπάρχει αυτή η θέση και αν υφίσταται στο μονομερές η στο διμερές της SecA) παρατηρείται διπλάσια ενθάλπια αποδιάταξης της πρωτεΐνης απ' ό τι στην περίπτωση που καλύπτεται μόνο η πρωταρχική θέση δέσμευσης ATP, η οποία κατά συνέπεια αναμένεται να αντιστοιχεί σε διατάραξη μεγαλύτερου εύρους αλληλεπιδράσεων απ' αυτές της N- με την C-περιοχή, δηλαδή μεταξύ των μονομερών στο διμερές της SecA (βλέπε Κεφάλαιο διερεύνησης των αλλαγών της διαμόρφωσης της SecA πρωτεΐνης, παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών, σχήμα 99?). Οι van der Wolk et al., 1997, στην προσπάθειά τους να καλύψουν με ATP και την δεύτερη χαμηλής συγγένειας θέση για ATP στη SecA, χρησιμοποίησαν πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις του ATP αναλόγου  $\text{DiN}_3\text{ATP}$ , που αποτελεί φωτοενεργοποιούμενο χημικό διασυνδετή, και διαπίστωσαν μόνο σ' αυτές, τις πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις του ATP αναλόγου, δημιουργία ενός σταθερού διμερούς της SecA. Διμερές SecA μέσω της παραπάνω χημικής διασύνδεσης πραγματοποιείται, αν και σε μικρότερο βαθμό, ακόμα και στην περίπτωση της μεταλλαγής D209N που παρουσιάζει πρόβλημα στη δέσμευση και υδρόλυση του ATP στην πρωταρχική θέση δέσμευσης του, ενώ δεν παρατηρείται στην περίπτωση της R509K μεταλλαγής όπου διαταράσσεται η περιοχή IRA2 στη SecA, που έχει προταθεί ότι εντοπίζεται η δεύτερη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου, σύμφωνα με τους Mitchell and Oliver, 1993. Προκύπτει λοιπόν ότι δημιουργία διμερούς SecA μέσω χημικής διασύνδεσης με  $\text{DiN}_3\text{ATP}$  πραγματοποιείται μόνο αν υπάρχει WTIRA2-περιοχή (από την οποία μεταφέρεται πιθανά η πληροφορία για σχηματισμό διμερούς στην C-περιοχή που ευθύνεται για τον διμερισμό) και πολύ αυξημένες συγκεντρώσεις νουκλεοτιδίου, ώστε να καλύπτεται και η υψηλής συγγένειας θέση δέσμευσης

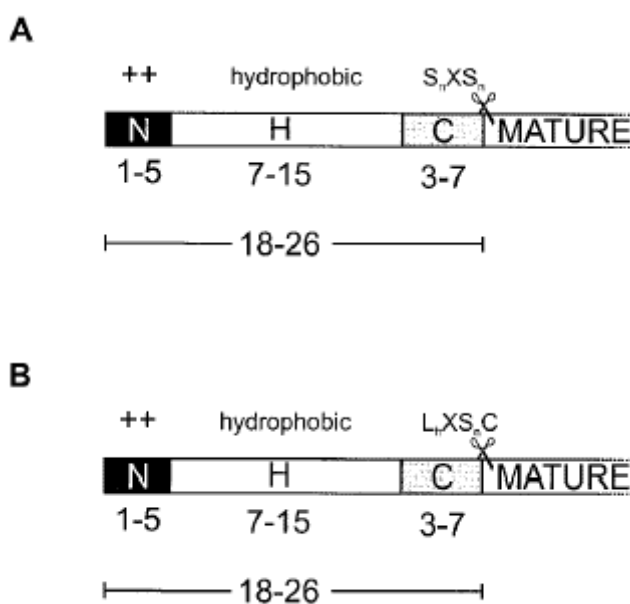


για ATP, αλλά και μια χαμηλότερης συγγένειας θέση δέσμευσης για ATP. Δηλαδή διάφοροι χημικοί διασυνδετές-παράγωγα του ATP αποκάλυψαν ότι η υποτιθέμενη δεύτερη θέση δέσμευσης του ATP, αποτελεί τμήμα της μεσόφασης μεταξύ των υπομονάδων της SecA στο ομοδιμερές της. Με βάση τα αποτελέσματα των Sianidis et al., η δεύτερη αυτή θέση δέσμευσης του ATP δεν μπορεί να εντοπίζεται στο πρωτομερές της SecA, αλλά αναμένεται να λαμβάνει χώρα στο δεύτερο πρωτομερές της SecA, γεγονός που συντελεί στην δημιουργία ασύμμετρου μορίου SecA (σχήμα 20). Συγκεκριμένα δημοσιεύματα αποτελέσματα από Karamanου, προτείνουν μία θέση δέσμευσης ATP ανά διμερή SecA ενώ στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Schmidt et al., 2000, με διαπίδυση ισορροπίας ανατρέποντας τα πειραματικά αποτελέσματα των Mitchell and Oliver, 1993.

## 1.2.Γ.II. Αλληλεπίδραση SecA με τα πρωτεϊνικά υποστρώματα.

### 1.2.Γ.II.α. Πεπτιδία σηματοδότες (Signal peptides).

Οι εκκριτικές πρωτεΐνες διαθέτουν πεπτιδία σηματοδότες μέσω των οποίων παγιδεύονται στο μονοπάτι έκκρισης καθώς αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες συνοδούς (chaperones). Η παρουσία των πεπτιδίων σηματοδοτών καθυστερεί την απόκτηση από τις πρωτεΐνες της τριτοταγούς διαμόρφωσης τους στο χώρο (αντίθετα από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν τέτοια σινιάλα και αποκτούν την στερεοδιάταξη τους στο κυτταρόπλασμα, σε msec ή sec), (Park et al., 1988; Randall and Hardy, 1986; Eilers and Schatz, 1988) οπότε και ανιχνεύονται από τις πρωτεΐνες συνοδούς. Παρά το γεγονός ότι τα πεπτιδία αυτά έχουν συγκεκριμένη λειτουργία, δεν μοιράζονται κάποια συναινετική αλληλουχία, αλλά παρουσιάζουν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες (Gierasch, 1989). Πρόκειται για μικρές αλληλουχίες (~20 αμινοξέα, σχήμα 20) που συνίστανται από ένα



υδρόφοβο πυρήνα, πάνω από συγκεκριμένο κατώφλι υδροφοβικότητας (Valent et al., 1995), ο οποίος περιβάλλεται από μικρές πολικές περιοχές (Zheng and Gierasch 1996). Το δεύτερο χαρακτηριστικό τους είναι ότι μπορούν και αποκτούν α-ελικοειδή διαμόρφωση, καθώς απομονωμένα πεπτιδία σινιάλα σε υδρόφοβο περιβάλλον παρουσιάζουν σημαντικό ποσό ελικοειδούς δομής (McKnight et al., 1989; Bruch et al., 1989), ενώ και μετά την απελευθέρωση από το SRP τα πεπτιδία σηματοδότες δεσμεύονται στο κανάλι της μεταθετάσης των θηλαστικών με α-ελικοειδή διαμόρφωση (Plath et al.,

Σχήμα 20: (Fekkes, Driessen, 1999). Δομή του πεπτιδίου σηματοδότη των διαφόρων προπρωτεϊνών. Α) Τα πεπτιδία σηματοδότες των SRP και SecB εξαρτούμενων προπρωτεϊνών έχουν στην αμινοτελική τους περιοχή (N) ένα θετικό φορτίο, εν συνεχεία μία υδρόφοβη περιοχή (H), και τέλος μία καρβοξυτελική περιοχή (C). Πριν από την θέση εκτομής του πεπτιδίου σηματοδότη από την Πεπτιδάση υπάρχει η αλληλουχία  $S_nXS_n$ , όπου το  $S_n$  αντιστοιχεί σ' ένα οποιοδήποτε αμινοξύ με μικρή ουδέτερη πλευρική αλυσίδα, ενώ το X αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε αμινοξύ. Β) Πεπτιδία σηματοδότες τύπου II, στα οποία πριν από την θέση εκτομής του πεπτιδίου σηματοδότη από την Πεπτιδάση II, υπάρχει η αλληλουχία  $L_nXS_nC$ , όπου το  $L_n$  αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε αμινοξύ με μεγάλη υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα και το C αντιπροσωπεύει την κυστεΐνη.

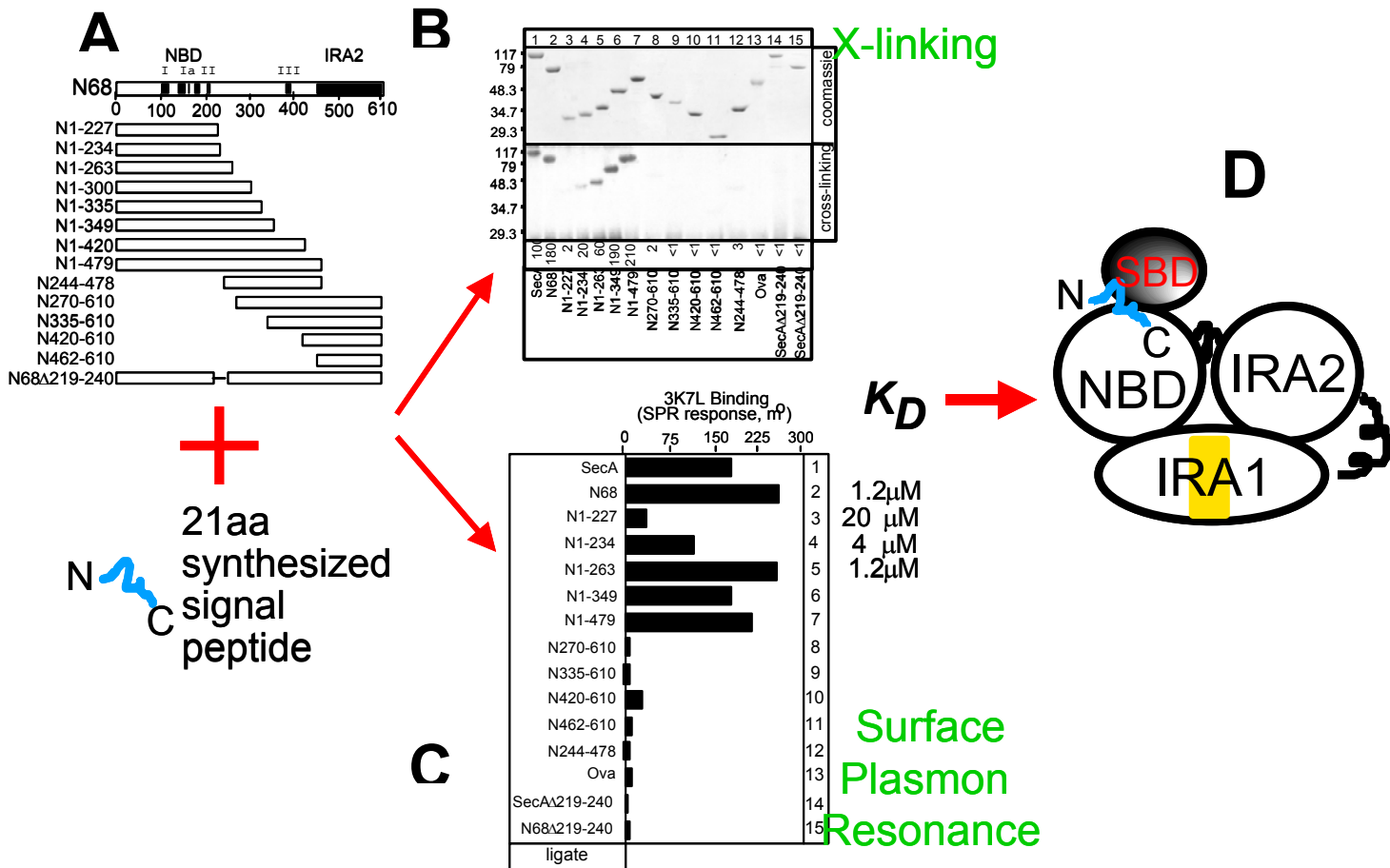
1998). Τα πεπτιδία σηματοδότες συνήθως τοποθετούνται στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών, από το οποίο και αποκρίνονται κατά ή μετά τη διαδικασία της μετατόπισης, από ειδικές πεπτιδάσες που εντοπίζονται στην trans πλευρά της μεμβράνης (περισσότερες λεπτομέρειες θα αναφερθούν στο κεφάλαιο της ωρίμανσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας).

Αντίθετα τα πεπτιδία σηματοδότες για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορεί να εντοπίζονται εσωτερικά και δεν αποκόπτονται. Το καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου σηματοδότη είναι πολικό και συνήθως συνίσταται από 6 αμινοξέα που υποδηλώνουν ουσιαστικά το τέλος του υδρόφοβου πυρήνα, ενώ η παρουσία γλυκίνης ή προλίνης σ' αυτό συντελούν στην κατάλληλη παρουσίαση της θέσης αποκοπής από την πεπτιδάση οδηγό (Izard et al., 1995). Για τον ίδιο λόγο τα πεπτιδία σηματοδότες δεν διαθέτουν και αμινοξέα με ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες στις θέσεις -1 και -3 (με αρχή από τον υδρόφοβο πυρήνα) (Laforet et al., 1991), αφού δεν το επιτρέπει η δράση σ' αυτή την περιοχή της πεπτιδάσης οδηγού (βλέπε δομή πεπτιδάσης οδηγού στο Κεφάλαιο ωρίμανσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας). Μάλιστα οι Kuhh et al., 1985 έδειξαν ότι τα αμινοξέα στις θέσεις -1, -3, -4 και -6 είναι πολύ σημαντικά για την αναγνώριση από την πεπτιδάση οδηγό, αλλά όχι για τη διαμεμβρανική μεταφορά της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αξίζει να σημειώσουμε ότι στην περίπτωση των λιποπρωτεϊνών οι πεπτιδάσες οδηγό ανήκουν στην κατηγορία II ( και όχι I όπως προηγουμένως) και έχουν διαφορετικές απαιτήσεις για τις θέσεις -3 και +1 (Sankaran et al., 1994). Έτσι στην θέση -3 οι πρόδρομοι των λιποπρωτεϊνών περιέχουν μεγάλα υδρόφοβα αμινοξέα, ενώ στην θέση +1 συναντάται πάντα κυστεΐνη (σχήμα 20).

Μία από τις αλληλεπιδράσεις του πεπτιδίου σηματοδότη με το σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, αφορά τη SecA πρωτεΐνη. Η SecA έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά με προπρωτεΐνες (Lill et al., 1990; Cunningham et al., 1989; Akita et al., 1990), αλλά και ότι μόνο του το πεπτιδίο σηματοδότης δεσμεύεται στη SecA σε λιποσώματα και διεγείρει τη δραστηριότητα ATPάσης της στα λιπίδια (SecA-Lipid ATPase activity) (Miller et al., 1998) ενώ χρειάζεται και το πεπτιδίο σηματοδότης και το ώριμο τμήμα της πρωτεΐνης για να μιλήσουμε για ATPάση μετατόπισης (Translocation ATPase) παρουσία μεμβρανών με SecYEG (Cunningham et al., 1989). Μάλιστα οι Kebir et al., 2002 έδειξαν ότι η πρωιμη περιοχή της ώριμης πρωτεΐνης δεν ενισχύει την παραπάνω ενεργοποίηση, παρά το γεγονός ότι ουσιαστικά αντιπροσωπεύει την ευρύτερη ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης στο φορτίο, την υδροφοβικότητα και την ποικιλία των αμινοξέων. Οι Akita et al., 1990, διαπίστωσαν χημική διασύνδεση της SecA με προπρωτεΐνες, λόγω του θετικού φορτίου στην αρχή του πεπτιδίου σηματοδότη, ενώ εντοπίστηκε και η επίδραση των νουκλεοτιδίων στην χημική διασύνδεση προπρωτεϊνών με SecA (van Voorst et al., 2000). Επιπλέον οι Wang et al., 2000 έδειξαν ότι η SecA μπορεί να αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο σηματοδότη, χωρίς την ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει ακόμα και σε διάλυμα χωρίς ανάγκη υδρόλυσης ATP, και άρα και όταν είναι ευρισκόμενη η SecA στο κυτταρόπλασμα, διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην καθοδήγηση των εκκριτικών πρωτεϊνών στη μεταθετάση της μεμβράνης. Προς τούτο χρησιμοποίησαν πάλι τη δοκιμασία της αύξησης της δραστηριότητας της SecA ATPάσης στα λιπίδια παρουσία λειτουργικών πεπτιδίων σινιάλων, αλλά και τη δοκιμασία εκτόπισης μέσω συναγωνισμού από κρύο, τριπλωμένου πεπτιδίου σηματοδότη η οποία και ποσοτικοποιείται από τη ραδιενέργεια που μένει στην SecA μετά από τη χημική διασύνδεση με το τριπλωμένο πεπτιδίο. Κατέληξαν έτσι στο συμπέρασμα ότι όσο αυξάνει η δραστηριότητα του πεπτιδίου σηματοδότη στη μετατόπιση πρωτεϊνών, τόσο αυξάνει και η δέσμευση του στη SecA. Δηλαδή αυξανόμενη της υδροφοβικότητας του πεπτιδίου σηματοδότη, ή αυξανόμενων των θετικών φορτίων στο αμινοτελικό άκρο μεσαίας υδροφοβικότητας πεπτιδίου σινιάλου, αυξάνεται και η συγγένεια του για την SecA. Στο ίδιο συμπέρασμα οι Wang et al., 2000, κατέληξαν και με την χρήση περιοριστικής πρωτεόλυσης παρουσία V8 πρωτεάσης, οπότε και παρατήρησαν ευαισθησία της SecA από την πρωτεάση παρουσία λειτουργικών πεπτιδίων σινιάλων. Η ευαισθησία αυτή της SecA παρουσία των πεπτιδίων σηματοδοτών, υποδηλώνει τη δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στη SecA και την αλλαγή της διαμόρφωσης της, όπως έχει διαπιστωθεί και από τους Ding et al., 2001; Roos et al., 2001; Fekkes et al., 1998. Αντίστοιχη είναι η επίδραση λιπιδίων στην περιοριστική πρωτεόλυση της SecA, ενώ η ευαισθησία του μορίου ελαττώνεται παρουσία νουκλεοτιδίων (Ulbrandt et al., 1992; Shinkai et al., 1991; περισσότερες λεπτομέρειες στο Κεφάλαιο-Αλλαγών στη διαμόρφωση της SecA παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης). Εξακολουθεί να ισχύει πάντως το γεγονός, ότι η ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης δεν επηρεάζει την δέσμευση του πεπτιδίου με τη SecA, αφού δεν ενισχύει την ATPάση της παρουσία λιπιδίων περισσότερο απ' ότι το πεπτιδίο σηματοδότης (Kebir et al., 2002).

Μπορεί να έχει πραγματοποιηθεί χημική διασύνδεση προπρωτεΐνης με την περιοχή 267-340 της SecA (Kimura et al., 1991), δεν είναι δυνατό όμως να ελεγχθεί αν αυτή η θέση είναι η θέση στην οποία δεσμεύεται το πεπτιδίο σινιάλο, ή η ώριμη πρωτεΐνη, ή ακόμα αν πρόκειται όχι για θέση δέσμευσης της προπρωτεΐνης αλλά απλά για θέση που εντοπίζεται

κοντά στη πραγματική θέση δέσμευσης της και για πειραματικούς λόγους και μόνο, διασυνδέθηκε με τον χημικό διασυνδετή. Απάντηση στο παραπάνω ερώτημα δώθηκε αρχικά από τους Triplett et al., 2001; που έδειξαν ότι το πεπτιδίο σηματοδότη δεσμεύεται στον DEAD κινητήρα. Μάλιστα οι Baud et al., 2002, έδειξαν ότι η περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο του, στην περιοχή της ATPάσης, περιοχή 1-420, σε διακριτή θέση όμως από την καταλυτική μηχανή (Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001). Έτσι απλοποιώντας το σύμπλοκο SecA-πεπτιδίο σηματοδότη με την χρησιμοποίηση ποικίλων τμημάτων του DEAD κινητήρα, και με χημική διασύνδεση των τμημάτων αυτών με τριτωμένο πεπτιδίο σηματοδότη (σχήμα 21), ή με αλλαγή του δείκτη

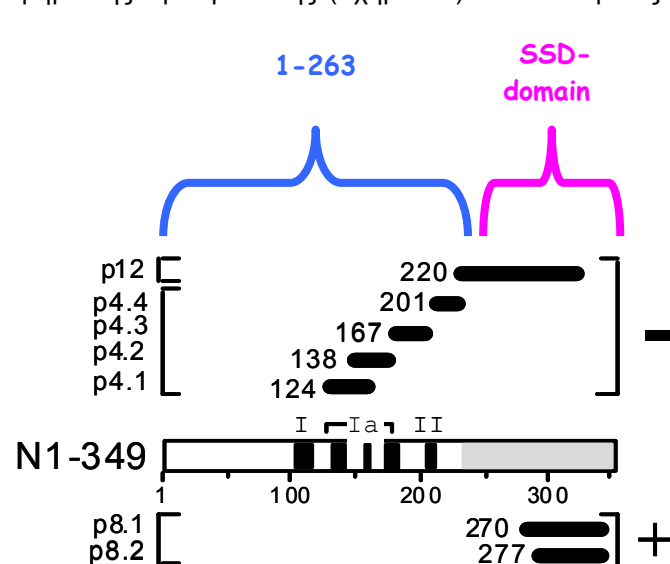


Σχήμα 21: (Baud et al., 2002). Μεθοδολογία ανίχνευσης της περιοχής δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη. Α) κατασκευή ποικιλίας αμινοτελικών και καρβοξυτελικών τμημάτων του DEAD κινητήρα (N68) και σύνθεση προτύπου πεπτιδίου σηματοδότη 21 αμινοξέων. Β) Το συντιθέμενο πεπτιδίο είτε σημαίνεται με τρίτο προκειμένου να χρησιμοποιηθεί με τα παραπάνω τμήματα σε πειράματα χημικής διασύνδεσης, τα αποτελέσματα των οποίων απεικονίζονται στην αυτοραδιογραφία του σχήματος. Γ) είτε ακινητοποιείται σε κατάλληλη επιφάνεια και από την αλλαγή του δείκτη διαθλάσεως (surface plasmon resonance) υπολογίζεται η συγγένεια καθενός από τα παραπάνω τμήματα για το πεπτιδίο σηματοδότη. Δ) Διαίρεση της SecA σε διάφορες περιοχές με διακριτή λειτουργία (βλέπε κείμενο).

διαθλάσεως σε επιφάνεια με ακινητοποιημένο πεπτιδίο σηματοδότη (surface plasmon resonance; σχήμα 21), ότι το τμήμα 1-234 αρκεί για την δέσμευση του πεπτιδίου σινιάλου. Απλά τα αμινοξέα από τη θέση 235-263, είτε βελτιώνουν τη δέσμευση ή είναι απαραίτητα για τη δομική σταθερότητα της θέσης δέσμευσης, αφού το τμήμα 1-263 παρουσιάζει αισθητά βελτιωμένη αισθητά αλληλεπίδραση με το πεπτιδίο σηματοδότη. Παρατήρησαν ακόμα ότι το τμήμα 1-227 δεν κάνει παρά φτωχή δέσμευση του πεπτιδίου οπότε και απέδωσαν στα αμινοξέα 228- 234 μεγάλη σημασία για την συγγένεια της δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη. Επιπλέον επειδή η μεταλλαγμένη SecA με έλλειψη αμινοξέων από την θέση 220 μέχρι 240 δεν δεσμεύει καθόλου πεπτιδίο σηματοδότη, πρότειναν ότι το επταπεπτιδίο 220-227 είναι εντελώς απαραίτητο για τη δέσμευση του πεπτιδίου σινιάλου. Επειδή όμως ούτε το 1-227 τμήμα, αλλά ούτε και το 221-328 όπως και η SecA με έλλειψη αμινοξέων από την θέση 220 μέχρι 240, μπορούν από μόνα τους να δεσμεύσουν ικανοποιητικά το πεπτιδίο σινιάλο,

προκύπτει ότι η θέση δέσμησης αυτού στη SecA πρέπει να συνίσταται από περιοχές τόσο του πυρήνα υδρόλυσης του ATP, 1-227 (Sianidis et al., 2001; Karamanou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα), όσο και από την υποπεριοχή 220-360 που προτείνεται ότι αποτελεί μία περιοχή εξειδικευμένη για τη δέσμηση του υποστρώματος (substrate specificity domain, SSD). Η περιοχή αυτή αποτελεί, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο Κεφάλαιο, διακριτή προσθήκη στη SecA που δεν απαντάται σ' άλλες DEAD πρωτεΐνες, οι οποίες όμως χαρακτηρίζονται από άλλες περιοχές-προσθήκες που προφανώς προσδιορίζουν τον τρόπο δράσης τους.

Το πεπτιδίο σηματοδότης μπορεί να χρειάζεται την επιφάνεια δέσμησης του ATP για να αλληλεπιδράσει με τη SecA, δεσμεύεται όμως σε διαφορετική θέση απ' αυτή που προσδένεται το ATP στην ευρύτερη περιοχή δέσμησης του νουκλεοτιδίου (1-420 NBD-domain) καθώς η συγγένεια,  $K_m$ , για ATP της SecA δεν αλλάζει παρουσία του πεπτιδίου σινιάλου. Με πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης, αλλά και με τη χρησιμοποίηση μονοειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων για τις διάφορες υποπεριοχές του DEAD κινητήρα (σχήμα 53?), οι Baud et al., 2002 διαπίστωσαν ακόμα ότι με τη δέσμηση στη SecA του πεπτιδίου σηματοδότη προκαλούνται μία σειρά από αλλαγές τόσο στον πυρήνα δέσμησης του νουκλεοτιδίου, όσο και στην περιοχή 267-340, πέρα από τη θέση δέσμησης του πεπτιδίου σινιάλου, που αναμένεται πλέον να αποτελεί τη περιοχή όπου δεσμεύεται το ώριμο τμήμα της προπρωτεΐνης (σχήμα 22). Οι εκτεταμένες αυτές αλλοστερικές αλλαγές εξηγούν



Signal Peptide

Σχήμα 22: (Baud et al., 2002). Δέσμηση του πεπτιδίου σηματοδότη προσξενεί μια σειρά από αλλαγές στην NBD-περιοχή αλλά και στην SSD υποπεριοχή της. Απεικονίζονται τα πεπτιδία που προκύπτουν μετά από πρωτεόλυση του τμήματος 1-349 απουσία και παρουσία του πεπτιδίου σηματοδότη.

την απομόνωση κατασταλικών μεταλλαγών μεταλλαγμένου πεπτιδίου σηματοδότη σ' όλη την περιοχή 1-360, στην οποία έχουν απομονωθεί αλληλόμορφα γονίδια *secA* που ανακουφίζουν προβλήματα έκκρισης από μεταλλαγές στην αλληλουχία οδηγό της πρωτεΐνης δέσμησης στη μαλτόζη; Fikes et al., 1989. Παράλληλα μπορούν να εξηγήσουν και την αύξηση της συγγένειας της SecA για την ώριμη πρωτεΐνη μετά τη δέσμηση του πεπτιδίου σινιάλου κατά τη διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών.

Επιπλέον η ποικιλία των αλλοστερικών αλλαγών στις υποπεριοχές του DEAD κινητήρα από την δέσμηση του πεπτιδίου σηματοδότη, δύνανται να εξηγήσουν και την μείωση της δραστηριότητας ATPάσης του DEAD κινητήρα

παρουσία του πεπτιδίου σινιάλου (Triplett et al., 2001; Baud et al., 2002) που φαίνεται να έχει λειτουργική σημασία. Συγκεκριμένα καθώς οφείλεται στην αναστολή της υδρόλυσης του ATP (Karamanou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και όχι στην κατακράτηση ADP, μπορεί να θεωρηθεί ότι επάγει την διαδικασία εισαγωγής της SecA στη μεμβράνη (ATP και προπρωτεΐνη οδηγούν τη SecA στη μεμβράνη, Economou et al., 1994). Έτσι η δέσμηση του πεπτιδίου σηματοδότη της προπρωτεΐνης στη SecA προωθεί την εισαγωγή της τελευταίας στη μεμβράνη, και μαζί με αυτήν και της προπρωτεΐνης. Στην συνέχεια η προπρωτεΐνη αποκόπτεται από την πεπτιδάση οδηγό και μόλις απελευθερωθεί από το πεπτιδίο σηματοδότη απομακρύνεται από τη SecA η οποία δύναται τώρα να εξέλθει από τη μεμβράνη. Αυτή η μείωση της λειτουργίας της ATPάσης παρουσία πεπτιδίου σηματοδότη παρατηρείται όμως μόνο απουσία της C-περιοχής της SecA, δηλαδή στον DEAD κινητήρα, και όχι στην ολόκληρη SecA, ή σε μεταλλαγμένες SecA όπως η W775A, όπου η

αλληλεπίδραση της C-περιοχής με τον DEAD κινητήρα περιορίζεται (αποτελέσματα-συζήτηση). Επομένως το πεπτιδίο σηματοδότης προτείνεται ότι δουλεύει όταν η SecA εντοπίζεται στη μεμβράνη στη SecYEG θέση και είναι ενεργοποιημένη για υδρόλυση (μεμβρανική ATPάση, Hartl et al., 1990). Δηλαδή όταν ο DEAD κινητήρας αποκαταστέλλεται από τη C-περιοχή (Karamanou et al., 1999). Επιπρόσθετα η συγγένεια της SecA για το πεπτιδίο σινιάλο, αντίστοιχα με την υδρόλυση του ATP, ρυθμίζεται από το IRA1 (Karamanou et al., 1999), καθώς μεταλλαγές σ' αυτό το μοτίβο που αυξάνουν την ATPάση (W775A) αυξάνουν και την δέσμευση του πεπτιδίου σινιάλου συντονίζοντας τις δύο διαδικασίες και ενισχύοντας την άποψη για αλλοστερική επικοινωνία μεταξύ των περιοχών δέσμευσης ATP και πεπτιδίου σηματοδότη.

Απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι ενώ το πεπτιδίο οδηγός μπορεί να δεσμευτεί στη SecA όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (διάλυμα), δεν συμβαίνει το ίδιο και με την ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης. Επομένως προτείνεται ότι η δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στη SecA, που είναι και το πρώτο τμήμα της προπρωτεΐνης που εκτίθεται για αλληλεπίδραση, αποτελεί και το πρώτο στάδιο της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες, που συντελεί στον εντοπισμό και στη συγκέντρωση και της υπόλοιπης προπρωτεΐνης στη SecA και στη συνέχεια και στη μεταθέτασή.

### 1.2.Γ.II.β. Η “ώριμη” περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω το πως η SecA αναγνωρίζει ποιες πρωτεΐνες πρόκειται να διασχίσουν τη μεμβράνη πρέπει να μελετηθεί και η συνεισφορά της ώριμης περιοχής της προπρωτεΐνης, αφού κατά τη διάρκεια της μεταφοράς της μέσα από τη μεμβράνη η μετακινούμενη προπρωτεΐνη ενδέχεται να προσδένεται σε επιπρόσθετες θέσεις δέσμευσης στη SecA. Έτσι έχουν πιστοποιηθεί πρωτεΐνες που μετατοπίζονται διαμέσου των μεμβρανών απουσία πεπτιδίου σινιάλου (Derman et al., 1993; Flower et al., 1994; Prinz et al., 1996) και οι οποίες στηρίζονται εξολοκλήρου σε πρωτεΐνες συνοδούς όπως η SecB. Από την άλλη ούτε όλες οι πρωτεΐνες που διαθέτουν τεχνητά ενσωματωμένο πεπτιδίο σηματοδότη εκκρίνονται από το κύτταρο (Lee et al., 1989). Αν μάλιστα αντικατασταθεί το πεπτιδίο σηματοδότης της M13 πρωτεΐνης από αυτό της proOmpA (προτύπου πρωτεΐνης για το sec μονοπάτι), η M13 πρωτεΐνη δεν εισέρχεται στη μεμβράνη διαμέσου του sec μονοπατιού, αν υπάρχουν μεταλλαγές στην ώριμη περιοχή της που εμποδίζουν την ανεξάρτητη της μετατόπισης εισαγωγή της στη μεμβράνη (Kuhn et al., 1986a, 1986b). Επιπλέον η διαδικασία της μετατόπισης εμποδίζεται από την παρουσία θετικά φορτισμένων αμινοξέων στην αρχή της ώριμης περιοχής (Lee et al., 1989; Li et al., 1988; Yamane et al., 1988), ενώ το ίδιο ισχύει και για πρόδρομες πρωτεΐνες χωρίς πεπτιδίο σηματοδότη (Prinz et al., 1996), υποδηλώνοντας ότι ακόμα και απουσία πεπτιδίου σινιάλου η αλληλεπίδραση της ώριμης περιοχής της εκκρινόμενης πρωτεΐνης με την SecA παραμένει η ίδια. Όταν τα θετικά φορτία απομακρυνθούν όμως, η έκκριση της πρωτεΐνης επανέρχεται, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα επιφέρει και η αύξηση του μήκους της υδρόφοβης περιοχής του πεπτιδίου σηματοδότη (MacIntyre et al., 1990). Είναι πολύ πιθανό ότι το θετικό φορτίο που αντιπαράκειται στην αλληλουχία οδηγό εμποδίζει την σύγχρονη εισαγωγή στη μεμβράνη και της SecA και της προπρωτεΐνης διότι αντιτίθεται στον κανόνα του θετικού φορτίου στο εσωτερικό (positive-inside rule; von Heigne, 1989). Εξάλλου οι Geller et al., 1993 έδειξαν ότι ούτε η παρουσία βαθμίδωσης δυναμικού, μπορεί να επιτρέψει την μετατόπιση των πρωτεϊνών που φέρουν θετικά φορτία στην αρχή της ώριμης περιοχής διαμέσου της μεμβράνης, ενώ αντίθετα η μετατόπιση επάγεται στην περίπτωση που έχουν εισαχθεί δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα μετά το πεπτιδίο σηματοδότη. Αυτό συμβαίνει διότι τα φορτισμένα αμινοξέα που εισάγονται στις πρωτεΐνες μετά το πεπτιδίο σινιάλο, επηρεάζουν τον ρυθμό της αρχικής εισαγωγής του υποστρώματος στη μεμβράνη. Και αυτό γιατί επηρεάζουν τον σχηματισμό της λούπας που συνίσταται από τα αμινοξέα του πεπτιδίου σηματοδότη και περίπου 20 αμινοξέα της ώριμης περιοχής και είναι απαραίτητη για την έναρξη της μεταφοράς της εκκρινόμενης ή διαμεμβρανικής πρωτεΐνης στη μεμβράνη (Summers et al., 1989; Schiebel et al., 1991), κατά τρόπο που ρυθμίζεται από το ηλεκτροχημικό δυναμικό της μεμβράνης το οποίο δρα ηλεκτροφορητικά. Μία υπόθεση λοιπόν είναι ότι η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία κοινή κινητήρια δύναμη της μεταφοράς των μεμβρανών μέσα από τη μεμβράνη στα βακτήρια, καθώς οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διαθέτουν συνήθως αρνητικό φορτίο στην καρβοξυτελική περιοχή του πεπτιδίου σινιάλου ή στις πρώτες θέσεις της ώριμης περιοχής της πρωτεΐνης

(von Heigne et al., 1986). Από την άλλη μεριά βέβαια πρωτεΐνες όπως η M13 και η β-λακταμάση που δεν μετατοπίζονται ηλεκτροφορητικά (Kuhn et al., 1990; Bakker and Randall, 1984), καθώς και πρωτεΐνες χωρίς φορτισμένα αμινοξέα στην ώριμη περιοχή διασχίζουν τη μεμβράνη κάτω από την επιρροή του μεμβρανικού δυναμικού (Kato et al., 1990).

Από την άλλη μεριά οι Ernst et al., 1994 έδειξαν ότι διαφορετικές προπρωτεΐνες έχουν διαφορετική εξάρτηση τόσο από τη SecB, όσο και από τη SecA και το διαμεμβρανικό δυναμικό, ενισχύοντας τη σημασία της ώριμης περιοχής της προπρωτεΐνης τόσο στον ερχομό της στη μεμβράνη όσο και στην μετέπειτα πορεία της μετατόπισης. Για να μελετήσουν πιο εμπειριστωμένα το ρόλο της ώριμης περιοχής της προπρωτεΐνης γενικότερα κατά τη πορεία της έκκρισης οι Bassilana et al., 1992 έκοψαν την πρότυπη εκκριτική πρωτεΐνη proOmpA σε μικρότερα αμινοτελικά κομμάτια και χρησιμοποίησαν σε ποικίλες βιοχημικές μελέτες το πεπτιδίο P74 που περιλαμβάνει τα 53 αμινοξέα της ώριμης περιοχής και τα 21 του πεπτιδίου σηματοδότη. Διαπίστωσαν ότι το πεπτιδίο αυτό υφίσταται μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης η οποία επιταχύνεται με την εφαρμογή διαμεμβρανικού δυναμικού, αλλά όχι με την παρουσία της συνοδού πρωτεΐνης SecB, ενισχύοντας την πρόταση ότι είναι η ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης που καθορίζει την εξάρτηση από την SecB (Liu et al., 1989; Collier et al., 1990). Παρατήρησαν ακόμα ότι ενώ ο αρχικός ρυθμός μεταφοράς διαμέσου της μεμβράνης είναι χαμηλότερος για το P74 πεπτιδίο σε σχέση με την ολόκληρη proOmpA το ποσό της πρωτεΐνης που μεταφέρεται ανά συγκέντρωση πρωτεΐνης,  $V_{max}$ , είναι το ίδιο. Επομένως το αργό στάδιο της αντίδρασης (rate-limiting-step) είναι το ίδιο, δεν εξαρτάται από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και πρέπει να προηγείται της μετάβασης του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης στη μεμβράνη. Μολονότι όμως είναι γνωστό ότι η ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης (όπως και του πεπτιδίου σηματοδότη) είναι αναγκαία για να παρατηρηθεί αύξηση της ATPάσης της SecA παρουσία μεμβρανών (Translocation ATPase; Lill et al., 1990), εντούτοις το P74 προκαλεί μικρή αύξηση της παραπάνω ATPάσης εν αντιθέσει με την proOmpA (υδρόλυση 20 mols ATP/molP74 <1000mols ATP/mol proOmpA). Προφανώς η πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν “γλυστράει” προς τα πίσω στην περίπτωση του P74, όπως στην proOmpA αλλά και σε πληθώρα άλλων υποστρωμάτων, και δεν δαπανάται προς τούτο επιπλέον ενέργεια. Οι Schiebel et al., 1991 έδειξαν ότι συμβαίνει αντίστροφη μετάθεση κατά την διάσχιση της μεμβράνης από πολλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες οπότε και εμφανίζονται ενδιάμεσα υποστρώματος και γι’ αυτό το λόγο πρότειναν ότι δαπανάται πληθώρα ATP μορίων για τη μετατόπιση των διαφόρων υποστρωμάτων. Προκύπτει λοιπόν ότι η πληροφορία για το “γλύστημα” προς τα πίσω της εκκρινόμενης πρωτεΐνης εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της.

Όπως είπαμε προηγουμένως οι Kimura et al 1991 προσδιόρισαν με την ανασύσταση της SecA (μόνο ως προς την χημική διασύνδεση ATP και προπρωτεΐνης) από μικρότερα επικαλυπτόμενα τμήματα (Taniuchi et al., 1969), την περιοχή 267-340 σαν την προτεινόμενη περιοχή δέσμευσης της προπρωτεΐνης. Διαπίστωσαν ακόμη ότι η δέσμευση της προπρωτεΐνης ενισχύεται παρουσία νουκλεοτιδίων προτείνοντας ότι οι περιοχές δέσμευσης του ATP και της προπρωτεΐνης μπορεί να είναι διακριτές ( με ανάλογη μεθοδολογία έχει προσδιοριστεί η θέση δέσμευσης ATP στο 1-217 τμήμα, Matsuyama et al., 1990), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αλλά μπορεί να έχουν συντονισμένη ρύθμιση, που επιτρέπει την αύξηση της ATPάσης της SecA παρουσία μεμβρανών και υποστρώματος, αλλά και την αύξηση δέσμευσης της προπρωτεΐνης στη SecA παρουσία νουκλεοτιδίων. Προκειμένου να διερευνήσουν περαιτέρω τον ρόλο της 267-340 προτεινόμενης περιοχής δέσμευσης του υποστρώματος οι Kourtz et al., 2000, επιτέλεσαν μια σειρά μεταλλαγών σ’ αυτή την περιοχή. Μολονότι παρουσιάζεται μια αξιοσημείωτη πλαστικότητα με βάση φυλογενετικές και γενετικές μελέτες, εντούτοις εντόπισαν στην περιοχή αυτή μία αρκετά συντηρημένη τυροσίνη, την Y326, στην οποία αντικαταστάσεις προς μη συντηρημένα αμινοξέα αποδεικνύουν τη σημασία της για τη λειτουργία της SecA πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα διαπίστωσαν ότι ενώ η πρωτεΐνη δεσμεύεται χωρίς κανένα πρόβλημα στη μεμβράνη και στην SecYEG θέση και δεν παρουσιάζει πρόβλημα στη δέσμευση νουκλεοτιδίου, εντούτοις παρουσιάζει σημαντικότερα προβλήματα έκκρισης *in vivo*, μειωμένη συγγένεια για το υπόστρωμα και προβληματική απελευθέρωση του κατά τη διάρκεια της μετατόπισης των πρωτεϊνών από τη μεμβράνη, ενώ δεν επιτυγχάνεται ενεργοποίηση της ATPάσης της μεταλλαγμένης SecA παρουσία μεμβρανών και υποστρώματος (Translocation ATPase). Πρότειναν λοιπόν ότι η Y326 στην SecA της *E.coli* αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο ρύθμισης των αλλοστερικών αλλαγών που υφίσταται η SecA είτε για να δεσμεύσει την ώριμη περιοχή της προπρωτεΐνης, είτε για να ανταποκριθεί σ’ αυτή τη δέσμευση και να οδηγήσει σε αυξημένη υδρόλυση του ATP.

Απάντηση στο ερώτημα του μηχανισμού με βάση τον οποίο η SecA αναγνωρίζει ως υποστρώματα διάφορες προπρωτεΐνες και συντελεί στη μεταφορά τους μέσω της μεταθετάσης κατά μήκος της μεμβράνης επιχειρείται να δωθεί με την χρησιμοποίηση μικρών πρωτεϊνών, όπως η M13 (procoat, 73 αμινοξέα) και η Pf3 (44 αμινοξέα) που προσπερνώντας τη μεταθετάση εισέρχονται στη μεμβρανική διπλοστιβάδα μέσω του YidC μονοπατιού. Μολονότι διαθέτουν πεπτιδίο σηματοδότη δεν αναγνωρίζονται ούτε από το SRP ούτε από την SecB (de Gier et al., 1998) υποδηλώνοντας ότι η παρουσία και μόνο πεπτιδίου σινιάλου δεν αρκεί για να παρουσιαστεί αλληλεπίδραση με τα συστατικά της μεταθετάσης. Μεταλλαγές όμως στην πρωτεΐνη M13 έχει βρεθεί ότι οδηγούν σε χρησιμοποίηση του sec μονοπατιού και επομένως προκύπτει ότι συγκεκριμένα γνωρίσματα της ώριμης περιοχής της M-13 πρέπει να καθορίζουν τον τρόπο εισαγωγής της στη μεμβράνη. Οι Roos et al., 2001, λοιπόν μελετώντας μία σειρά τέτοιων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών M-13, αλλά και μεταλλαγμένων πρωτεϊνών M-13, που δεν χρησιμοποιούν το sec μονοπάτι προσπάθησαν να διερευνήσουν τον μηχανισμό με τον οποίο αποφασίζεται ποιες προπρωτεΐνες θα αλληλεπιδράσουν με τα συστατικά της μεταθετάσης και θα ενεργοποιήσουν την ενζυμική της λειτουργία. Διαπίστωσαν ότι ένα πολύ σημαντικό βήμα για τη χρησιμοποίηση του sec μονοπατιού από τις διάφορες προπρωτεΐνες είναι η δέσμευση τους στη SecA πρωτεΐνη, αλλά και η ενεργοποίηση της ATPάσης της SecA προκειμένου να λειτουργήσει σαν κινητήρας στη διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης.

Απ' όλα τα παραπάνω, αλλά και με βάση το μοντέλο εισαγωγής-εξαγωγής της SecA από τη μεμβράνη και της σύγχρονης μετακίνησης τμημάτων της προπρωτεΐνης από τους Economou and Wickner 1994; Economou et al., 1995 (βλέπε και παρακάτω Κεφάλαια), προτείνεται ότι τα παραπάνω διακριτά τμήματα της προπρωτεΐνης που μεταφέρονται διαμέσω της μεμβράνης αποτελούν φορτίο της SecA η οποία θεωρείται ότι διαθέτει μία ή περισσότερες θέσεις δέσμευσης υποστρώματος με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αυτά είναι: 1) Η ικανότητα δέσμευσης συγκεκριμένου μήκους πολυπεπτιδικής αλυσίδας (περίπου 20-30 αμινοξέα). 2) Η απουσία ειδικότητας αλληλουχίας υποστρώματος, αφού η SecA μπορεί και μεταφέρει διαμέσου της μεμβράνης ποικιλία πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων και ενζύμων του κυτταροπλάσματος. Αντίθετα σημαντικό ρόλο πρέπει να παίζει ο σκελετός των ανθράκων στην αναγνώριση του υποστρώματος από την SecA. 3) Η ποικιλότητα στη συγγένεια της SecA για το υπόστρωμα (ή για τμήματα του υποστρώματος), έτσι ώστε ο ενεργειακός φραγμός μεταξύ της δεσμευμένης και απελευθερωμένης κατάστασης να είναι χαμηλός και ταυτόχρονα αρκετός για να επιτυγχάνεται μεταφορά μέσω της SecA. Δεν αναμένεται πάντως με κανένα τρόπο η αλληλεπίδραση της SecA με το υπόστρωμα να στηρίζεται στο μηχανισμό κλειδιού-κλειδαριάς και γι' αυτό και υπάρχει ποικιλία αλληλομόρφων μεταλλαγμένων SecA που καταστέλουν διαφορετικές βλάβες πεπτιδίων σηματοδοτών. Υδροφοβές δε περιοχές που διευκολύνουν την δέσμευση των υδροφοβών κομματιών που συναντώνται στις ώριμες περιοχές των διαφόρων υποστρωμάτων (Sato et al., 1997) εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές της SecA (βλέπε κεφάλαιο SecA –ιδιότητες και χαρακτηριστικά), όπως και στην περιοχή 267-340 που όπως είπαμε προηγουμένως έχει καταγραφεί η χημική διασύνδεση με την προπρωτεΐνη.

Από την άλλη μεριά έχει παρατηρηθεί ότι η δέσμευση της προπρωτεΐνης στη SecA, στο διάλυμα, συντελεί στην απελευθέρωση ADP (Shinkai et al., 1991). Επομένως κάθε φορά που η προπρωτεΐνη που έχει απελευθερωθεί από την SecA στο κανάλι της μεταθετάσης επαναδεσμευτεί στη SecA, το ADP+P<sub>i</sub> αποδεσμεύονται και ο κύκλος δέσμευσης και υδρόλυσης ATP μπορεί να ξεκινήσει από την αρχή. Άρα το υπόστρωμα της προπρωτεΐνης πρέπει να δρα σαν παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίων από την SecA, συνδέοντας την κυκλική δράση της SecA (εισαγωγή και εξαγωγή από τη μεμβράνη) με την δική του μεταφορά μέσα από τη μεμβράνη.

### 1.2.Γ.III. Αλληλεπίδραση SecA με ανιονικά φωσφολιπίδια

Είναι αποδεδειγμένο ότι η SecA, αυξάνει την ATPάση της παρουσία μεμβρανών (από Βασική (Basal) ATPάση αποκτά Μεμβρανική (Membrane) ATPάση). Επιπρόσθετα όμως η ενδογενής δραστηριότητα ATPάσης σε χαμηλή συγκέντρωση Mg<sup>2+</sup> διεγείρεται από την παρουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων, μία δραστηριότητα που λέγεται Λιπιδική ATPάση (Lipid ATPase; Lill et al., 1990). Παράλληλα οι Lill et al., 1990; Kusters et al., 1991 παρατήρησαν ότι ο ρυθμός της μετατόπισης μέσα από τη μεμβράνη πρόδρομων πρωτεϊνών, είναι ανάλογος του ποσού βιοσύνθεσης των ανιονικών φωσφολιπιδίων. Η SecA τέλος δεσμεύεται σε κυστίδια που περιέχουν μόνο ανιονικά φωσφολιπίδια και ενεργοποιείται απουσία άλλων πρωτεϊνών.

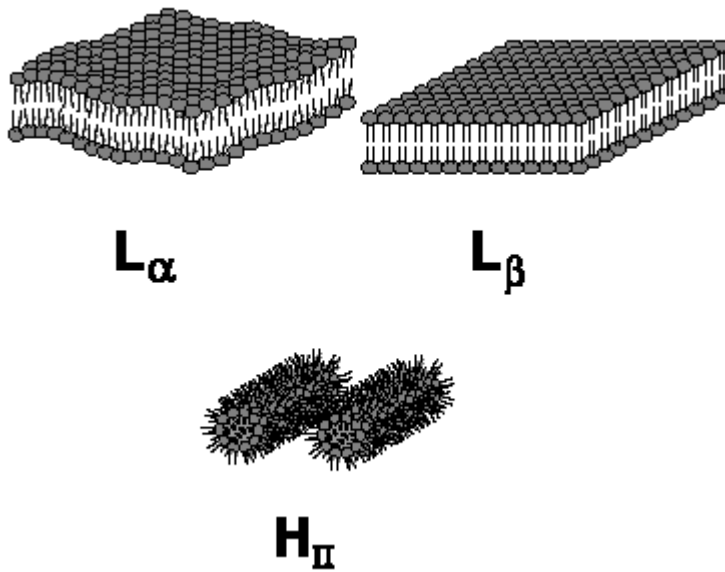
Βέβαια η συγγένεια της SecA για τις μεμβράνες αυξάνεται με τη συγκρότηση ολόκληρου του συμπλόκου της μεταθετάσης παρουσία και του υποστρώματος. Οι παραπάνω μεμβράνες κυττάρων που αναπτύσσονται σε διαφορετικά ποσά IPTG συσχετίζουν ακόμα το ποσό των ανιονικών φωσφολιπιδίων με το επίπεδο διέγερσης της δραστηριότητας ATPάσης της SecA παρουσία μεμβρανών, όπως επίσης και με την αποδοτικότητα των μεμβρανών να επιτελούν μετατόπιση πρωτεϊνών από το εσωτερικό τους. Η προβληματική ενεργότητα της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες απουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων, δεν οφείλεται πάντως σε προβληματική διευθέτηση της δομής της μεμβράνης ή σε προβληματική συγκρότηση και προσανατολισμό της SecYEG στη μεμβράνη, αλλά είναι αποτέλεσμα της ίδιας της επίδρασης των ανιονικών φωσφολιπιδίων.

Η υδρόλυση πάντως του ATP, που είναι στενά συνδεδεμένη με τη διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες απαιτεί ολόκληρο το σύμπλοκο της μεταθετάσης (Economidou et al., 1995), υποδηλώνοντας έτσι ότι η δέσμευση της SecA στη μεμβράνη είναι μία πολυβαθμιδωτή διαδικασία. Μεγάλη σημασία στον τρόπο δράσης των φωσφολιπιδίων πρέπει να παίζει η αλληλεπίδραση τους με την SecA πρωτεΐνη. Η αρχική δέσμευση της SecA στη μεμβράνη φαίνεται να είναι ασθενής και σπηρίζεται στις ιονικές αλληλεπιδράσεις μέσω των θετικά φορτισμένων περιοχών της πολύ όξινης SecA. Ακολουθεί αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA που προκαλεί αυξημένη ευαισθησία στη θρυψίνη (Ulbrandt et al., 1992; Shinkai et al., 1991) και η οποία μπορεί να οδηγήσει σε έκθεση υδρόφοβων περιοχών της SecA για αλληλεπίδραση με τα λιπίδια. Εξάλλου εισαγωγή μέρους της SecA στη μεμβράνη, έχει αποδειχθεί μέσω ανίχνευσης αλλαγών στον φθορισμό των τρυπτοφανών της με μεμβράνες (Ulbrandt et al., 1992), ενώ με την χρησιμοποίηση spin labeled φωσφολιπιδίων διαπιστώθηκε συγκεκριμένα ότι η SecA εισέρχεται μέχρι τη μέση της διπλοστοιβάδας. Μάλιστα οι Keller et al., 1995 διαπίστωσαν ότι η SecA εισέρχεται μέχρι την δεκατητέταρτη θέση της ακυλιωμένης αλυσίδας των φωσφολιπιδίων, αφού επηρεάζεται η κινητικότητα 15 περίπου μορίων DOPG με την εισαγωγή ενός μορίου SecA με την χρησιμοποίηση ESR φασματοσκοπίας (electron spin resonance), σε συστήματα διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων σημασμένων σε διάφορες θέσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι η SecA όχι μόνο εισέρχεται στη διπλοστοιβάδα, αλλά και την διασχίζει (Ahn et al., 1994), αφού εξωγενώς προστιθέμενη SecA σε μεμβρανικά κυστίδια που περικλείουν, είτε πρωτεάση, είτε κάποιον αποσβεστή φθορισμού, υφίσταται τόσο πρωτεόλυση όσο και μείωση του φθορισμού της. Σημειώνεται επίσης ότι η μεμβρανική τοπολογία της SecA εξαρτάται από την παρουσία ή όχι νουκλεοτιδίων και από το είδος τους (Kim et al., 1994a,b). Παράλληλα έχει επιβεβαιωθεί απ' ευθείας εισαγωγή της SecA στο υδρόφοβο τμήμα της φωσφολιπιδικής μονοστοιβάδας, η οποία αυξάνεται παρουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων, ενώ έχει παρατηρηθεί και ανταγωνισμός της δέσμευσης και εισαγωγής της SecA στη μεμβράνη παρουσία ATP (Breukink et al., 1992), με τη χρησιμοποίηση της τεχνικής της μονοστοιβάδας (monolayer technique). Μπορεί να εξηγηθεί λοιπόν η ανικανότητα μετατόπισης πρωτεϊνών, απουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων στη μεμβράνη, αφού η SecA δεν μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό της μεμβράνης και να επιτελέσει το κυκλικό μοντέλο δράσης της (Economidou et al., 1994,1995). Αυξημένα ποσά SecA μπορούν να αντισταθίσουν την ανικανότητα μεταφοράς των πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης παρουσία χαμηλών επιπέδων αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων (Kusters et al., 1992). Πάντως η δέσμευση της SecA στη μεμβράνη ενισχύεται και αποκτά αιτία και κατεύθυνση μέσω της αυξανόμενης συγγένειας της για τη μεμβράνη που αποκτιέται από το σύμπλοκο της μεταθετάσης. Από την άλλη μεριά όμως, μολονότι η μετατόπιση των προπρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω ενός πρωτεϊνικού πόρου (Joly et al., 1993; Martoglio et al., 1995), οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή με τον πυρήνα της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας σ' ένα αρχικό στάδιο της εισαγωγής τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Martoglio et al., 1995).

#### **1.2.Γ.IV. Αλληλεπίδραση SecA με λιπίδια που έχουν την τάση δημιουργίας μη ελασματοειδούς δομής (Nonlamellar-proneLipids) στη μεμβράνη.**

Η κλασική αναπαράσταση της οργάνωσης των φωσφολιπιδίων στις μεμβράνες εστιάζεται στην ελασματοειδή δομή ή στην δομή διπλοστοιβάδας, όπως η οργανωμένη πηκτική κατάσταση ( $L_{\beta}$ ) ή η υγρή κρυσταλλική κατάσταση ( $L_{\alpha}$ ) σχήμα 23. Παρόλα αυτά μερικά φυσιολογικά φωσφολιπίδια *in vitro* δεν μπορούν να συνιστούν δομές διπλοστοιβάδας, αλλά επάγουν την αντιστρεπτή εξαγονική φάση ( $H_{II}$ ) όπως έχει καταγραφεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) (Lindblom et al., 1989). Η λιπιδική





Σχήμα 23: (Dowhan et al., 1999). Δομική αναπαράσταση της διεύθετης των φωσφολιπιδίων σε μεμβράνες. Διευθέτηση της ομάδας του κεφαλιού και των περιοχών λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων στην υγρή κρυσταλλική κατάσταση ( $L_{\alpha}$ ), στην οργανωμένη πηκτή κατάσταση ( $L_{\beta}$ ), και στην εξαγωνική κατάσταση ( $H_{II}$ ).

σύσταση της εσωτερικής μεμβράνης της *E.coli*, περιλαμβάνει ανιονικά φωσφολιπίδια σε ποσοστά 20% φωσφατίδουλογλυκερόλη PG και 5% καρδιολιπίνη CL (Raetz, 1978) που και τα δύο συνιστούν οργάνωση διπλοστοιβάδας κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Cullis and De Kruijff, 1979). Επίσης περιλαμβάνει σαν κύριο συστατικό το επαμφοτερίζον λιπίδιο φωσφατίδουλοαιθανολαμίνη PE σε ποσοστό 75% το οποίο είναι τυπικό λιπίδιο που δεν συνιστά δομή διπλοστοιβάδας. Συστηματική ανάλυση της ανάγκης των διαφόρων φωσφολιπιδίων στη διαδικασία της μετατόπισης, πραγματοποιήθηκε μόνο

μετά την ανασύσταση της μετατόπισης των προπρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες μ' ένα περιορισμένο αριθμό καθαρισμένων Sec πρωτεϊνών. Έτσι οι van der Does et al., 2000, αφού κατάφεραν να καθαρίσουν το SecYEG σύμπλοκο χωρίς την παρουσία λιπιδίων (αλλά με την χρήση του απορρυπαντικού dodecyl maltoside), μπόρεσαν να μελετήσουν και την ενεργότητα του σε ανασυστάμενα λιποσώματα με συγκεκριμένη σύσταση φωσφολιπιδίων. Έτσι όμως διαπιστώθηκε η σημασία των διαφόρων ειδών λιπιδίων στην μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, μέσω της πραγματοποίησης ή όχι της μετατόπισης πρωτεϊνών στο εσωτερικό πρωτεολιποσωμάτων *in vitro*. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι ενώ τα όξινα φωσφολιπίδια είναι εντελώς απαραίτητα για την επιτέλεση της παραπάνω διαδικασίας *in vitro*, τα λιπίδια που διαταράσσουν την λιπιδική διπλοστοιβάδα παρουσιάζουν ενισχυτικό ρόλο στην παραπάνω διαδικασία. Η βέλτιστη απόδοση της μετατόπισης πρωτεϊνών στο εσωτερικό πρωτεολιποσωμάτων *in vitro*, επιτυγχάνεται παρουσία και των όξινων και των λιπιδίων διατάραξης της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, και μάλιστα σε συγκεντρώσεις όμοιες μ' αυτές με τις οποίες απαντούν στις φυσικές μεμβράνες.



## 1.2.Δ. Βασικές πρωτεΐνες της βακτηριακής μεταθετάσης στην *E.coli*.

Η λειτουργική μεταθετάση συνίσταται από την SecA ATPάση και τις μεμβρανικές πρωτεΐνες SecY, SecE και SecG και απαιτεί για την δράση της όξινα φωσφολιπίδια (Oliver, 1993; Arkowitz and Bassilana, 1994; Wickner and Leonard, 1996). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της μεταθετάσης που φαίνονται στο σχήμα 6, έχουν βοηθητικό ρόλο και θα μελετηθούν παρακάτω. Συγκεκριμένα οι SecYEGA πρωτεΐνες είναι αρκετές προκειμένου να ανασυσταθεί σε πρωτεολιποσώματα από καθαρισμένα φωσφολιπίδια, η εξαρτώμενη από ATP και SecA, μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες με μεγάλη απόδοση (Hanada et al., 1994; Douville et al., 1995; van der Does et al., 1998). Η απόδοση αυτή αγγίζει το 25-50% της παραγωγής, και των ρυθμών μετατόπισης που πραγματοποιούνται με άθικτες βακτηριακές μεμβράνες. Επιπρόσθετα η ανασυστάμενη μεταθετάση επιτρέπει πολλαπλούς κύκλους πρωτεϊνικής μετατόπισης (Bassilana and Wickner, 1993; Manting et al., 2000), αλλά και την ενσωμάτωση των υδρόφοβων τμημάτων του μεταφερόμενου πολυπεπτιδίου στην λιπιδική διπλοστοιβάδα (Duong and Wickner, 1998).

Η SecA, είναι περιφερειακή πρωτεΐνη που εισέρχεται στη μεμβράνη κατά την διάρκεια του κύκλου της ζωής της (περισσότερες λεπτομέρειες σε επόμενο Κεφάλαιο). Οι SecY, SecE και SecG πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανικές και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους καθώς μπορούν να απομονωθούν (χρωματογραφικά και με ανοσοκατακρήμνιση) σαν ένα σταθερό τριμερές, ενώ σταθερή υπερέκφραση της SecY απαιτεί και σύγχρονη υπερέκφραση της SecE. Αξίζει να σημειωθεί ότι υποσύμπλοκα SecY/E (Joly et al., 1994; Duong and Wickner, 1997a; Homma et al., 1997), αλλά και SecY/G (Homma et al., 1997) μπορούν επίσης να ανιχνευθούν στη μεμβράνη.

Αναλυτικότερα η SecY (48kDa) είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη με 10 διαμεμβρανικές έλικες, ενώ οι μικρότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες SecE (14kDa) και SecG (11.5kDa) αποτελούνται από τρεις και δύο διαμεμβρανικές έλικες αντίστοιχα (σχήμα 31). Οι Schatz et al., 1991 έδειξαν ότι μόνο η καρβοξυτελική έλικα της SecE είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μετατόπισης. Οι SecY και SecA είναι οι μοναδικές υπομονάδες της μεταθετάσης που έχουν εντοπιστεί να γειτνιάζουν με τις μεταφερόμενες εκκριτικές πρωτεΐνες (Joly and Wickner, 1993; Sato et al., 1997) παρά την διαπίστωση *prl* μεταλλαγών και στις τρεις υπομονάδες του SecYEG συμπλόκου. Μεμβράνες που δεν διαθέτουν SecG μπορούν να επιτελούν *in vitro* μεταφορά ορισμένων πρωτεϊνών μέσα από αυτές (Yang et al., 1997) υποδηλώνοντας ότι ο ελάχιστος καταλυτικός πυρήνας της βακτηριακής πρωτεϊνικής μεταθετάσης είναι ο SecYEA (σχήμα 5), και ίσως μόνο ο SecYA όπως συμβαίνει στο *Mycoplasma genitalium*. Εξάλλου και οι Yang et al., 1997, διαπίστωσαν με πειράματα *in vitro*, ότι η παρουσία της SecE δεν είναι τόσο απαραίτητη για την μετατόπιση ορισμένων προπρωτεϊνών από τη μεμβράνη του κυττάρου. Πειράματα επιπλέον από τους Homma et al., 1997 έχουν δείξει ότι τόσο η SecE όσο και η SecG συνδέονται ανεξάρτητα με τη SecY, καθιστώντας την ως την κεντρική υπομονάδα του τριμερούς SecYEG.

Η SecY και η SecE συνιστούν την υψηλή θέση δέσμευσης της SecA στη μεμβράνη. Γι' αυτό και η παραπάνω συνάφεια καταργείται παρουσία της Syd πρωτεΐνης, σ' ένα στέλεχος με μεταλλαγμένη SecY, όπου η SecY και η SecE αλληλεπιδρούν ασθενώς μεταξύ τους, (αφού η πρωτεΐνη Syd αλληλεπιδρά με την SecY) Matsuo et al., 1998). Συγκεκριμένα η SecA δεσμεύεται στο σύμπλοκο SecYEG, μέσω μιας άμεσης αλληλεπίδρασης με την SecY πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση αυτή ανιχνεύεται με χημική διασύνδεση *in vivo* (Manting et al., 1997), και περιλαμβάνει τα πρώτα τουλάχιστον 107 αμινοξέα της SecY (Snyders et al., 1997). Η SecY, ενδέχεται να έχει πολλαπλές θέσεις αλληλεπίδρασης με την SecA, καθώς μεταλλαγές στις καρβοξυτελικές περιοχές της SecY (C5 και C6), διαταράσσουν τον κύκλο δέσμευσης και αλληλεπίδρασης της SecA (Matsumoto et al., 1997; Taura et al., 1997), ενώ μία και μοναδική αμινοξική αντικατάσταση στην διαμεμβρανική περιοχή 7, TMS7, βελτιώνει και την δέσμευση της SecA στην SecYEG, και την διαδικασία της μετατόπισης μέσα από μεμβράνες (Manting et al., 1999). Εξάλλου η βελτιωμένη δέσμευση της SecA στην SecY, ευθύνεται για την ελαττωμένη ειδικότητα δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη στο στέλεχος *prlA4* (Van der Wolk et al., 1998; βλέπε Κεφάλαιο με τις διάφορες μεταλλαγές της SecA).

Όσον αφορά τώρα την SecG πρωτεΐνη αυτή καθαρίζεται σαν σύμπλοκο με την SecYE αλλά με άγνωστη στοιχειομετρία, εξαιτίας της ποικιλίας των δεσμευμένων ποσών της SecG στα διάφορα πειράματα των Brundage et al., 1990; Joly et al., 1994; Duong and Wickner, 1997a; Bessonneau et al., 2002. Η SecG που διασχίζει, όπως επώθησε προηγουμένως, δύο φορές την μεμβράνη, διαθέτει ένα κυτταροπλασματικό υδρόφοβο τμήμα

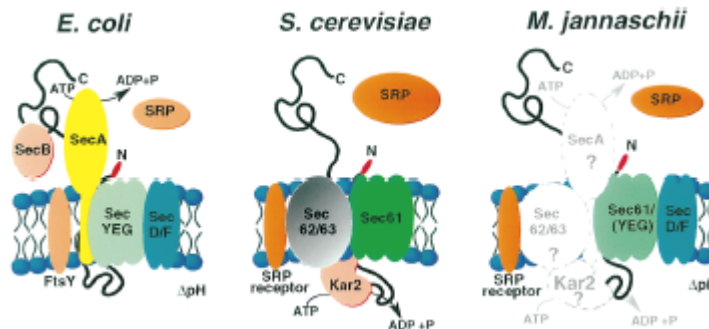
που κάνει ολόκληρη την πρωτεΐνη πολύ υδρόφοβη (Nishiyama et al., 1996). Επιπλέον είναι μία εύπλαστη πρωτεΐνη που υπόκειται σε σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση της κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των πρωτεϊνών μέσα από την μεμβράνη (Nishiyama et al., 1996). Μάλιστα έχει διαπιστωθεί ότι αναστρέφει τον μεμβρανικό προσανατολισμό της, και σταθεροποιεί έτσι την μεμβρανοεισερχόμενη SecA (Nishiyama et al., 1996; Suzuki et al., 1998). Προβλέπεται κατά συνέπεια ότι η SecG βοηθάει στην επιτέλεση των κύκλων εισαγωγής και εξαγωγής της SecA από τη μεμβράνη. Βέβαια παραμένει το θερμοδυναμικό ερώτημα για το πως οι ενεργειακά πολυέξοδες μεμβρανικές κινήσεις flip-flop της SecG βοηθούν την αλλαγή των διαμορφώσεων στη SecA. Από την άλλη μεριά, έχει διαπιστωθεί ότι η SecG δίσταται από το σύμπλοκο SecYE (Joly et al., 1994), δεν είναι απαραίτητη ούτε για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, ούτε για την έκκριση των πρωτεϊνών, αλλά χρειάζεται μόνο για την ανάπτυξη του κυττάρου σε χαμηλές θερμοκρασίες (Nishiyama et al., 1996). Είναι επίσης απαραίτητη σ' ένα μεταλλαγμένο στέλεχος με περιορισμένη λειτουργία της SecA, καθώς διαπιστώνεται συνθετική θνησιμότητα σ' ένα διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος με μεταλλαγές και στην SecA και στη SecG (Suzuki et al., 1998). Αντίθετα η απαίτηση για SecG αναστέλλεται από μία μεταλλαγή gain of function στη SecA (Matsumoto et al., 1998). Υπενθυμίζεται ότι καταστολείς των μεταλλαγών στο πεπτιδίο σηματοδότη που επαναφέρουν την διαδικασία της μετατόπισης σε φυσιολογικά επίπεδα, έχουν εντοπιστεί και στο *secG* γονίδιο και ονομάζονται *prfH* μεταλλαγές (Bost and Belin, 1997).

Το σύμπλοκο SecYEG προβλέπεται ότι αποτελεί το κανάλι μέσα από το οποίο διέρχονται οι διάφορες εκκριτικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες από την βακτηριακή μεμβράνη. Η δομή αυτού του καναλιού, και του ομολόγου του Sec61 του ενδοπλασματικού δικτύου των ευκαρυωτικών οργανισμών, θα παρουσιαστεί σε επόμενο Κεφάλαιο

## 1.2.Δ.1. Το SecYEG/Sec61 κανάλι της μεταθέσεως.

Σ' όλους τους οργανισμούς οι εξωκυτταροπλασματικές πρωτεΐνες μετατοπίζονται διαμέσου λιπιδικών στοιβάδων προκειμένου να καταλήξουν στον τελικό τους προορισμό. Πυρήνας αυτού του μηχανισμού θεωρείται ότι είναι ένα εξελικτικά συντηρημένο ετεροτριμερές διαμεμβρανικό σύμπλοκο, γνωστό ως το σύμπλοκο SecYEG στα βακτήρια και Sec61 στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Δύο από τις υπομονάδες αυτού του συμπλόκου είναι εντελώς απαραίτητες για την μετατόπιση των πρωτεϊνών τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro*, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αλλά είναι και συντηρημένες τόσο στα βακτήρια όσο και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Pohlschröder et al., 1997).

Αυτές είναι η SecY/Sec61α και η SecE/Sec61γ στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (στα θηλαστικά συγκεκριμένα) αντίστοιχα. Στην περίπτωση των αρχαιοβακτηρίων (η Τρίτη μορφή ζωής μετά τα βακτήρια και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς) οι υπομονάδες αυτές σχετίζονται πιο στενά με αυτές των βακτηρίων απ' ότι με αυτές των ευκαρυωτικών οργανισμών (σχήμα 24). Όσον αφορά το τρίτο συστατικό του



Σχήμα 24: Μοντέλλα μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες σε αντιπροσωπικούς βακτηρίων (*E.coli*), ευκαρυωτικών οργανισμών (*S.cerevisiae*) και αρχαιοβακτηρίων (*M.jannaschii*). Μολονότι τα συστατικά κλειδιά του μηχανισμού έχουν εντοπιστεί τόσο με γενετικές όσο και με βιοχημικές μελέτες στην περίπτωση της *E.coli* και της *S.cerevisiae*, το μοντέλλο για το αρχαιοβακτήριο *M.jannaschii* βασίζεται σε μελέτες ομολογίας ολόκληρου του γονιδιώματος του, με συστατικά της μετατόπισης τόσο βακτηρίων όσο και ευκαρυωτικών οργανισμών. Όσα απ' αυτά δεν έχουν ακόμα εντοπιστεί στα αρχαιοβακτήρια (ή δεν υφίστανται) χρωματίζονται με γκρι ανοιχτό χρώμα. Συνοπτικά οι πρωτεΐνες που συνιστούν το ετεροτριμερές κανάλι στα αρχαιοβακτήρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία με τις πρωτεΐνες του ευκαρυωτικού Sec61 απ' ότι με τις πρωτεΐνες του βακτηριακού SecYEG συμπλόκου-καναλιού.

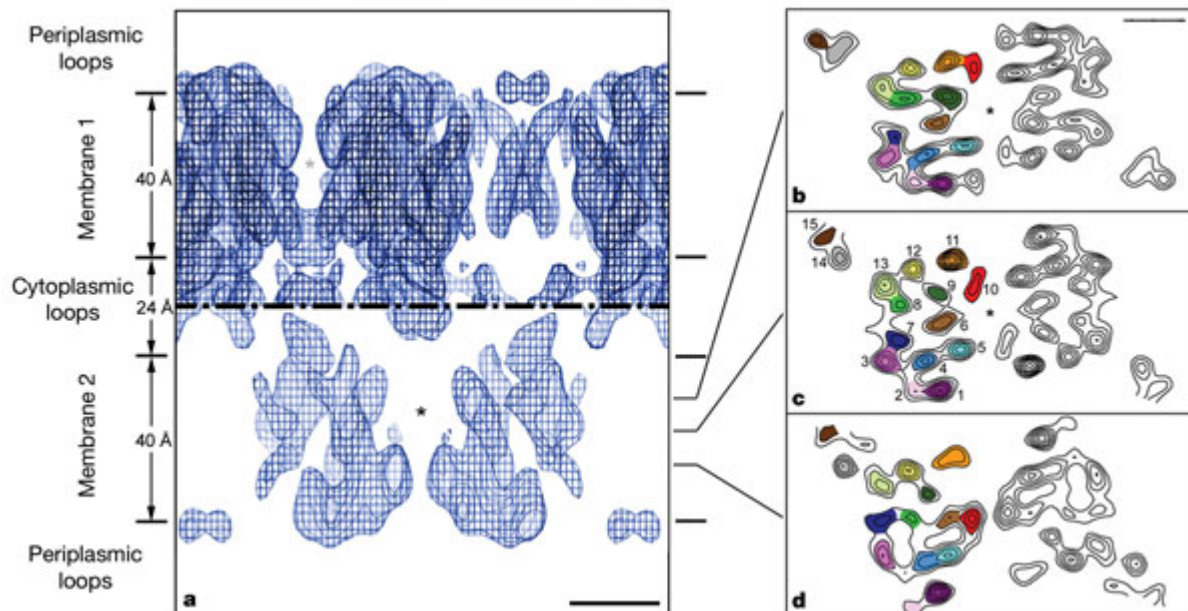
οργανισμούς. Συμπερασματικά το βακτηριακό σύμπλοκο SecYEG συνιστά ένα πολύ συντηρημένο σύμπλοκο. Είναι ομόλογο με το ευκαρυωτικό σύμπλοκο Sec61p που συνιστά την μεταθέταση στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου ER (Endoplasmic reticulum; Hartmann et al., 1994). Το σύμπλοκο Sec61p στα θηλαστικά συνίσταται όπως είπαμε από τις υπομονάδες Sec61α, β, και γ. Οι αντίστοιχες υπομονάδες στη ζύμη ονομάζονται Sec61p, Sbh1, και Sss1p (Hartmann et al., 1994; Panzner et al., 1995). Η μετατόπιση των πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης του ER των θηλαστικών συμβαίνει κυρίως σύγχρονα με την μετάφραση και καθοδηγείται από την ταυτόχρονη σύνθεση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων από τα δεσμευμένα στο Sec61p ριβοσώματα (Görlich and Rapoport, 1993). Στη ζύμη παράλληλα με το παραπάνω μονοπάτι, συνυπάρχει και ένα μονοπάτι μετατόπισης πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης, που λαμβάνει χώρα μετά το πέρας της μετάφρασης, με την συμμετοχή του Sec61p συμπλόκου, του βοηθητικού πρωτεϊνικού μεμβρανικού συμπλόκου Sec62/63, και της Bip ATPάσης που εντοπίζεται στην κοιλότητα του ER (Panzner et al., 1995). Στα αρχαία η μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα από την μεμβράνη πρέπει να συμβαίνει ταυτόχρονα με την μετάφραση, αφού όπως είδαμε υφίστανται ομόλογες πρωτεΐνες με την SecY (Sec61α), και την SecE (Sec61γ), αλλά όχι με την SecA (Pohlschröder et al., 1997). Ομόλογες πρωτεΐνες των SecY και SecE πιστοποιήθηκαν μετά από γενωμική ανάλυση και σ' ένα αρχαίο μιτοχόνδριο (Lang et al., 1997). Τέλος μία ομόλογη μεταθέταση επιτελεί την μετατόπιση των πρωτεϊνών στα θηλακοειδή των χλωροπλαστών (Yuan and

συμπλόκου SecYEG/Sec61, που είναι το SecG στα βακτήρια και το Sec61β στα θηλαστικά δεν παρατηρείται καμία συντηρητικότητα. Στην περίπτωση των αρχαιοβακτηρίων όμως έχει εντοπιστεί ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που μοιάζει με την Sec61β. Αρα μολονότι μορφολογικά τα αρχαιοβακτήρια μοιάζουν με τα βακτήρια (και τα δύο ανήκουν στους προκαρυωτικούς οργανισμούς), εξελικτικά διαφέρουν τόσο από τα βακτήρια όσο και από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Φαίνεται ότι στην περίπτωση όλων των συστατικών του συμπλόκου SecYEG/Sec61, τα αρχαιοβακτήρια προσεγγίζουν περισσότερο τους ευκαρυωτικούς

Cline, 1994; Settles and Martiensen, 1998). Απ' όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η έκκριση πρωτεϊνών πραγματοποιείται από ένα συντηρημένο πρωτεϊνικό κανάλι και από γεννήτορες δύναμης ώσης (SecA ή ριβόσωμα), ή δύναμης έλξης (BiP), που αλληλεπιδρούν με το κανάλι.

### 1.2.Δ.ΙΙ.Σύμπλοκο SecYEG.

Πρόσφατα αναλύθηκε η τριτοταγής διαμόρφωση του συμπλόκου SecYEG σε διακριτικότητα 8 Å στο επίπεδο της μεμβράνης από τους Breyton et al., 2002. Συγκεκριμένα έγινε ανάλυση μικρογραφιών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δυσδιάστατων κρυστάλλων του συμπλόκου στραμμένων υπό γωνίες 0-55 Å και ακολούθησε συνδυασμός του πλάτους και των φάσεων των δομικών παραγόντων που εξάγονται από αυτές τις εικόνες για να προκύψει ο τρισδιάστατος χάρτης του SecYEG (σχήμα 25). Αρχικά δημιουργήθηκαν δυσδιάστατοι κρύσταλλοι του SecYEG απ' όπου και προέκυψε με κρυσταλλογραφική μικροσκοπία μία δομή προβολής 15 Å (σχήμα 48). Αξιοσημείωτο είναι ότι η κυψελίδα διατρέχει δύο μεμβράνες και κάθε ασύμμετρη μονάδα περιέχει ένα διμερές SecYEG με δυακτινωτή μη κρυσταλλογραφική συμμετρία. Ο χάρτης παρουσιάζει στοιχεία δευτεροταγούς δομής που μοιάζουν με διαμεμβρανικές έλικες. Από αυτούς πάντως τους δυσδιάστατους κρυστάλλους προέκυψε ο τρισδιάστατος χάρτης του SecYEG (σχήμα 25) στον οποίο φαίνεται το σάντουιτς των δύο



Σχήμα 25: Τρισδιάστατη απεικόνιση της SecYEG στην διπλή μεμβράνη. α) Πλευρική όψη του χάρτη του SecYEG με διακριτικότητα 8 Å. b-d) Οριζόντιες τομές στο διμερές SecYEG που απέχουν 8 Å μεταξύ τους. Σε κάθε τομή του μονομερούς εντοπίζονται 15 κορυφές πυκνότητας που αντιστοιχούν σε τομές 15 ελίκων που αυθαίρετα αναγράφονται από 1-15.

μεμβρανών. Στον χάρτη αυτό, οι SecYEG πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μέσω των εκτεταμένων κυτταροπλασματικών περιοχών τους. Ο προσανατολισμός της SecYEG πρωτεΐνης στους προκύπτοντες κρυστάλλους, πραγματοποιήθηκε με ανοσοεντόπιση, με αντισώματα έναντι των καρβοξυτελικών περιοχών της SecY και της SecG, που είναι γνωστό ότι εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική και περιπλασματική πλευρά της μεμβράνης αντίστοιχα. Σε κάθε μεμβράνη το σύμπλοκο SecYEG σχηματίζει διμερή που διαχωρίζονται από περιοχές με λιπίδια. Τα δύο μονομερή στο διμερές σχετίζονται με μη κρυσταλλογραφική δυακτινωτή συμμετρία, ενώ σε κάθε μονομερές διακρίνονται 15 πυκνότητες-σχοινιά, χαρακτηριστικές διαμεμβρανικών α-ελίκων. Οι 13 μόνο έλικες από το κάθε μονομερές μπορούν να διευθετηθούν σε μία δεσμίδα, ενώ οι υπόλοιπες δύο, τοποθετούνται σε μία πιο περιφερειακή θέση και είναι πιθανό ότι αντιστοιχούν στις έλικες της SecG που δεν είναι απαραίτητη για την διαδικασία της μετατόπισης. Στο κέντρο κάθε διμερούς είναι ορατή μία κοιλότητα 16 X 25 Å φαρδιά και 22 Å βαθιά που είναι κλειστή από την περιπλασματική μεριά από δύο έντονα κεκαμμένες διαμεμβρανικές έλικες. Είναι πολύ πιθανό λοιπόν, ότι η παρούσα δομή αντιστοιχεί

στην κλειστή φάση του πρωτεϊνικού καναλιού. Συγκεκριμένα η κοιλότητα που διαμορφώνεται στη μεσόφαση των δύο μονομερών ορίζεται σ' όλο το μήκος της από τις έλικες 5 και 10 και στο κυτταροπλασματικό μισό και από τις έλικες 6 και 9. Η έλικα 10 που είναι πολύ κεκαμμένη, στην περιπλαστική μεριά της μεμβράνης βρίσκεται σε στενή επαφή με την ίδια έλικα του γειτονικού μονομερούς κλείνοντας την κοιλότητα στην περιπλαστική της μεριά. Οι έλικες αυτές πιθανά να απομακρύνονται κατά την διαδικασία της μετατόπισης και να οδηγούν στη δημιουργία συνεχούς καναλιού. Άρα η παραπάνω δομή είναι πολύ πιθανό ότι αντιπροσωπεύει το κλειστό κανάλι της μετατόπισης που φέρει κοιλότητα ανάλογη με το μέγεθος του πόρου των 9-25 Å και την κεντρική οδόντωση που έχει αναφερθεί προηγουμένως. Η σημασία της δομής αυτής ενισχύεται από το γεγονός ότι με πολύ μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση της μπορεί να μετατραπεί σε συνεχές κανάλι, ενώ από την άλλη μιας και δεν είναι ακόμα σίγουρος ο αριθμός των ετεροτριμερών που συνθέτουν το λειτουργικό SecYEG κανάλι, ενδέχεται να αντιστοιχεί σε φάση του συμπλόκου SecYEG που μπορεί να ξεκινήσει (χωρίς να το έχει κάνει ακόμα) την μετατόπιση των πρωτεϊνών. Η SecA μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις εκτεταμένες κυτταροπλασματικές λούπες του SecYEG κοντά στην επιφάνεια του διμερούς, επιτρέποντας έτσι στο πεπτιδίο σηματοδότη να περάσει από αυτήν στις διαμεμβρανικές έλικες της SecY και να ξεκινήσει η μετατόπιση.

Μέχρι στιγμής θεωρήσαμε ότι οι πρωτεΐνες διακινούνται μόνο προς μία κατεύθυνση, για παράδειγμα από το κυτταρόπλασμα προς την κοιλότητα του ενδοπλασματικού δικτύου. Η μεταθετάση όμως φαίνεται να εμπλέκεται και στην αντίθετη κατεύθυνση προκειμένου να πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση πρωτεϊνών με λανθασμένη τριτοταγή διαμόρφωση από το πρωτεάσωμα του κυτταροπλάσματος (Brodsky & McCracken 1997, Kopito 1997, Sommer & Wolf 1997). Συγκεκριμένα μία από τις πρώτες ενδείξεις ότι το σύμπλοκο Sec61p εμπλέκεται στην παραπάνω διαδικασία ήταν η απομόνωση μιας μετάλλαξης στην πρωτεΐνη Ubc6p της ζύμης (που συμμετέχει στην προσθήκη ουβικιινόνης σε υποστρώματα που επρόκειτο να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα) που καταστέλλεται από μία μετάλλαξη στην Sec61p πρωτεΐνη (Sommer & Jentsch 1993).

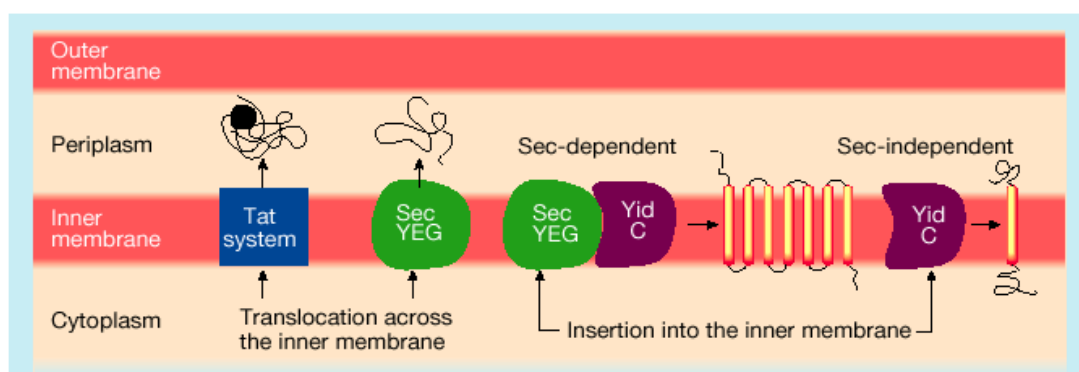
Μιλήσαμε προηγουμένως για το πιθανό μοντέλο ενσωμάτωσης πρωτεϊνών στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η διαδικασία αυτή έχει μελετηθεί περαιτέρω στα βακτήρια και συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαφέρουν από τις εκκριτικές στην παρουσία επιπρόσθετων υδρόφοβων αλληλουχιών που σταματούν τη μεταφορά της πρωτεϊνικής αλυσίδας (von Heijne, 1994, 1997) και οι οποίες μεταφερόμενες σε εκκριτικές πρωτεΐνες τις μετατρέπουν σε διαμεμβρανικές (Adams and Rose, 1985; Davis et al., 1985). Οι αλληλουχίες αυτές περιλαμβάνουν συνήθως μακριά τμήματα υδρόφοβων αμινοξέων. Θεωρητικά υδρόφοβα τμήματα 20 τουλάχιστον αμινοξέων είναι αρκετά για να διασχίσουν την μεμβράνη (Engelman et al., 1986) ενώ οι περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες έχουν υδρόφοβα τμήματα αυτού του μεγέθους (Persson and Argow, 1994; Von Heijne, 1994). Όμως οι Kuroiwa et al., 1991; Chen and Kendall, 1995 διαπίστωσαν ότι και μικρές τεχνητές αλληλουχίες με πολύ υδρόφοβα αμινοξέα μπορούν να συντελέσουν στην αγκυροβόληση στη μεμβράνη. Συστηματική ανάλυση της ικανότητας αλληλουχιών 18 αμινοξέων να σταματούν την μεταφορά πρωτεϊνών, έδειξε ότι υπάρχει ένα κατώφλι υδροφοβικότητας κάτω από το οποίο χάνεται αυτή η δραστηριότητα της αλληλουχίας και το οποίο αντιστοιχεί σε δείκτη υδροφοβικότητας με τιμή 1.3 (Sääf et al., 1998). Οι παραπάνω αλληλουχίες επιτελούν πολλαπλές λειτουργίες, όπως την διακοπή της μετατόπισης, την απελευθέρωση της αλυσίδας πλευρικά από την μεταθετάση καθώς και την σταθερή ενσωμάτωση στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Για ποιά ακριβώς από τις παραπάνω λειτουργίες απαιτείται το παραπάνω κατώφλι υδροφοβικότητας δεν είναι γνωστό και μόνο αν οι παραπάνω λειτουργίες διαχωριστούν βιοχημικά μπορεί να διαπιστωθούν οι διάφοροι παράγοντες που ρυθμίζουν τις παραπάνω διαδικασίες. Οι Duong et al., 1998 χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ProOmpA με μία συνθετική αλληλουχία με δείκτη υδροφοβικότητας κάτω από το επιτρεπόμενο όριο πέτυχαν ένα ενδιάμεσο φαινότυπο όσον αφορά την μετατόπιση της πρωτεΐνης, δηλαδή αυτή είτε μεταφέρεται διαμέσω της μεμβράνης, είτε σταματά και δημιουργείται ενδιάμεσο μετατόπισης. Μελέτησαν έτσι τους παράγοντες με τους οποίους ευνοείται η μία ή η άλλη από τις παραπάνω πορείες και τις διαχώρισαν βιοχημικά. Διαπίστωσαν ότι η ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι μία καταλυτική διαδικασία με κινητική παρόμοια μ' αυτή με την οποία συμβαίνει η μετατόπιση πρωτεϊνών, ενώ απαιτείται η λειτουργία τόσο της SecA όσο και της SecYEG. Όσον αφορά την διαδικασία διακοπής της μετατόπισης απαιτείται υψηλή υδροφοβικότητα με δείκτη τουλάχιστον με την παραπάνω τιμή, ενώ για μεσαίου τύπου υδροφοβικότητα η διακοπή της μετατόπισης συμβαίνει όταν πραγματοποιείται με αργή κινητική (απουσία βαθμίδωσης

πρωτονίων και χαμηλή συγκέντρωση ATP). Φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση της υδροφοβής αλληλουχίας με κάποιο συστατικό της μεταθετάσης προκαλεί τέτοιες αλλαγές στη διαμόρφωση του συμπλόκου που διακόπτεται η πορεία της μετατόπισης, οπότε στην περίπτωση που υφίσταται μια μεσαία υδροφοβικότητα αλληλουχία η αλληλεπίδραση αυτή διευκολύνεται σε συνθήκες αργής μετακίνησης του υποστρώματος. Αντίθετα η απελευθέρωση της πρωτεΐνης από την μεταθετάση στη λιπιδική στοιβάδα δε χρειάζεται παρά μία μεσαία υδροφοβικότητα και υψηλή θερμοκρασία, ενώ δεν απαιτείται υδρόλυση ATP από SecA, ούτε και κυκλική εισαγωγή της ίδιας πρωτεΐνης στη μεμβράνη.

Από πειράματα των Prinz et al., 1998 διαπιστώθηκε ότι και η ίδια η μηχανή της μεταθετάσης συντελεί στον καθορισμό της τοπολογίας των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στην *E.coli*, καθώς PrlA μεταλλαγές του γονιδίου *secY* που έχει προταθεί ότι δρουν στην διαμόρφωση της μεταθετάσης, μπορούν να αλλάζουν ή να αντιστρέφουν την τοπολογία διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.

## 1.2.Ε.Ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια.

Οι κυτταρικές μεμβράνες σχηματίζονται με την εισαγωγή νεοσυντιθέμενων συστατικών, όπως λιπιδίων και πρωτεϊνών, σε προϋπάρχουσες μεμβράνες. Επειδή κάθε μεμβράνη αποτελείται από ένα συγκεκριμένο σετ πρωτεϊνών η εισαγωγή των διαφόρων πρωτεϊνών στις μεμβράνες δεν πρέπει να είναι αποτέλεσμα αυθόρμητης εισαγωγής τους στη μεμβράνη. Αντίθετα πραγματοποιείται από διάφορες πρωτεϊνικές μεταθετάσες (protein translocases) που εντοπίζονται στις μεμβράνες και διακινούν μέσα απ' αυτές διάφορες πρωτεΐνες. Στο Κεφάλαιο κανάλι Sec61/SecYEG, αναφέρθηκε το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο γίνεται η ενσωμάτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών κατά την σύγχρονη με την μετάφραση μετατόπιση των πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Εδώ θα αναφερθούμε στην ενσωμάτωση μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια. Συγκεκριμένα στα Gram αρνητικά βακτήρια (ορίζονται από δύο μεμβράνες) εντοπίζονται οι μεταθετάσες που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο των διαφόρων συστημάτων μεταφοράς πρωτεϊνών. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν τις μεταθετάσες όχι μόνο για να ενσωματώσουν πρωτεΐνες στις μεμβράνες, αλλά και για να τις εκκρίνουν στο εξωτερικό των κυττάρων. Οι



Σχήμα 26: Μονοπάτια μετατόπισης ή ενσωμάτωσης πρωτεϊνών κατά μήκος ή στο εσωτερικό της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων. Η YidC φαίνεται ότι δρα στην εισαγωγή των πρωτεϊνών στη μεμβράνη είτε μόνη της, είτε μαζί με σύμπλοκο SecYEG, ανάλογα με το είδος της πρωτεΐνης.

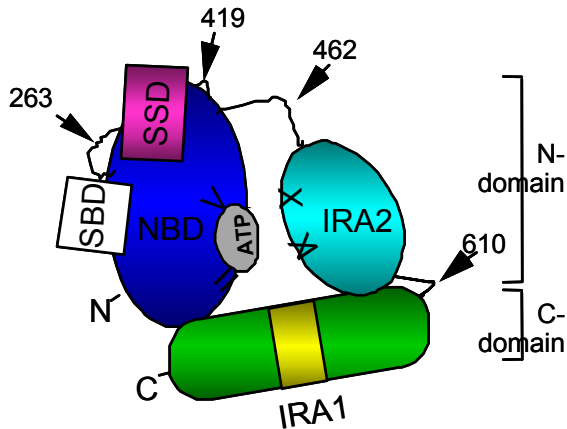
περισσότερες πρωτεΐνες διακινούνται μέσα από τις μεμβράνες μέσω του γενικού μονοπατιού SecYEG (Sec-εξαρτώμενη μετατόπιση) (σχήμα 26). Από την άλλη



πρωτεΐνες που περιέχουν δεσμευμένους συμπαράγοντες εισέρχονται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης μέσω του TAT μονοπατιού (σχήμα 26). Όσον αφορά τώρα τις μεμβρανικές πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων αυτές εισέρχονται στη μεμβράνη, είτε μέσω του Sec μονοπατιού, είτε μέσω του YidC μονοπατιού που φαίνεται όμως ότι συμμετέχει και στο Sec-εξαρτόμενο μονοπάτι (σχήμα 26). Η YidC είναι μία 60kDa πρωτεΐνη απαραίτητη στην *E.coli*. Η εύρεση της στα βακτήρια, τόσο στα Gram θετικά όσο και στα Gram αρνητικά στηρίχθηκε στην ομολογία της με την πρωτεΐνη Oxa1 που εντοπίζεται στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων και απαιτείται για τον σχηματισμό μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων (Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994).

### 1.2.Z. SecA-ATPάση. Από την βιοχημική ανάλυση της πρωτεΐνης στην κρυσταλλογραφική της διαμόρφωση.

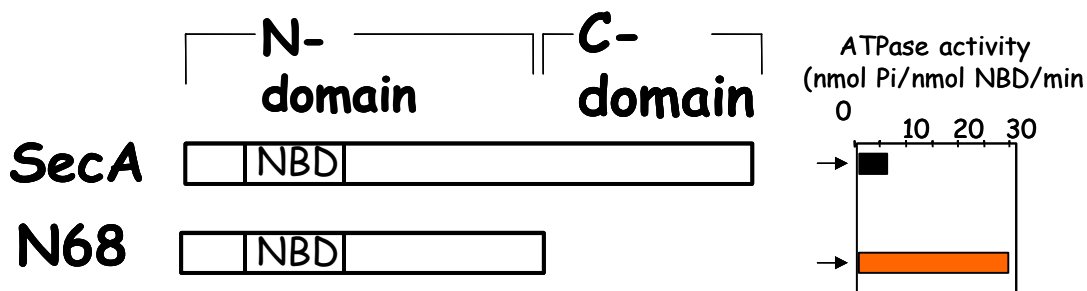
Η SecA είναι μία διμερής πρωτεΐνη με μάζα πρωτομερούς 102 kDa. Το μέγεθος και η περιπλοκότητα της, της επιτρέπουν να λειτουργεί και σαν υποδοχέας, αλλά και σαν ATPάση κινητήρας της μεταθετάσης. Τα ποικίλα βιοχημικά πειράματα των Karamanou et al., 1999;



Σχήμα 27:(Sianidis et al., 2001). Μοντέλο οργάνωσης των διάφορων περιοχών στο πρωτομερές της SecA (στο κείμενο αναγράφονται περισσότερες λεπτομέρειες).

Sianidis et al., 2001; Baud et al., 2002, έδειξαν ότι η SecA αποτελείται από πληθώρα διακριτών περιοχών (multidomain protein) (σχήμα 27). Συγκεκριμένα κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από δύο πρωταρχικά δομικά στοιχεία : την αμινοτελική περιοχή της ATPάσης (N-περιοχή) των 68 kDa, και την καρβοξυτελική περιοχή (C-περιοχή) των 34 kDa (Price et al., 1996). Οι δύο αυτές περιοχές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μάλιστα έχει πραγματοποιηθεί ανασύσταση διμερούς SecA *in vitro* από τις απομονωμένες N- και C-περιοχές (Karamanou et al., 1999). Μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης η SecA στο κυτταρόπλασμα παρουσιάζει μόνο βασική (χαμηλή) ATPάση. Συγκεκριμένα η N-περιοχή (σχήμα 28) παρουσιάζει στους

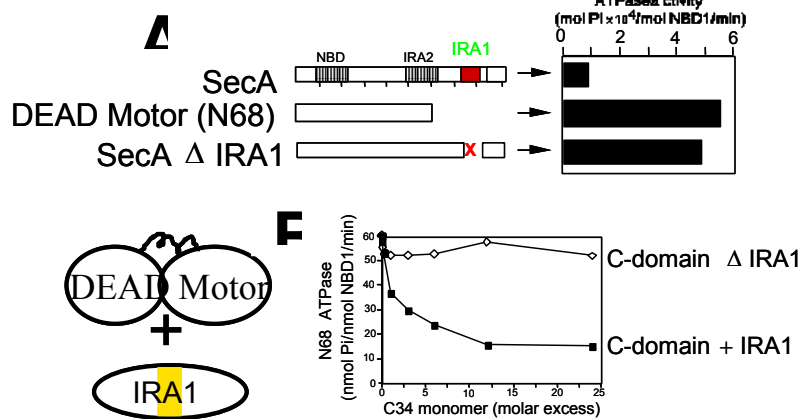
37<sup>0</sup>C πολύ υψηλό ρυθμό ανακύκλωσης (turnover number) σε σχέση με την ολόκληρη πρωτεΐνη (η  $k_{cat}$  για την SecA είναι  $4.6 \text{ min}^{-1}$  ενώ για το N68  $36.4 \text{ min}^{-1}$ , όπως θα δούμε και παρακάτω), γεγονός που οδήγησε τους Karamanou et al., 1999, στην αντιστοίχιση της C-περιοχής της SecA ως ρυθμιστικής περιοχής. Μάλιστα οι Karamanou et al., 1999 πιστοποίησαν την ύπαρξη ενός συντηρημένου μοτίβου στην C-περιοχή της SecA του οποίου η έλλειψη οδηγεί σε αντίστοιχη αρύθμιστη υδρόλυση ATP από την SecA πρωτεΐνη, όπως και στην περίπτωση του N68 (σχήμα 29). Το μοτίβο αυτό είναι το XIII (αμινοξέα 767-818; σχήμα 56), το ονόμασαν IRA1 (intramolecular regulator of ATP hydrolysis 1, ενδομοριακό ρυθμιστή της υδρόλυσης του ATP) και διαπίστωσαν ότι είναι σημαντικό για την βιωσιμότητα του



Σχήμα 28: (Karamanou et al., 1999). Σχηματική αναπαράσταση της SecA, του N68 και των δραστηριοτήτων ATPάσης που παρουσιάζουν στους 37<sup>0</sup>C.

κυτάρου *in vivo* αλλά και για την μετατόπιση των πρωτεϊνών *in vitro*. Προτάθηκε ότι το IRA1 λειτουργεί σαν διακόπτης ο οποίος είναι ανοιχτός όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (βασική ATPάση) και κλειστός κατά τη διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών (Translocation ATPase) που η υδρόλυση του ATP αυξάνεται. Επειδή στην SecAΔIRA1 η αλληλεπίδραση των N-και C-περιοχών μειώνεται, προτείνεται ότι η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την αρμονική αλληλεπίδραση των N-και C-περιοχών η οποία λειτουργώντας σαν διακόπτης ευθύνεται για την καταστολή της αρύθμιστης υδρόλυσης από την SecA. Όταν η SecA λοιπόν εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, οι N-και C-περιοχές της αλληλεπιδρούν, ο IRA1 διακόπτης είναι ανοιχτός και δεν δαπανάται ATP. Όταν η SecA όμως έρχεται στη μεμβράνη και αλληλεπιδρά με την SecY οπότε και αυξάνει η ATPάση της

(Μεμβρανική ATPάση), προτείνεται ότι η SecY προενεργοποιεί (primes) την SecA για την διαδικασία της μετατόπισης, όπου θα χρειαστούν μεγάλα ποσά ATPάσης. Προκαλούνται δηλαδή αλλαγές στη διαμόρφωση της καρβοξυτελικής περιοχής που γίνονται αισθητές από το IRA1, που χαλαρώνει έτσι την αλληλεπίδραση των N- και C-περιοχών και ανακουφίζει μερικώς την καταστολή της υδρόλυσης του ATP από την SecA. Στην περίπτωση της SecAΔIRA1 μολονότι σημειώνεται δέσμευση στη SecYEG θέση (είναι ασθενέστερη σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA-βλέπε συζήτηση-αποτελέσματα) η πρωτεΐνη δεν ενεργοποιείται



Σχήμα 29:(Karamanou et al., 1999). Ιδιότητες SecAΔIRA1. Το IRA1 στοιχείο λειτουργεί σαν διακόπτης που είναι ανοιχτός και καταστέλλει την υδρόλυση του ATP από την N-περιοχή (N68) όταν η τελευταία αλληλεπιδρά με την C-περιοχή, ενώ όταν λείπει το IRA1 και αναστέλλεται η αλληλεπίδραση N- και C-περιοχής η υδρόλυση της SecA είναι αρύθμιστη. Στο A) απεικονίζεται η Βασική ATPάση της SecA, του N68 και της SecAΔIRA1. Στο B) απεικονίζεται η καταστολή *in vitro* της ATPάσης σταθερής ποσότητας N68 παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων της C-περιοχής (C34), μόνο παρουσία του στοιχείου IRA1.

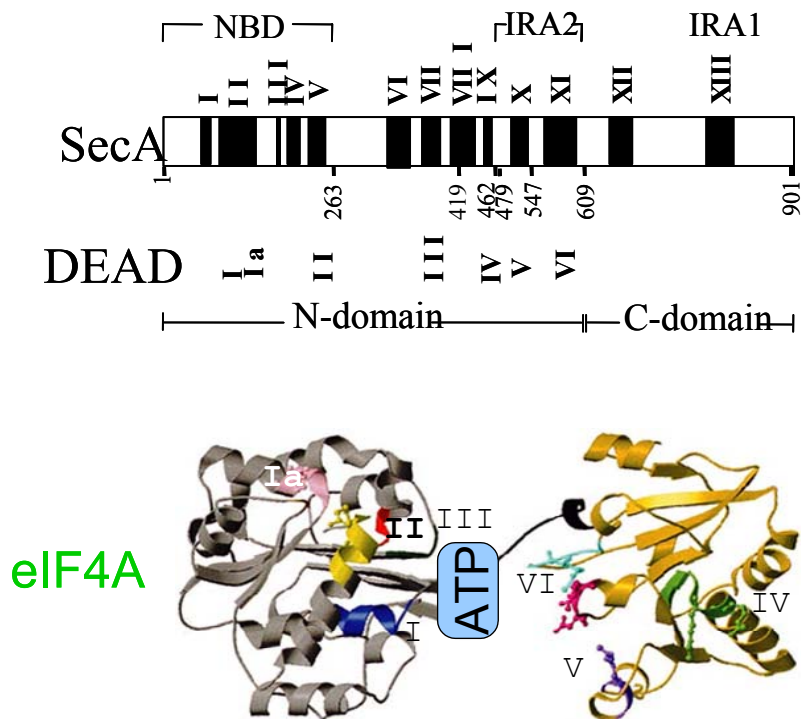
περαιτέρω στην διαδικασία υδρόλυσης ATP. Αυτή η ανικανότητα δεν οφείλεται στον κορεσμό της καταλυτικής χωρητικότητας του ενζύμου, αφού παρά το γεγονός ότι η βασική ATPάση του ενζύμου είναι ιδιαίτερα αυξημένη η SecAT109N που παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερη βασική ATPάση από την SecAΔIRA1 διεγείρεται περαιτέρω από τους διάφορους υποκαταστάτες και τις μεμβράνες (Mitchel and Oliver, 1993).

Προφανώς η αλληλεπίδραση με την SecY δεν είναι παραγωγική υποδηλώνοντας την ρυθμιστική δράση του IRA1. Πλήρης αναστολή της καταστολής της ATPάσης από τον IRA1 διακόπτη προκύπτει μόνο μετά τον σχηματισμό του τριτοταγούς συμπλόκου μεταθετάσης-υποστρώματος. Εξάλλου σε μία αντίδραση με χαοτροπικά αντιδραστήρια που χαλαρώνουν την C-περιοχή παρατηρείται αύξηση της ATPάσης, σε αναλογία με την δράση της SecY (Song and Kim, 1997). Παρόμοια, δέσμευση της SecA σε μοντέλα μεμβρανών προκαλεί τοπική αποδιάταξη της (Breukink et al., 1992; Ulbrandt et al., 1992; Song and Kim, 1997) η οποία αποδίδεται πάλι στην C-περιοχή (Song and Kim, 1997) και διεγείρεται έτσι η δέσμευση υποστρώματος και η λιπιδική ATPάση της SecA (Lill et al., 1990). Επίσης αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA από την αλληλεπίδραση με τα διάφορα νουκλεοτίδια γίνονται αντιληπτές από την W775 του IRA1 διακόπτη και οδηγούν σε ακριβείς αντιδράσεις δέσμευσης και απελευθέρωσης με την N-περιοχή (den Blaauwen et al., 1996).

Ρυθμίζοντας όμως την υδρόλυση ATP από την N-περιοχή μέσω της αλληλεπίδρασης των N-και C-περιοχών, το IRA1 μπορεί να θεωρηθεί ότι συσχετίζει την υδρόλυση ATP με την μετατόπιση της προπρωτεΐνης από τη μεμβράνη. Σύμφωνα με το μοντέλο της μετατόπισης των πρωτεϊνών από τους Economidou and Wickner, 1994 η μεταφορά των υποστρωμάτων μέσα από τη μεμβράνη στηρίζεται στους συνεχόμενους κύκλους εισαγωγής και εξαγωγής της SecA στη μεμβράνη με τη δέσμευση και υδρόλυση του ATP αντίστοιχα. Όταν λοιπόν όλα είναι έτοιμα για τη διαδικασία της μετατόπισης και η SecA δεσμεύει ATP και υπόστρωμα, ο IRA1 διακόπτης είναι κλειστός και η αλληλεπίδραση των N-και C-περιοχών περιορίζεται. Έτσι ευνοείται η απόκτηση από την SecA της χαλαρή διαμόρφωσης (βλέπε Κεφάλαιο αλλαγών της διαμόρφωσης της SecA παρουσία των διαφόρων ειδών υποκαταστατών) που διευκολύνει την εισαγωγή της στη μεμβράνη. Στη συνέχεια όταν το ATP υδρολυθεί σε ADP και απελευθερωθεί το υπόστρωμα από τη SecA που διεγείρει την διαδικασία της υδρόλυσης, ο IRA1 διακόπτης ανοίγει και η αλληλεπίδραση των N-και C-περιοχών ενισχύεται. Έτσι η SecA αποκτά σφιχτή δομή, αφού το ADP σταθεροποιεί την N-περιοχή και αυτή με τη σειρά της την C-περιοχή με την οποία και αλληλεπιδρά, και έτσι η SecA εξάγεται από τη μεμβράνη. Επαναπρόσδεση του υποστρώματος στη SecA κλείνει τον IRA1 διακόπτη και επιτρέπει επανεκίνηση της παραπάνω διαδικασίας.

Η N-περιοχή της SecA περιέχει τα επτά χαρακτηριστικά μοτίβα της υπερικογένειας 2 των RNA ελικασών (Koonin and Gorbalenya, 1992; Sianidis et al., 2001), και παρουσιάζει δομή ATPάσης ανάλογη με τη δομή ATPάσης που παρουσιάζουν οι ελικάσες (Sianidis et al., 2001; Hunt et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνει τα DEAD (από τα αντίστοιχα αμινοξέα) χαρακτηριστικά μοτίβα (σχήμα 30) που παρουσιάζουν οι DEAD ATPάσες, στις οποίες ανήκουν πέντε υπερικογένειες ATPάσεων που περιλαμβάνουν και τις ελικάσες των νουκλεϊκών οξέων (de la Cruz et al., 1999; Hall and Matson, 1999) και γι' αυτό η N-περιοχή ονομάζεται και DEAD κινητήρας.

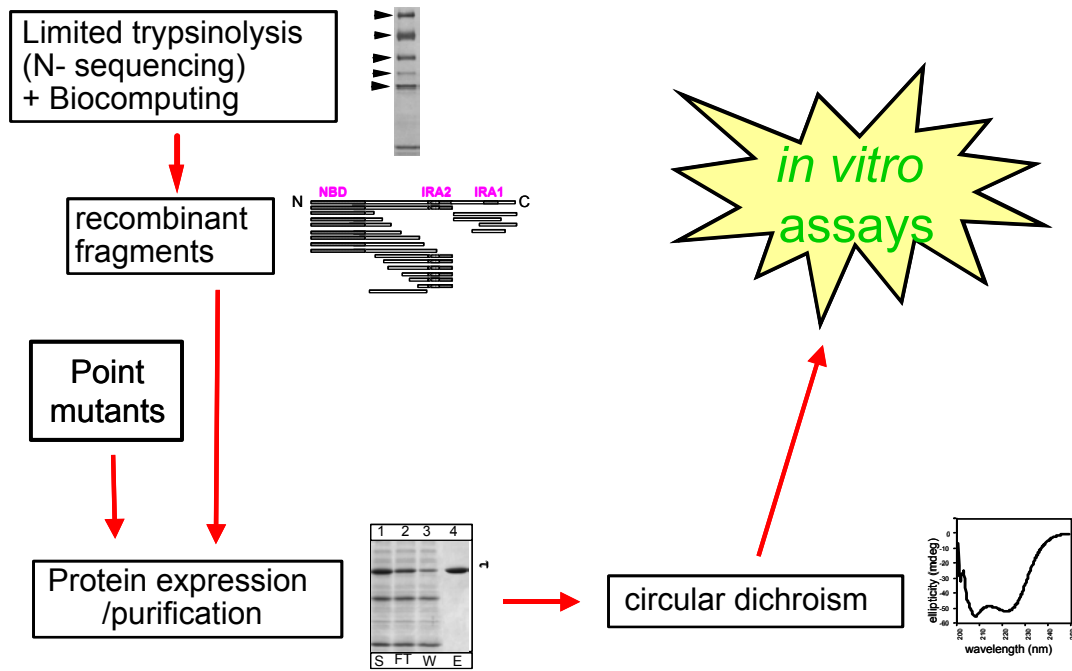
Η περιοχή όμως του DEAD κινητήρα μπορεί να υποδιαιρεθεί και σε μικρότερες υποπεριοχές με διαφορετική λειτουργία (Karamanou et al., 1999; Baud et al., 2002; Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003). Συγκεκριμένα οι Sianidis et al., 2001 σχημάτισαν κατασκευές που παράγουν μικρότερα τμήματα της SecA τόσο από το αμινοτελικό όσο και από το καρβοξυτελικό τμήμα της N-περιοχής της, λαμβάνοντας όμως υπόψη τα τμήματα της πρωτεΐνης που προκύπτουν με περιοριστική πρωτεόλυση και αμινοτελική ανίχνευση της



αλληλουχίας τους, όπως και τα συντηρημένα μοτίβα κατά μήκος της SecA. Παρήγαγαν επίσης μεταλλαγμένες SecA με ήπιες μεταλλαγές στα παραπάνω μοτίβα και αφού καθάρισαν σε μεγάλες ποσότητες τα διάφορα κομμάτια της SecA και τις μεταλλαγμένες εκδοχές της έλεγξαν την διατήρηση της οργανωμένης και αναδιπλωμένης μορφής τους με κυκλικό διχρωισμό. Γενικότερα η στρατηγική με την οποία η SecA διαιρέθηκε σε μικρότερες περιοχές, με διακριτές λειτουργίες απεικονίζεται στο σχήμα 31. Έτσι οι Sianidis et al., 2001 εντόπισαν την περιοχή δέσμευσης του

Σχήμα 30:(Sianidis et al., 2001). Α) Χάρτης της SecA όπου αναγράφονται τα συντηρημένα μοτίβα (70% ταυτότητα/ομοιότητα), τα οποία καθορίζονται όπως περιγράφεται από τους Bailey and Gribskov, 1999, αλλά και με οπτική παρατήρηση. Παρουσιάζονται ακόμα τα αντίστοιχα DEAD μοτίβα της υπερικογένειας II των RNA ελικασών. Τα μοτίβα στην *E.coli* που σημειώνονται με μαύρα κουτάκια είναι: μοτίβο I (αμινοξέα 66-82); μοτίβο II (αμινοξέα 83-139); μοτίβο III (αμινοξέα 149-156); μοτίβο IV (αμινοξέα 166-191); μοτίβο V (αμινοξέα 205-227); μοτίβο VI (αμινοξέα 333-361); μοτίβο VII (αμινοξέα 371-397); μοτίβο VIII (αμινοξέα 404-430); μοτίβο IX (αμινοξέα 449-466); μοτίβο X (αμινοξέα 494-516); μοτίβο XI (αμινοξέα 532-599); μοτίβο XII (αμινοξέα 630-663); μοτίβο XIII (αμινοξέα 767-818). Β) Τα DEAD μοτίβα της υπερικογένειας II, SF II, των RNA ελικασών, σημειώνονται στην αναλυμένη δομή ενός μέλους της οικογένειας όπως είναι η eIF4A.

νουκλεοτιδίου 1-419 (NBD-περιοχή; Nucleotide Binding Domain) η οποία μπορεί όχι μόνο να δεσμεύει ATP αλλά και να το υδρολύει. Με πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης (Karamanou et al., 1999; βλέπε και στο Κεφάλαιο αλλαγών της διαμόρφωσης των διαφόρων περιοχών της SecA παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών) η θέση 419 φάνηκε ότι συνιστά ένα σύνδεσμο υποπεριοχών στον DEAD κινητήρα, αφού αλλάζει την έκθεση της στο διαλύτη, και άρα στη πρωτεάση, παρουσία και απουσία ADP ή ATP. Συγκεκριμένα οι Sianidis et al., 2001 διαπίστωσαν ότι αμινοτελικά κομμάτια (που παρουσιάζουν φάσμα που υποδηλώνει α-ελικοειδή δομή μετά από κυκλικό διχρωισμό, CD), μέχρι την θέση 420, σταθεροποιούνται με ADP στις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης τους (μετρούμενες με κυκλικό διχρωισμό), και άρα δεσμεύουν ADP (βλέπε Κεφάλαιο αλλαγών της διαμόρφωσης των διαφόρων περιοχών της SecA παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών; συζήτηση-αποτελέσματα). Τα ίδια κομμάτια επίσης, υδρολύουν ATP όταν χρησιμοποίησαν



Σχήμα 31: Στρατηγική με την οποία η SecA διαιρέθηκε σε μικρότερες περιοχές με διακριτές λειτουργίες.

χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας, TLC (Thin Layer Chromatography) και ραδιενεργό α- ή γ-<sup>32</sup>PATP. Διαπίστωσαν συγκεκριμένα για όλα τα παραπάνω αμινοτελικά τμήματα μέχρι την θέση 1-420, ρυθμό ανακύκλωσης  $k_{cat}$  που είναι χαμηλότερος της ολόκληρης πρωτεΐνης SecA, αλλά είναι μετρήσιμος. Δηλαδή η  $k_{cat}$  για την SecA είναι  $4.6 \text{ min}^{-1}$  και για το 1-263 αμινοτελικό τμήμα είναι  $0.1 \text{ min}^{-1}$ . Από τα παραπάνω πειράματα οι Sianidis et al., 2001, διαπίστωσαν ότι η περιοχή 1-227 είναι η μικρότερη περιοχή δέσμευσης και υδρόλυσης του νουκλεοτιδίου ATP. Μπορεί όλα τα παραπάνω αμινοτελικά τμήματα να δεσμεύουν και να υδρολύουν ATP, όμως τόσο η κατάλυση όσο και η δέσμευση ADP απ' αυτά είναι πολύ φτωχή, όπως και η σταθεροποίηση της καμπύλης θερμοκίνησης με το ADP παρουσιάζεται περιορισμένη. Τα παραπάνω συμβαίνουν διότι να μεν στα παραπάνω αμινοτελικά τμήματα εντοπίζονται τα μοτίβα Walker A (μοτίβο II στη SecA) και Walker B (μοτίβο V στη SecA) που είναι χαρακτηριστικά των ATPασών (Walker et al., 1982), λείπει όμως η περιοχή 462-610. Προτάθηκε λοιπόν ότι αυτή η περιοχή συνιστά σημαντική επιφάνεια του καταλυτικού πυρήνα, απαραίτητη για να επιτελείται η βέλτιστη κατάλυση από την ολόκληρη πρωτεΐνη SecA στο διάλυμα-κυτταρόπλασμα (Βασική ATPάση; η  $k_{cat}$  για την SecA που περιέχει την περιοχή 462-610, είναι  $4.6 \text{ min}^{-1}$ ). Η περιοχή αυτή ονομάστηκε IRA2 (intramolecular regulator of ATP hydrolysis 2, ενδομοριακός ρυθμιστής της υδρόλυσης του ATP, σε αντιπαράθεση με τον IRA1 διακόπτη για τον οποίο μιλήσαμε προηγουμένως) και διαπιστώθηκε ότι δύο DEAD μοτίβα στην IRA2 περιοχή, το X και το XI είναι σημαντικά για την δράση της. Συγκεκριμένα εντόπισαν σημειακές μεταλλαγές που απέδειξαν του λόγου το αληθές, όπως για παράδειγμα την R577K στο μοτίβο XI, που έχει τέτοιο δραματικό φαινότυπο στον ρυθμό ανακύκλωσης της NBD-περιοχής ( $k_{cat}=0.14 \text{ min}^{-1}$  για το N68R577K, ενώ είδαμε ότι για το WTN68(1-610)  $k_{cat}=36.4 \text{ min}^{-1}$ ) σαν να λείπει ολόκληρο το μοτίβο XI (το τμήμα 1-547 έχει  $k_{cat}=0.08 \text{ min}^{-1}$ ) ή σαν να έχουμε έλλειψη ολόκληρης της περιοχής IRA2 ( $k_{cat}=0.1 \text{ min}^{-1}$  για το 1-263 τμήμα ή  $k_{cat}=0.06 \text{ min}^{-1}$  για το 1-479 τμήμα). Επιπλέον διαπίστωσαν ότι ενώ στην περίπτωση είτε της SecA, είτε του N68, με στοιχειομετρικά ποσά ATP, η κατάλυση ολοκληρώνεται σε 1 λεπτό, είτε στους 4 είτε στους  $37^{\circ}\text{C}$ , δεν συμβαίνει το ίδιο με την SecAR577K και το N68R577K, με πιο έντονα τα φαινόμενα στους  $4^{\circ}\text{C}$  απ' ότι στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Το πείραμα αυτό της κινητικής προ-σταθερής κατάστασης (pre-steady-state kinetics) είναι εφικτό επειδή η συγγένεια ( $K_m$ ) για ATP των μεταλλαγών στο XI μοτίβο δεν αλλάζει σε σχέση με την αγρίου τύπου SecA. Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα για μεταλλαγές του μοτίβου X. Είναι προφανές λοιπόν ότι η παραπάνω μεταλλαγή απώλειας λειτουργίας (loss of function) R577K, οφείλεται σε ελαττωματική υδρόλυση στην περιοχή NBD η οποία βελτιστοποιείται μόνο παρουσία αγρίου τύπου IRA2.

Επιπλέον οι Sianidis et al., 2001 διαπίστωσαν ότι η IRA2 περιοχή αποτελεί και ρυθμιστικό στοιχείο της υδρόλυσης από τον DEAD κινητήρα, αφού όλα τα αμινοτελικά τμήματα του N68 (κατά τ' άλλα αναδιπλωμένα στο χώρο όπως είπαμε και προηγουμένως από το φάσμα τους με κυκλικό διχρωϊσμό) από τα οποία απουσιάζει η IRA2 περιοχή δεν παρουσιάζουν τον ρυθμό ανακύκλωσης (turnover rate) του DEAD κινητήρα το WTN68 (1-610) έχει  $k_{cat}=36.4 \text{ min}^{-1}$ , ενώ το  $k_{cat}$  κυμαίνεται από  $0.06-0.1 \text{ min}^{-1}$  για τα τμήματα του N68 μέχρι το αμινοξύ 420. Εξάλλου η προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων καθαρισμένου τμήματος που περιέχει το IRA2, στο N1-479 τμήμα *in vitro*, οδηγεί σε σημαντική αύξηση (15 φορές) της υδρόλυσης του ATP απ' αυτό, υποδεικνύοντας την διεγερτική δράση της IRA2 περιοχής. Μάλιστα απέδωσαν τη λειτουργία αυτή του IRA2 στην απ' ευθείας αλληλεπίδραση του με την NBD-περιοχή. Συγκεκριμένα με την χρησιμοποίηση απομονωμένων πρωτεϊνών από τις παραπάνω περιοχές, και με τη χρησιμοποίηση βιοαισθητήρα με ακινητοποιημένη την IRA2-περιοχή, μέτρησαν πρόσδεση σ' αυτήν όλων των τμημάτων με την NBD-περιοχή. Η επικοινωνία αυτή NBD-IRA2 μεταφέρει την πληροφορία της δομικής πλαστικότητας που χαρακτηρίζει την περιοχή IRA2 στην NBD-περιοχή διευκολύνοντας πιθανά την καταλυτική χημεία της. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η δευτεροταγής δομή και πιο ειδικά η α-ελικοειδής δομή της περιοχής IRA2 ελλατώνεται με την θερμοκρασία (δομική ευκινησία) κάτι που δεν παρατηρείται για κανένα από τα αμινοτελικά κομμάτια της NBD-περιοχής, αλλά χαρακτηρίζει τόσο την SecA όσο και το N68 που περιέχει την IRA2 περιοχή. Φαίνεται δε, ότι ελαττωμένη α-ελικοειδής διαμόρφωση χαρακτηρίζει τις παραπάνω IRA2 μεταλλαγμένες SecA που μπορούν και απελευθερώνουν το ADP στον πάγο (Karamanou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Επιβεβαίωση της ρυθμιστικής δράσης της IRA2-περιοχής ήρθε με μία σειρά μεταλλαγών τόσο στο μοτίβο X όσο και στο μοτίβο XI που είτε αυξάνουν, είτε μειώνουν τον ρυθμό υδρόλυσης της SecA. Η  $k_{cat}$  για την WTSecA είναι  $4.6 \text{ min}^{-1}$ , ενώ για την SecAG510A και την SecAR566A είναι 42.2 και  $19.6 \text{ min}^{-1}$  αντίστοιχα. Αντίθετα η  $k_{cat}$  για την SecAR509K και SecAR577K είναι 4.5 και  $2.6 \text{ min}^{-1}$  αντίστοιχα.

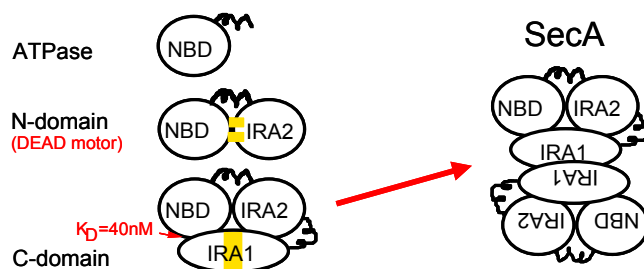
Το καθοριστικό στάδιο της υδρόλυσης του ATP (rate limiting step) είναι η απελευθέρωση του παραγόμενου ADP, το οποίο οι Sianidis et al., 2001, έδειξαν ότι ρυθμίζεται από την περιοχή IRA2. Έτσι μετά από ένα κύκλο υδρόλυσης ATP και παραγωγή ADP και Pi, η SecA στο κυτταρόπλασμα μένει δεσμευμένη με το ADP το οποίο και δεν αποχωρίζεται εύκολα (λόγω του ανοιχτού IRA1 διακόπτη), και γι' αυτό πραγματοποιούνται εκεί μόνο λίγοι κύκλοι υδρόλυσης. Εξάλλου με μετρήσεις της σταθεράς πρόσδεσης  $K_{on}$  και της σταθεράς απελευθέρωσης  $K_{off}$  στην περίπτωση της WTSecA (Karamanou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) διαπιστώνεται ότι η συγγένεια για το ADP στους  $37^{\circ}\text{C}$  είναι πολύ χαμηλή,  $K_{on}=0.35 \times 10^7 / \text{M}/\text{min}$ , αλλά και η σταθερά απελευθέρωσης επίσης,  $K_{off}=0.975 / \text{min}$ . Επομένως τα ελάχιστα μόρια του ATP που προσδένονται και υδρολύονται σε ADP, μένουν δεσμευμένα και δεν απελευθερώνονται εύκολα από την πρωτεΐνη. Αντίθετα στη περίπτωση του N68 ενώ δεν φαίνεται να αλλάζει σημαντικά η συγγένεια  $K_{on}$  για το ADP στους  $37^{\circ}\text{C}$ , εντούτοις αυξάνεται δραματικά η σταθερά απελευθέρωσης  $K_{off}$  (Karamanou, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και γι' αυτό έχουμε πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης ATP. Μόνο όταν η SecA έρθει στη μεμβράνη και αλληλεπιδράσει με τους διάφορους υποκαταστάτες της μεταθετάσης και με το μεταφερόμενο υπόστρωμα και ανοίξει ο IRA1 διακόπτης, τα προϊόντα της υδρόλυσης απελευθερώνονται και πραγματοποιούνται πολλαπλοί κύκλοι υδρόλυσης. Και αυτό γιατί τότε μπορεί να εξασκήσει τη δράση της η περιοχή IRA2. Από την άλλη οι μεταλλαγμένες SecA (SecAG510A, SecAR566A) που παρουσιάζουν υψηλό ρυθμό ανακύκλωσης χαρακτηρίζονται από αυξημένους ρυθμούς απελευθέρωσης του ADP, το απελευθερώνουν ακόμα και στον πάγο. Έτσι προσπερνούν την καταστολή της υδρόλυσης του ATP που παρατηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες τόσο από την SecA, όσο και από το N68 που μένουν προσδεμένα με το ADP. Τόσο η SecA όσο και το N68 δεν απελευθερώνουν το ADP στον πάγο επιτελώντας απλούς μόνο κύκλους υδρόλυσης στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Αντίθετα στους  $37^{\circ}\text{C}$  τόσο η SecA όσο και το N68 επιτελούν περισσότερους του ενός κύκλους υδρόλυσης λόγω της πλαστικότητας που αποκτά η IRA2-περιοχή. Βέβαια η υδρόλυση του N68 είναι πολύ μεγαλύτερη συγκρινόμενη με την υδρόλυση της SecA και αυτό γιατί η παρουσία του IRA1 διακόπτη υπονομεύει την απρόσκοπτη δράση του IRA2. Συγκεκριμένα με μετρήσεις των σταθερών πρόσδεσης  $K_{on}$  και των σταθερών απελευθέρωσης  $K_{off}$  τόσο στους  $4^{\circ}\text{C}$  όσο και στους  $37^{\circ}\text{C}$  για τη SecA (Karamanou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) προκύπτει πολύ χαμηλή συγγένεια για το ADP στους  $4^{\circ}\text{C}$  που αυξάνεται στους  $37^{\circ}\text{C}$ , αλλά εξακολουθεί να είναι πολύ χαμηλή (μικρότερης τάξης του ρυθμού διάχυσης  $10^8$ ), και πολύ μικρός ρυθμός απελευθέρωσης που καταστέλλει την απελευθέρωση του ADP

στον πάγο, και απλώς την περιορίζει στους 37°C ( $K_{on}4^{\circ}C=0.67 \times 10^2/M/min$ ,  $K_{on}37^{\circ}C=0.35 \times 10^7/M/min$  και  $K_{off}4^{\circ}C=0.94 \times 10^{-5}/min$ ,  $K_{off}37^{\circ}C=0.975/min$ ). Αντίθετα για το N68 η συγγένεια για ADP είναι χαμηλή και στους 4 και στους 37°C, αλλά ο ρυθμός απελευθέρωσης ενώ είναι μικρός στους 4°C, αυξάνεται εντυπωσιακά στους 37°C οπότε και συντελείται μη ρυθμιζόμενη υδρόλυση ( $K_{on}4^{\circ}C=0.85 \times 10^6/M/min$  και  $K_{off}4^{\circ}C=0.24/min$ ). Συμπερασματικά η περιοχή IRA2 δρα και απελευθερώνει ADP, όταν ο διακόπτης IRA1 είναι κλειστός και η θερμοκρασία είναι αυξημένη, προκειμένου να αποκτήσει την απαιτούμενη δομική πλαστικότητα και να επιτελέσει τη δράση της.

Ακόμα με την χρησιμοποίηση διπλών μεταλλαγών στην IRA1 και IRA2 περιοχή όπως των SecAR509KΔIRA1 και SecAR577KΔIRA1 οι Sianidis et al., 2001 έδειξαν ότι η δράση του διακόπτη IRA1 πραγματοποιείται μέσω WT IRA2, αφού και οι δύο διπλά μεταλλαγμένες SecA καταργούν την υψηλή ATPάση της SecAΔIRA1. Είπαμε προηγουμένως ότι η καταστολή της υδρόλυσης του ATP μέσω του IRA1 διακόπτη πραγματοποιείται μέσω απ' ευθείας αλληλεπίδρασης των N και C-περιοχών της SecA. Πως λοιπόν οι IRA2 μεταλλαγές στη SecA (SecAG510A και SecAR566K) που παρουσιάζουν αυξημένη υδρόλυση στο διάλυμα προσπερνούν τον IRA1 διακόπτη; Η αυξημένη υδρόλυση τους οφείλεται στην περιορισμένη αλληλεπίδραση των N και C-περιοχών της SecA, σε σχέση με την αλληλεπίδραση στην WTSecA. Σε πειράματα με βιοισθητήρα με ακινητοποιημένη την C-περιοχή και μέτρηση της πρόσδεσης της N-περιοχής διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση φτωχαίνει στην περίπτωση των μεταλλαγμένων N-περιοχών. Χαλαρότερη όμως αλληλεπίδραση N- και C-περιοχών ανακουφίζει την πρωτεΐνη από την καταστολή του IRA1 διακόπτη και πιθανότατα επιτρέπει στην IRA2-περιοχή να επάγει την αυξημένη υδρόλυση στην NBD-περιοχή. Εξάλλου έχει παρατηρηθεί για τις παραπάνω IRA2 μεταλλαγές στη SecA ότι επικρατεί χαλαρότερη αλληλεπίδραση των περιοχών NBD-IRA2, αφού σε πειράματα με βιοισθητήρα με ακινητοποιημένη την NBD-περιοχή και μέτρηση της πρόσδεσης της IRA2-περιοχής διαπιστώθηκε φτωχότερη αλληλεπίδραση NBD-IRA2 στην περίπτωση των μεταλλαγμένων IRA2-περιοχών. Έτσι το ADP απελευθερώνεται με μεγάλη ευκολία από την θέση δέσμευσης του και γι' αυτό και δεν σταθεροποιεί στον ίδιο βαθμό με την WTSecA τις καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των SecAG510A και SecAR566A. Από την άλλη μεριά έχει διαπιστωθεί ότι η C-περιοχή μπορεί και αλληλεπιδρά τόσο με την NBD όσο και με την IRA2-περιοχή και επομένως μπορεί να θεωρηθεί σαν μοριακός σύνδεσμος και ρυθμιστής της μετακίνησης των NBD-IRA2 περιοχών που με τη σειρά της ρυθμίζει την κατακράτηση ADP από την πρωτεΐνη. Με μία τέτοια αλληλεπίδραση εξάλλου η C-περιοχή πιθανά σταθεροποιεί την χαλαρή επικοινωνία των NBD-IRA2 περιοχών στις SecAG510A και SecAR566K και γι' αυτό απουσία της, στις N68 μορφές των παραπάνω μεταλλαγών δεν μπορεί να κατασταλεί η μείωση της ATPάσης από τις IRA2 μεταλλαγές. Η  $k_{cat}$  για τις N68G510A και N68R566K είναι 7.8 και 12.6  $min^{-1}$  αντίστοιχα, ενώ οι ρυθμοί ανακύκλωσης για τις ολόκληρες πρωτεΐνες είναι πολύ μεγάλοι όπως είδαμε προηγουμένως. Βέβαια στις SecAG510A και SecAR566A και η αλληλεπίδραση των N- και C-περιοχών είναι περιορισμένη, εξακολουθεί όμως να υφίσταται και να επάγει τα παραπάνω αποτελέσματα.

Ένας πλήρης λοιπόν λειτουργικός αμινοτελικός κινητήρας ATPάσης που περιέχει όλα τα DEAD μοτίβα των ελίκασών συγκροτείται από την αλληλεπίδραση της περιοχής δέσμευσης και υδρόλυσης του νουκλεοτιδίου NBD με την ρυθμιστική περιοχή IRA2 (σχήμα 32). Η λειτουργική

Σχήμα 32: (Sianidis et al., 2001). Σχηματικό μοντέλο περιοχών στη SecA. Η αμινοτελική περιοχή της SecA αποτελείται από την περιοχή δέσμευσης και υδρόλυσης νουκλεοτιδίου (NBD) και την περιοχή που βελτιώνει την προηγούμενη χημεία και ρυθμίζει την ένταση της υδρόλυσης (IRA2). Οι περιοχές αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και συνιστούν τον DEAD κινητήρα. Αυτός αλληλεπιδρά με την C-περιοχή της πρωτεΐνης με συγγένεια 40nM οπότε και σχηματίζεται το πρωτομερές της SecA. Μέσω αλληλεπίδρασης των C-περιοχών τους δύο πρωτομερή σχηματίζουν μία διμερές SecA.



επικοινωνία όμως μεταξύ των παραπάνω περιοχών απαιτεί τα αγρίου τύπου μοτίβα X και XI του IRA2, ενώ διευκολύνεται από περιοχές-συνδέσμους όπως το μοτίβο VIII που περιέχει την αμινοξική θέση 419 ή από το μοτίβο VII (SAT). Το τελευταίο μοτίβο αποτελεί το μοτίβο III των υπεροικογενειών I και II (SF I και SF II) των ελίκασών και ενδέχεται να παίζει κάποιον, ή όλους, από τους παρακάτω ρόλους. Έτσι προβλέπεται ότι συμμετέχει στην δημιουργία

δεσμών υδρογόνου, και άλλων αλληλεπιδράσεων με τις βάσεις του υποστρώματος του νουκλεϊκού οξέος, όπως με τις βάσεις του DNA στην περίπτωση της Rep DNA ελικάσης (Korolev et al., 1997) ή με τα αμινοξέα του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Πιθανά επιπλέον, συμμετέχει στην μεταβίβαση της ενέργειας από την θέση της ATPάσης, στο υπόστρωμα, για την μετατόπιση του, όπως στην περίπτωση της PcrA DNA ελικάσης (Velankar et al., 1999). Τέλος είναι δυνατόν να εμπλέκεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, που πριμοδοτούνται από την δέσμευση νουκλεοτιδίου, οι οποίες μεταδίδουν την ενέργεια από την υδρόλυση του NTP στο υπόστρωμα, όπως στο μόριο RNA στην περίπτωση της NS3 RNA ελικάσης.

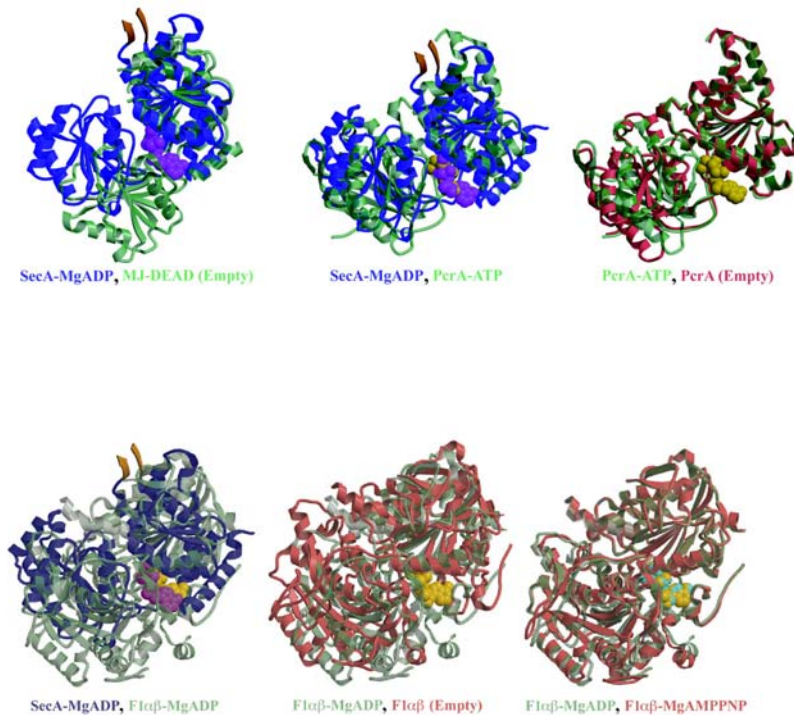
Απ' όλα τα παραπάνω προτάθηκε από τους Sianidis et al., 2001 ότι οι NBD και IRA2 περιοχές οργανώνονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούν μία σχισμή-κοιλότητα που επενδύεται από τα μοτίβα II (WalkerA), V (WalkerB), X και XI (σχήμα 27) και στην οποία προσδέεται ένα μόριο ATP, κατά τρόπο ανάλογο με τον οποίο οργανώνονται οι κινητήρες ATPάσης άλλων DEAD πρωτεϊνών των οποίων έχουν αναλυθεί οι κρυσταλλογραφικές δομές (Korolev et al., 1998; de la Cruz et al., 1999; Soultanas and Wigley, 2000; σχήμα 30B). Έτσι ο πυρήνας ATPάσης των DEAD πρωτεϊνών οργανώνεται από δύο δομικά παρόμοιες περιοχές, τις 1A και 2A, οι οποίες πιθανά αντιστοιχούν στις NBD και IRA2 περιοχές. Οι περιοχές 2A μπορούν να υφίστανται σαν ανεξάρτητα πολυπεπτίδια (Koonin and Rudd, 1996; Singleton et al., 2000), ή μπορεί να μετακινούνται ως προς τις καταλυτικές περιοχές 1A, να απομακρύνονται απ' αυτές ή να τις πλησιάζουν (Caruthers et al., 2000).

Του λόγου το αληθές πιστοποιήθηκε από την ανάλυση της τριτοταγούς διαμόρφωσης της SecA τόσο από το *Bacillus subtilis* (Hunt et al., 2002), όσο και από το *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma et al., 2003) από την οποία διαπιστώθηκε ότι, πράγματι ο πυρήνας της SecA συνίσταται από ένα ζευγάρι αναδιπλώσεως νουκλεοτιδίου (nucleotide binding fold) τύπου F1 (σχήμα 34; δεύτερη σειρά) που ομοιάζει με τις σε σειρά κινητικές περιοχές στις υπεροικογένειες I και II, SF-I και SF-II, των ATP-εξαρτούμενων ελικασών. Διαπιστώνεται ότι η θέση δέσμευσης ATP εντοπίζεται μεταξύ των δύο περιοχών των NBF-I NBF-II (Nucleotide binding fold I, II) (όπως φαίνεται από την κρυσταλλογραφική δομή της SecA; σχήμα 34). Σημειώνουμε ότι η περιοχή NBF-I, είναι η NBD-περιοχή (Nucleotide binding domain), και η NBF-II είναι η περιοχή IRA2 για την οποία μιλήσαμε προηγουμένως. Επίσης υπογραμμίζεται (βλέπε και στο Κεφάλαιο αλληλεπίδρασης της SecA με ATP), ότι δεν έχει πιστοποιηθεί πειραματικά, πέραν πάσης αμφιβολίας, η ύπαρξη στην πρωτεΐνη μιας δεύτερης θέσης δέσμευσης ATP, χαμηλότερης συγγένειας, (στην οποία αναφέρεται η ονομασία NBF-II) αλλά παρόλα αυτά, εξακολουθεί να αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Η περιοχή NBF-I (NBD) είναι η πιο καλά διευθετημένη σ' όλη δομή με μέσο B παράγοντα κύριας αλυσίδας της τάξεως των  $50 \text{ \AA}^2$ , ενώ η τιμή του παραπάνω παράγοντα φτάνει τα  $86 \text{ \AA}^2$  στην περίπτωση της λιγότερη οργανωμένης NBF-II (IRA2) περιοχής, καθιστώντας μεταβλητή την τοποθέτηση της ως προς την NBF-I περιοχή. Οι περιοχές NBF-I (NBD), NBF-II (IRA2) μοιράζονται την ίδια μορφή αναδίπλωσης (σχήμα 33) εκτός από την αντικατάσταση ενός μαιάνδρου στην περίπτωση της NBF-II (IRA2) για την α-έλικα που συνδέει τις β αλυσίδες 4 και 5, καθώς και την αντικατάσταση μιας αντιπαράλληλης για μία παράλληλη β αλυσίδα στη θέση 7 των β-πτυχωτών επιφανειών. Από την άλλη μεριά οι κεντρικές β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσιάζουν το χαρακτηριστικό πρότυπο της σύγκλισης των β-αλυσίδων που παρατηρείται στην F1 ATPάση (Abrahams et al., 1994) όπως και σε ποικιλία ATPασών, στις οποίες περιλαμβάνεται και η RecA recombinase. Μεγαλύτερη πάντως δομική ομοιότητα παρατηρείται με τις σε σειρά περιοχές που μοιάζουν με την F1, στις SF-I SF-II ελικάσες (Singleton et al., 2002; Caruthers et al., 2002; Velankar et al., 1999). Η μεγαλύτερη δομική ομοιότητα πάντως παρατηρείται με την MJ0660 (Story et al., 2001) και την eLF4A (Johnson et al., 1999; Caruthers et al., 2000) DEAD ελικάσες της SF-II, ενώ διαπιστώνεται και μεγάλη ομοιότητα με τις κινητικές περιοχές στην UvrB SF-II ελικάση και μόνο λίγο λιγότερη ομοιότητα με την SF-II ελικάση NS3 από τον ιό της ηπατίτιδας C και τις SF-I ελικάσες PcrA και Rep. Ο πρωταρχικός ρόλος της δέσμευσης του νουκλεοτιδίου στα ομόλογα μηχανοένζυμα είναι η ρύθμιση της γωνίας πακεταρίσματος μεταξύ των NBF-I και NBF-II (βλέπε Κεφάλαιο- Δέσμευση ATP από την SecA).

Η συντηρημένη περιοχή ATPάσης της SecA που παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τις DEAD κινητικές περιοχές των ελικασών, παρουσιάζει κατά αναλογία και χαρακτηριστικά με τις πιο μακρινές κινητικές περιοχές των πρωτεϊνών Κινεσίνης και Δυνεΐνης. (Kull et al., 1996). Τέτοιοι μοριακοί κινητήρες όπως οι παραπάνω, παράγουν ενέργεια που μεταφράζεται σε κίνηση, μετά από τη δέσμευση ATP και/ή την απελευθέρωση ADP και Pi. Η δυναμική ενέργεια σ' αυτούς τους μοριακούς κινητήρες προκύπτει από την μετακίνηση (συνήθως



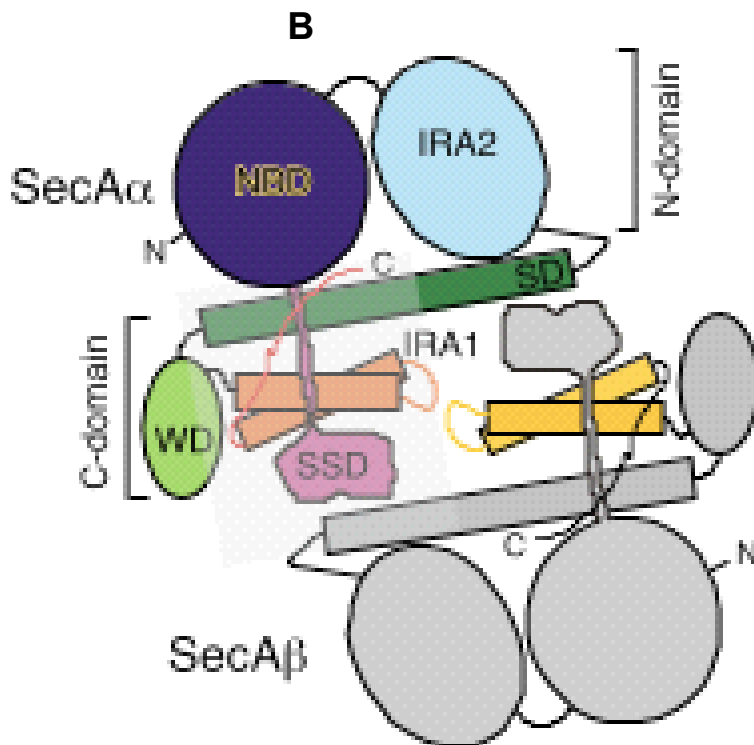
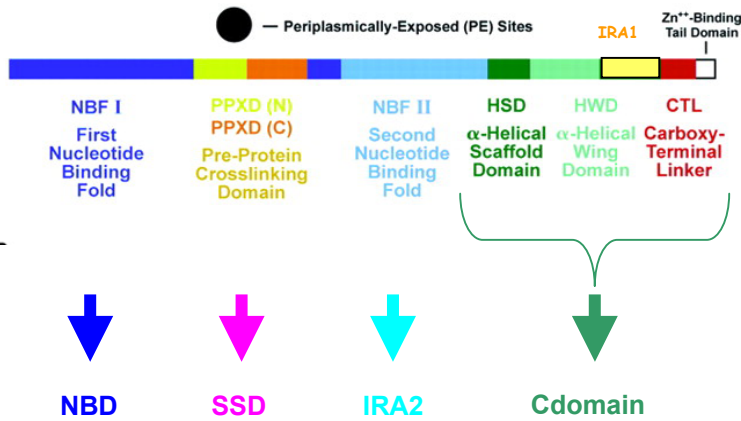
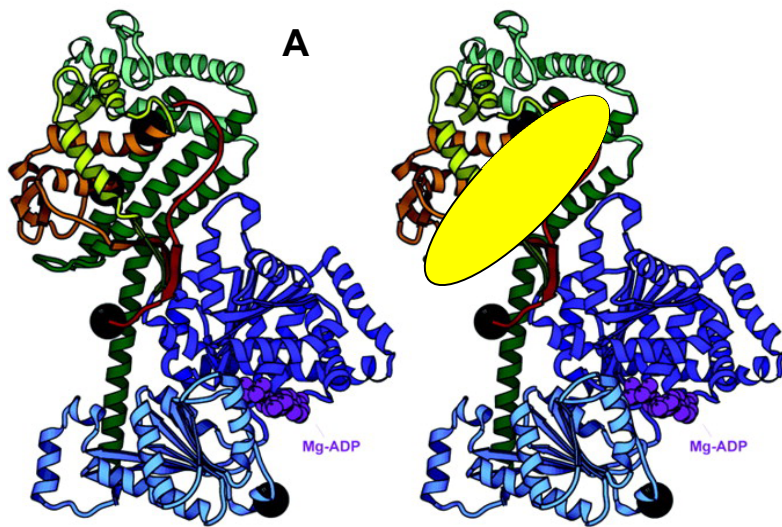


περιστροφή) δύο αντιπαρατιθέμενων περιοχών αλληλεπίδρασης νουκλεοτιδίου της πρωτεΐνης, που επάγεται μετά από ειδικές αλληλεπιδράσεις με το ATP οπότε και αποκτιέται τελικά η διαμόρφωση “ανοιχτού διακόπτη”. Από την άλλη μεριά η υδρόλυση του ATP διεγείρει αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης προς την αντίθετη κατεύθυνση, λόγω της απώλειας των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης και του γ-

Σχήμα 33: Hunt et al., 2002. Κινητικές περιοχές SecA και ελικασών. Στην πρώτη σειρά γίνεται σύγκριση των σε σειρά κινητικών περιοχών της SecA με τις αντίστοιχες περιοχές δύο δομικά σχετικών ATP-εξαρτούμενων ελικασών στηριζόμενη σε στοίχιση ελαχίστων τετραγώνων της NBF-I (NBD) με την αντίστοιχη περιοχή της ελικάσης. Ανάλογα συγκρίνεται η δομή της PcrA με και χωρίς ATP. Ο πυρήνας δέσμευσης νουκλεοτιδίου της SecA απεικονίζεται με σκούρο μπλε χρώμα, με τις β-αλυσίδες που οδηγούν προς και από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος να χρωματίζονται κίτρινες, ενώ το δεσμευμένο Mg-ADP παρουσιάζεται με τη μορφή σφαιρών με μωβ χρώμα. Οι κινητικές περιοχές από τα σχετικά μηχανοζύγια απεικονίζονται με πράσινο ή κόκκινο χρώμα με το δεσμευμένο νουκλεοτίδιο όπου υπάρχει να χρωματίζεται κίτρινο. Στην κάτω σειρά παρουσιάζεται μία ισοδύναμη σύγκριση των σε σειρά κινητικών περιοχών της SecA με τις αντίστοιχες περιοχές του α/β ετεροδιμερούς της F1 ATPάσης (στοίχιση ελαχίστων τετραγώνων της NBF-I (NBD) της SecA με την β υπομονάδα της F1) όπως και των διαμορφώσεων του παραπάνω ετεροδιμερούς απουσία νουκλεοτιδίου ή παρουσία δεσμευμένου Mg-ADP και Mg-AMPPNP (αντιπαραθέσεις των διαμορφώσεων του α/β ετεροδιμερούς της F1 παρουσία διαφόρων νουκλεοτιδίων σύμφωνα με την μέθοδο στοίχισης ελαχίστων τετραγώνων των β υπομονάδων τους). Και οι τρεις διαμορφώσεις που παρουσιάζονται εδώ έχουν παρατηρηθεί στην κρυσταλλική δομή ενός δακτυλίου F1 που συνίσταται από ένα τριμερές α/β ετεροδιμερών (Abrahams et al., 1994). Η σύγκριση της F1 χωρίς νουκλεοτίδιο (κόκκινη) με την F1 με Mg-ADP(πράσινη) φανερώνει την ύπαρξη ενός μεγάλου ανοίγματος στο ενεργό κέντρο της ATPάσης που τοποθετείται στη μεσόφαση μεταξύ των α και β υπομονάδων της F1. Αντίθετα η διαμόρφωση της F1 με Mg-ADP(πράσινη) με την διαμόρφωση της με Mg-AMPPNP (κόκκινη) είναι παρόμοιες. (Το Mg-AMPPNP χρωματίζεται κυανό)

φωσφόρου, οπότε και επαναευθυγραμμίζονται οι δύο περιοχές δέσμευσης του νουκλεοτιδίου στην διαμόρφωση του “κλειστού διακόπτη”. Η μετακίνηση αυτή συνδέεται με άλλα δομικά συστατικά της πρωτεΐνης που μεγεθύνουν την έκταση και αλλάζουν και την κατεύθυνση των κινήσεων του κινητήρα. Πράγματι πρωτεϊνικά δομικά στοιχεία που συνδέονται στις περιοχές κινητήρες, περιγράφονται σαν σύνδεσμοι, μοχλοί, και ενισχυτές, προκειμένου να εξηγηθεί το πως σχετικά απλές μετακινήσεις των δύο περιοχών δέσμευσης νουκλεοτιδίου μεταδίδουν την ενέργεια και την μετακίνηση τους για να δημιουργηθούν μεγάλες αλλαγές στη δομή της πρωτεΐνης.

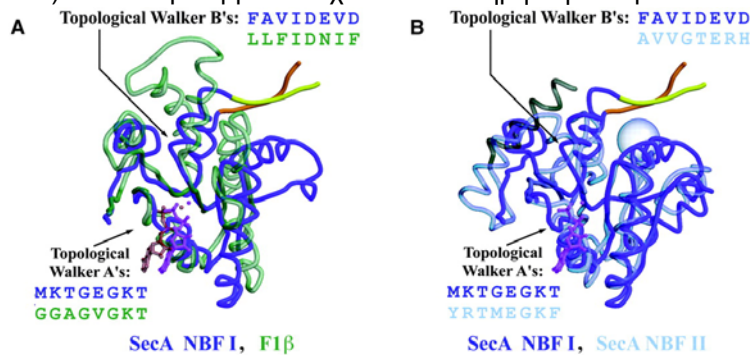
Ο DEAD κινητήρας όμως εκτός από τις NBD και IRA2 περιοχές συνίσταται και από μικρότερες υποπεριοχές. Συγκεκριμένα όπως θα αναφερθεί και στο κεφάλαιο της δέσμευσης πεπτιδίων σηματοδοτών και υποστρωμάτων στη SecA, η περιοχή NBD 1-420, αποτελείται από τουλάχιστον δύο ακόμα υποπεριοχές. Αυτές είναι η περιοχή δέσμευσης του ATP από την θέση 1 μέχρι τη θέση 263 (Sianidis et al., 2002) και η προτεινόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος από την θέση 267-340 (Kimura et al., 1991). Η περιοχή όμως 1-263, περιλαμβάνει τόσο την περιοχή 1-227 που αποτελεί τον ελάχιστο δομικό και λειτουργικό πυρήνα ATPάσης, όσο και την περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη SBD (Signal peptide Binding Domain; σχήμα 27) με εντελώς απαραίτητα αμινοξέα από την



θέση δέσμευσης 227 μέχρι την 263. Πιο συγκεκριμένα, απαραίτητα για την δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στη SecA, είναι τα αμινοξέα 220-240, τα οποία είτε εμπλέκονται άμεσα στη δέσμευση του, είτε η θέση δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη είναι μία σύνθετη επιφάνεια αποτελούμενη τόσο από τον πυρήνα NBD (1-227) όσο και από την 220-263 περιοχή. Η πρώτη υπόθεση είναι μάλλον αδύνατη αφού ούτε το τμήμα N1-227, ούτε το 220-329 (το ρ12 τμήμα που προκύπτει από πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης αμινοτελικών τμημάτων της N-περιοχής), αλλά ούτε και η SecA $\Delta$ 219-240 δεσμεύει πεπτιδίο σηματοδότη. Επομένως ευνοείται η δεύτερη υπόθεση. Πρέπει να σημειώσουμε ότι ένα εντυπωσιακό γνώρισμα της 1-420 NBD-περιοχής είναι μία μεγάλη ένθεση, από τη θέση ~220 μέχρι την θέση ~360 η οποία ορίζεται από τα DEAD μοτίβα II και III και περιλαμβάνει τα απαραίτητα αμινοξέα για την δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη, αλλά και την προτεινόμενη περιοχή δέσμευσης ολόκληρου του υποστρώματος (σχήμα 36). Η περιοχή 220-360

Σχήμα 34: (Hunt et al., 2002). Κρυσταλλική δομή της SecA από το *B. subtilis* χρωματισμένη ανάλογα με την οργάνωση των διαφόρων περιοχών. Α) Στερεοδιάγραμμα κορδέλας του πρωτομερούς της SecA, με δεσμευμένο Mg-ADP. Η μπάρα κάτω από την κρυσταλλική δομή απεικονίζει τις θέσεις των διαφόρων πρωτεϊνικών περιοχών στην γραμμική αλληλουχία της SecA και ορίζει τον κωδικό του χρώματος. Οι μαύρες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις θέσεις που εκτείνονται στο περίπλασμα στην SecA που δεσμεύεται στην SecYEG θέση στη μεμβράνη. Το δεσμευμένο Mg-ADP αναπαριστάται με τη μορφή σφαιρών με μοβ χρώμα. Οι περιοχές NBF-I (NBD) και NBF-II (IRA2) παρουσιάζονται με μπλε σκούρο ή ανοιχτό μπλε χρώμα; Η προτεινόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος χωρίζεται σε αμινοτελική [PPXD(N)] και καρβοξυτελική [PPXD(C)] περιοχή και χρωματίζεται με κίτρινο και πορτοκαλί αντίστοιχα, ή με ροζ (SSD) όπως φαίνεται στα αποτελέσματα και τη συζήτηση; Η α-ελικοειδής περιοχή "σκαλωσίας" (HSD) και η α-ελικοειδής περιοχή "φτερού" (HWD) αντιπροσωπεύονται με σκούρο και ανοιχτό πράσινο χρώμα αντίστοιχα, και η καρβοξυτελική περιοχή (CTL) είναι κόκκινη. Η C-περιοχή ολόκληρη βάφεται και πράσινη (βλέπε σχήμα 28). Στο Β) απεικονίζεται σχηματική αναπαράσταση της διμερούς SecA, με έμφαση στο πρωτομερές και τις υποπεριοχές του.

προβλέπεται ότι είναι δομημένη (40% α-έλικα και 17% β-πτυχωτή επιφάνεια), ενώ τα όρια της 220 και 360 ανατέμνονται και πρωτεολυτικά, και προκύπτει ένα σταθερό τμήμα 12 kDa (220-329) που περιλαμβάνει σχεδόν ολόκληρη την παραπάνω περιοχή (Baud et al., 2002).

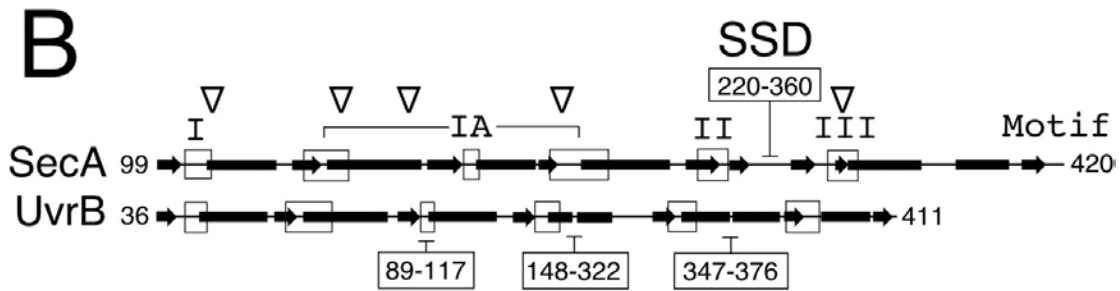


Επιπλέον η περιοχή 220-360 είναι περισσότερο ανθεκτική σε πρωτεόλυση όταν εντοπίζεται σ' όλο της το μήκος σε καρβοξυτελικά παράγωγα της N1-420 περιοχής. Επομένως η περιοχή 220-360 σχηματίζει ένα διακριτό δομικό στοιχείο εντός της N1-420 περιοχής, και μοιάζει με τις μη ομόλογες "περιοχές ειδικότητας υποστρώματος"

Σχήμα 35: (Hunt et al., 2002). Περιοχή δέσμευσης του νουκλεοτιδίου. Α) Σύγκριση της περιοχής NBF-I (NBD) της SecA (μπλε σκούρο) με την β υπομονάδα της μιτοχονδριακής ATPάσης των βοοειδών (διαφανές πράσινο), σύμφωνα με την στοίχιση των ελαχίστων τετραγώνων των κεντρικών β-πτυχωτών επιφανειών τους. Οι β-αλυσίδες που οδηγούν προς και από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος χρωματίζονται με κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα αντίστοιχα. Το δεσμευμένο Mg-ADP χρωματίζεται μωβ στη SecA και κόκκινο στην F1β. Β) Σύγκριση με αντίστοιχο τρόπο της NBF-I (NBD) (σκούρο μπλε) και της NBF-II (IRA2) περιοχής (διαφανές κυανό) της SecA. Η μεγάλη σφαίρα αντιπροσωπεύει την τοποθεσία της θέσης δέσμευσης του νουκλεοτιδίου σε σχέση με την NBF-II (IRA2) περιοχή της SecA (γειτονική στα μοτίβα ελικάσων V και VI στην NBF-II (IRA2)).

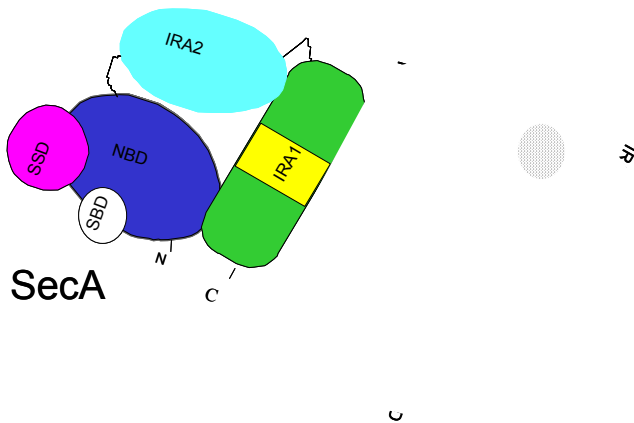
(substrate specificity domains) που αποτελούν διασπαρμένες αποφύσεις των DEAD πρωτεϊνών (π.χ στην UvrB τα αμινοξέα 89-117, 148-322, και 347-376; σχήμα 36) και προσδίδουν ειδικότητα στους DEAD κινητήρες για τα διάφορα υποστρώματα τους (Theis et al., 1999; Moolenaar et al., 2001)., σχηματίζονται Δηλαδή από δομικά ομόλογες περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίου που μοιάζουν με την RecA (Bird et al., 1998), απ' όπου ποικίλες περιοχές ειδικότητας υποστρώματος προεκβάλλουν (Theis et al., 1999; Moolenaar et al., 2001; Machius et al., 1999), οι οποίες όμως δεν επηρεάζουν την συνολική RecA αναδίπλωση, προκύπτουν άλλοι DEAD κινητήρες. Προτείνεται λοιπόν ότι το στοιχείο 220-360 στην SecA είναι μία τέτοια περιοχή, ειδικότητας υποστρώματος που επιτρέπει στην SecA να αναγνωρίζει υποστρώματα προπρωτεϊνών και γι' αυτό ονομάζεται SSD (substrate specificity domain). Σε απόλυτη συμφωνία με τα παραπάνω η περιοχή SSD είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη και την διαδικασία της μετατόπισης των προπρωτεϊνών (Baud et al., 2002), εμπλέκεται στην χημική διασύνδεση ολόκληρης της προπρωτεϊνης (Kimura et al., 1991), και περιέχει την Y326 που είναι πολύ σημαντική για την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα (Kourtz et al., 2000). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τόσο η αμινοτελική υποπεριοχή ATPάσης όσο και η παρεμβαλλόμενη γειτονική περιοχή ειδικότητας υποστρώματος αποτελούν διακριτά τμήματα της ευρύτερα δομημένης περιοχής N1-420.

Απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι τα DEAD μοτίβα της SecA είναι απαραίτητα για τη διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, υποδηλώνοντας συντηρημένα μηχανιστικά γνωρίσματα μεταξύ των διαφόρων κινητήρων ATPάσης με διαφορετικές ειδικότητες υποστρωμάτων. Πιθανά όταν η SecA δημιουργήθηκε νωρίς κατά την εξέλιξη των βακτηρίων όταν μία αρχέγονη RNA ελικάση απέκτησε μία σειρά περιοχών (SBD, SSD, C-περιοχή) που τις προσκόμισαν μία σειρά ιδιοτήτων (Economou, 1998, 2002) όπως το να αλληλεπιδρά εκτός από RNA και με αμινοακυλιωμένα πολυμερή (SBD, SSD; Baud et al., 2002; Kimura et al., 1991), ή να διμερίζεται (C-περιοχή; Hirano et al., 1996; σχήμα 37), να



Σχήμα 36:(Baud et al., 2002). Δομικά γνωρίσματα της αμινοτελικής περιοχής ATPάσης της SecA. Παριστάνεται ευθυγράμμιση της προβλεπόμενης δευτεροταγούς δομής της αμινοτελικής περιοχής της SecA (αμινοξέα 99-420) με τις αντίστοιχες περιοχές από την κρυσταλλική δομή της UvrB από το *Bacillus caldotenax*. Τα μοτίβα της υπεροικογένειας SF-2 των DEAD ελικασών είναι τα ακόλουθα: I (αα105-109), Ia (αα128-136/160-163/177-188), II (αα207-212), III (αα371-376). Τα μαύρα κουτιά αντιπροσωπεύουν α-έλικες ενώ τα βέλη β-πτυχωτές επιφάνειες. Οι μεταλλαγές καταστολής των ελαττωματικών πεπτιδίων σηματοδοτών (T111N, Y134S, E148K, N179Y, και A373V) σημειώνονται πάνω από την SecA με ανοιχτά βέλη. Τα αριθμημένα κουτιά πάνω από την SecA και κάτω από την UvrB αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες που δεν υφίστανται σ' άλλες DEAD πρωτεΐνες.

αλληλεπιδρά με όξινα φωσφολιπίδια (C-περιοχή; Breukink et al., 1995) και με SecB (C-περιοχή; Breukink et al., 1995; Fekkes et al., 1997) καθώς και να αλληλεπιδρά με την SecY (Snyders et al., 1997; Dapic et al., 2000), ή να εισέρχεται στη μεμβράνη στη SecYEG θέση (Economidou and Wickner, 1994; Eichler et al., 1997). Ανάλογα πρέπει να έχουν προκύψει και οι υπόλοιπες ελικασές που χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες μη ομόλογες προσθήκες αμινοξικών αλληλουχιών, σε συγκεκριμένες θέσεις περιοχών, στην δομή της ATPάσης οι



Σχήμα 37: (Karamanou et al., 1999). Η SecA διμερίζεται μέσω της C-περιοχής της.

οποίες τους προσδίδουν τις ιδιαίτερες λειτουργίες και τα διακριτά χαρακτηριστικά τους. Παρόλα τα παραπάνω η αρχέγονη ιδιότητα ξετυλίγματος RNA της SecA έχει διατηρηθεί (Park et al., 1997) αν και ο φυσιολογικός της ρόλος δεν είναι ακόμα γνωστός (Schmidt et al., 2001).

Όλες οι παραπάνω προτεινόμενες περιοχές της SecA από τους Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001; Baud et al., 2002 πιστοποιούνται με βάση τις κρυσταλλικές δομές της SecA απουσία και παρουσία

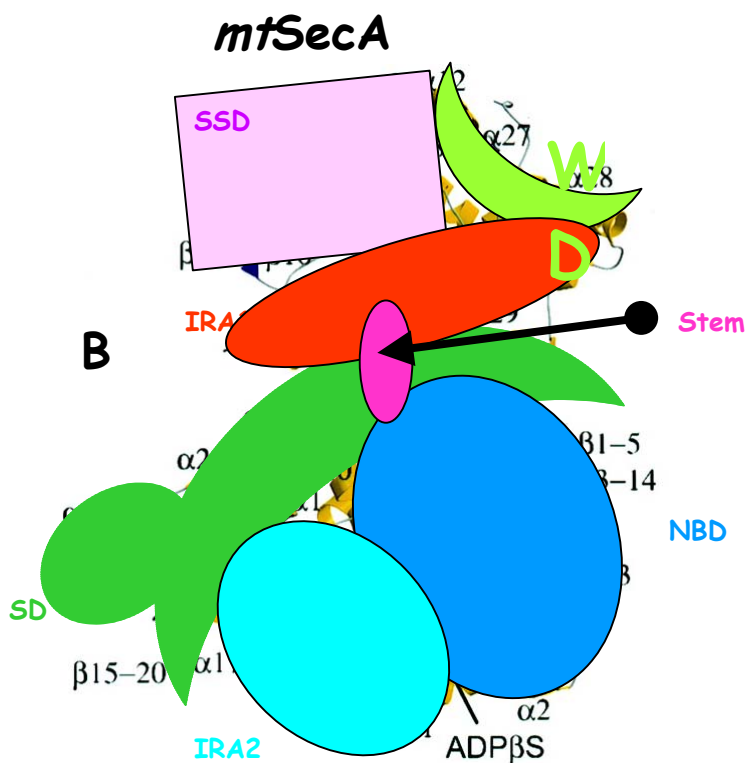
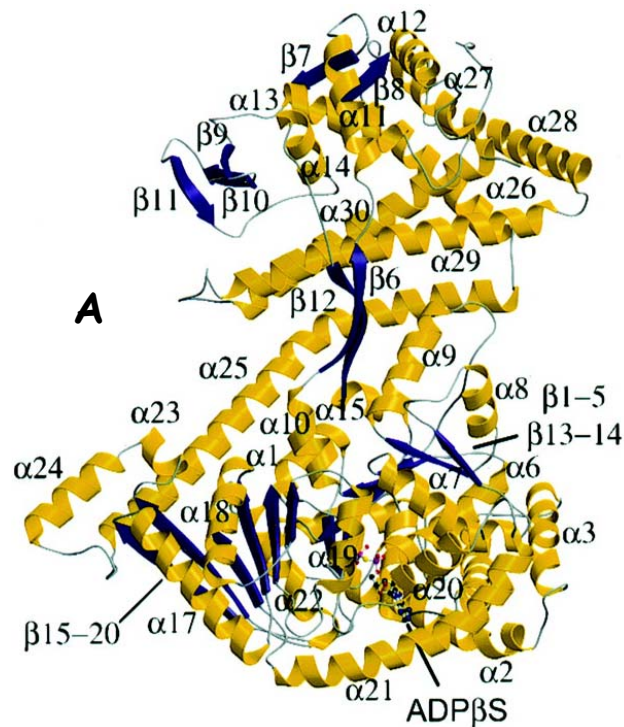
νουκλεοτιδίου τόσο από το βακτήριο *Bacillus subtilis* (Hunt et al., 2002; σχήμα 34) όσο και από το *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma et al., 2003; σχήμα 38) σε ανάλυση 3 και 2.7Å με και χωρίς Mg-ADP στην πρώτη περίπτωση και στα 2.6 και 2.8Å στη δεύτερη περίπτωση. Με βάση την κρυσταλλική δομή της διαλυτής *bsSecA* προκύπτει ένα ευρύτατο δίκτυο αλληλεπιδράσεων και τέσσερις διακριτές περιοχές (σχήμα 34). Αυτές είναι η θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου NBD (Nucleotide Binding Domain) ή NBF-I (Nucleotide Binding Fold-I) από τη θέση 1 μέχρι 220 και 356-395, (ή η αλληλουχία 1-222 και η αλληλουχία 376-415 στην *ecSecA*), η προτεινόμενη θέση δέσμευσης του υποστρώματος SSD (Substrate Specificity Domain) ή PPXD (PreProtein Xlinking Domain) από την θέση 221 μέχρι την 298 [SSD1 ή PPXD(N)] (ή η αλληλουχία 223-318 στην *ecSecA*) και από την θέση 299 μέχρι την 355 [SSD2 ή PPXD(C)] (ή η αλληλουχία 319-375 στην *ecSecA*), η ρυθμιστική περιοχή IRA2 (Intramolecular Regulator of ATP hydrolysis 2 ή για μερικούς η δεύτερη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου NBF-II (Nucleotide Binding Fold-II), αν και δεν υφίστανται επαρκή βιοχημικά δεδομένα που να την ορίζουν ως τέτοια, ενώ η κρυσταλλική δομή απομονώθηκε μ' ένα Mg-ADP από την θέση 396 μέχρι 570 (ή η αλληλουχία 416-619 στην *ecSecA*), η ελικοειδής δομή "σκαλωσιάς" HSD (Helical Scaffold Domain) από την θέση 571 μέχρι την θέση 620 (ή η

αλληλουχία 620-669 στην *ecSecA*), η ελικοειδής περιοχή “φτερού” HWD (Helical Wing Domain) από την θέση 621-703 (670-754 στην *ecSecA*), η IRA1 περιοχή (Intramolecular Regulator of ATP hydrolysis 1) από 704-777 (ή η αλληλουχία 755-828 στην *ecSecA*); και η καρβοξυτελική περιοχή CTL (Carboxy Terminal domain) από 778-841 (ή η αλληλουχία 829-901 στην *ecSecA*). Οι HSD, HWD, IRA1 και η CTL περιοχές, αποτελούν την C-περιοχή της SecA (σχήμα 28).

Πρέπει να σημειωθεί ότι στην κρυσταλλική δομή της *bsSecA*, 148 από τα 802 αμινοξέα (τα αμινοξέα από την θέση 803-841 δεν απαντούν στη δομή της *bsSecA* επειδή δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική οργάνωση) θεωρούνται ως προς την διεύθυνση τους αναξιόπιστα. Όλα αυτά απαντούν σε περιοχές με μεγάλους B παράγοντες ανθρακικής αλυσίδας, δηλαδή σε περιοχές με μεγάλη κινητικότητα όπως είναι η περιοχή SSD1 ή PPXD(N) που έχει μέση τιμή B παράγοντα  $129\text{\AA}^2$ , εν αντιθέση με την περιοχή NBD ή NBF-I περιοχή που διαθέτει μέση τιμή B παράγοντα  $50\text{\AA}^2$  και τα αμινοξέα της είναι πολύ καλά διευθετημένα.

Στην περίπτωση του βακτηρίου *M. tuberculosis* γίνεται κρυστάλλωση της πρωτεΐνης του ομόλογου γονιδίου *secA1* της SecA που είναι ισοδύναμο με το γονίδιο *secA* της *E.coli* (και απαραίτητο για τη ζωή του κυττάρου) και όχι της πρωτεΐνης του γονιδίου *secA2* (που επίσης εντοπίζεται στο γονιδίωμα, αλλά δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου. Από το γονίδιο της *secA1* έχουν αφαιρεθεί οι βάσεις που κωδικοποιούν για τα τελευταία 57 αμινοξέα, ενώ η παραγόμενη πρωτεΐνη *mtSecA* διαθέτει και μία αμινοτελική επέκταση 31 αμινοξέων από τον φορέα έκφρασης. Και τα δύο αυτά στοιχεία προσδίδουν μια πιο σταθερή πρωτεΐνη με αρκετά καλή δυνατότητα κρυστάλλωσης. Επειδή τα πρώτα 14 αμινοξέα της επέκτασης που προσδίδεται στην *mtSecA* από τον φορέα έκφρασης, όπως και τα αμινοξέα από το τμήμα 720-729 και από το τμήμα 836-892 δεν φαίνονται στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, η δομή της *mtSecA* περιλαμβάνει αναλυμένα 17 αμινοξέα από την αμινοτελική επέκταση, και 825 από τα 949 αμινοξέα της ώριμης περιοχής της. Η οργάνωση των περιοχών NBD (NBF-I) και IRA2 (NBF-II) στην περίπτωση της *mtSecA*, είναι αντίστοιχη με την οργάνωση των περιοχών αυτών στην *bsSecA* που μελετήθηκε προηγουμένως. Παρατηρείται ότι αντίθετα με την υπόθεση ότι η προτεινόμενη θέση δέσμευσης του υποστρώματος τοποθετείται μετά την περιοχή NBD (NBF-I) (Mitchell and Oliver, 1993), η SSD (PPXD) εισέρχεται μεταξύ των β-αλυσίδων 5 και 6 της NBD (NBF-I). Μολονότι η περιοχή αυτή δεν παρουσιάζει παρουσία παρά φτωχή ομολογία με άλλες αναλυμένες πρωτεΐνες και μολονότι πέρα από τα πειράματα χημικής διασύνδεσης, επικαλυπτόμενων τμημάτων της SecA με μοντέλο προπρωτεΐνης, που την προσδιορίζουν σαν περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (Kimura et al., 1991), δεν υπάρχουν επιπρόσθετα βιοχημικά πειράματα που να υποστηρίζουν εκ νέου την παραπάνω υπόθεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε γειτονική τοπολογικά θέση στην περιοχή NBD (NBF-I) πολλών SF-I και SF-II ελικασών έχουν παρεμβληθεί περιοχές δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων (υποστρώματα στις ελικάσες) (Caruthers et al., 2002). Τέλος η περιοχή SSD (PPXD) διαιρείται σε δύο υποπεριοχές, όπως είδαμε προηγουμένως την SSD1 [PPXD(N)] και την SSD2 [PPXD(C)] που δεν είναι αυστηρά διευθετημένες στο χώρο, καθώς διαθέτουν μέσους B παράγοντες 129 και  $87\text{\AA}$  αντίστοιχα. Οι δύο β-αλυσίδες μία της SSD1 [PPXD(N)] και η άλλη της SSD2 [PPXD(C)] που οδηγούν αντίστοιχα έξω και μέσα από την NBD (NBF-I) περιοχή σχηματίζουν μία β-πτυχωτή επιφάνεια που ονομάζεται στέλεχος (stem) (σχήμα 34; οι β-αλυσίδες β-PPXD-7(C) και β-PPXD-1(N) στην *bsSecA*; και σχήμα 38; Οι β-αλυσίδες β6 και β12 στην *mtSecA*).

Όσον αφορά την C-περιοχή της *bsSecA* αυτή συνίσταται κυρίως από α-ελικοειδείς περιοχές. Η πρώτη ονομάζεται α-ελικοειδής περιοχή “σκαλωσίας” HSD και αποτελεί μία μακριά α-έλικα 49 αμινοξέων με μικρό μέσο B παράγοντα (ικανοποιητικά διευθετημένη δομή στο χώρο), που εκτείνεται σ’ όλο το μήκος της SecA. Η μία επιφάνεια αυτής της μακριάς έλικας αλληλεπιδρά με τις περιοχές NBD (NBF-I) και IRA2 (NBF-II) και η άλλη γειτνιάζει τόσο με την IRA1 περιοχή όσο και με το στέλεχος της SSD (PPXD) περιοχής (σχήμα 34, 38 και αποτελέσματα-συζήτηση). Ακολουθεί η α-ελικοειδής περιοχή φτερού HWD που συνδέεται ασθενώς με τον υπόλοιπο πυρήνα της SecA, λόγω του υψηλού μέσου B παράγοντα που διαθέτει (σχήμα 34 και 38). Εξάλλου διαπιστώθηκε (Holm and Sander, 1995) ότι παρουσιάζει ασθενή αλλά σημαντική δομική ομοιότητα με μία πρωτεΐνη φορέα ακυλίου που εμπλέκεται στην πολυκετιδική σύνθεση. Στη συνέχεια ακολουθεί η IRA1 περιοχή που περιλαμβάνει δύο έλικες και μία ενδιάμεση λούπα οι οποίες μαζί με την μακριά α-έλικα της HSD συνιστούν τρεις αντιπαράλληλες α-έλικες με κάποια δομική ομοιότητα με α-ελικοειδή περιλειγμένα σπειράματα, που είναι τόσο καλά διαταγμένα όπως στην περιοχή NBD (NBF-I) (σχήμα 34 και 38). Η δεύτερη έλικα της περιοχής IRA1 δεσμεύεται στην SSD (PPXD) περιοχή, η οποία έτσι



διατηρεί τη θέση της ως προς τις περιοχές NBD (NBF-I) και IRA2 (NBF-II) (βλέπε σχήμα 34 και 38 και συζήτηση-αποτελέσματα). Σημειώνεται ότι οι περιοχές HSD, HWD και η IRA1 σχηματίζουν το ανθεκτικό σε πρωτεάση τμήμα των 30 kDa που προκύπτει όταν η SecA αλληλεπιδρά στις μεμβράνες με την SecYEG (Economou et al., 1994; van der Does et al., 1996; Eichler and Wickner, 1997). Τα τελευταία 22 αμινοξέα της *bsSecA* στα οποία απαντούν πολλές κυστεΐνες και τα οποία σχηματίζουν μία περιοχή δέσμωσης Zn που αλληλεπιδρά με SecB και φωσφολιπίδια (κεφάλαιο-Αλληλεπίδρασης SecA με SecB και SecA με λιπίδια), μπορεί να μην απαντούνται στη δομή (τα αμινοξέα από την θέση 803- 841 δεν απαντούνται στη δομή της *bsSecA*, καθώς δεν παρουσιάζουν αυστηρή οργάνωση), αλλά, 25 αμινοξέα της CTL που την συνδέουν με την IRA1 περιοχή παρουσιάζονται οργανωμένα στη δομή της *bsSecA* και παρατηρείται ότι τμήμα τους σχηματίζει μία β-αλυσίδα που δεσμεύεται στο ένα άκρο της μικρής αντιπαράλληλης β-πτυχωτής επιφάνειας που συνίσταται από τις δύο β-αλυσίδες που συνδέουν την NBD (NBF-I) περιοχή με την SSD (PPXD), δηλαδή από την περιοχή του στελέχους (stem; σχήμα 34 και 38).

Στο σχήμα 34 σημειώνονται επίσης με τη μορφή μαύρων σφαιρών οι ισοδύναμες θέσεις στην *bsSecA* με αυτές που έχουν βρεθεί ότι είναι εκτεθειμένες στο περίπλασμα στην μεμβρανοσυνδεόμενη SecA, PE (Periplasmically Exposed sites). Έτσι με βάση τοπολογικά πειράματα χαρτογράφησης, είτε με χημική σήμανση σε κύτταρα

Σχήμα 38: (Sharma et al., 2003). Κρυσταλλική δομή της ATPάσης της SecA από το *M. Tuberculosis*. A) Η στερεοαναπαράσταση του δεσμευμένου με ADPβS-πρωτομερούς χρωματίζεται ανάλογα με την δευτεροταγή δομή είτε με κίτρινο χρώμα στην περίπτωση α-έλικας, είτε με μπλε στην περίπτωση της β-πτυχωτής επιφάνειας. B) Διαίρεση σε περιοχές της παραπάνω δομής, οι οποίες χρωματίζονται όπως στην *bsSecA*.

διαπερατά ως προς την εξωτερική τους μεμβράνη σε ειδικό ανιχνευτή, ο οποίος όμως είναι αδιαπέρατος από την εσωτερική μεμβράνη, είτε σε συνδυασμό με μεταλλαξογένεση σάρωσης με κυστεΐνες σε μη ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια από στελέχη που συνθέτουν SecA με μοναδικές κυστεΐνες όπου πραγματοποιείται σήμανση με μεμβρανοδιαπερατο σουλφιδρυλικό ανιχνευτή, οι van der Does et al., 1996; Ramamurthy and Oliver, 1997; Eichler and Wickner, 1998, ανίχνευσαν τις παραπάνω PE θέσεις. Μάλιστα οι van der Does et al., 1996 διαπίστωσαν ότι η SecA εισέρχεται στην μεμβράνη και εκθέτει την καρβοξυτελική περιοχή της στο περίπλασμα, και όχι κάτω από συνθήκες μετατόπισης πρωτεϊνών από την μεμβράνη, αλλά υπερέκφρασης της SecYEG, όπως έχει δείχθει και από τους Kim et al., 1994. Σημειώνεται πάντως ότι δεν είναι ακόμη γνωστή η σχέση της εισερχόμενης στη μεμβράνη SecA παρουσία μόνο λιπιδίων, της εισερχόμενης στη μεμβράνη SecA στην SecYEG θέση που ειπώθηκε προηγουμένως, και της SecA που εισέρχεται στη μεμβράνη κατά την μεταφορά των πρωτεϊνών (Economou and Wickner, 1994). Εν συνεχεία οι Ramamurthy and Oliver, 1997 με χρησιμοποίηση κατευθυνόμενης σουλφιδρυλικής σήμανσης, πρωτεόλυσης και διαφόρων πεπτιδικών τμημάτων της SecA, διαπίστωσαν ότι αμινοτελικές, κεντρικές και καρβοξυτελικές περιοχές της SecA εισέρχονται στη μεμβράνη με τα αμινοξέα 300/358, 530 και 858,895 να εκτίθενται στο περίπλασμα. Μάλιστα διαπίστωσαν ότι τα αμινοξέα 300 και 350 της SSD (PPXD) σημαίνονται μόνο παρουσία ATP, που υποδηλώνει ότι μόνο τότε η προτεινόμενη περιοχή του υποστρώματος αποκτά κατάλληλη διαμόρφωση για να εισέλθει στη μεμβράνη. Εξάλλου σύμφωνα με τους Eichler and Wickner, 1998 η περιοχή της SecA που εκτίθεται στο περίπλασμα εντοπίζεται τόσο κοντά στη θέση 300 στην *E.coli*, σε μεμβράνες αγρίου τύπου όσο και στην καρβοξυτελική περιοχή, αλλά μόνο σε μεμβράνες με αυξημένα ποσά SecYEG. Η πιο έντονα σημασμένη PE θέση στην *ecSecA* εντοπίζεται σε μία παρεμβαλλόμενη περιοχή στην IRA2 (NBF-II) που δεν υπάρχει στην *bsSecA* (σχήμα 62). Η θέση αυτή στην κρυσταλλική δομή εντοπίζεται στην επιφάνεια κοντά στη θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου (σχήμα 34). Οι άλλες PE θέσεις εντοπίζονται είτε στην SSD (PPXD), είτε στην καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης (σχήμα 34). Μία από αυτές τις θέσεις εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της SecA στην περιοχή της θέσεως δέσμευσης ψευδαργύρου, που είναι όμως απύσχα από τη δομή της *bsSecA*, ενώ μία άλλη PE θέση, εντοπίζεται στο τέλος της καρβοξυτελικής δομής που είναι διαταγμένη στην κρυσταλλική δομή και εντοπίζεται στο κέντρο του μορίου (σχήμα 34). Μολονότι οι PE θέσεις διαχωρίζονται σε απόσταση μέχρι και 80Å στο πρωτομερές, εντούτοις συγκεντρώνονται στην μία επιφάνεια της SecA (σχήμα 34), που προτείνεται ότι μπορεί κατά συνέπεια να βλέπει την SecYEG θέση στη μεμβράνη. Εξάλλου οι πιο συντηρημένες επιφάνειες στο πρωτομερές εντοπίζονται γειτονικά των PE θέσεων στην NBD (NBF-I), IRA2 (NBF-II) και στην HSD περιοχή. Επιπλέον πειράματα δέσμευσης *in vitro* δείχνουν ότι επίτοποι τόσο στην NBD (NBF-I) και/ή στην SSD (PPXD) περιοχή αλληλεπιδρούν με την SecYEG (Dapic and Oliver, 2000). Παρόλα αυτά τμήματα τόσο της HSD, HWD, IRA1 και της CTL περιοχής μπορούν επίσης να αλληλεπιδρούν με την SecYEG, αφού σχηματίζουν ένα καρβοξυτελικό τμήμα 30kDa ανθεκτικό σε πρωτεάση, με την δέσμευση της SecA στη SecYEG (Economou and Wickner, 1994); Eichler and Wickner, 1997; Van der Does et al., 1998), ενώ το ίδιο διαφαίνεται και από πειράματα σύπωσης υποκαταστατών (Snyders et al., 1997). Σημειώνουμε ότι καμιά από τις PE θέσεις στην SSD (PPXD) περιοχή δεν εκτίθεται στο διαλύτη στην κρυσταλλική δομή (αλλά κάτι τέτοιο πρέπει να συμβαίνει όταν η SecA έρχεται στη μεμβράνη) σε συμφωνία με την ανικανότητα τους να σημανθούν από τους Ramamurthy and Oliver, 1997. Μία απ' αυτές τις θέσεις, S330 στην *bsSecA*, εντοπίζεται σε μια αυστηρά συντηρημένη περιοχή που πακετάρεται πάνω στην επιφάνεια της IRA1 περιοχής (σε περιοχή αξιόπιστης ηλεκτρονικής πυκνότητας; Σχήμα 34). Μόνο αν ανοίξει η μεσόφαση μεταξύ της SSD (PPXD) και της IRA1 περιοχής, όταν η SecA αλληλεπιδράσει με την SecYEG, θα εκτεθεί η παραπάνω PE θέση στο περίπλασμα (βλέπε και συζήτηση-αποτελέσματα).

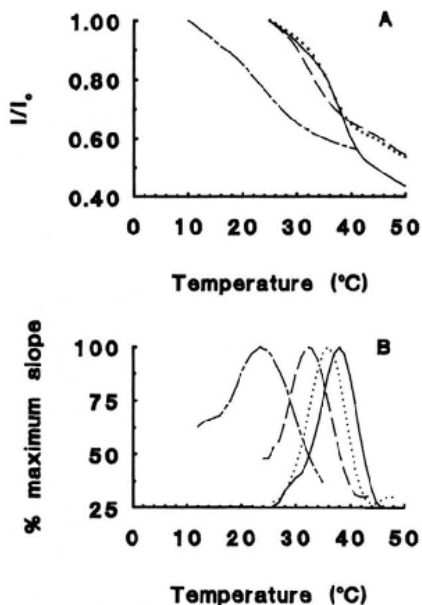
Τέλος υπογραμμίζεται ότι μπορεί οι κινητικές περιοχές της SecA, οι πρωτεΐνες που συνιστούν τον πόρο της SecYEG και τα πεπτιδικά σηματοδότες των νεοσυντιθέμενων πεπτιδίων να είναι πολύ συντηρημένα στα βακτήρια, κάποια άλλα στοιχεία όμως της SecA-εξαρτώμενης μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες, είναι λιγότερο συντηρημένα. Έτσι σε μερικά Gram θετικά βακτήρια όπως στο *Mycobacterium tuberculosis* εντοπίζονται δύο αντίγραφα του γονιδίου της SecA που έχουν διακριτούς ρόλους και ειδικότητες (Braunstein et al., 2001). Στο *Mycobacterium tuberculosis* το γονίδιο που είναι απαραίτητο για την επιβίωση του κυττάρου *secA1* είναι το ομόλογο γονίδιο που είναι ισοδύναμο με το γονίδιο *secA* της *E.coli*, ενώ το *secA2*, δεν είναι απαραίτητο για τη ζωή, και χρειάζεται μόνο για να αποφέρει τοξικότητα.





### 1.2.Z.I. Διερεύνηση των αλλαγών της διαμόρφωσης της SecA πρωτεΐνης παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες.

Προκειμένου να διερευνηθεί το κυκλικό μοντέλο δράσης της SecA (για το οποίο θα μιλήσουμε αναλυτικότερα σε επόμενο Κεφάλαιο; Economidou and Wickner, 1994, Economidou et al., 1995), που εξηγεί την μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, είναι ανάγκη να διερευνηθεί η διαμόρφωση της πρωτεΐνης παρουσία και απουσία των διαφόρων υποκαταστατών που μετέχουν στην διαδικασία της μετατόπισης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η πρωτεόλυση σαν μέσο μελέτης της διαμόρφωσης της SecA, και βρέθηκε ότι αυτή αλλάζει, παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της μετατόπισης με τους οποίους κατά συνέπεια και αντιδρά (Shinkai et al., 1991). Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η SecA σταθεροποιείται (παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πρωτεάση) παρουσία των νουκλεοτιδίων ATP, ADP και ATPγS, ενώ αποσταθεροποιείται παρουσία AMP-PNP, όξινων φωσφολιπιδίων, ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων και προπρωτεϊνών (παρουσιάζει ευαισθησία σε πρωτεάση). Πιο συγκεκριμένα οι (Ulbrandt et al., 1992) μελετώντας την αλληλεπίδραση της SecA με λιπίδια βρήκαν ότι η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται με ανιονικά φωσφολιπίδια σ' όλες τις θερμοκρασίες (στις πιο αυξημένες με μεγαλύτερη απόδοση), αλλά με οποιαδήποτε είδος λιπιδίων μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον βρήκαν ότι η SecA εισχωρεί σε κυστίδια με ανιονικά φωσφολιπίδια σ' όλες τις θερμοκρασίες, (στις πιο αυξημένες με μεγαλύτερη απόδοση) αλλά με οποιαδήποτε είδος λιπιδίων μόνο σε υψηλές θερμοκρασίες. Υπέθεσαν λοιπόν ότι η SecA πρέπει να αλλάζει τη διαμόρφωση της σε υψηλή θερμοκρασία έτσι ώστε να διευκολύνει τόσο την αλληλεπίδραση όσο και την εισχώρηση στη μεμβράνη, ακόμα και απουσία ανιονικών φωσφολιπιδίων. Πράγματι πραγματοποιώντας θερμική τιτλοδότηση της έντασης του φθορισμού της SecA (σχήμα 39) διαπίστωσαν οξεία μείωση του



Σχήμα 39: (Ulbrandt et al., 1992). Φθορισμός της SecA έναντι της θερμοκρασίας. Α) Ο φθορισμός της SecA σε συνάρτηση με την θερμοκρασία μετρήθηκε τόσο για την SecA στο διάλυμα (-), όσο και για την SecA παρουσία λιπιδικών κυστιδίων DOPC (...), DOPC/DOPG (w/w) σε αναλογία (19:1) (- -), και DOPC/DOPG (w/w) σε αναλογία (4:1) (- - -). Οι εντάσεις του φθορισμού μετρώνται σε μήκος κύματος διέγερσης 280nm και μήκος εκπομπής 330nm, ενώ η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 0.5°C/min. Στο διάγραμμα δίνεται η σχετική τιμή της έντασης του φθορισμού ως προς την ένταση στην αρχική θερμοκρασία (I/I<sub>0</sub>). Β) Διάγραμμα της πρώτης παραγώγου της έντασης φθορισμού των παραπάνω καμπύλων, εκφρασμένης σαν ποσοστό της μέγιστης κλίσης της SecA, είτε μόνης της, είτε παρουσία των παραπάνω ειδών λιπιδικών κυστιδίων.

φθορισμού της σε υψηλή θερμοκρασία που πρέπει να αντιπροσωπεύει μία συνεργατική αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης με σημείο τήξεως  $T_m=38-39^{\circ}\text{C}$ . Το γεγονός ότι αυτή η μετάπτωση επάγεται σε υψηλή θερμοκρασία προβλέπει ότι

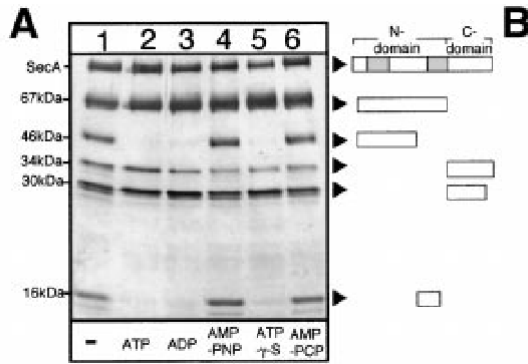
κάποιο γεγονός αποδιάταξης λαμβάνει χώρα. Πράγματι με διαφορετική θερμιδομετρία σάρωσης και αύξηση της ενθαλπίας στην ίδια περιοχή θερμοκρασιών που παρατηρείται η παραπάνω αλλαγή στη διαμόρφωση, έγινε αντιστοιχία αυτής της διαμόρφωσης με μερικό ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης (ενδόθερμη μετάπτωση), ενώ το ίδιο φαίνεται ότι προτείνει και η αύξηση της πρωτεόλυσης της SecA σε υψηλή θερμοκρασία. Το σίγουρο είναι ότι αυτή η μετάπτωση δεν συνιστά κατάσταση πλήρους αποδιάταξης της SecA, αφού το φάσμα από τον κυκλικό διχρωισμό της, CD (Circular dichroism), σε αυξημένη θερμοκρασία, απλά υποδηλώνει μείωση της α-ελικοειδούς δομής και αύξηση της β-πτυχωτής επιφάνειας, αλλά όχι τυχαία περιέλιξη, ενώ σε αυξημένη θερμοκρασία η SecA διαθέτει και δραστηριότητα ATPάσης. Συνεπώς η SecA αποκτά σε υψηλή θερμοκρασία διαμόρφωση λιωμένης σφαιρικής κατάστασης (molten globule state) που προφανώς διευκολύνει την είσοδο της στη μεμβράνη και στην οποία θα αναφερθούμε παρακάτω. Επιπλέον οι Ulbrandt et al., 1992 διαπίστωσαν ότι η παραπάνω διαμόρφωση επάγεται από ανιονικά φωσφολιπίδια, αφού το σημείο τήξεως της ενδόθερμης μετάπτωσης ελαττώνεται παρουσία τους (σχήμα 39), το φάσμα από το CD της SecA

παρουσία των ανιονικών φωσφολιπιδίων ταυτίζεται με αυτό στους 45°C, και τέλος η πρωτεόλυση αυξάνεται παρουσία λιπιδίων όπως συμβαίνει σε υψηλή θερμοκρασία. Προτείνεται λοιπόν ότι η ενδόθερμη μετάπτωση στην οποία υπόκειται η SecA σε υψηλή θερμοκρασία σταθεροποιείται από φωσφολιπίδια, και έτσι προετοιμάζεται η είσοδος της στη μεμβράνη. Μάλιστα βρέθηκε ότι οι μεταλλαγμένες SecA που καταστέλλουν την ανικανότητα μεταλλαγμένων πεπτιδίων σηματοδοτών να ξεκινούν την διαδικασία της μετατόπισης πρωτεϊνών από μεμβράνες (PriD μεταλλαγές), ευνοούν την παραπάνω ενδόθερμη μετάπτωση της SecA. Το σημείο τήξεως των PriD μεταλλαγών ελαττώνεται με πιλοδότηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών, ενώ παράλληλα αυξάνεται η ικανότητα δέσμευσης τους στη μεμβράνη στη SecYEG θέση, αλλά και η ικανότητα υδρόλυσης ATP (Schmidt et al., 2000)

Επειδή η SecA εντοπίζεται μισή στο κυτταροπλασμα και μισή στη μεμβράνη (Cabelli et al., 1991), διαπερνά τη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Ulbrandt et al., 1992), και σύμφωνα με το κυκλικό μοντέλο δράσης της (Economou and Wickner, 1994; Economou et al., 1995) έχουμε διαδοχικές εισαγωγές και εξαγωγές της από τη μεμβράνη στην θέση της SecYEG, μελέτηθηκε η ικανότητα της να εισχωρεί σε μεμβράνες. Μία πρωτεΐνη όμως, προκειμένου να έχει αυτή την ιδιότητα, πρέπει να είναι μερικώς ξεδιπλωμένη, να έχει αποκτήσει δηλαδή την «λιωμένη σφαιρική κατάσταση (molten globule state)» (Ptitsyn et al., 1995). Αυτή δεν είναι τίποτε άλλο από μία ενδιάμεση κατάσταση μεταξύ αναδιπλωμένης και αποδιαταγμένης δομής, όπου διατηρείται η δευτεροταγής αλλά όχι η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης ενώ υπάρχει και υδρόφοβος πυρήνας. Η κατάσταση αυτή δεν παρατηρείται υπό φυσιολογικές συνθήκες στις διάφορες πρωτεΐνες, αλλά μόνο σε χαμηλό p.H. Μα η SecA είναι ήδη μερικώς ξεδιπλωμένη στη θερμοκρασία του κυττάρου (37°C), αφού το σημείο τήξεως Tm από την καμπύλη φθορισμού είναι 38°C όπως είδαμε προηγουμένως (σχήμα 39). Μάλιστα φαίνεται ότι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, χάνεται πρώτα η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης και μετά η δευτεροταγής, αφού το Tm από το CD είναι λίγο μεγαλύτερο και πλησιάζει τους 40°C (Song et al., 1997). Η SecA λοιπόν μπορεί να εισέρχεται στη μεμβράνη του βακτηρίου στην θερμοκρασία του κυττάρου.

Όταν όμως η SecA εισέρχεται στη μεμβράνη σύμφωνα με το κυκλικό μοντέλο των Economou and Wickner, 1994, προστατεύεται από πρωτεόλυση τόσο η άμινο (N-domain), όσο και η καρβοξυτελική περιοχή της (C-domain) (Economou et al., 1994, Economou et al., 1995, Eichler et al., 1997). Κατά συνέπεια η SecA πρέπει να υπόκειται σε μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση της κατά την εισαγωγή της στη μεμβράνη, και επομένως η μελέτη του μονοπατιού αναδίπλωσης της είναι απαραίτητη για την κατανόηση της λειτουργίας της *in vivo*. Συγκεκριμένα παρακολουθώντας το ποσοστό αποδιάταξης της SecA σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της ουρίας στο διάλυμα (πορεία αποδιάταξης ή επαναδιάταξης της SecA με αυξανόμενες ή μειούμενες συγκεντρώσεις ουρίας αντίστοιχα) μέσω του φθορισμού των τρυπτοφανών ή με το φάσμα από το CD (Doyle et al., 2000), διαπιστώνεται ότι η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται όχι μόνο μέσω ενός σταθερού ενδιάμεσου (molten globule state), όπως ειπώθηκε προηγουμένως (Song et al., 1997), αλλά και ενός διμερούς ενδιάμεσου. Αυτό συμβαίνει διότι το ποσοστό αποδιάταξης σταθεροποιείται σε υψηλότερη τιμή με μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης (ενδεικτική συμπεριφορά διμερούς). Έτσι η SecA θεωρείται ότι αναδιπλώνεται μέσω ενός μονοπατιού τριών σταδίων:  $N_2 \leftrightarrow I_2 \leftrightarrow 2U$  ( Διμερής SecA  $\leftrightarrow$  διμερές ενδιάμεσο  $\leftrightarrow$  2 μονομερή). Αξίζει να θυμηθούμε ότι αυτό το ενδιάμεσο σταθεροποιείται από ανιονικά φωσφολιπίδια κατά την διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες και έτσι εξηγείται το πως διευκολύνεται η είσοδος της SecA στη μεμβράνη.

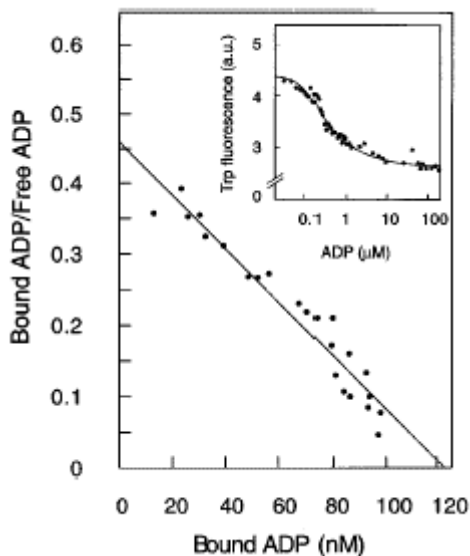
Σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης της SecA όμως θα προκύψουν και από την μελέτη της διαμόρφωσης της SecA παρουσία νουκλεοτιδίων, αφού σύμφωνα με το κυκλικό μοντέλλο της SecA η εισαγωγή και η εξαγωγή από την μεμβράνη ρυθμίζεται από την δέσμευση και υδρόλυση ATP και επομένως από τις διαφορετικές αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA που προκαλούν τα διάφορα νουκλεοτίδια. Είδαμε προηγουμένως με τη χρήση περιοριστικής πρωτεόλυσης, ότι η αλληλεπίδραση της SecA με τα διάφορα νουκλεοτίδια προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της. Εν συνεχεία πάλι με περιοριστική πρωτεόλυση οι den Blaauwen et al., 1996 εντόπισαν διαφορετικές αλλαγές στο πρότυπο πρωτεόλυσης της SecA με ADP και με AMP-PNP. Συγκεκριμένα ανίχνευσαν με ADP δύο πρωτεολυτικά κομμάτια ~25 και 35 kDa τα οποία ανιχνεύονται και παρουσία μεμβρανών απουσία ADP και αντιστοιχούν κατά συνέπεια σε λειτουργικές αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Αντίθετα οι αλλαγές αυτές δεν ανιχνεύονται με AMP-PNP. Πιο εμπειριστωμένες μελέτες πάλι με περιοριστική πρωτεόλυση απουσία και παρουσία νουκλεοτιδίων, από τους



Σχήμα 40: (Karamanou et al., 1999). Σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της SecA παρουσία ADP. Α) Περιοριστική θρυψινόλυση της SecA παρουσία διαφόρων νουκλεοτιδίων. Β) Διαγραμματική απεικόνιση των διαφόρων πρωτεολυτικών τμημάτων της SecA.

(46kDa) και 420-560 (15kDa) πρωτεολυτικά κομμάτια μετατρέπονται σε 1-360 (40kDa) και 361-586 (25kDa) που πιθανά αντιστοιχούν στα 25 και 35kDa πεπτίδια που βρήκαν με πρωτεόλυση οι den Blaauwen et al., 1996.

Παρακολουθώντας ακολούθως τις αλλαγές αυτές στη διαμόρφωση της SecA μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών της, οι den Blaauwen et al., 1996, διαπίστωσαν ότι πράγματι η SecA υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωση της παρουσία ADP, αφού το περιβάλλον των τρυπτοφανών της αλλάζει, καθώς ο φθορισμός τους ελαττώνεται (σχήμα 41). Συγκεκριμένα διαπίστωσαν εκτεταμένες αλλαγές στη SecA πρωτεΐνη αφού



Σχήμα 41: (den Blaauwen et al., 1996). Φθορισμός τρυπτοφανών στην *E.coli*, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων ADP. Απεικόνιση του Scatchard plot, από το οποίο προκύπτει συγγένεια,  $K_D=0.3\mu\text{M}$  για το ADP. Στο μικρότερο διάγραμμα απεικονίζεται η μείωση του φθορισμού των τρυπτοφανών σαν ποσοστό του φθορισμού τους απουσία ADP, σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του ADP σε λογαριθμική κλίμακα.

Karamanou et al., 1999, έδειξαν ότι το πρωτεολυτικό προφίλ της SecA είναι το ίδιο με ADP και ATP ή οποιοδήποτε άλλο υδρολυόμενο ανάλογο του ATP (ATPγS και AMP-PCP), διαφέρει όμως από αυτό της SecA απουσία νουκλεοτιδίου ή παρουσία μη υδρολυόμενου ATP αναλόγου (AMP-PNP) (σχήμα 40A και B). Παρατηρήθηκε ότι με ADP η αμινοτελική περιοχή της SecA (N-domain) σταθεροποιείται και παράλληλα το ίδιο συμβαίνει με την καρβοξυτελική περιοχή (C-domain). Αυτό συμβαίνει διότι οι δύο αυτές περιοχές της SecA αλληλεπιδρούν άμεσα μεταξύ τους (Karamanou et al., 1999) και έτσι αλλαγές της διαμόρφωσης στη μία περιοχή, μεταφέρονται στην άλλη. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία ADP συμβαίνει τέτοια αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA, ώστε η Arg-419 σταματάει να ανιχνεύεται από θρυψίνη, ενώ αποκαλύπτεται η Arg-360. Έτσι τα 1-419

(46kDa) και 420-560 (15kDa) πρωτεολυτικά κομμάτια μετατρέπονται σε 1-360 (40kDa) και 361-586 (25kDa) που πιθανά αντιστοιχούν στα 25 και 35kDa πεπτίδια που βρήκαν με πρωτεόλυση οι den Blaauwen et al., 1996. Παρακολουθώντας ακολούθως τις αλλαγές αυτές στη διαμόρφωση της SecA μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών της, οι den Blaauwen et al., 1996, διαπίστωσαν ότι πράγματι η SecA υφίσταται αλλαγή στη διαμόρφωση της παρουσία ADP, αφού το περιβάλλον των τρυπτοφανών της αλλάζει, καθώς ο φθορισμός τους ελαττώνεται (σχήμα 41). Συγκεκριμένα διαπίστωσαν εκτεταμένες αλλαγές στη SecA πρωτεΐνη αφού αλλάζει το περιβάλλον των τρυπτοφανών στο καρβοξυτελικό άκρο της, στο οποίο και οφείλεται ο φθορισμός της, ενώ η δέσμευση ADP, γίνεται στο αμινοτελικό της άκρο. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν απομονώνοντας μεταλλαγμένες SecA με μοναδικές τρυπτοφάνες, οπότε και διαπίστωσαν ότι στον φθορισμό της SecA συντελούν κυρίως η τρυπτοφάνη 775 και έπειτα η τρυπτοφάνη 701 που εντοπίζονται στη καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Αφού και η αλληλεπίδραση της SecA με νουκλεοτίδια επηρεάζει τον φθορισμό της C-περιοχής, ενώ η δέσμευση τους πραγματοποιείται στην N-περιοχή, εντοπίζονται εκτεταμένες διαμορφώσεις σ' ολόκληρη την SecA πρωτεΐνη (η πληροφορία μεταφέρεται από την N- στην C-περιοχή). Εξάλλου επειδή η N- και η C-περιοχή της SecA αλληλεπιδρούν, αλλαγές στην C-περιοχή αναμένεται να γίνονται αντιληπτές από την N-περιοχή και αντίστροφα μεταφέροντας την αλλαγή της διαμόρφωσης σ' ολόκληρη την πρωτεΐνη, υποδεικνύοντας έτσι και την σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής στη ρύθμιση του κύκλου της SecA κατά την μετατόπιση των πρωτεϊνών από τη μεμβράνη.

Επιπλέον μελέτες για την αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA παρουσία νουκλεοτιδίων, πραγματοποιήθηκαν με δυναμική σκέδαση του φωτός (dynamic light scattering, DLS), με τις οποίες διαπιστώθηκε ότι η φαινομενική

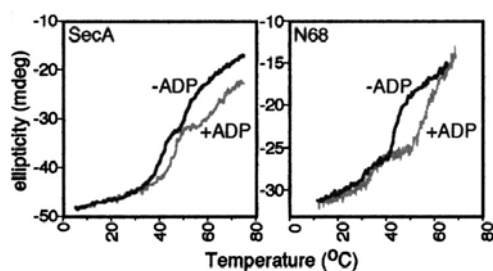
μοριακή μάζα της SecA, αλλάζει παρουσία των διαφόρων νουκλεοτιδίων (den Blaauwen et al., 1996). Η αύξηση είναι της τάξης του 16% και του 40% στην περίπτωση της δέσμευσης ADP και AMP-PNP αντίστοιχα. Όμως η αύξηση του μέσου όγκου της πρωτεΐνης παρουσία των νουκλεοτιδίων ( $\Delta v_0$ ) σηματοδοτεί ενίσχυση του ποσού της SecA που έρχεται σε επαφή με το νερό καθώς και ασυμμετρία του σχήματος της. Έτσι απουσία νουκλεοτιδίων η SecA πρέπει να είναι σχεδόν σφαιρική με αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων υποπεριοχών της. Παρουσία ADP το σχήμα της SecA γίνεται ανωμάλως σφαιρικό και η συμπαγής δομή διατηρείται. Η αύξηση της αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κύριων υποπεριοχών της SecA παρουσία ADP φάνηκε τόσο από τα πειράματα πρωτεόλυσης που είδαμε παραπάνω, όσο και από την αύξηση του σημείου τήξεως της ευρύτερης περιοχής της SecA που περιλαμβάνει και την καρβοξυτελική περιοχή C-domain με κυκλικό διχρωισμό (Karamanou et al., 1999) ή με διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης, όπως θα δούμε παρακάτω. Αντίθετα παρουσία AMP-PNP, η SecA αποκτά πιο εκτεταμένη διαμόρφωση και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών της περιορίζονται (αφού δεν παρατηρείται σταθεροποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής της SecA με πρωτεόλυση παρουσία AMP-PNP, ούτε αύξηση του σημείου τήξεως της πρωτεΐνης). Δεδομένου ότι η SecA με ATP και προπρωτεΐνη ή μόνο με AMP-PNP (εκτεταμένη διαμόρφωση) εισέρχεται στη μεμβράνη, ενώ εξέρχεται με υδρόλυση ATP (παραγωγή ADP και συμπαγής διαμόρφωση) (Economou et al., 1994), υποδηλώνει ότι οι διαφορετικές αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA παρουσία διαφορετικών νουκλεοτιδίων που είδαμε παραπάνω, πιθανά αντιστοιχούν σε κινήσεις που αποκαλύπτουν ή κρύβουν την θέση αλληλεπίδρασης της SecA με την SecYEG και κατά συνέπεια διευκολύνουν την είσοδο της ή την έξοδο της από την μεμβράνη.

Προκειμένου λοιπόν να μάθουν όσο γίνεται περισσότερα γι' αυτές τις διαμορφώσεις και κατά συνέπεια και για το πως η ενέργεια από την υδρόλυση του ATP από την SecA μετατρέπεται σε μηχανική ενέργεια μετακίνησης της προπρωτεΐνης από τις μεμβράνες, οι den Blaauwen et al., 1996; den Blaauwen et al., 1999 πραγματοποίησαν διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC) της SecA από το *Bacillus subtilis*, απουσία και παρουσία νουκλεοτιδίων ADP και AMP-PNP. Βρήκαν ότι η SecA παρουσιάζει απουσία νουκλεοτιδίων δύο ενδόθερμες αντιδράσεις (στο διάγραμμα της θερμοχωρητικότητας με την θερμοκρασία παρουσιάζονται δύο κορυφές) με σημεία τήξεως  $T_{m1}=40^{\circ}\text{C}$  και  $T_{m2}=49^{\circ}\text{C}$ , και μία εξώθερμη αντίδραση που οφείλεται σε δημιουργία συσσωματωμάτων (στην περίπτωση της *E.coli* SecA με την ίδια μέθοδο παρατηρείται μία μόνο μετάπτωση στους  $52^{\circ}\text{C}$ ). Από τις δύο ενδόθερμες αντιδράσεις η πρώτη μόνο είναι αντιστρεπτή και θερμικά ελεγχόμενη. Αν η SecA θερμανθεί μέχρι τους  $43^{\circ}\text{C}$  και ακολούθως ψυχθεί στην αρχική θερμοκρασία, το φάσμα μένει το ίδιο. Η δεύτερη αντίδραση είναι χρονικά ελεγχόμενη. Δηλαδή αν ο ρυθμός μέτρησης του φάσματος αλλάξει από 1 σε  $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  μόνο το  $T_{m2}$  αυξάνει κατά  $1^{\circ}\text{C}$ . Επειδή πρόκειται για ενδόθερμες αντιδράσεις τόσο η πρώτη όσο και η δεύτερη μετάπτωση αντιπροσωπεύουν ξεδιπλάτωση-αποδιάταξη δύο περιοχών της SecA που λόγω της παρόμοιας ενθαλπίας αποδιάταξης που παρουσιάζουν μάλλον έχουν παρόμοιο μέγεθος. Επειδή το πρωτεϊνικό κομμάτι 1-443 της *B. subtilis* SecA παρουσιάζει ένα σημείο τήξεως που συμπίπτει με το  $T_{m2}$  της ολόκληρης SecA θεωρήθηκε ότι η δεύτερη μετάπτωση αντιπροσωπεύει την αποδιάταξη της αμινοτελικής περιοχής της SecA (N-domain) ενώ η πρώτη μετάπτωση αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή της (C-domain). Έτσι παρουσία ADP που όπως είπαμε παραπάνω ευνοεί τη συμπαγή διαμόρφωση της SecA, παρατηρείται σταθεροποίηση του  $T_{m1}$  (η αλλαγή από την δέσμευση ADP στο N-domain μεταφέρεται μέσω απ' ευθείας αλληλεπίδρασης στο ρυθμιστικό C-domain) και μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ADP (πάνω από 2mM) εντοπίζεται σταθεροποίηση του  $T_{m2}$ . Μάλιστα στην τελευταία περίπτωση η αύξηση της ενθαλπίας είναι πολύ μεγάλη και υποδηλώνει μεγάλο αριθμό περιοχών που ξεφεύγουν από το υδρόφοβο περιβάλλον τους και αποκαλύπτονται στο νερό. Αντίθετα παρουσία AMP-PNP δεν παρατηρείται καμία σπουδαία σταθεροποίηση ούτε του  $T_{m1}$ , ούτε του  $T_{m2}$ , τουλάχιστον σε συγκεντρώσεις μέχρι 0.02mM, κάτι που αναμένεται από την εκτεταμένη διαμόρφωση της SecA στην περίπτωση αυτή και την περιορισμένη κατά συνέπεια αλληλεπίδραση των δύο κύριων περιοχών της.

Μελέτη των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων κάθε διαμόρφωσης πραγματοποιήθηκε εν συνεχεία με ισοθερμική τιτλοδότηση θερμιδομετρίας (Isothermal titration calorimetry, ITC) που δίνει πληροφορίες για την θερμοκρασία της αντίδρασης αλληλεπίδρασης μ' έναν υποκαταστάτη αλλά και για την συγγένεια με τον ίδιο υποκαταστάτη (den Blaauwen et al., 1999; Pierce et al., 1999). Βρέθηκε λοιπόν ότι η σταθερά δέσμευσης είναι μεγαλύτερη για το ADP  $K_a=3.6(0.7)\times 10^6 \text{ mol}^{-1}$  απ' ότι για το ATPγS  $K_a=1.4(4.3)\times 10^6 \text{ mol}^{-1}$  (όπως είχε αναφερθεί και στο Κεφάλαιο αλληλεπίδρασης της SecA με ATP). Ακόμα διαπιστώθηκε ότι και

οι δύο αντιδράσεις δέσμευσης είναι εξώθερμες, καθώς χαρακτηρίζονται από αρνητική αλλαγή στην ενθαλπία, που είναι και πολύ μεγαλύτερη στην περίπτωση της δέσμευσης του ADP  $\Delta H^0 = -14.44$  (1.14) Kcal/mol, απ' ό,τι στην περίπτωση της δέσμευσης του ATPγS  $\Delta H^0 = -5.56$  (0.88) Kcal/mol. Επιπλέον η δέσμευση του ADP οδηγεί σε μείωση της εντροπίας  $\Delta S^0 = -18.25$  (3.69) cal/mol/K, ενώ η δέσμευση του ATPγS σε αύξηση  $\Delta S^0 = 9.55$  (3.08) cal/mol/K και η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs είναι  $\Delta G^0 = -9.00$  (0.08) Kcal/mol στην περίπτωση του ADP και  $\Delta G^0 = -8.42$  (0.22) Kcal/mol στην περίπτωση του ATPγS. Τέλος από την θερμική τιτλοδότηση της μεταβολής της ενθαλπίας υπολογίζεται η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας σε κάθε περίπτωση. Έτσι λοιπόν ενώ βρέθηκε μεγάλη αλλαγή της μεταβολής της ενθαλπίας με την θερμοκρασία τόσο για το ADP, όσο και για το ATPγS η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση του ADP  $\Delta C_p = -780$  (160) cal/mol/K απ' ό,τι στην περίπτωση του ATPγS  $\Delta C_p = -186$  (160) cal/mol/K. Επομένως όταν γίνεται δέσμευση ADP, λόγω της μεγάλης αλλαγής της θερμοχωρητικότητας, παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές τόσο στην ενθαλπία όσο και στην εντροπία με την μεταβολή της θερμοκρασίας, ενώ η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας μένει σταθερή. Μεγάλη αλλαγή στη θερμοχωρητικότητα όμως σημαίνει ότι ένα μικρό μέρος της πρωτεϊνικής επιφάνειας της SecA με δεσμευμένο ADP είναι προσιτή στο διαλύτη (απόκτηση συμπαγούς δομής όπως αναφέρθηκε και παραπάνω) ενώ μεγάλη αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA με ADP, αναμένεται και από την μεγάλη εξάρτηση της ενθαλπίας και της εντροπίας της με την θερμοκρασία σ' αυτή την περίπτωση. Επειδή όμως το φάσμα της SecA παρουσία και απουσία ADP είναι το ίδιο, αλλά και για άλλους λόγους που θα αναφερθούν παρακάτω (πειράματα με SAXS και κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής της SecA), αυτή η αλλαγή που συμβαίνει στην πρωτεΐνη με ADP δεν είναι στην πραγματικότητα τόσο εκτεταμένη αλλά είναι περισσότερο εντοπισμένη και οφείλεται στην ενισχυμένη αλληλεπίδραση των άμινο και καρβοξυτελικών περιοχών της SecA. Στην περίπτωση του ATPγS τα πράγματα είναι περισσότερο περίπλοκα. Επειδή η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας δεν είναι μεγάλη, ένα μεγάλο μέρος της πρωτεϊνικής επιφάνειας της SecA με δεσμευμένο ATPγS πρέπει να είναι προσιτή στο διαλύτη και επομένως η αλληλεπίδραση των άμινο και καρβοξυτελικών περιοχών της SecA είναι περιορισμένη (απόκτηση εκτεταμένης δομής). Η μεταβολή της εντροπίας έχει θετική τιμή, αλλά δεν αντισταθμίζει την μεταβολή της ενθαλπίας, ενώ παρατηρείται εξάρτηση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας από την θερμοκρασία.

Μελέτη της παραπάνω ενδοθερμικής αντίδρασης της SecA πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση κυκλικού διχρωισμού CD, από τους Sianidis et al., 2001, πιο εμπειριστικά από τους Song et al., 1997; Doyle et al., 2000. Έτσι μέτρηση της Ellipticity (mdeg) κατά την θερμική αποδιάταξη της SecA (σχήμα 42), οδήγησε στη διαπίστωση δύο αντιδράσεων



Σχήμα 42: (Sianidis et al., 2001). Το ADP προκαλεί αύξηση στη θερμοκρασία που λιώνει τόσο η SecA όσο και το N68. Στο σχήμα παρουσιάζονται καμπύλες θερμικής αποδιάταξης παρουσία ή απουσία ADP (2mM), μετά από μέτρηση της ellipticity στα 222nm με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους (far-UV CD). Τα δείγματα θερμαίνονται στους 50°C/h.

μετάπτωσης, που εντοπίζονται στους 39°C και στους 48°C ( $T_{m1} = 39^\circ\text{C}$  και  $T_{m2} = 48^\circ\text{C}$ ). Μελετώντας στη συνέχεια τη θερμική αποδιάταξη τόσο του DEAD κινητήρα τόσο του DEAD κινητήρα (N68), όσο και μιας σειράς πρωτεϊνικών κομματιών από το καρβοξυτελικό και από το αμινοτελικό άκρο του, διαπίστωσαν ότι το σημείο τήξεως της δεύτερης μετάπτωσης,  $T_{m2}$ , παρατηρείται μόνο στα πρωτεϊνικά κομμάτια που περιέχουν την NBD υποπεριοχή του N-domain και έτσι αντιστοίχισαν την δεύτερη μετάπτωση στην αποδιάταξη της NBD υποπεριοχής της ευρύτερης N-περιοχής. Όπως είδαμε προηγουμένως και από τους den Blaauwen et al., 1999, παρουσία ADP (2mM) διαπίστωσαν σταθεροποίηση του  $T_{m2}$ , τόσο στην περίπτωση της ολόκληρης SecA όσο και των πρωτεϊνικών κομματιών με την NBD υποπεριοχή, που δεσμεύουν το ADP. Το  $T_{m1}$  δεν μπορεί να

αποδοθεί σε μία μόνο περιοχή της SecA και πρέπει να είναι σύνθετο, αποτελούμενο από την IRA2 υποπεριοχή και την C-περιοχή στην οποία αποδώθηκε λανθασμένα αποκλειστικά, προηγουμένως. Εξάλλου νεότερες μελέτες φαίνεται να αποδίδουν το  $T_{m1}$  στην IRA2 υποπεριοχή (Karamanou et al., unpublished results). Επιπλέον οι Sianidis et al., 2001 μετρώντας την α-ελικοειδή δομή της SecA σε αυξανόμενη θερμοκρασία εντόπισαν μείωση της κατά ~50% από τους 4°C στους 37°C. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρείται στα πρωτεϊνικά

κομμάτια που περιέχουν μόνο την NBD υποπεριοχή ενώ συμβαίνει σημαντική μείωση της α-ελικοειδούς δομής στα πρωτεϊνικά κομμάτια που διαθέτουν και ή μόνο την IRA2 υποπεριοχή. Επομένως η IRA2 υποπεριοχή παρουσιάζει μεγάλη δομική ευκινησία και είναι αυτή που προσδίδει την ικανότητα μείωσης της α-ελικοειδούς δομής με την αύξηση της θερμοκρασίας στη SecA. Αντίστοιχα χάρη σε αυτή τη δυνατότητα αλλαγής της δευτεροταγούς δομής της IRA2 περιοχής, οφείλεται η απελευθέρωση του ADP (αργό στάδιο κατάλυσης της υδρόλυσης του ATP) κατά τους πολλαπλούς κύκλους κατάλυσης που πραγματοποιούνται κατά την διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες. Αυτό διαπιστώθηκε με μετρήσεις μείωσης της α-ελικοειδούς δομής σε μία σειρά από μεταλλαγμένες SecA στην IRA2 υποπεριοχή, που απελευθερώνουν ADP ακόμα και στον πάγο και παρουσιάζουν αυξημένη βασική ATPάση (Karamanou et al., unpublished results). Συνεπώς όχι μόνο η C-περιοχή, (Song et al., 1997), ούτε μόνο η NBD υποπεριοχή (Doyle et al., 2000), αλλά και η IRA2 υποπεριοχή συνεισφέρει στην μερική ενδοθερμική αποδιάταξη της SecA και στην απόκτηση από αυτήν της "λιωμένης σφαιρικής κατάστασης".

Είναι αναμενόμενο κάποιες περιοχές στην SecA να είναι περισσότερο ευκίνητες από άλλες, ή να εναλλάσσουν την διαμόρφωση τους, ώστε να χρησιμεύουν ως σύνδεσμοι υποπεριοχών, ή ως ρυθμιστικές περιοχές, που επιτρέπουν αλλαγή της αλληλεπίδρασης των διάφορων περιοχών της SecA, μετακινήσεις περιοχών, και αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου, παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών. Εξάλλου οι ελικάσες όπως είδαμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, επιτελούν μετακίνηση της IRA2 ως προς την NBD υποπεριοχή. Επίσης η μετάβαση από την εκτεταμένη στην συμπαγή διαμόρφωση της SecA παρουσία AMP-PNP και ADP αντίστοιχα, οφείλεται σε αλλαγή της αλληλεπίδρασης των N και C-περιοχών της SecA. Επιπλέον το IRA1 ρυθμιστικό στοιχείο, έχει προταθεί ότι δουλεύει πάνω στη ρύθμιση της ATPάσης και της δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη της N-περιοχής, μέσω αλλαγής των αλληλεπιδράσεων των N- και C-περιοχών. Τέλος η IRA2 περιοχή, απελευθερώνει το ADP, μέσω αλλαγής της ελικοειδούς δομής στην NBD περιοχή με την οποία αλληλεπιδρά.

Περισσότερες πληροφορίες για την κινητικότητα των διαφόρων υποπεριοχών της SecA, κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της, προήλθαν από την ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής της SecA, σε συνδυασμό με πειράματα μέτρησης του φθορισμού των τρυπτοφανών αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων SecA όπως και της αλλαγής στην ανισοτροπία τους (Hunt et al., 2002). Καταρχήν οι Ding et al., 2001 έδειξαν, όπως είπαμε παραπάνω, ότι κατά την θερμική τιτλοδότηση της SecA παρατηρείται μείωση του φθορισμού των τρυπτοφανών, κυρίως λόγω της αυξημένης έκθεσης στον διαλύτη της W775. Οι Hunt et al., 2002 όμως διαπίστωσαν ότι παράλληλα με την μείωση του φθορισμού των τρυπτοφανών μειώνεται και η ανισοτροπία της SecA κατά την θερμική της τιτλοδότηση. Μείωση του φθορισμού απουσία άλλων παραγόντων, κανονικά αναμένεται όμως, να οδηγεί σε αύξηση της ανισοτροπίας, αφού μειώνεται ο χρόνος περιστροφικού επαναπροσανατολισμού πριν την εκπομπή φωτονίων. Η σύγχρονη λοιπόν μείωση της ανισοτροπίας και του φθορισμού της SecA με την αύξηση της θερμοκρασίας, μπορεί να εξηγηθεί μόνο με την αύξηση στην κινητικότητα (συντελεστής περιστροφικής διάχυσης) του συγκροτήματος των τρυπτοφανών κατά την ενδόθερμη μετάπτωση. Επιπλέον οι Hunt et al., 2002 διαπίστωσαν ότι μείωση της ανισοτροπίας ταυτόχρονη με την μείωση του φθορισμού παρατηρείται και σε πολλές PrfD μεταλλαγμένες SecA που δουλεύουν σαν καταστολείς μεταλλαγών στο πεπτιδίο σηματοδότης.

Οι Schmidt et al., 2000 έδειξαν ότι η ενδόθερμη μετάπτωση που ευνοείται στις παραπάνω μεταλλαγμένες ecSecA (den Blaauwen et al., 1996; Ulbrandt et al., 1992; Ramamurthy et al., 1998; Ding et al., 2001), χωρίζεται σε δύο υπομεταπτώσεις όπως συμβαίνει στην περίπτωση της αγρίου τύπου SecA μόνο από το *B.subtilis* και όχι από την *E.coli* (den Blaauwen et al., 1996). Από τις δύο αυτές μεταπτώσεις μόνο η πρώτη, και όχι η δεύτερη είναι πλήρως ανισοτροπική και επειδή η μετάπτωση της ανισοτροπίας στις παραπάνω περιπτώσεις ταυτίζεται πάντα με την πρώτη ενδοθερμική μετάπτωση, η σχετιζόμενη αύξηση της κινητικότητας του συγκροτήματος των τρυπτοφανών στις παραπάνω περιπτώσεις πρέπει να αποτελεί μία φυσιολογική αντίδραση αλλαγής της διαμόρφωσης της SecA. Αυτή η αύξηση στην κινητικότητα μπορεί να οφείλεται είτε σε μονομερισμό της SecA, είτε σε διάσπαση υποπεριοχών στο ένα πρωτομερές της SecA. Βέβαια και στις δύο περιπτώσεις η πρώτη ενδόθερμη μετάπτωση πρέπει να περιλαμβάνει διαταραχή αλληλεπιδράσεων υποπεριοχών και περιοχών στο διμερές της SecA. Στην περίπτωση που η αύξηση της κινητικότητας προερχόταν από αντίδραση μονομερισμού της SecA θα έπρεπε να συμβαίνει συνεργατικά και στα δύο πρωτομερή. Η μελέτη όμως της ανισοτροπίας, μετά από θέρμανση

των διαφόρων SecA, μέχρι την θερμοκρασία που επάγει την πρώτη ενδοθερμική μετάπτωση, με τιτλοδότηση με Mg-ADP της αντίστροφης αντίδρασης διαμόρφωσης, διαδεικνύει ότι η αύξηση στην κινητικότητα συμβαίνει ανεξάρτητα σε κάθε πρωτομερές. Ο συντελεστής Hill για την αντίδραση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου είναι κοντά στο 1, και επομένως αναμένεται να συμβαίνει το ίδιο και για την αντίστροφη αντίδραση. Κατά συνέπεια η αύξηση της κινητικότητας πρέπει να οφείλεται σε διάσταση των αλληλεπιδράσεων διαφόρων περιοχών στο μονομερές της SecA. Εν παραλλήλω οι Hunt et al., 2002 χρησιμοποιώντας ένα πλήρες σετ μεταλλαγμένων SecA με μοναδικές αντικαταστάσεις τρυπτοφάνων σε φαινυλανανίνες (Ding et al., 2001) κατάφεραν να αποδώσουν την αύξηση της κινητικότητας του συγκροτήματος των τρυπτοφάνων κατά την ενδόθερμη μετάπτωση, τουλάχιστον στις τρυπτοφάνες της  $\alpha$ -ελικοειδούς περιοχής HWD. Πιο συγκεκριμένα αντικατάσταση τεσσάρων από τις επτά τρυπτοφάνες της *E.coli* SecA (W349F, W519F, W541F, και W622F), δεν δημιουργεί σημαντική διαφορά ούτε στον συνολικό φθορισμό, ούτε στις μεταπτώσεις της ανισοτροπίας με την αύξηση της ανισοτροπίας. Αντίθετα στην περίπτωση της SecAW775F παρατηρείται αλλαγή στην ανισοτροπία, με μείωση του  $T_m$  μέχρι και 7<sup>o</sup>, χωρίς αλλαγή στην συνολικό φθορισμό. Αυτή η καθαρή μετάπτωση ανισοτροπίας ταυτίζεται σχεδόν με την πρώτη ενδοθερμική υπομετάπτωση μερικών από τις παραπάνω μεταλλαγμένες SecA, ενώ παράλληλα η SecAW775F, παρουσιάζει και φαινότυπο ανθεκτικότητας στο αζίδιο που χαρακτηρίζει τις μεταλλαγμένες SecA καταστολείς μεταλλαγών στο πεπτιδίο σηματοδότη (Oliver et al., 1990; Huie and Shilhavy, 1995). Το γεγονός ότι η μετάπτωση της ανισοτροπίας στην SecAW775F συμβαίνει χωρίς αλλαγή στον συνολικό φθορισμό, σημαίνει ότι η συνολική μείωση του φθορισμού κατά την πρώτη ενδοθερμική μετάπτωση οφείλεται στην απόσβεση του φθορισμού που υφίσταται η τρυπτοφάνη στην θέση 775, που προφανώς εκτείνεται τώρα στον διαλύτη. Αντίθετα στην διαμόρφωση που διαθέτει στην χαμηλή θερμοκρασία η W775F, κρύβεται από μία πληθώρα αλληλεπιδράσεων μεταξύ της HSD-NBD-SSD. Αύξηση της διαλυτότητας του αμινοξέος W775 κατά την ενδόθερμη μετάπτωση, σημαίνει άνοιγμα της μεσόφασης των HSD-NBD-SSD περιοχών και κατά συνέπεια έκθεση στον διαλύτη και των θέσεων που εκτείνονται στο περίπλασμα (PE) και εντοπίζονται στην SSD-περιοχή. Οι PE θέσεις, στην συμπαγή διαμόρφωση της SecA σε χαμηλή θερμοκρασία είναι κρυμμένες, αλλά εκτείνονται, όταν η SecA δεσμευτεί στην θέση SecYEG στη μεμβράνη (αφού ανιχνεύονται στη μεμβράνη). Και ενώ το μέγεθος αλλαγής της ανισοτροπίας είναι το ίδιο στην αγρίου τύπου SecA και στην SecAW775F, η ανισοτροπία μειώνεται σημαντικά και στις δύο αντικαταστάσεις τρυπτοφάνων στην HWD, δηλαδή στην SecAW701F και στην SecAW723F, υποδηλώνοντας ότι η αυξημένη κινητικότητα στην HWD-περιοχή ευθύνεται για την αλλαγή της ανισοτροπίας στην πρώτη ενδοθερμική υπομετάπτωση. Ο μονομερισμός της πρωτεΐνης στις παραπάνω περιπτώσεις αποκλείεται, αφού η μετάπτωση συμβαίνει ανεξάρτητα στις δύο υπομονάδες του διμερούς όπως είπαμε προηγουμένως, ενώ και ο μονομερισμός που προκαλείται με χρήση απορρυπαντικού οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερη μείωση της ανισοτροπίας σε αντίστοιχες θερμοκρασίες (Benach et al., 2003). Επομένως οι Hunt et al., 2002, απέδωσαν στην ενδόθερμη μετάπτωση της SecA αλλαγές στην κινητικότητα τουλάχιστον της περιοχής HWD, η οποία θα πρέπει να δίσταται από τον συμπαγές πυρήνα της SecA και να οδηγεί έτσι σε ελάττωση της συγγένειας για νουκλεοτίδιο στην ρωγμή μεταξύ των περιοχών NBD-IRA2 (στην άλλη μεριά του πρωτομερούς), αλλά και στην αύξηση της δέσμευσης στη SecYEG θέση στη μεμβράνη (ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τις PrID μεταλλαγές).

Η HWD-περιοχή όμως πρέπει να υφίσταται και σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωση της κατά τη διάρκεια της δεύτερης ενδοθερμικής μετάπτωσης, μετά την απελευθέρωση της από τον πυρήνα της SecA κατά την πρώτη μετάπτωση. Και αυτό γιατί παρατηρείται μείωση του φθορισμού στη SecAW775F κατά τη δεύτερη ενδοθερμική μετάπτωση η οποία πρέπει να οφείλεται σε αλλαγές στο περιβάλλον είτε της τρυπτοφάνης 701, είτε και της τρυπτοφάνης 723, αφού οι άλλες τρυπτοφάνες δεν συμβάλλουν στον φθορισμό της SecA, όπως ειπώθηκε προηγουμένως (Ding et al., 2001). Η χαμηλότερη τιμή του  $T_m$  που διαπιστώνεται στις μεταλλαγμένες SecAW701F και SecAW723F σε σχέση με τη WTSecA υποδηλώνει ακόμα ότι μεταλλαγές στην HWD-περιοχή διευκολύνουν την αλλαγή κατά την ενδοθερμική διαμόρφωση της πρωτεΐνης, που οφείλεται, όπως εξηγήθηκε παραπάνω, σε διάσταση της HWD-περιοχής από τον πυρήνα της SecA. Από τα παραπάνω αποτελέσματα των Hunt et al., 2002, μπορεί να διαφάνεται μετακίνηση της HWD-περιοχής και απελευθέρωση της από τον συμπαγή πυρήνα της SecA κατά τη ενδόθερμη μετάπτωση της πρωτεΐνης, όμως δεν αποκλείονται αλλαγές (ίσως και μεγαλύτερες) και σ' άλλες περιοχές της πρωτεΐνης, αφού ουσιαστικά παρακολουθείται μόνο η αλλαγή του περιβάλλοντος των τρυπτοφάνων στην πρωτεΐνη και μάλιστα μόνο αυτών που φθορίζουν που όπως είπαμε εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο

της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα στην SD- και στη HWD-περιοχή. Επιπλέον, μολονότι σύμφωνα με τους Ding et al., 2001, οι μεταλλαγμένες SecA με τις απλές αντικαταστάσεις των τρυπτοφανών σε φαινυλανανίνες αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες αγρίου τύπου, κάτι τέτοιο δεν αντιπροσωπεύει την πραγματικότητα, αφού για παράδειγμα η SecAW775F παρουσιάζει αυξημένη βασική-ενδογενή ATPάση (Economidou et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα) και άρα μολονότι μπορεί και αντικαθιστά θερμοουαίσθητη SecA *in vivo* δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι μοιράζεται την ίδια ακριβώς δομή με την WTSecA. Έτσι όμως και τα παραπάνω συμπεράσματα τίθενται σε αμφισβήτηση, και αν και παραμένουν ως υποθέσεις, δεν μπορεί να θεωρηθούν τίποτε παραπάνω.

Απ' όλα τα παραπάνω πειράματα λοιπόν, προκύπτει ότι η SecA παρουσία ADP αποκτά την συμπαγή-σφιχτή διαμόρφωση της που είναι γεμάτη με ενέργεια. Αυτή η ενέργεια απελευθερώνεται σε μηχανικό έργο όταν η SecA αποκτά την πιο εκτεταμένη της διαμόρφωση που σταθεροποιείται με ATP, και που διευκολύνει όπως αναφέρθηκε την εισχώρηση στη μεμβράνη ενώ οδηγεί και σε αύξηση της εντροπίας και δεν παρουσιάζει μεγάλη αλλαγή στη θερμοχωρητικότητα. Περισσότερες πληροφορίες για την μετατροπή της ενέργειας της SecA σε μηχανική κίνηση της προπρωτεΐνης θα προκύψουν από αντίστοιχες μελέτες της διαμόρφωσης της με διάφορα νουκλεοτίδια, παρουσία όμως και των άλλων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης σε μικηλιακό διάλυμα για παράδειγμα της πρωτεΐνης.

Οι αλλαγές όμως στη διαμόρφωση της SecA παρουσία των διαφόρων νουκλεοτιδίων επηρεάζουν αλυσιδωτά την δέσμευση των υπολοίπων υποκαταστατών στη SecA, όπως του υποστρώματος, σύμφωνα με τους van Voorst et al., 2000. Διαπιστώθηκε συγκεκριμένα ότι η δεσμευμένη με ADP SecA παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για το υπόστρωμα, ενώ αυτή αυξάνεται με τη δέσμευση ATP ή AMP-PNP. Προφανώς η ισχυρή αλληλεπίδραση των N- και C-περιοχών στην SecA με ADP εμποδίζει την αναγνώριση της θέσης δέσμευσης της SecA για το υπόστρωμα. Εξάλλου και οι Schiebel et al., 1991 έδειξαν ότι με την υδρόλυση του ATP το μεταφερόμενο υπόστρωμα αποδεσμεύεται από την SecA.

Προκειμένου λοιπόν να κατανοήσουν τις επαναδιευθετήσεις των διάφορων υποπεριοχών στην SecA, που συμβαίνουν κατά το μηχανιστικό μοντέλο εισαγωγής και εξαγωγής της από την μεμβράνη, οι Chou et al., 2003, μελέτησαν την SecA με NMR, για να εντοπίσουν περιοχές που χαρακτηρίζονται από αυξημένη κινητικότητα, και κατά συνέπεια δουλεύουν σαν σύνδεσμοι ή ρυθμιστές των αλλαγών της διαμόρφωσης των διαφόρων υποπεριοχών της. Κανονικά επειδή η SecA είναι μεγάλη πρωτεΐνη, το NMR φάσμα της αναμένεται να δίνει ευρεία σήματα (>100Hz) και ευρύ συντονισμό. Εντοπίστηκαν όμως και διάφορες στενές κορυφές, συντονισμοί, που υποδηλώνουν κινητικότητα τμημάτων της πρωτεΐνης, και οι οποίες αντιστοιχήθηκαν σε δύο περιοχές της SecA. Σε τμήμα της IRA2 περιοχής, και συγκεκριμένα στην περιοχή από το αμινοξύ 564 μέχρι το αμινοξύ 579, που αποτελεί τμήμα του μοτίβου VI (570-577), όπως και στην καρβοξυτελική περιοχή των 43 τελευταίων αμινοξέων. Το παραπάνω μοτίβο VI, παρουσιάζει 100% συντηρητικότητα και εντοπίζεται όπως είπαμε εντός του IRA2 που έχει βρεθεί ότι επιτελεί ρυθμιστικό ρόλο. Από την κρυσταλλική δομή της SecA, φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια και ότι μεταλλαγές σ' αυτό, επηρεάζουν την δραστικότητα ATPάσης του (Sianidis et al., 2001). Αντίστοιχα η καρβοξυτελική περιοχή της SecA, έχει δείχθει ότι είναι σημαντική για την μετατόπιση ορισμένων πρωτεϊνών *in vivo* (βλέπε Κεφάλαιο καθοδήγησης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη με τη βοήθεια της SecB πρωτεΐνης). Εξάλλου έχει βρεθεί ακόμα ότι αλληλεπιδρά με λιπίδια,  $Zn^{2+}$ , και SecB, που επηρεάζουν και την ATPάση, και την διαμόρφωση της SecA. Επίσης η καρβοξυτελική περιοχή εντοπίζεται κοντά στην IRA1 περιοχή, που έχει προσδιοριστεί ως ρυθμιστικό στοιχείο της SecA (Karamanou et al., 1999). Συνάγεται λοιπόν ότι στη SecA πρωτεΐνη, επικρατεί κινητικότητα σε λειτουργικά σημαντικές περιοχές. Επειδή όμως οι περιοχές αυτές μπορούν να παρακολουθηθούν με NMR, δίνεται η δυνατότητα μελέτης τους και παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης. Οι παρατηρούμενες αλλαγές, υποδηλώνουν ότι παρουσία ATPγS και  $Mn^{2+}$  διευρύνεται ο συντονισμός που προκύπτει και από τις δύο κινητικές περιοχές, οι οποίες κατά συνέπεια συμπεραίνεται ότι προσεγγίζουν την θέση δέσμευσης του (όπως αναμένεται από την κρυσταλλική δομή της SecA, σχήμα 34, 38). Όμως η προσθήκη AMP-PNP, προκαλεί αναστροφή του παραπάνω φαινομένου. Συγκεκριμένα διορθώνεται η ένταση συντονισμού και από τις δύο κινητικές περιοχές της SecA, που σημαίνει ότι και οι δύο απομακρύνονται από την θέση δέσμευσης του  $Mn^{2+}$ . Αυτό άλλωστε αναμένεται και από την εκτεταμένη και ανοιχτή διαμόρφωση της πρωτεΐνης που προκαλεί το AMP-PNP. Τονίζεται ότι το παραπάνω φαινόμενο δεν παρατηρείται με ATP ή ADP, τα οποία ευνοούν την συμπαγή διαμόρφωση της SecA. Μπορεί λοιπόν να ειπωθεί ότι το AMP-PNP επηρεάζει την ισορροπία διαμόρφωσης της



SecA, κατά τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να αυξάνει την απόσταση των κινητικών στοιχείων της πρωτεΐνης από την "τσέπη" δέσμευσης του νουκλεοτιδίου. Εξάλλου η C-περιοχή, εντοπίζεται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, είτε κοντά στον DEAD κινητήρα, και άρα στην παραπάνω "τσέπη" παρουσία ADP, είτε απομακρύνεται απ' αυτήν, παρουσία AMP-PNP. Επομένως η περιοχή αυτή αποκτά εναλλασσόμενες διαμορφώσεις, στις οποίες, είτε αλληλεπιδρά με την περιοχή δέσμευσης του νουκλεοτιδίου, την οποία και ρυθμίζει, είτε αλληλεπιδρά με τους άλλους υποκαταστάτες της μετατόπισης των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες, όπως η SecB. Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ παρουσία ADP, αναμένεται συμπαγής-σφιχτή διαμόρφωση της SecA και μειωμένη κινητικότητα, διακρίνονται στενές κορυφές συντονισμού στις κινητικές περιοχές της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια η εκτεταμένη και συμπαγής διαμόρφωση της SecA πρέπει να βρίσκονται σε ισορροπία, με αποτέλεσμα να διακρίνεται κινητικότητα της πρωτεΐνης ακόμα και όταν η ισορροπία της SecA είναι μετατοπισμένη προς την συμπαγή της διαμόρφωση, λόγω των λιγοστών μορίων της που βρίσκονται στην πιο εκτεταμένη μορφή.

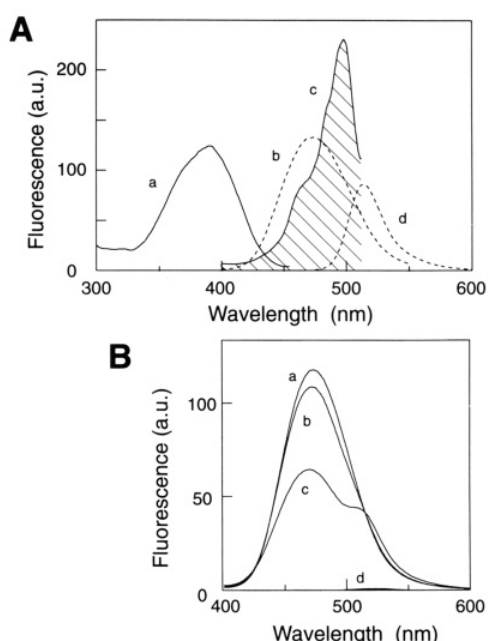
Προκύπτει λοιπόν ότι ενώ σε κάποια φάση του κύκλου των διαμορφώσεων της SecA, οι κινητικές περιοχές του μοτίβου VI του IRA2 και της καρβοξυτελικής περιοχής εντοπίζονται κοντά στην "τσέπη" δέσμευσης του νουκλεοτιδίου, και άρα κοντά και μεταξύ τους, όταν προστεθεί AMP-PNP (που μιμείται το ATP), απομακρυνόμενες από την παραπάνω τσέπη οι παραπάνω περιοχές, απομακρύνονται και μεταξύ τους.

## 1.2.Z.II. Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού της SecA.

Για την περαιτέρω κατανόηση της επιτέλεσης των ενζυμικών δραστηριοτήτων από την SecA μελετήθηκε η κατάσταση ολιγομερισμού της στο διάλυμα. Έτσι οι (Woodbury et al., 2002) διαπίστωσαν ότι όταν η SecA βρίσκεται σε μικρομοριακή κλίμακα ( $\mu\text{M}$ ) συγκεντρώσεων συνιστά μείγμα διμερούς και μονομερούς μορφής, το οποίο περιγράφεται από τουλάχιστον δύο ισορροπίες διμερούς/μονομερούς που επηρεάζονται από την θερμοκρασία, την ιονική ισχύ του διαλύματος και την συγκέντρωση του δείγματος. Παρακολουθώντας λοιπόν την χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού στους  $8^{\circ}\text{C}$  βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη εκλύεται σε ολοένα και μεγαλύτερο όγκο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του δείγματος ενώ και το σχήμα των κορυφών της SecA είναι ασύμμετρο υποδηλώνοντας ότι η SecA που διασχίζει την κολώνα είναι ολιγομερής πρωτεΐνη σε ισορροπία. Επιπλέον με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση διαπιστώθηκε αύξηση του συντελεστού καθίζησης της SecA με την αύξηση της συγκέντρωσης της στο δείγμα. Όταν εν συνεχεία η χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου τρεις κορυφές παρατηρήθηκαν στο χρωματογράφημα. Από αυτές η πρώτη αντιπροσωπεύει την οξειδωμένη μορφή της SecA που δεν αλλάζει το σημείο εκλούσης της σε διαφορετική συγκέντρωση φορτωμένου στην κολώνα δείγματος, ενώ οι άλλες κορυφές μετακινούνται, επηρεαζόμενες από την συγκέντρωση του δείγματος. Γι' αυτό το λόγο και αντιπροσωπεύουν δύο ξεχωριστές ισορροπίες μονομερούς/διμερούς από τις οποίες η μία τουλάχιστον εξαρτάται από την θερμοκρασία αφού στη χαμηλή θερμοκρασία των  $8^{\circ}\text{C}$  επικρατεί μία κορυφή. Οι δύο ισορροπίες αναμένεται να έχουν την ίδια σταθερά διαστάσεως. Παράλληλα με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση διαπιστώθηκε ότι σε αυξημένη συγκέντρωση αλλά διαφορετική θερμοκρασία ο συντελεστής καθίζησης είναι διαφορετικός. Επομένως οι δύο ισορροπίες πρέπει να αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δείγματα διμερούς όσον αφορά την διαμορφωσή τους τα οποία πιθανά σχετίζονται με τις διαφορετικές μορφές της SecA (Ramamurthy et al., 1997, Chen et al., 1998). Έτσι οι διαφορετικές διμερείς μορφές της SecA μπορεί να οφείλονται είτε σε διαφορετική διαμόρφωση, είτε σε διαφορετική επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο υπομονάδων της. Εξαιτίας των περισσότερων της μιας ισορροπιών μονομερούς/διμερούς υπόλογιστηκε η φαινομενική σταθερά διάστασης στους  $8^{\circ}\text{C}$  όπου οι δύο ισορροπίες έχουν παρόμοιες σταθερές διάστασης. Έτσι από τη σκέδαση του φωτός στο δείγμα που εκλύεται η υψηλότερη κορυφή στο χρωματογράφημα, και την συγκέντρωση του δείγματος υπόλογίζεται η απόλυτη μοριακή μάζα της SecA. Αυτή παριστάνεται γραφικά σε συνάρτηση με την συγκέντρωση όχι του δείγματος που φορτώνεται στην κολώνα, αλλά της πρωτεΐνης στο έκλουσμα που υπόκειται σε σκέδαση του φωτός. Η συγκέντρωση αυτής υπολογίζεται από ανιχνευτή υπεριώδους οπότε και προκύπτει η σταθερά διάστασης σ' ένα εύρος τιμών από 0.5-2 $\mu\text{M}$ . Στους  $20^{\circ}\text{C}$  το εύρος τιμών της σταθεράς διαστάσεως μετατοπίζεται σε μικρότερες τιμές από 0.25-0.5 $\mu\text{M}$  και διαπιστώνεται η σταθεροποίηση του διμερούς σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Ομοίως με την μείωση της ιονικής ισχύος στο διάλυμα παρατηρείται ανάλογη σταθεροποίηση του διμερούς ενώ το ίδιο συμβαίνει και με την αύξηση της συγκέντρωσης του δείγματος. Δεδομένου ότι σε κύτταρα *E.coli* η συγκέντρωση της SecA είναι περίπου 5 $\mu\text{M}$  ενώ αν λάβουμε υπόψη και φαινόμενα αποκλεισμού όγκου που περιορίζουν την τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε 10-100X παραπάνω από την σταθερά διαστάσεως αναμένουμε διμερή SecA στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 80-90%. Η διμερής μορφή πιθανά να βοηθάει στην αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων SecA αφού έχει βρεθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις όχι μόνο μονομερείς αλλά και ολιγομερείς μορφές της πρωτεΐνης δημιουργούνται, ενώ η μεταλλαγμένη μονομερής SecA δημιουργεί έγκλειστα σωμάτια (Or et al., 2002). Επίσης αφού οι υδρόφοβες επιφάνειες αλληλεπίδρασης φωσφολιπιδίων και πεπτιδίου σηματοδότη μπορεί να προκαλούν πρόβλημα *in vivo*, η διμερής SecA μπορεί να παίζει ρόλο και στην αποφυγή της πρόωρης ενεργοποίησης της από τους παραπάνω υποκαταστάτες. Η μονομερής μορφή από την άλλη πιθανά εμπλέκεται σε κάποιες αλληλεπιδράσεις με υποκαταστάτες και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε πειραματικές διαδικασίες που το εύρος συγκέντρωσης της πρωτεΐνης είναι κάποια  $\mu\text{M}$ . Το σίγουρο είναι ότι δεν μπορεί να προβλεφθεί τι συμβαίνει με την ολιγομερή κατάσταση της SecA στην μεμβράνη με βάση τις παραπάνω μετρήσεις που έλαβαν χώρα με την χρησιμοποίηση πρωτεΐνης από το ευδιάλυτο κλάσμα της *E.coli*.

Η πρώτη προσπάθεια εύρεσης της ολιγομερικής κατάστασης της SecA στη μεμβράνη πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις της δέσμευσης των μονομερών από την μεταφορά της ενέργειας συντονισμού με την χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού (Fluorescence energy transfer, FRET) (Driessen et al., 1993, Or et al., 2002). Προς τούτο δημιουργήθηκαν ετεροδιμερή

της SecA στα οποία κάθε πρωτομερές έχει διαφορετικό φθορίζων σηματοδότη. Η SecA επωάζεται είτε με ιωδιοακεταμίδο, είτε με μηλεϊνιμίδο κουμαρίνη (Coumarin) ή φλουορεσεΐνη (Fluorescein) που αντιδρούν ειδικά με κυστεΐνες (παρουσία ATP για να προστατευτεί η κυστεΐνη της SecA που υπάρχει στη θέση δέσμευσης νουκλεοτιδίου) και στη συνέχεια αποδιατάσσεται με GdnHCL. Η ετεροδιμερής SecA σχηματίζεται με ανάμιξη π.χ CMmal- και FMmal-SecA σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί επαναδιάταξη της πρωτεΐνης με αραιώση και διαπίδυση και τέλος απομόνωση με χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού του επαναδιαταγμένου διμερούς. Τόσο η κουμαρίνη, όσο και η φλουορεσεΐνη διεγείρονται και εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικά μήκη κύματος, αλλά το μήκος κύματος εκπομπής της πρώτης συμπίπτει με το μήκος κύματος στο οποίο διεγείρεται η δεύτερη. Έτσι όταν διεγερθεί μόνο η κουμαρίνη παρατηρείται μεταφορά ενέργειας συντονισμού στην φλουορεσεΐνη, αρκεί τα δύο πρωτομερή να είναι συνδεδεμένα. Παρακολουθώντας λοιπόν το προφίλ εκπομπής της κουμαρίνης και της φλουορεσεΐνης μπορεί κανείς να διαπιστώσει αν τα δύο ετεροδιμερή συνδέονται ή δίστανται. Η μείωση της έντασης εκπομπής της κουμαρίνης με ταυτόχρονη εμφάνιση εκπομπής της φλουορεσεΐνης, υποδηλώνει δέσμευση των μονομερών της SecA, ενώ η σταθερή ένταση εκπομπής της κουμαρίνης χωρίς εκπομπή από την φλουορεσεΐνη, διαδεικνύει διάσταση των μονομερών (σχήμα 43). Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώθηκε ότι η



SecA είναι διμερής στο διάλυμα (Driessen ., 1993; Or et al., 2002), αλλά και ότι βρίσκεται σε ισορροπία με το μονομερές (Or et al., 2002) καθώς παρατηρήθηκε μείωση της μεταφοράς ενέργειας στο ετεροδιμερές με την προσθήκη μη σηματοδοτημένης SecA.

Η ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ διμερούς και μονομερούς SecA ενισχύθηκε και από το ότι μικρές αλλαγές στην πρωτοταγή της αλληλουχία μετατρέπουν την διμερή μορφή κατά ένα μεγάλο ποσοστό σε μονομερή (Or et al., 2002). Έτσι πολλαπλές σημειακές μεταλλαγές υδρόφοβων αμινοξέων προς αλανίνες, στο συντηρημένο IRA1 στοιχείο (Karamanou et al., 1999) που περικλείεται στην περιοχή διμερισμού της SecA (από την Trp675 μέχρι την Val831; Hirano et al., 1996), μετατοπίζουν σημαντικά την ισορροπία προς την κατεύθυνση του μονομερούς. Συγκεκριμένα τρέξιμο σε πήκτωμα ακρυλαμίδης κάτω από μη απόδιατακτικές συνθήκες ή φυγοκέντρηση σε

Σχήμα 43: (Driessen, 1993). Μεταφορά ενέργειας φθορισμού μεταξύ της CMmal- και της FMmal-σηματοδοτημένης SecA. Α) Επικάλυψη του φασμάτος εκπομπής φθορισμού της CMmal-SecA με το φάσμα διέγερσης της FMmal-SecA. Τα φάσματα διέγερσης (a), και εκπομπής (b) φθορισμού της CMmal-SecA καταγράφονται σε μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης 465 και 387 nm αντίστοιχα, ενώ τα φάσματα διέγερσης (c), και εκπομπής (d) φθορισμού της FMmal-SecA καταγράφονται σε μήκη κύματος εκπομπής και διέγερσης 514 και 465 nm αντίστοιχα. Β) Εκπομπή φθορισμού σηματοδοτημένων μορίων SecA, σε μήκη κύματος από 400-600nm, όταν η διέγερση πραγματοποιείται στα 387nm. (a) Μίγμα ομοδιμερών μη σηματοδοτημένης και σηματοδοτημένης CMmal-SecA, σε αναλογία 1:1. (b) Μίγμα ομοδιμερών σηματοδοτημένης CMmal-SecA και σηματοδοτημένης FMmal-SecA, σε αναλογία 1:1. (c) Ετεροδιμερή SecA, που προκύπτουν από μίγμα σηματοδοτημένης CMmal-SecA και σηματοδοτημένης FMmal-SecA, σε αναλογία 1:1. (d) Μίγμα ομοδιμερών μη σηματοδοτημένης και σηματοδοτημένης FMmal-SecA, σε αναλογία 1:1.

βαθμίδωση σουκρόζης της μεταλλαγμένης SecA, κάνει ορατή την ύπαρξη μονομερούς πρωτεΐνης σε μεγάλο βαθμό. Αυτό όμως δεν αποκλείει και την παρουσία διμερούς μορφής σε μικρότερο ποσοστό (ανίχνευση κάτω από πιο ευαίσθητες συνθήκες), καθώς δεν δίνεται και η σταθερά διάστασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Μετρώντας λοιπόν τη μεταφορά ενέργειας από το ένα μονομερές στο άλλο, στο ετεροδιμερές της SecA, μετά από διαδοχική προσθήκη στο διάλυμα της πρωτεΐνης των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας μετατόπισης (προσθήκη εσωτερικών μεμβρανών *E.coli*, και προσθήκη μη σηματοδοτημένης SecA, και προσθήκη συμπλόκου SecB+ProOmpA, και προσθήκη νουκλεοτιδίων, και προσθήκη ενέργειας από βαθμίδωση πρωτονίων), διαπιστώθηκε ότι η SecA διατηρεί την διμερή της μορφή κατά τη διαδικασία της μετατόπισης, χωρίς όμως να αποκλείονται πιο δυσδιάκριτες αλλαγές της δέσμευσης των μονομερών που δεν ανιχνεύονται με την συγκεκριμένη μέθοδο

(Driessen, 1993). Εξάλλου η πληθώρα των ενζύμων στην *E.coli* λειτουργούν σαν ολιγομερή με το καταλυτικό τους κέντρο να εντοπίζεται μεταξύ των υπομονάδων του ολιγομερούς. Επιπλέον στην SecA έχουν εντοπιστεί επικρατείς αρνητικές μεταλλαγές, ενδογονιδιακοί καταστολείς, και θέσεις δέσμευσης ATP και προπρωτεΐνης που μπορούν να ανασυσταθούν από αλληλοεπικαλυπτόμενα κομμάτια της SecA, και υποδηλώνουν την δράση της ως ολιγομερούς. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι όχι μόνο οι δύο υπομονάδες της SecA μένουν συνδεδεμένες κατά την διαδικασία της μετατόπισης, αλλά χρειάζονται και οι δύο να είναι λειτουργικές για να επιτελεί η πρωτεΐνη το ρόλο της. Έτσι με την χρησιμοποίηση ετεροδιμερούς SecA, όπου όμως τώρα η μία υπομονάδα είναι αδρανικοποιημένη με αζίδιο, διαφαίνεται η ανικανότητα της SecA να επιτελεί την μετατόπιση προπρωτεΐνων από μεμβράνες *in vitro* (Driessen ., 1993).

Η λειτουργία όμως της SecA σαν διμερές μπορεί να εξηγήσει την διαδοχική και εν εξελίξει (processive) δράση της κατά την μετατόπιση κατά την μετατόπιση των πρωτεϊνών από μεμβράνες. Συγκεκριμένα κατά την διαδικασία της μετατόπισης, χρησιμοποιείται αρχικά η ενέργεια από την υδρόλυση του ATP μέσω της SecA, αλλά εν συνεχεία η μετατόπιση προχωρεί μέσω της ενέργειας που προκύπτει από την βαθμίδωση πρωτονίων στη μεμβράνη (Schiebel et al., 1991). Αν όμως η τελευταία μορφή ενέργειας δεν υφίσταται, η μετατόπιση πραγματοποιείται με μόνο την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP από την SecA, σε διαδοχικά στάδια. Έτσι αν δεχθούμε ότι μία προπρωτεΐνη δεσμεύεται ανά διμερή SecA (Hartl et al., 1991), η μεταφορά της από το ένα μονομερές στο άλλο θα μπορούσε να εξηγήσει την διαδοχική αλλά διακοπτόμενη δράση της πρωτεΐνης. Μία τέτοια διαδικασία όμως, προϋποθέτει ασυμμετρία των δύο υπομονάδων, που μπορεί να οφείλεται καταρχήν σε ασυμμετρία των θέσεων δέσμευσης για ATP (υψηλή συγγένεια ATP στο ένα μονομερές και χαμηλή στο άλλο, Karamanou et al., unpublished results), η οποία οδηγεί σε ασύμμετρη αλληλεπίδραση του κάθε μονομερούς με τους διάφορους υποκαταστάτες που μετέχουν στην μετατόπιση των πρωτεϊνών μέσα από τις μεμβράνες, και κατ' επέκταση και της μεταφερόμενης προπρωτεΐνης.

Μπορεί να μην πραγματοποιείται πλήρης διάσταση της SecA σε υπομονάδες κατά την διάρκεια της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, όπως φάνηκε με την μεταφορά ενέργειας συντονισμού με φασματοσκοπία φθορισμού, φαίνεται όμως ότι συμβαίνει αλλαγή του ολιγομερισμού της SecA μετά από αλληλεπίδραση είτε μόνο με φωσφολιπίδια είτε μόνο με το πεπτιδίο σηματοδότη της προπρωτεΐνης. Συγκεκριμένα με πειράματα χημικής διασύνδεσης βρέθηκε ότι όταν η SecA αλληλεπιδρά με φωσφολιπίδια (φωσφολιπίδια *E.coli*, όξινα φωσφολιπίδια, ή λιποσώματα ανασυστάμενα με SecYEG) μετατρέπεται σε μονομερές (Or et al., 2002). Επιπλέον με ανάλογα φωσφολιπιδίων με μακρούς ή κοντή αλυσίδα, με μεγάλη ή μικρή πολική ομάδα και με ποικιλία μη ιονικών απορρυπαντικών διαπιστώθηκε ότι είναι απαραίτητη η δημιουργία μικυλλίων από τα φωσφολιπίδια για να έχουμε διάσταση της SecA σε μονομερές (Benach et al., 2002). Έτσι με πειράματα αναλυτικής υπερφυοκεντρήσης, χημικής διασύνδεσης με γλουταραλδεύδη και με μέτρηση της ανισοτροπίας φθορισμού φάνηκε η σημασία της δημιουργίας μικυλλίων και ερμηνεύτηκε η ποικιλία της συνεργατικότητας αυτών για τον μονομερισμό της SecA. Σε συγκεντρώσεις λιπιδίων κοντά στις κρίσιμες συγκεντρώσεις δημιουργίας μικυλλίων (critical micellar concentration, cmc) δημιουργούνται συσσωματώματα πρωτομικυλλίων ετερογενούς σύστασης που επηρεάζουν την φαινομενική συνεργατικότητα στον μονομερισμό της SecA. Έτσι κατά την τιτλοδότηση της SecA με αυξανόμενη συγκέντρωση φωσφολιπιδίων παρατηρείται μείωση του σχετικού ολικού φθορισμού που παραπέμπει σε αύξηση της ανισοτροπίας (αφού μειώνεται ο χρόνος φθορισμού που μένει υπό διέγερση το σύνολο των τρυπτοφάνων). Εντούτοις διαπιστώνεται μεγάλη μείωση, κοντά στο μισό της ανισοτροπίας που σημαίνει ότι έχει αυξηθεί κατά πολύ ο συντελεστής περιστροφικής διάχυσης παράλληλα με την αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Επομένως πραγματοποιείται αύξηση της κινητικότητας της SecA με φωσφολιπίδια που δεν μπορεί να οφείλεται σε διάσταση των υποπεριοχών κάθε μονομερούς (μεγάλη μείωση της ανισοτροπίας σε σχέση με αυτή που παρατηρείται κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της SecA (που είδαμε προηγουμένως), αλλά εξηγείται από την διάσταση της SecA σε μονομερές. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν με πειράματα αναλυτικής υπερφυοκεντρήσης, αλλά και χημικής διασύνδεσης με γλουταραλδεύδη (GA). Η αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης σε κάθε πρωτομερές πάντως πρέπει να παρουσιάζει ομοιότητες με αυτή κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της SecA αφού μονομερής SecA από την επίδραση φωσφολιπιδίων δεν παρουσιάζει επιπρόσθετη αλλαγή στον φθορισμό αν υποβληθεί εν συνεχεία σε θερμική τιτλοδότηση.

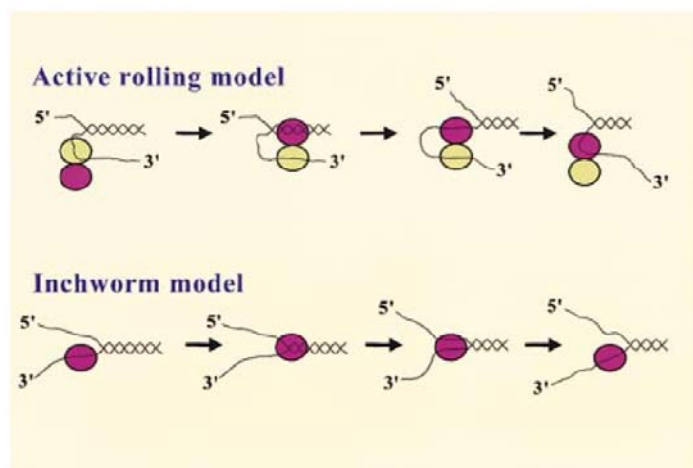
Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι αλληλεπίδραση της παραπάνω μονομερούς SecA με το πεπτιδίο σηματοδότη προπρωτεΐνης, οδηγεί σε επαναδιμερισμό της πρωτεΐνης. Αυτό συμβαίνει και γιατί παρατηρείται αύξηση του συντελεστού καθίζησης με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση, και γιατί αυξάνεται το διμερές με χημική διασύνδεση με GA, αλλά και γιατί παρατηρείται αύξηση του φθορισμού με τιτλοδότηση της SecA με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πεπτιδίου σηματοδότη, ενώ διαπιστώνεται και σιγμοειδής αύξηση της ανισοτροπίας. Η μέτρηση της σταθεράς διάστασης είναι  $K_d=14\mu\text{M}$  και ο συντελεστής Hill είναι 2 σε συμφωνία με συνεργατική διαδικασία μείωσης της κινητικότητας από επαναδιμερισμό της πρωτεΐνης μετά από δέσμευση πεπτιδίου σηματοδότη σε κάθε πρωτομερές. Πάντως η διαμόρφωση του διμερούς που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου σηματοδότη με την μονομερή SecA πρέπει να είναι διαφορετική από αυτή του αρχικού διμερούς αφού τόσο η αύξηση του φθορισμού όσο και της ανισοτροπίας δεν πλησιάζουν τις τιμές που παρατηρούνται με το αρχικό διμερές.

Από την άλλη μεριά η αλληλεπίδραση της διμερούς SecA με το πεπτιδίο σηματοδότη δεν οδηγεί παρά σε φτωχή αύξηση της τάσης αυτοσυγκρότησης της πρωτεΐνης, αφού παρατηρείται μικρή μετακίνηση της SecA προς μεγαλύτερη μοριακή μάζα, στο προφίλ διασποράς της μοριακής μάζας από την μέτρηση του συντελεστού καθίζησης. Όταν όμως η SecA αποκτήσει τη διαμόρφωση που την χαρακτηρίζει κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της τότε η αλληλεπίδραση με το πεπτιδίο σηματοδότη, οδηγεί σε ολιγομερισμό της πρωτεΐνης. Με πειράματα χημικής διασύνδεσης SecA και πεπτιδίου σηματοδότη στους  $37^\circ\text{C}$  δημιουργούνται μορφές υψηλότερης τάξης που δεν εισχωρούν στο πήκτωμα της ακρυλαμίδης, ενώ με σκέδαση του φωτός στο δείγμα της SecA στην ίδια θερμοκρασία ανιχνεύεται θολότητα πρόδηλη της δημιουργίας ολιγομερών μορφών. Επιπρόσθετα κατά την θερμική τιτλοδότηση της SecA με φασματοσκοπία φθορισμού διαπιστώνεται αύξηση της ανισοτροπίας μόνο όταν η πρωτεΐνη αποκτήσει την ενδόθερμη διαμόρφωση της που αντανάκλα επίσης την διαδικασία ολιγομερισμού. Η αύξηση της ανισοτροπίας δεν μπορεί να οφείλεται παρά μόνο σε μείωση της κινητικότητας της πρωτεΐνης (η μείωση του σχετικού ολικού φθορισμού παρουσία και απουσία πεπτιδίου σηματοδότη είναι η ίδια) και αυτή με την σειρά της σε ολιγομερισμό, αφού η μείωση είναι μεγάλη για να οφείλεται σε δυσκαμψία της πρωτεΐνης από απλή αλλαγή στη διαμόρφωση του μονομερούς. Η αλλαγή όμως στην κατάσταση ολιγομερισμού της SecA παρουσία πεπτιδίου σηματοδότη υπό συγκεκριμένη διαμόρφωση, ενισχύει την σημασία του σταδίου αυτού για την επίτευξη της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Επιπλέον το γεγονός ότι PrfD μεταλλαγές που υπόκεινται σε ενδόθερμη μετάπτωση σε χαμηλότερη θερμοκρασία παρουσιάζουν αύξηση της ανισοτροπίας στην ίδια χαμηλότερη θερμοκρασία, αποδεικνύει ότι ο ολιγομερισμός της SecA δεν οφείλεται απλά σε αλλαγές της δράσης του πεπτιδίου σηματοδότη σε αυξημένη θερμοκρασία. Η αλληλεπίδραση της SecA με προβληματικό πεπτιδίο σηματοδότη οδηγεί επίσης σε ολιγομερισμό της πρωτεΐνης, που όμως πραγματοποιείται σε υψηλότερη θερμοκρασία, καθώς η αντίδραση προφανώς καθυστερεί λόγω της μη ισχυρής δέσμευσης του προβληματικού πεπτιδίου σηματοδότη με την SecA (παρότι προβληματικό το πεπτιδίο σηματοδότη αλληλεπιδρά με την SecA που δέχεται πληθώρα διαφορετικών προπρωτεϊνικών κομματιών κατά την διάρκεια της διαδοχικής-σταδιακής διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες). Το ότι ο πολυμερισμός της SecA για τον οποίο μιλούμε δεν αντανάκλα στείρα συσσωμάτωση φαίνεται από την αντιστρεψιμότητα του. Έτσι αν θερμανθεί η SecA ώστε να αποκτήσει την διαμόρφωση της ενδόθερμης μετάπτωσης και προστεθεί πεπτιδίο σηματοδότη αυξάνεται η ανισοτροπία που όμως αντίστοιχα ελαττώνεται στην αρχική τιμή (επιβεβαιώνεται στο διμερές) αν προστεθούν φωσφολιπίδια που προκαλούν μονομερισμό της διμερούς SecA. Επειδή η SecA κατά την ενδοθερμική αλλαγή της διαμόρφωσης της παραμένει διμερής (Hunt et al., 2002) ο ολιγομερισμός της με την προσθήκη πεπτιδίου σηματοδότη οφείλεται στην δημιουργία καινούργιων επιφανειών αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονομερών που πιθανά παρουσιάζονται και κατά τον επαναδιμερισμό της μονομερούς από φωσφολιπίδια SecA, παρουσία πεπτιδίου σηματοδότη. Αξίζει να τονίσουμε ότι οι Or et al., 2002 βρήκαν μονομερισμό της SecA παρουσία πεπτιδίου σηματοδότη. Όμως όχι τόσο οι συνθήκες όσο η απόδοση της χημικής διασύνδεσης (η μοναδική μέθοδο προσέγγισης του προβλήματος που χρησιμοποιήσαν) είναι χαμηλή, και επομένως αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης από το πεπτιδίο περιορίζει την χημική διασύνδεση των υπομονάδων της SecA περαιτέρω.

Όλες οι παραπάνω αλλαγές στην ολιγομερική κατάσταση της SecA από τους διάφορους υποκαταστάτες αναμένεται να έχουν νόημα για την διαδικασία της μετατόπισης; Η απάντηση είναι ναι, γιατί η SecA καταρχήν όταν αποσύρεται από την SecYEG θέση σύμφωνα με το κυκλικό μοντέλο της μετατόπισης (που θα δούμε σε επόμενο Κεφάλαιο), και

δεν προστατεύεται από το υδρόφοβο περιβάλλον της διπλοστοιβάδας, μπορεί να αλληλεπιδρά με τα φωσφολιπίδια, και να παραμένει στη μεμβράνη διευκολύνοντας την έναρξη του επόμενου κύκλου της μετατόπισης. Εξάλλου έχει βρεθεί ότι η SecA αλληλεπιδρά άμεσα με τον υδρόφοβο πυρήνα της φωσφολιπιδικής διπλοστοιβάδας (Breukink et al., 1992) και επίσης ότι εισχωρεί στο εσωτερικό κυστιδίων ανιονικών φωσφολιπιδίων οπότε και σημαίνεται από φωτοενεργοποιούμενες ομάδες εντοπισμένες σε διάφορες θέσεις της αλυσίδας των υδρογονανθράκων των φωσφολιπιδίων (Ulbrandt et al., 1992). Από την άλλη έχει βρεθεί ότι λιπίδια που αποσταθεροποιούν την διπλοστοιβάδα επιταχύνουν την διαδικασία της μετατόπισης (van der Does et al., 2000). Αυτό θα μπορούσε να αντανάκλα την σημασία της αλληλεπίδρασης της SecA με τα φωσφολιπίδια για την προώθηση του κύκλου σε επόμενο στάδιο, καθώς τα λιπίδια αυτά διευκολύνουν την πρόσβαση της SecA στον υδρόφοβο πυρήνα των φωσφολιπιδίων (Ahn et al., 1998) και κατά συνέπεια επιταχύνουν την αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης από αυτή την αλληλεπίδραση. Από την άλλη μεριά και η αλλαγή του ολιγομερισμού της SecA, υπό συγκεκριμένη διαμόρφωση, από το πεπτιδίο σηματοδότη, δεν μπορεί παρά να αντανάκλα συγκεκριμένα βήματα της διαδικασίας της μετατόπισης. Καθώς η αλληλεπίδραση της SecA με το πεπτιδίο σηματοδότη είναι απαραίτητη για την έναρξη της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες, αναμένεται να προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης που θα προωθούν αυτή την διαδικασία. Μάλιστα έχουν εντοπιστεί περίπλοκες αλληλεπιδράσεις της SecA με το πεπτιδίο σηματοδότη καθώς παρατηρείται μείωση της ATPάσης του N68 παρουσία του πεπτιδίου (Triplett et al., 2001; Baud et al., 2002), αλλά αύξηση της λιπιδικής ATPάσης ολόκληρης της SecA (Miller et al., 1998; Wang et al., 2000), που υποδηλώνουν διαφορετική αλλαγή της SecA από το πεπτιδίο σηματοδότη σε διαφορετικό στάδιο της διαδικασίας μετατόπισης. Είναι πολύ πιθανόν λοιπόν ότι το ολιγομερικό καθεστώς της SecA αλλάζει κατά την διάρκεια της μετατόπισης από την αλληλεπίδραση με τους διάφορους υποκαταστάτες κάτι που ίσως θα έπρεπε να είναι αναμενόμενο από την διαφορετική ολιγομερική κατάσταση της SecYEG σε σχέση με αυτήν της SecA (όπως είδαμε στο Κεφάλαιο: Sec61/SecYEG κανάλι).

Οι παραπάνω μελέτες οδήγησαν στην υπόθεση ότι ούτε η μονομερής αλλά ούτε και η δύσκαμπτη διμερής μορφή της πρωτεΐνης αρκούν προκειμένου να έχουμε λειτουργική SecA. Το πιο πιθανό είναι ότι η SecA δουλεύει σύμφωνα με το "rolling model" των ελικασών (σχήμα 44) (Caruthers et al., 2002), σύμφωνα με το οποίο το ένα πρωτομερές δεσμεύεται σε



Σχήμα 44 : (Caruthers et al., 2002). Μοντέλλα δράσης των ελικασών (περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο)

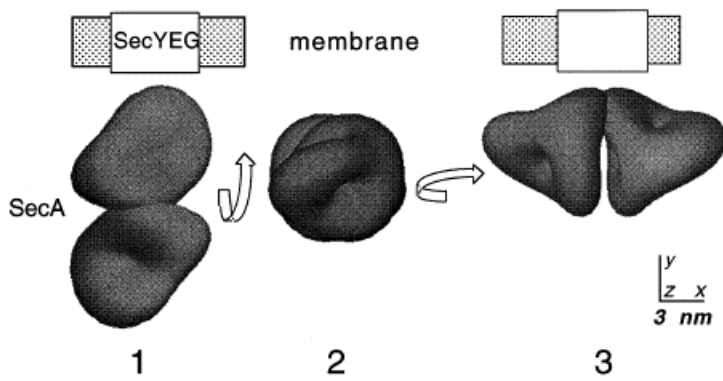
ένα μονόκλωνο τμήμα του δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, και ανακτά το δεύτερο πρωτομερές προς δέσμευση στο επόμενο νουκλεοτιδικό τμήμα με παρόμοιο τρόπο, σταθεροποιώντας το νουκλεοτίδιο στην μονόκλωνη κατάσταση. Υπέρ αυτού του μοντέλου είναι η διαπίστωση, ότι τόσο η NS3, όσο και η Rep ελικάσες, διμερίζονται όταν δεσμεύουν συγκεκριμένα και μόνο υποστρώματα DNA (και επομένως μόνο όταν αποκτούν συγκεκριμένη διαμόρφωση), ενώ και η UvrD SF1 ελικάση έχει διαπιστωθεί ότι δουλεύει σαν διμερές (Maluf et al., 2003). Έπειτα υπάρχουν και τα

παραπάνω αποτελέσματα ρύθμισης της ολιγομερικής κατάστασης της πρωτεΐνης από τους διάφορους υποκαταστάτες. Έτσι αντί να απαιτείται διαρκής δέσμευση της διμερούς SecA στη θέση της SecYEG κατά την διάρκεια των κύκλων εισαγωγής και εξαγωγής της από την μεμβράνη, ώστε όταν αφήνει την προπρωτεΐνη στο τέλος του ενός κύκλου να πιάνει το επόμενο προς μετατόπιση τμήμα στην αρχή του άλλου κύκλου, μπορεί το υπόστρωμα να μεταφέρεται από το ένα μονομερές στο άλλο. Επομένως στο τέλος του ενός κύκλου η προπρωτεΐνη μεταφέρεται στο δεύτερο πρωτομερές καθώς το πρώτο αποσύρεται από την μεμβράνη (π.χ μέσω του μονομερισμού που επιφέρουν τα φωσφολιπίδια) και όταν το τελευταίο αποκτήσει την κατάλληλη διαμόρφωση (π.χ αυτήν της ενδόθερμης μετάπτωσης)

παρουσία του πεπτιδίου σηματοδότη, ανακαλεί στη θέση της SecYEG το πρώτο μονομερές επιτυγχάνοντας κατά συνέπεια επιτυγχάνεται η διαδοχική και σταδιακή διαδικασία της μεταφοράς των πρωτεϊνών. Αντίθετα το “inchworm model” των ελικασών (σχήμα 44) δέχεται ότι το ένα πρωτομερές, αυτό με την μεγαλύτερη συγγένεια για το πολυνουκλεοτίδιο, αρκεί για να ξεδιπλώσει την διπλή του έλικα αν κινείται κατά μήκος του νουκλεοτιδίου, προς την ίδια κατεύθυνση, σπρώχνοντας την διπλή έλικα. Όταν πραγματοποιηθεί δέσμευση ATP τα δύο μονομερή ανταλλάσσουν συγγένεια για το νουκλεοτίδιο και δέσμευση του, μετά από την υδρόλυση ATP. Το γεγονός ότι δεν έχουν απομονωθεί με κρυστάλλωση μόνο ολιγομερείς μορφές των διαφόρων ελικασών, καθώς και το ότι από την ελεύθερη στην δεσμευμένη με ATP μορφή της PcrA, συμβαίνει μετάθεση μιας βάσης του συνδεδεμένου νουκλεοτιδίου, αποτελούν για πολλούς σαφείς ενδείξεις της δράσης του “inchworm model”. Όμως και από τα αποτελέσματα των Or et al., 2002, που προτείνουν την μονομερή μορφή της SecA ως την λειτουργική μορφή της κατά την διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών (αυτή η μονομερής SecA δεσμεύεται στη θέση της SecYEG και επιτελεί και την διαδικασία της μετατόπισης *in vitro*) δεν διαφαίνεται ότι συμβαίνει κάτι τέτοιο. Η πολύ χαμηλή δραστηριότητα *in vitro* της μονομερούς SecA που απομόνωσαν με έξι σημειακές μεταλλαγές προβάλλει αν μη τι άλλο την σημασία της διμερούς SecA για αποτελεσματική μετατόπιση. Εξάλλου δεν διαχωρίζουν την μετατόπιση *in vitro* μέσω της δράσης της SecA, από την μετατόπιση μέσω της ενέργειας από τη βαθμίδωση πρωτονίων. Επίσης αφού δεν δίνουν την σταθερά διάστασης για την μεταλλαγμένη SecA τίποτα δεν αποκλείει ότι αυτή δεν επαναδιμερίζεται σε κάποιο στάδιο της διαδικασίας της μετατόπισης.

Για την ίδια ανάγκη διερεύνησης του κυκλικού μοντέλλου δράσης της SecA έγινε προσπάθεια να γίνουν γνωστά όσο το δυνατόν περισσότερα για την δομή της SecA, το σχήμα και τις διαστάσεις της. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο η SecA καθώς υπόκειται σε κύκλους εισαγωγής και εξαγωγής από την μεμβράνη (Economou and Wickner, 1994; Economou et al., 1995), δίνει την δυνατότητα στην μετατόπιση να κινείται διαδοχικά πάνω στην προπρωτεΐνη. Δεν είναι γνωστό όμως, πως η SecA καταλύει την ανυσματική κίνηση του υποστρώματος. Η υπόθεση που προτείνεται, αναφέρει ότι η SecA συμπαρασύρει μαζί της το υπόστρωμα κατά την διάρκεια των κύκλων εισαγωγής της στη μεμβράνη. Είναι λοιπόν εντελώς απαραίτητη η γνώση της δομής της SecA και οι πρώτες επιτυχείς προσπάθειες όσον αφορά την εύρεση του σχήματος της, πραγματοποιήθηκαν με σκέδαση των ακτίνων X υπό μικρή γωνία, SAXS (small angle X ray scattering)(Shilton et al., 1998). Πρόκειται για μία μέθοδο με την οποία μπορεί κανείς να πάρει πληροφορίες πολύ γρήγορα σχετικά με το σχήμα μιας πρωτεΐνης σε διάλυμα, σε χαμηλή όμως ανάλυση σε σχέση με αυτήν που παίρνει κανείς από την κρυσταλλογραφία της πρωτεΐνης. Βρέθηκε λοιπόν ότι η διμερής SecA είναι ένα επιμηκυμένο μόριο με διαστάσεις 15X8 nm σε αντιπαράθεση με το πάχος της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας που είναι περίπου 4 nm και την διάμετρο της SecYEG που προβλέπεται να είναι 7 nm (σχήμα 46). Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας την συνάρτηση διασποράς του μήκους P(r) βρήκαν την ακτίνα περιστροφικότητας (Radius of gyration,  $R_g$ )  $R_g=4.47\pm 0.006$  nm η οποία αντιστοιχεί σε μακρύ μόριο. Η ακτίνα περιστροφικότητας για κάθε μονομερές είναι  $3.3\pm 0.1$  nm (σφαιρικά πρωτομερή) ενώ η απόσταση των κέντρων μάζας των μονομερών είναι  $\Delta d=5.9\pm 0.3$  nm, και διαθέτουν περιορισμένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης. Παλιότερη προσπάθεια εύρεσης του σχήματος της SecA με ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λεπτοεπιμεγμένων κρυστάλλων της πρωτεΐνης (Weaver et al., 1992) έλειξε άδοξα λόγω του ότι οι χάρτες προβολής ήταν ακατάλληλοι. Τελευταία επιτεύχθηκε η εύρεση της διαμόρφωσης της SecA σε υψηλή ανάλυση 2.7Å με κρυσταλλογραφία (Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003) με την οποία επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα του SAXS όσον αφορά το επιμηκυμένο μόριο και τις διαστάσεις του (σχήμα 45, 34 και 38).

Τόσο από τα πειράματα με το SAXS όσο και πολύ περισσότερο από την κρυσταλλική δομή της SecA εξελίσσονται οι απόψεις μας όσον αφορά την διαδικασία της μετατόπισης αλλά γεννιούνται και πολλαπλά ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό της. Από την δομή επιβεβαιώνεται ότι οι δύο πρωταρχικές περιοχές της SecA (N-/C-domain) αλληλεπιδρούν (Karamanou et al., 1999) και έτσι εξηγείται πως πρόσδεση ATP στην N-περιοχή επηρεάζει την σταθερότητα της C-περιοχής (Den Blaauwen et al., 1996). Έπειτα η τοποθέτηση της διμερούς πρωτεΐνης στην μεμβράνη μπορεί να είναι κάθετη ή και παράλληλη στο επίπεδο της, ενώ στο εσωτερικό της μπορεί να εισέρχεται μόνο το ένα πρωτομερές ή κεντρικά τμήματα του διμερούς. Σε κάθε περίπτωση πάντως ενδομοριακή ασυμμετρία που ενδέχεται να συμβάλλει στην διαδοχική δράση της SecA, είναι δυνατόν να επιτευχθεί. Επιπλέον το μεγάλο μέγεθος της SecA δεν μπορεί παρά να προκαλεί αλλαγές στο σχήμα και στη στοιχειομετρία της SecYEG κατά την είσοδο της στη μεμβράνη. Ξέρουμε ότι η SecA



προφυλλάσεται από τα φωσφολιπίδια στη παραπάνω φάση (Eichler et al., 1997; Van Voorts et al., 1998). Κάτι τέτοιο όμως δεν μπορεί να επιτευχθεί από ένα ετεροτριμερές της SecYEG αλλά από περισσότερα, όπως προτάθηκε και από τους Manting et al., 2000), και ισχύει στην

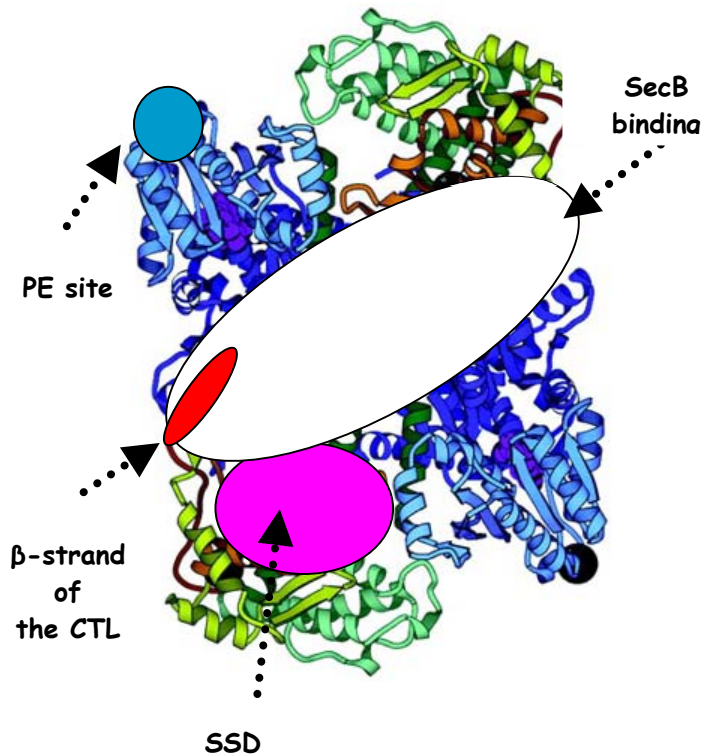
Σχήμα 45: (Shilton et al., 1998). Καθορισμός του σχήματος της SecA σε διάλυμα. Απεικόνιση του χαμηλής διακριτικότητας σχήματος-μοντέλου του μορίου της SecA, που αποτελείται από δύο μονομερή. Η SecA υπολογίζεται ότι είναι ένα επιμήκησμένο σωματίδιο με διαστάσεις 15X8 nm. Το παραπάνω σχήμα-μοντέλο της SecA απεικονίζεται σε τρεις διαφορετικές όψεις (1-3). Όψη 1: Ο άξονας δυαδικής συμμετρίας συμπίπτει με τον άξονα των Z (επίπεδο του χαρτιού), ενώ τα δύο μονομερή της SecA κατά μήκος του άξονα των Y; Μία περιστροφή 90° περί τον άξονα των X, οδηγεί στην όψη 2, όπου ο άξονας δυαδικής συμμετρίας συμπίπτει με τον άξονα των Y, και τα δύο μονομερή διαχωρίζονται κατά μήκος του άξονα των Z; Η όψη 3 είναι η όψη 2 στραμμένη κατά 90° γύρω από τον άξονα των Y, έτσι ώστε ο άξονας δυαδικής συμμετρίας συμπίπτει με τον άξονα των Y, και τα δύο μονομερή διαχωρίζονται κατά μήκος του άξονα των Z. Και στις τρεις πάντως περιπτώσεις ο προσανατολισμός της SecA σε σχέση με το επίπεδο της μεμβράνης είναι υποθετικός. Προκειμένου να γίνει σύγκριση των σχετικών μεγεθών, σχηματική αναπαράσταση μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας (σκιασμένο ορθογώνιο, πάχους 3.4-4nm, που περιέχει ένα υδρόφοβο πυρήνα ~ 3nm), και ενός τριμερούς SecYEG (άσπρο ορθογώνιο), σχεδιάζονται επίσης σε ανάλογη κλίμακα. Η διάμετρος του SecYEG υπολογίστηκε από τις κρυσταλλογραφικά καθορισμένες διαστάσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών, στις οποίες κάθε διαμεμβρανική έλικα καταλαμβάνει ~ 2.7nm<sup>2</sup>. Έτσι το SecYEG με στοιχειομετρία 1:1:1, που προβλέπεται ότι περιέχει 15 διαμεμβρανικές α-έλικες, υπολογίστηκε ότι θα καταλαμβάνει μία επιφάνεια ~ 40nm<sup>2</sup>, που αντιστοιχεί σε διάμετρο ~ 7nm.

περίπτωση του ευκαρυωτικού ομολόγου Sec61 (Hanein et al., 1996). Από την άλλη μεριά θα μπορούσε η είσοδος της SecA στη μεμβράνη να είναι λιγότερο έντονη απ' όσο παρουσιάζεται με τα πειράματα πρωτεόλυσης και να μην γίνεται παρά εισαγωγή στο εσωτερικό της εντοπισμένων τμημάτων των δύο πρωταρχικών περιοχών της SecA (N-/C-domain). Ένα εναλλακτικό μοντέλλο επίσης θα έβλεπε περιστροφική εισαγωγή στη μεμβράνη πότε του πρώτου και πότε του δεύτερου πρωτομερούς ενώ η ευλυγισία ενός τόσο μεγάλου μορίου σαν της SecA πιθανά να οφείλεται στην αλληλεπίδραση με τους διάφορους υποκαταστάτες που το οδηγούν σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας.

Σημαντικές πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης της SecA λαμβάνονται όπως είδαμε από την μελέτη της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης παρουσία νουκλεοτιδίων, αφού σύμφωνα με το κυκλικό μοντέλο της SecA η εισαγωγή και η εξαγωγή από την μεμβράνη ρυθμίζεται από την δέσμευση και υδρόλυση ATP και επομένως από τις διαφορετικές αλλαγές στη διαμόρφωση της SecA που προκαλούν τα διάφορα νουκλεοτίδια. Τόσο τα πειράματα με SAXS (Shilton et al., 1998) όσο και η ανάλυση της δομής της SecA απουσία και παρουσία ADP και μαγνησίου τόσο από το *Bacillus subtilis* (σχήμα 34), όσο και από το *Mycobacterium tuberculosis* (σχήμα 38), έδωσαν πληροφορίες και για την έκταση των αλλαγών στην διαμόρφωση της SecA παρουσία νουκλεοτιδίων. Έτσι όπως η ακτίνα περιστροφικότητας  $R_g$  είναι η ίδια απουσία και παρουσία διαφόρων ειδών νουκλεοτιδίων, και η δομή της SecA είναι περίπου η ίδια είτε υπάρχει είτε δεν υπάρχει ADP. Επομένως προκύπτει ότι η δέσμευση του νουκλεοτιδίου δεν προκαλεί εκτεταμένες αλλαγές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης. Προκαλούνται μάλλον περισσότερο ήπιες και πιο εντοπισμένες αλλαγές που ανιχνεύονται όπως είδαμε με θρυψινόλυση (αλλάζει η έκθεση μιας λούπας στην θρυψίνη) και φασματοσκοπία φθορισμού (αλλάζει η έκθεση στο νερό του συγκροτήματος των τρυπτοφάνων). Σε καμία περίπτωση πάντως δεν πρέπει να εκλειφθεί ότι οι όποιες αλλαγές δεν είναι σταθερές και ότι χρειάζονται πολλαπλοί κύκλοι υδρόλυσης, όπως κατά την διάρκεια της μετατόπισης, για να εδραιωθούν, μιας και η διαμόρφωση της SecA με ADP είναι σταθερή σε συνθήκες περιοριστικής πρωτεόλυσης στον πάγο (όπως είδαμε στο προηγούμενο Κεφάλαιο). Έτσι χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένη SecA με υψηλή βασική ATPάση δεν εντοπίζεται επίσης, καμία αλλαγή στην ακτίνα περιστροφικότητας  $R_g$  με τα SAXS πειράματα.



Από την κρυσταλλική δομή της SecA από το *Bacillus subtilis* μπορεί να μην απομονώνεται διμερές (οι κρύσταλλοι της SecA περιέχουν ένα πρωτομερές σε κάθε ασυμμετρική μονάδα), όμως με συγκεκριμένη κρυσταλλογραφική συμμετρία (151 6 6 P3112 PG312 TRIGONAL:-Y,-X,2/3-Z) προκύπτει ένα κρυσταλλογραφικό διμερές (σχήμα 46) το οποίο έχει μεγάλες πιθανότητες να είναι το φυσιολογικό διμερές που αναφέρθηκε προηγουμένως (Shilton et al., 1998; Woodbury et al., 2002), καθώς σ' αυτό απαντάται εκτεταμένος αριθμός διαμοριακών επαφών και μεγάλο εύρος των προστίπων στο διαλύτη επιφανειών εγλωβίζεται στο εσωτερικό του (σχήμα 46). Όλες οι θέσεις έκθεσης στο

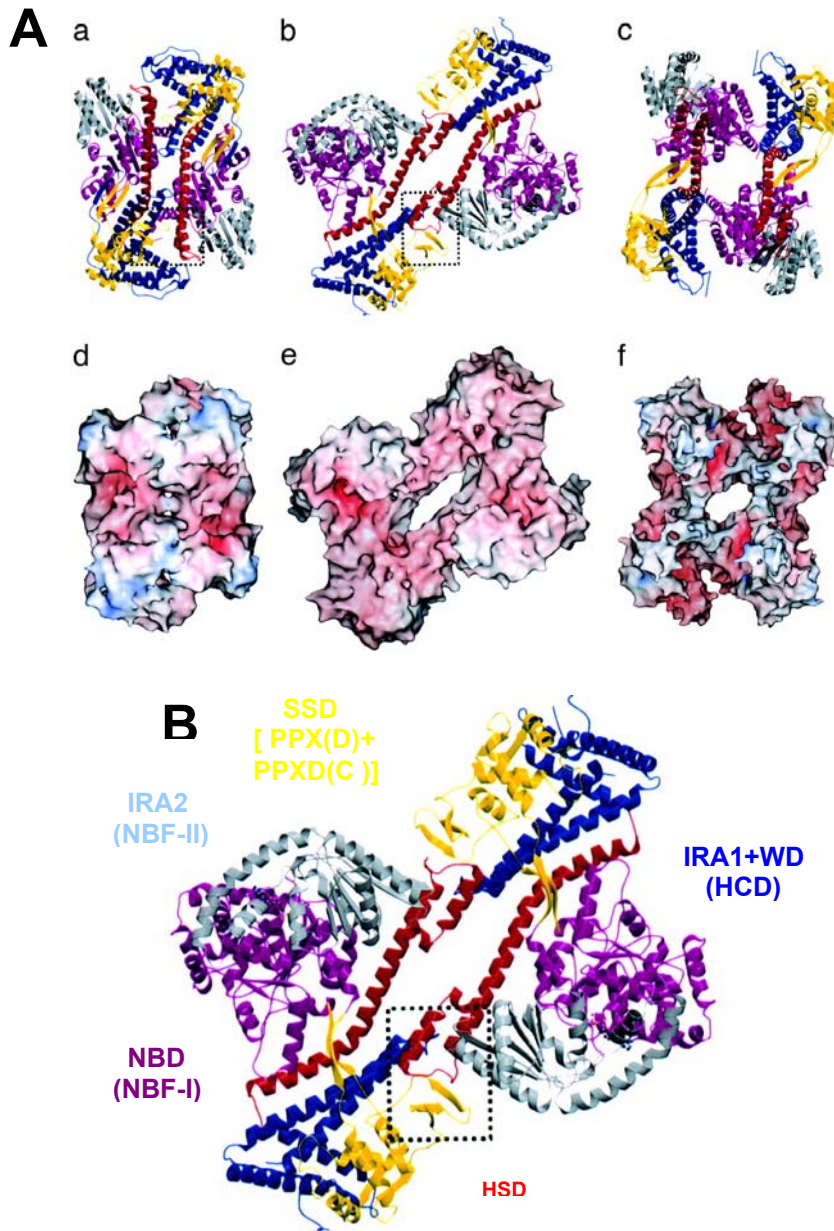


Σχήμα 46: (Hunt et al., 2002). Αναπαράσταση του διμερούς της SecA όπως προκύπτει μετά από εφαρμογή κρυσταλλογραφικής συμμετρίας. Οι χρωματισμοί είναι αντίστοιχοι με αυτούς στο σχήμα 63 που απεικονίζεται η bsSecA. Στο σχήμα απεικονίζονται οι θέσεις που εκτίθενται στο περίπλασμα (PE Sites), η SSD περιοχή, η β-αλυσίδα της CTL-περιοχής, και η θέση δέσμευσης της SecB.

περίπλασμα, PE sites (Periplasmically Exposed sites), αλλά και η προτεινόμενη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, τοποθετούνται πάνω ή κοντά στην μία επιφάνεια του διμερούς (σχήμα 46). Στην ίδια επιφάνεια και συγκεκριμένα στο κέντρο της, προβλέπεται ότι τοποθετούνται οι καρβοξυτελικές περιοχές της πρωτεΐνης όπου δεσμεύεται ο ψευδάργυρος. Αυτές αν και αναδιοργανώνονται στην κρυσταλλική τους δομή, η τοποθέτησή τους εξάγεται από την θέση των γειτονικών πρωτεϊνικών τμημάτων, δηλαδή των καρβοξυτελικών τμημάτων της CTL-περιοχής. Επομένως και οι δύο καρβοξυτελικές περιοχές δέσμευσης  $Zn^{2+}$  πιθανά προεκβάλουν από την ίδια επιφάνεια στην οποία εντοπίζονται οι PE θέσεις, και η θέση δέσμευσης του

υποστρώματος, και έτσι δύνανται να αλληλεπιδράσουν με το τετραμερές μόριο της SecB που κουβαλάει το υπόστρωμα.

Η παραπάνω διμερής δομή της bsSecA όμως μοιάζει και με την μία από τις δύο διμερείς μορφές της tbSecA όπως προκύπτουν κατευθείαν από την κρυσταλλική δομή της, αφού οι Sharma et al., 2003 επέτυχαν την κρυστάλλωση της διμερούς tbSecA, και έτσι σε κάθε ασύμμετρη μονάδα εντοπίζεται ένα διμερές και όχι μονομερές όπως στην περίπτωση της bsSecA (σχήμα 47). Συγκεκριμένα στην κρυσταλλική δομή τα μόρια που συνιστούν το διμερές, είτε απομακρύνουν από το διαλύτη  $1,290\text{\AA}^2$  της προσβάσιμης επιφάνειας κάθε υπομονάδας, και τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις επαφές των δύο μονομερών είναι κυρίως υδρόφοβα [σε συμφωνία με πρόσφατα δεδομένα με τα οποία τα διμερή της SecA δίστανται παρουσία απορρυπαντικών ή λιπιδίων, όπως είπαμε προηγουμένως (Or et al., 2002), είτε κρύβουν από το διαλύτη  $730\text{\AA}^2$  (αν αφαιρεθεί η κρυμμένη επιφάνεια των 17 αμινοξέων του φορέα έκφρασης που δεν ανήκουν στην φυσιολογική πρωτεΐνη), και οι επαφές είναι κυρίως πολικές (σχήμα 47c). Στην πρώτη περίπτωση μιλάμε για το A-B διμερές όπου οι αλληλεπιδράσεις εντοπίζονται μεταξύ των περιοχών SSD (PPXD), IRA2 (NBF-II), HSD και IRA1 (πιο αναλυτικά στα αποτελέσματα και συζήτηση), ενώ στη δεύτερη περίπτωση για το A-C διμερές όπου οι αλληλεπιδράσεις τώρα εντοπίζονται μεταξύ NBD (NBF-I), HSD και IRA1 (πιο αναλυτικά στα αποτελέσματα και συζήτηση) (σχήμα 47). Στην περίπτωση του διμερούς της bsSecA που προκύπτει από εφαρμογή κρυσταλλογραφικής συμμετρίας, οι δύο υπομονάδες διευθετούνται σε μία ενδιάμεση διαμόρφωση απ' αυτή που απαντώνται τα A-B



και A-C διμερή (σχήμα 47α) με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών NBD (NBF-I), IRA2 (NBF-II), SSD (PPXD), HSD, WD, και IRA1 (πιο αναλυτικά στα αποτελέσματα και συζήτηση). Παρόλα αυτά η μεσόφαση του διμερούς της *bsSecA* είναι παρόμοια με αυτή του A-B διμερούς. Η μεσόφαση όμως για την *bsSecA* είναι στην αντίθετη μεριά της β-πτυχωτής επιφάνειας σε σχέση με την μεσόφαση της *tbSecA*.

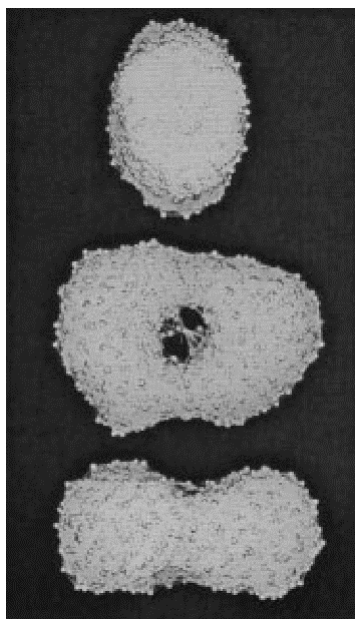
Από τους Sharma et al., 2003 προτείνεται ότι το διμερές A-B είναι πιο κοντά στην ενεργή μορφή της *tbSecA*. Και αυτό γιατί πέρα από τα παραπάνω οι δύο υπομονάδες στο παραπάνω διμερές σχετίζονται με μία σχεδόν τέλεια δυαδική συμμετρία, σε επίπεδο κάθετο στο επίπεδο που ορίζει ο ελλειπτικός πόρος που εντοπίζεται στο κέντρο του διμερούς (σχήμα

Σχήμα 47: (Sharma et al., 2003). Σχηματισμός διμερούς από την SecA ATPάση. Α) Στην πρώτη σειρά αναπαριστώνται με μορφή κορδέλας τα διμερή της *bsSecA* (a) και τα A-B (b) και A-C (c) διμερή της *tbSecA* χρωματισμένα ανάλογα με τις λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης. Ο κινητήρας της SecA περιλαμβάνει την μοβ περιοχή NBD (NBF-I) και την γκρι περιοχή IRA2 (NBF-II). Η περιοχή που συντελεί στην μετατόπιση των πρωτεϊνών (translocation domain; Sharma et al., 2003) περιλαμβάνει την κίτρινη προτεινόμενη περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος SSD [PPXD(N)+PPXD(C)] και την μπλε ελικοειδή περιοχή πυρήνα IRA1+WD. Η μακριά α-έλικα και μικρότερα τμήματα που συνιστούν την περιοχή HSD χρωματίζονται κόκκινα. Η μεσόφαση του διμερούς στην *bsSecA* (a) και στην *mtSecA* (b) μαρκάρεται μ' ένα κουτί και απεικονίζεται σε μεγένθυση στο επόμενο σχήμα 125. Στην κάτω σειρά απεικονίζονται οι μοριακές επιφάνειες των διμερών της πρώτης σειράς, με τον ίδιο προσανατολισμό. Το προτεινόμενο A-B διμερές (b, e) της *tbSecA* περιέχει ένα ελλειπτικό πόρο που πιστεύεται ότι ευθυγραμμίζεται με το διαμεμβρανικό κανάλι της SecYEG. Επίσης παριστάνεται το δεσμευμένο μόριο ADP-β-S με τη μορφή σφαίρας και ραβδίου. Β) Μεγένθυση του διμερούς A-B (b) της *mtSecA* (απέναντι σελίδα). Στο σχήμα αυτό σημειώνονται οι διάφορες περιοχές της SecA με διαφορετικά χρώματα απ' ότι προηγουμένως για την *bsSecA*.

47). Το μέγεθος του πόρου (10X35Å) είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται σε δομή ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από την SecYEG της *E.coli* (16X25Å) (Breyton et al., 2002) που κρυσταλλώθηκε επίσης σαν διμερές. Ο πόρος διευρύνεται και αλλάζει σχήμα κατά την μετάβαση της διμερούς SecA, από την διαμόρφωση της *bsSecA* προς την A-B και την A-C, αλλά και αντίστροφα, όπως φαίνεται στην αναπαράσταση της μοριακής επιφάνειας των παραπάνω διαμορφώσεων στο σχήμα 47. Είναι πολύ πιθανό λοιπόν ότι όλες οι παραπάνω

διευθετήσεις του διμερούς, A-B και A-C στην *tbSecA*, η διευθέτηση του διμερούς στην *bsSecA*, αλλά και όποιες άλλες προκύπτουν ακόμα, αποτελούν πιθανές διαμορφώσεις, που αποκτώνται κατά τον κύκλο ζωής του διμερούς της *SecA*, αφού είναι μία πρωτεΐνη με μεγάλη πλαστικότητα όπως είδαμε σε προηγούμενο Κεφάλαιο. Έτσι η διαμόρφωση της *SecA* στην περίπτωση του A-B διμερούς της *tbSecA*, προκύπτει από “γλύστρημα” των δύο μονομερών μεταξύ τους σε μία διαμόρφωση όπως αυτή της *bsSecA*, οπότε και δημιουργείται ένας πιο διευρυμένος πόρος, και μία πιο επιμηκησμένη επιφάνεια (σχήμα 47). Εν συνεχεία ενώ ο διευρυμένος πόρος μεταξύ των δύο μονομερών διατηρείται, απλά αλλάζει σχήμα, η επιφάνεια του μορίου από επιμηκησμένη, στρογγυλοποιείται και καταλήγουμε στην A-C διαμόρφωση του διμερούς της *tbSecA* (σχήμα 47).

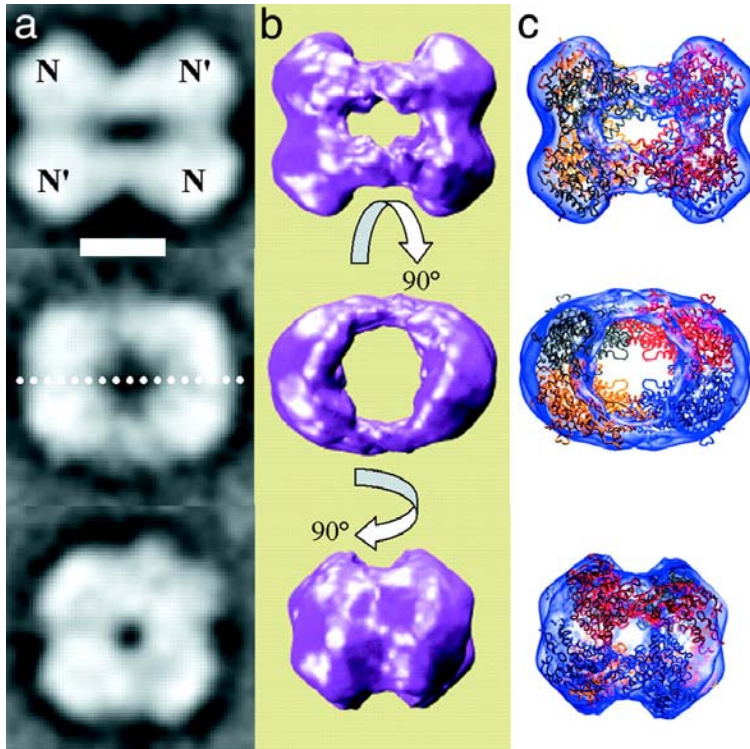
Σημειώνεται βέβαια ότι δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η *SecA* λειτουργεί σαν μονομερές (Or et al., 2002) ή σαν τετραμερές (Dempsey et al., 2002). Συγκεκριμένα οι Dempsey et al., 2002 με πειράματα μοριακής διήθησης, αναλυτικής υπερφυγοκέντρησης και SAXS, διαπίστωσαν ότι ο DEAD κινητήρας (N68) αυτοσυγκροτείται, για να σχηματίσει ένα τετραμερές μόριο σε διάλυμα (σχήμα 48). Πρότειναν δηλαδή ότι η απομάκρυνση της



Σχήμα 48: (Dempsey et al., 2002). Απεικόνιση του σχήματος του τετραμερούς N68 από δεδομένα με τη μέθοδο SAXS.

καρβοξυτελικής C-περιοχής, διευκολύνει τον σχηματισμό μιας υψηλότερης τάξης δομή της *SecA*. Αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο ότι η *SecA* διμερίζεται μέσω της καρβοξυτελικής περιοχής της (Hirano et al., 1996), ενώ μετά την παρατήρηση της κρυσταλλικής δομής της, τόσο από το *B.subtilis* όσο και από το *M.tuberculosis* (σχήματα 46, 47), διαφαίνεται ότι στον διμερισμό της συμμετέχουν και άλλες περιοχές του μορίου όπως η SSD, NBD και IRA2 (υποπεριοχές του DEAD (N68) κινητήρα), για τις οποίες θα μιλήσουμε αναλυτικότερα στη συζήτηση-αποτελέσματα. Επομένως ο τετραμερισμός του N68 δεν είναι ανεπιβεβαιωτός, αλλά μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις αλληλεπιδράσεις των παραπάνω SSD, NBD και IRA2 υποπεριοχών. Μάλιστα οι Dempsey et al., 2002 έδειξαν ότι η διαδικασία αυτοσυγκρότησης του N68, μπορεί να απεικονιστεί σαν μία ισορροπία μονομερούς-τετραμερούς με  $K_D=63 \mu\text{M}^3$ , (όπου  $K_D=[\text{μονομερές}]^4/[\text{τετραμερές}]$ ). Αυτό έχει σαν συνέπεια την παρουσία του τετραμερούς σαν το κύριο είδος N68 σε μέτριες συγκεντρώσεις του, όπως 10 $\mu\text{M}$  ή μεγαλύτερες. Οι υδροδυναμικές ιδιότητες του μονομερούς N68, διαδεικνύουν ότι διαθέτει σφαιρικό σχήμα, σε αντίθεση με το τετραμερές N68 που έχει ελλειψοειδής εμφάνιση, όπως φαίνεται στο σχήμα 48. Εξάλλου ανάλυση των SAXS δεδομένων, υποδηλώνει ότι το τετραμερές N68 είναι μία πεπλατισμένη δίλοβη δομή με διαστάσεις 13.5 nm x 9.0 nm x 6.5 nm που περιέχει ένα κεντρικό πόρο (σχήμα 48).

Από την άλλη μεριά τρισδιάστατη ανασύσταση της *tbSecA* με ηλεκτρονική μικροσκοπία πάλι από τους Sharma et al., 2003, έδειξε ότι η *tbSecA* σχηματίζει τετραμερές με συμμετρία D2 (σχήμα 49). Από την μελέτη του διμερούς στην πλάγια όψη 1 και 2 αντίστοιχα, προκύπτει ότι η μία επιφάνεια του είναι κυρτή, ενώ η άλλη είναι κοίλη. Στην κυρτή επιφάνεια οι πρωτεϊνικές αλυσίδες εκτείνονται μέχρι ~25Å επάνω από το επίπεδο του πόρου. Από την άλλη οι θέσεις δέσμευσης ATP/ADP εκτείνονται στον διαλύτη στην εξωτερική στεφάνη του διμερούς. Τελικά μετά από την μελέτη των δύο επιφανειών του διμερούς οι Sharma et al., 2003, πρότειναν ότι η *SecA* αγκυροβολεί στην *SecYEG* θέση μέσω της κοίλης επιφάνειάς της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να τοποθετείται η C-περιοχή του κάθε μονομερούς σε επαφή οπότε και τοποθετείται η C-περιοχή του κάθε μονομερούς σε επαφή με το *SecYEG* (σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Snyder et al., 1997; Karamanou et al., 1999), ενώ δίνεται και η δυνατότητα αλληλεπίδρασης και με την IRA2 (NBF-II) περιοχή (σε συμφωνία με τους Dapic and Oliver, 2000; Sianidis et al., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Αντίθετα η περιοχή δέσμευσης της προπρωτεΐνης στην οποία μεταφέρεται το υπόστρωμα από την *SecB* εντοπίζεται στην κυρτή μεριά του διμερούς. Στην ίδια όμως μεριά με την προτεινόμενη θέση δέσμευσης της προπρωτεΐνης εντοπίζονται οι θέσεις που εκτείνονται στο περίπλασμα καθώς και τα καρβοξυτελικά άκρα της *SecA* όπου δεσμεύεται η *SecB*, όπως πρότειναν οι Hunt et al., 2002 για την *bsSecA* βλέπε και συζήτηση αποτελέσματα). Οι Sharma et al., 2003 μάλιστα, πρότειναν ένα μοντέλλο (υποθετικό βέβαια) σύμφωνα με το

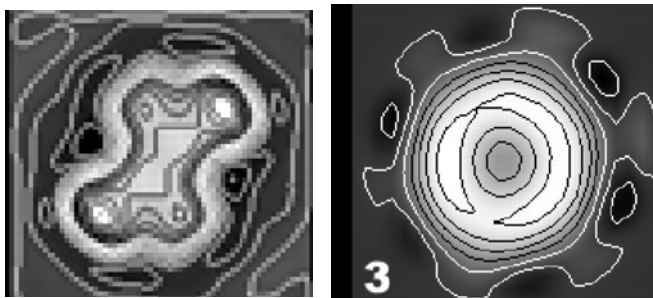


οποίο οι προπρωτεΐνες εισέρχονται μέσω του πόρου του διμερούς στο SecYEG κανάλι, το οποίο δεν προϋποθέτει μεγάλες αλλαγές στην διαμόρφωση της SecA (βλέπε επόμενο Κεφάλαιο στο οποίο αναλύεται το μοντέλο δράσης της SecA πρωτεΐνης κατά την μετατόπιση των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Wang et al., 2003 επεκτείνουν την άποψη των Watanabe et al., 1990, σύμφωνα με την οποία, η SecA από μόνη της μπορεί να συντελεί στην μετατόπιση διαφόρων πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, έδειξαν δημιουργία ενδεχόμενων καναλιών αποκλειστικά και

Σχήμα 49: (Sharma et al., 2003). Ανασύσταση της *mtSecA* μετά από ανάλυση μοναδικών κομματιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία (EM) (single particle analysis) και αντιστοίχιση με την κρυσταλλική της δομή. α) Προβολές μέσου όρου της *tbSecA*. β) Μετατροπή επιφάνειας της τρισδιάστατης ανασύστασης της πρωτεΐνης με EM. γ) Αντιστοίχιση του τρισδιάστατου EM χάρτη με την κρυσταλλική δομή. Οι σειρές από πάνω προς τα κάτω αντιπροσωπεύουν τις τρεις σημαντικότερες προβολές της πρωτεΐνης: πλάγια όψη 1, πλάγια όψη 2, και end-on όψη. Για ευκολία προσανατολισμού στην πλάγια όψη 1 σημειώνονται οι πυκνότητες που συνεισφέρουν στις περιοχές κινητήρα (το N διμερές βρίσκεται επάνω και το N' διμερές κάτω από το επίπεδο του χαρτιού), ενώ η μεσόφαση διμερούς-διμερούς εντοπίζεται στο επίπεδο του χαρτιού. Στην πλάγια όψη 2 η μεσόφαση διμερούς-διμερούς σημειώνεται με μία διακεκομμένη γραμμή

μόνο από SecA. Συγκεκριμένα με ηλεκτρονική μικροσκοπία της SecA παρουσία μονοστοιβάδων φωσφολιπιδίων παρατήρησαν δύο χαρακτηριστικές δομές. Η μία είναι επιμήκησμένη και έχει σχήμα καμπάνας (σχήμα 50), ενώ η άλλη παρουσιάζει τη δομή δαχτυλιδιού (σχήμα 50). Η τελευταία δομή φέρει τρύπες 3-6nm (χωρίς χρώση), και παρατηρήθηκε και με Atomic force



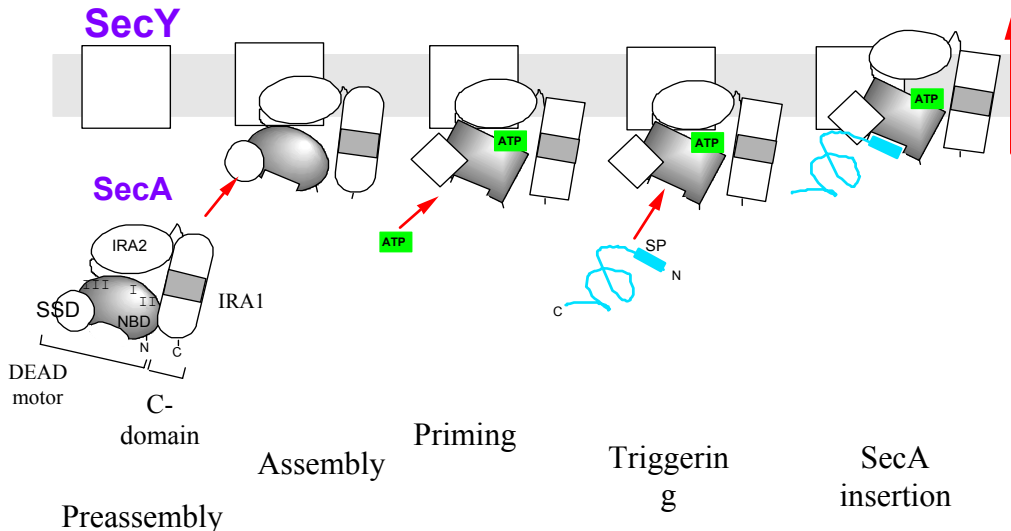
μικροσκοπία. Επειδή ακριβώς αυτές οι δομές-δαχτυλίδια εμφανίζονται μόνο παρουσία φωσφολιπιδίων, ενώ δεν παρατηρούνται στο διάλυμα, ή παρουσία αφόρτιστης φωσφατίδουλοχολίνης, πιθανά σχηματίζουν τον πυρήνα του πόρου μέσα από τον οποίο οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες εξέρχονται από τις βακτηριακές μεμβράνες.

Σχήμα 50: (Qiang et al., 2003). Απεικόνιση δομών της SecA παρουσία λιπιδικών μονοστοιβάδων *E.coli*. Συγκεκριμένα η SecA επωάζεται στους 4°C με τις παραπάνω μονοστοιβάδες και στη συνέχεια υπόκειται σε αρνητική χρώση. Παρουσιάζονται μεγενθύσεις των σωματιδίων με μορφή καμπάνας και δαχτυλιδιού (αριστερά και δεξιά αντίστοιχα), μετά από ανάλυση μοναδικών σωματιδίων (single particle analysis) και εύρεση μέσων όρων



## 1.2.H. Η μηχανή της μεταθετάσης επί το έργο

Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα μπορεί να διατυπωθεί η ακόλουθη σειρά διαδοχικών βημάτων που συνιστούν το μοντέλο μεταφοράς πρωτεϊνών διαμέσου του βακτηριακού Sec μονοπατιού (σχήμα 51).



Σχήμα 51: (Economidou, 2002). Στάδια κατά τη μεταφορά πρωτεϊνών μέσω του βακτηριακού Sec μονοπατιού

Α) Στάδιο **“προσυγκρότησης της μεταθετάσης”**. Η SecA στο κυτταρόπλασμα υδρόλυσε ATP (Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001) αλλά μόνο σε χαμηλά επίπεδα (Βασική ATPάση-IRA1 switch, Karamanou et al., 1999), καθώς το παραγόμενο ADP δεν μπορεί να απελευθερωθεί από την πρωτεΐνη (Sianidis et al., 2001), και έτσι η SecA μένει σε μια αδρανή αλλά θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση (den Blaauwen et al., 1996; Sianidis et al., 2001). Αυτή η διαμόρφωση της SecA πρωτεΐνης έχει διαπιστωθεί ότι είναι περισσότερο συμπαγής (den Blaauwen et al., 1996; Karamanou et al., 1999), αλλά παρόλα αυτά δεν συντελεί σε μεγάλη αλλαγή του σχήματος της (Shilton et al., 1998; Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003). Στο κυτταρόπλασμα όμως η SecA μπορεί να αλληλεπιδράσει απουσία ενέργειας, με το σύμπλοκο υποστρώματος-SecB (Lecker et al., 1990; Shinkai et al., 1991; VanVoorst et al., 2000; Roos et al., 2001; Fekkes et al., 1997), αν και με χαμηλή συγγένεια (den Blaauwen et al., 1997; Baud et al., 2002), και δημιουργούνται έτσι σύμπλοκα SecA-υποστρώματος-SecB.

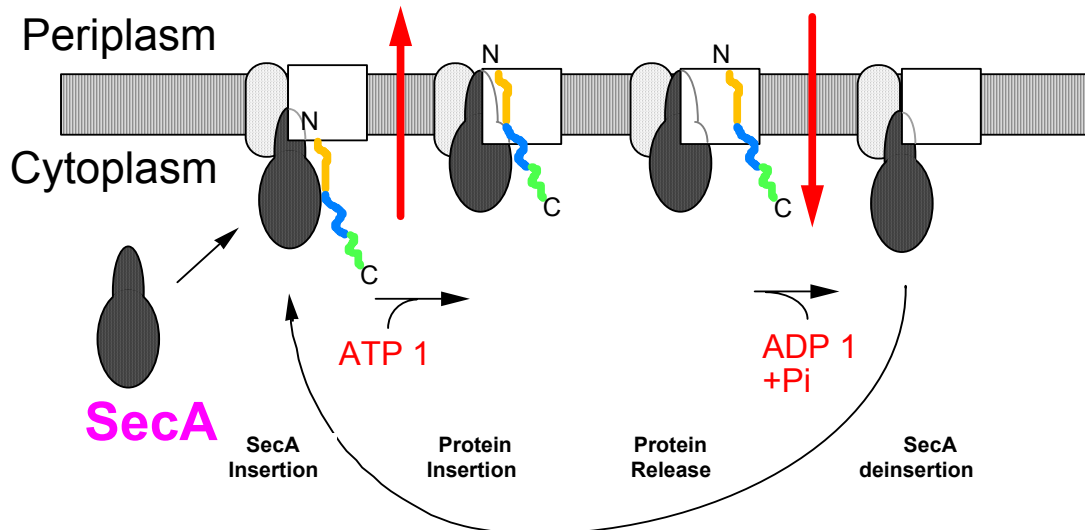
Β) Στάδιο **“συγκρότησης της μεταθετάσης στη μεμβράνη”**. Η SecA από το κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στη μεμβράνη λόγω της συγγένειας που έχει για τα ανιονικά φωσφολιπίδια και σαρώνοντας την λιπιδική διπλοστοιβάδα προσδένεται στις SecYEG θέσεις για τις οποίες διαθέτει αυξημένη συγγένεια, γύρω στα 20-40 nM (Hartl et al., 1990), οπότε και συγκροτείται το σύμπλοκο της μεταθετάσης στη μεμβράνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι πιθανότατα η SecA δεσμεύεται στη μεμβράνη με την βοήθεια του DEAD κινητήρα (Dapic and Oliver, 2000) αν και η συγγένεια αυξάνεται μέχρι και τέσσερις φορές παρουσία της C-περιοχής (βλέπε αποτελέσματα-συζήτηση). Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να μεταφέρονται στη SecYEG θέση σύμπλοκα SecA με υποστρώματα και SecB.

Γ) Στάδιο **“προενεργοποίησης της μεταθετάσης”**. Όταν η SecA προσδεθεί στην SecYEG θέση, αυξάνεται η υδρόλυση ATP από την SecA (Μεμβρανική ATPάση, Lill et al., 1990) καθώς και η συγγένεια της SecA για τα διάφορα υποστρώματα (Hartl et al., 1990). Αυτό συμβαίνει διότι όταν η SecA έρθει στη SecYEG θέση, προτείνεται ότι ο IRA1 διακόπτης αδρανοποιείται μερικώς και έτσι αυξάνεται και ο ρυθμός υδρόλυσης του ATP (Karamanou et al., 1999) και η συγγένεια για το πεπτιδίο σηματοδότη, (Baud et al., 2002). Δημιουργείται έτσι μία προενεργοποιημένη (primed) μεταθετάση που διαθέτει ενισχυμένη ικανότητα δέσμευσης για τα σύμπλοκα υποστρώματος-SecB της τάξεως των 40 nM (Hartl et al., 1990; den Blaauwen et al., 1997), οπότε και σχηματίζονται τριτοταγή σύμπλοκα SecA-υποστρώματος-SecB στις SecYEG θέσεις.

Δ) Στάδιο **“ενεργοποίησης της μεταθετάσης”**. Με την δέσμευση των υποστρωμάτων στη SecA η ATPάση αυξάνεται ακόμα περισσότερο, ATPάση της μετατόπισης (Translocation ATPase, Lill et al., 1990). Μπορεί ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της SecA να μην είναι γνωστός, αναμένεται όμως τώρα η κατασταλτική δράση του IRA1 διακόπτη να έχει διακοπεί

εντελώς. Από την άλλη λόγω των αλλαγών που επιφέρει η δέσμευση του υποστρώματος στη SecA, αναμένεται να χαλαρώνει η αλληλεπίδραση NBD-IRA2 (Sianidis et al., 2001), και έτσι να διεγείρεται η απελευθέρωση του νουκλεοτιδίου (Shinkai et al., 1991) και να αυξάνεται η υδρόλυση του ATP. Είναι πολύ πιθανό ότι τόσο η δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη (Miller et al., 1998), όσο και της ώριμης περιοχής του υποστρώματος (Basilana et al., 1992) δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς στην ενεργοποίηση της ATPάσης μετά την μεταφορά τους στην SecA (Fekkes et al., 1998). Το πεπτιδίο σηματοδότη όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο εμποδίζει την υδρόλυση του ATP (Baud et al., 2002), ενώ παράλληλα αυξάνει την συγγένεια για την ώριμη περιοχή του υποστρώματος η οποία και επάγει την διαδικασία της υδρόλυσης.

Ε) Στάδιο "σύγχρονης εισαγωγής SecA και προπρωτεΐνης στη μεμβράνη" (σχήμα 52). Μόλις



Σχήμα 52: (Economou and Wickner, 1994). Κυκλικό μοντέλο εισαγωγής και εξαγωγής της SecA στη μεμβράνη καθώς δεσμεύεται και υδρολύεται ATP αντίστοιχα. Ταυτόχρονα με την εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη συμπαρασύρεται τμήμα του υποστρώματος (πορτοκαλί τμήμα). Το τμήμα αυτό, με την υδρόλυση του ATP απελευθερώνεται από την SecA, η οποία και εξάγεται από τη μεμβράνη. Με την πρόσδεση εκ νέου ATP από την SecA, ξεκινά ένας καινούργιος κύκλος εισαγωγής της στη μεμβράνη, και μεταφέρεται το επόμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του υποστρώματος στη μεμβράνη (μπλε τμήμα). Επαναλαμβανόμενοι τέτοιοι κύκλοι είναι απαραίτητοι προκειμένου να μεταφερθεί ολόκληρο το υπόστρωμα στην άλλη πλευρά του κυττάρου.

η SecA δεσμεύσει ATP αποκτά μία χαλαρή διαμόρφωση σε διάλυμα (σε σχέση με τη συμπαγή διαμόρφωση παρουσία ADP) (den Blaauwen et al., 1996; Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001), ενώ στη SecA που είναι δεσμευμένη στη SecYEG θέση στη μεμβράνη, παρουσία υποστρώματος, η δέσμευση ATP, προκαλεί τέτοια αλλαγή στη διαμόρφωση, που της επιτρέπει να εισχωρήσει μέσα στη μεμβράνη (SecA insertion) στη θέση SecYEG (Economou and Wickner 1994; Kim et al., 1994; Eichler and Wickner 1997). Αυτή η αλλαγή στη διαμόρφωση της SecA έχει διαπιστωθεί όχι μόνο κατά την έναρξη της μεταφοράς των πρωτεϊνών από την μεμβράνη, αλλά και κατά την μετακίνηση προχωρημένων ενδιάμεσων μετατόπισης (Economou, αδημοσίευτα αποτελέσματα) γεγονός που ενισχύει τη σημασία της διαμόρφωσης αυτής για την διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών γενικότερα. Οι περιοχές της SecA που εισέρχονται στη μεμβράνη εντοπίζονται και στην περιοχή του DEAD κινητήρα αλλά και στην καρβοξυτελική περιοχή C-περιοχή (Economou and Wickner 1994; Eichler and Wickner 1997; Chen et al., 1998). Για να επιβεβαιωθεί όμως η ενσωμάτωση στη μεμβράνη σχεδόν ολόκληρης της SecA πρωτεΐνης, χρειάζονται ήπιες (όχι πρωτεόλυση που έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί) βιοφυσικές μέθοδοι. Έχει διαπιστωθεί ότι κατά την εισχώρηση της SecA στη μεμβράνη ορισμένες περιοχές της εκτίθενται στην περιπλαμική μεριά της μεμβράνης (Kim et al., 1994; Ramamurthy and Oliver 1997), ενώ παράλληλα εκτεταμένες περιοχές της αποκλείονται από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Eichler et al., 1997; van Voorst et al., 1998). Εκτός από τη δέσμευση του ATP και η δέσμευση που πεπτιδίου σηματοδότη φαίνεται να επάγει την προσχώρηση της SecA στη μεμβράνη, αφού όπως ειπώθηκε προηγουμένως αναστέλλει την υδρόλυση του ATP. Η δράση της SecB πρωτεΐνης περιορίζεται στην πιθανή ρύθμιση των αρχικών αλληλεπιδράσεων της SecA με το νουκλεοτίδιο (Miller et al., 2002), διότι μόλις η SecA εισέλθει στη μεμβράνη σταματάει να είναι

χρήσιμη και αποδεσμεύεται από αυτήν (Fekkes et al., 1998). Πρέπει να σημειωθεί ότι η SecA έχει παρατηρηθεί ότι εισέρχεται στη μεμβράνη, σε χαμηλά έστω ποσά, ακόμα και απουσία των διαφόρων υποκαταστατών (νουκλεοτιδίων και υποστρωμάτων, Economou and Wickner, 1994), ενώ επίσης έχει βρεθεί ότι τμήματα της SecA εκτίθενται στο περίπλασμα απουσία της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες (Kim et al., 1994; Van der Does et al., 1996; Ramamurthy and Oliver, 1997). Στην περίπτωση αυτή η SecA πιθανά υφίσταται τροποποιημένη αλλαγή στη διαμόρφωση της, που της επιτρέπει να εισχωρεί στη μεμβράνη, αλλά δεν την προστατεύει από την πρωτεάση, ενώ μπορεί να βρίσκεται σε στενότερη αλληλεπίδραση με λιπίδια, όπως άλλωστε έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει από τους Ulbrandt et al., 1992; Breukink et al., 1995; Chen et al., 1996).

Στην εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη όμως φαίνεται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο και διάφορα άλλα συστατικά της μεταθετάσης. Συγκεκριμένα όπως έχει διατυπωθεί σε προηγούμενα κεφάλαια τόσο η SecG (Nishiyama et al., 1996; Duong and Wickner 1997a) όσο και το σύμπλοκο SecDF (Economou et al., 1995; Duong and Wickner 1997b), διευκολύνουν την παραπάνω διαδικασία σταθεροποιώντας την εισερχόμενη στη μεμβράνη μορφή της SecA, με μηχανισμό όμως που δεν είναι ακόμα γνωστός. Από την άλλη μεριά και το μεταφερόμενο διαμέσου της μεμβράνης υπόστρωμα έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται σε χημική διασύνδεση τόσο με τη SecA όσο και με την SecY (Joly and Wickner, 1993). Ταυτόχρονα όμως με τη δέσμευση ATP από την SecA και την αλλαγή στη διαμόρφωση που υφίστανται τα διάφορα συστατικά της μεταθετάσης, έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει και μετακίνηση 20-30 αμινοξέων κατά μήκος της μεμβράνης (Schiebel et al., 1991; Joly and Wickner 1993; Economou and Wickner 1994; Van der Wolk et al., 1997), γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η SecA κατά την εισχώρησή της στη μεμβράνη συμπαρασύρει και τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του υποστρώματος (Economou et al., 1994, 1995). Έτσι κατά την έναρξη της διαδικασίας μεταφοράς του υποστρώματος η αμινοτελική αλληλουχία που περιέχει το πεπτιδίο σηματοδότη (20-30 αμινοξέα) σχηματίζει λούπα με τα απόμεινα 20-30 αμινοξέα της προπρωτεΐνης (Schiebel et al., 1991). Μολονότι η SecA πρέπει να αποτελεί το κύριο συστατικό της παραπάνω αντίδρασης εισαγωγής των τμημάτων της προπρωτεΐνης στη μεμβράνη, η αντίδραση του πεπτιδίου σηματοδότη με υδρόφοβες επιφάνειες της μεταθετάσης και με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Arkowitz and Bassilana, 1994), μπορεί να είναι επίσης σημαντικός. Σε πιο προχωρημένα στάδια της μετατόπισης και αφού έχει αποκοπεί το πεπτιδίο σηματοδότης, η ίδια κίνηση της SecA λόγω πάλι της δέσμευσης του ATP, οδηγεί σε εισαγωγή στη μεμβράνη των επόμενων 20-30 αμινοξέων της προπρωτεΐνης (Schiebel et al., 1991; Joly and Wickner, 1993; Uchida et al., 1995; Sato et al., 1997).

Αξίζει να σημειώσουμε ότι επειδή πλήρης εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη στη θέση SecYEG μπορεί να πραγματοποιηθεί και με μόνο μη υδρολυόμενα νουκλεοτίδια, απουσία υποστρώματος (Economou et al., 1995), η παρουσία του ίδιου του υποστρώματος τουλάχιστον μηχανιστικά και ενεργειακά δεν πρέπει να είναι απαραίτητη για το στάδιο της εισαγωγής της SecA στη μεμβράνη. Με την χρησιμοποίηση μεταλλαγμένων SecA, μη υδρολυόμενων αναλόγων ATP, και με τον καθορισμό των βιοχημικών και κινητικών απαιτήσεων της παραπάνω αντίδρασης, οι Economou and Wickner, 1994, πρότειναν ότι οι δύο υποαντιδράσεις, της εισαγωγής της SecA στη μεμβράνη και της περιορισμένης προς τα εμπρός μετακίνησης του υποστρώματος είναι στενά συνδεδεμένες. Πως όμως η SecA και η SecY αναγνωρίζουν και μεταφέρουν διαμέσου της μεμβράνης μία τεράστια ποικιλία υποστρωμάτων αποτελεί αντικείμενο ερεύνης, όπως και η διασαφήνιση του περιβάλλοντος στο οποίο εισέρχεται η SecA, μία πρωτεΐνη χωρίς συνεχή υδρόφοβα τμήματα, μετά την πρόσδεση του ATP. Ανικανότητα χημικής διασύνδεσης τόσο της N- όσο και της C- περιοχής της SecA από χημικό διασυνδετή προσδεδεμένο στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Eichler et al., 1997) αποτελεί απλά και μόνο ένδειξη της μη γειννίας της SecA με λιπίδια, τόσο κατά την εισαγωγή όσο και κατά την εξαγωγή της από την μεμβράνη. Έτσι ενδέχεται η SecA να αλληλεπιδρά με τις υδρόφιλες επιφάνειες που συνιστούν συστατικά της μεταθετάσης όπως το SecYEG προτεινόμενο κανάλι (Manting et al., 2000) ενώ άλλες επιφάνειες της SecA μπορεί να εισέρχονται ακόμα και στη λιπιδική διπλοστοιβάδα (Ulbrandt et al., 1992; Breukink et al., 1995).

ΣΤ) Στάδιο **“διάσπασης της προπρωτεΐνης από την SecA”**. Εάν το δεσμευμένο στη SecA ATP δεν υδρολυθεί η αντίδραση της μετατόπισης σταματά μετά την είσοδο στη μεμβράνη μερικών αμινοξέων του υποστρώματος. Πράγματι πολλοί κύκλοι υδρόλυσης του ATP απαιτούνται για την ολοκλήρωση της μεταφοράς του υποστρώματος από τη μεμβράνη (Schiebel et al., 1991; Bassilana et al., 1992; Economou and Wickner, 1994; Uchida et al., 1995; Sato et al., 1997). Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο σύστημα λιποσωμάτων οι Schiebel et al., 1991 πρότειναν ότι η



προπρωτεΐνη αποδεσμεύεται από την SecA με την υδρόλυση του ATP. Συγκεκριμένα απουσία SecA, η proOmpA (το υπόστρωμα μοντέλο της μετατόπισης πρωτεϊνών από μεμβράνες) προσδένεται στα λιπίδια, και αποκτά τέτοια διαμόρφωση που αυξάνει την προστασία της από πρωτεάση. Παρουσία SecA η proOmpA δεσμεύεται σ' αυτήν, και παρουσιάζει ευαισθησία σε πρωτεάση η οποία αναστέλλεται μόνο αν υδρολυθεί ATP από την SecA. Η ανθεκτικότητα όμως αυτή του υποστρώματος στην πρωτεάση, σημαίνει ότι απελευθερώθηκε από την SecA, και δεσμεύτηκε στα λιπίδια. Κάτι ανάλογο λοιπόν αναμένεται ότι συμβαίνει κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του ATP από τη SecA, κατά την μεταφορά της εκκρινόμενης πρωτεΐνης από τη μεμβράνη, μολονότι ο ακριβής μηχανισμός, όπως και η έκταση της απελευθέρωσης του υποστρώματος από τη SecA δεν είναι γνωστά. Πάντως η απελευθέρωση της προπρωτεΐνης από την SecA μπορεί να διευκολύνεται περαιτέρω από τις αλλαγές στην τοπολογία της SecG (Nishiyama et al., 1996), αλλά και από την SecD πρωτεΐνη (Matsuyama et al., 1993). Απομάκρυνση όμως της ProOmpA από την SecA δεν σημαίνει και απομάκρυνση από την βακτηριακή μεταθετάση. Αυτό που είναι σίγουρο πάντως είναι ότι μετά την απελευθέρωση της SecA, σε προχωρημένα στάδια της διαδικασίας μετατόπισης, μπορούν να απομονωθούν σταθερά εκκριτικά ενδιάμεσα *in statu translocanti* (translocation intermediates) (Schiebel et al., 1991; Joly and Wickner 1993) υπό συνθήκες είτε χαμηλού επιπέδου ATP, είτε ομοιοπολικά δεσμευμένων ογκωδών ομάδων στο μεταφερόμενο υπόστρωμα, ή κάτω από οξειδωτικές συνθήκες. Έτσι μπορεί η μεταφερόμενη πρωτεΐνη να αποκλείεται από λιπίδια και να βρίσκεται σε γειτνίαση με SecA και SecY (Joly and Wickner 1993) κατά την εισχώρηση της SecA στη μεμβράνη, όταν όμως αποδεσμεύεται πρόσκαιρα από την SecA το υπόστρωμα εξακολουθεί να παραμένει δεσμευμένο σ' ένα διμερές SecYEG (Schiebel et al., 1991; Driessen 1992; Bessonneau et al., 2002). Γι' αυτό το λόγο εξάλλου και μιλάμε για εν εξελίξει (processive) διαδικασία μεταφοράς του υποστρώματος αφού αυτό δεν διαφεύγει την "αγκαλιά" της μεταθετάσης παρά μόνο με την ολοκλήρωση της βήμα-βήμα μεταφοράς του μέσα από τη μεμβράνη (Schiebel et al., 1991; Economou et al., 1995; van der Wolk et al., 1997). Αξίζει να σημειωθεί πάντως ότι τα παγιδευμένα ενδιάμεσα μετατόπισης ενώ είναι συνδεδεμένα με την μεταθετάση πρέπει να έχουν χαλαρή μ' αυτήν αλληλεπίδραση, αφού μπορούν υπό κατάλληλες συνθήκες να μεταφερθούν προς τα εμπρός ή προς τα πίσω (Schiebel et al., 1991; Driessen, 1992; Joly and Wickner 1993). Με δέσμευση και μόνο ATP (μη υδρολυόμενο ανάλογο ATP) στη SecA, απουσία PMF στους 37°C, το ακινητοποιημένο ενδιάμεσο μετατόπισης προχωρά προς το εσωτερικό του κυστιδίου, κατά 2kDa (περίπου 20 αμινοξέα, όπως και κατά την έναρξη της διαδικασίας). Από την άλλη απουσία PMF, και ATP ή SecA στους 37°C, το ακινητοποιημένο ενδιάμεσο μετατόπισης γλυστρά προς την αντίθετη κατεύθυνση. Παρουσία PMF, και εφόσον το υπόστρωμα έχει απελευθερωθεί από την SecA, μετά την υδρόλυση του δεσμευμένου ATP, το ακινητοποιημένο ενδιάμεσο, μπορεί να ολοκληρώσει την διαδικασία μεταφοράς του στο εσωτερικό του κυστιδίου (αν δεν οφείλεται σε προσθήκη ογκώδους ομάδας στο καρβοξυτελικό του άκρο, αλλά έχει δημιουργηθεί κάτω από οξειδωτικές συνθήκες, ή παρουσία μικρής συγκέντρωσης ATP). Αντίστοιχα όμως, ολοκληρώνεται η διαδικασία της μετατόπισης του υποστρώματος από την μεμβράνη, και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ATP και λειτουργικής SecA.

Η) Στάδιο "εξαγωγής της SecA από τη μεμβράνη". Μετά όμως από την υδρόλυση του ATP από την SecA, το παραγόμενο ADP την οδηγεί σε απόκτηση σφιχτούς δομής, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Σ' αυτή τη δομή, ο DEAD κινητήρας αποκτά την συμπαγή του διαμόρφωση που συνδέεται πιο στενά με τον διακόπτη IRA1 (den Blaauwen et al., 1996; Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001) και έτσι η SecA εξάγεται από τη μεμβράνη. Η ενέργεια από τη δέσμευση του ADP φαίνεται ότι είναι αρκετή για να προωθήσει μια τέτοια διαδικασία, αφού η D209N SecA που δεν μπορεί να αποκτήσει την ADP διαμόρφωση, εισέρχεται αλλά δεν εξέρχεται από τη μεμβράνη (Economou et al., 1995). Εξάλλου σύμφωνα με την ανάλυση της δομής της *B. subtilis* SecA και με πειράματα μέτρησης του φθορισμού, και της ανισοτροπίας διαφόρων μεταλλαγμένων SecA, όπως οι PrlD, οι Hunt et al., 2002, πρότειναν ότι η δέσμευση του ADP μεταξύ των περιοχών NBD-IRA2 (ή μεταξύ των περιοχών NBF-I-II), αντιστρέφει την διάσταση συγκεκριμένων υποπεριοχών της SecA, και δρα με το να αλλάζει την γωνία πακεταρίσματος μεταξύ των δύο παραπάνω περιοχών. Έτσι προωθώντας μια πιο σφιχτή δομή μεταξύ των NBD-IRA2 περιοχών, σταθεροποιεί το δίκτυο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων περιοχών της SecA και επαναφέρει την συμπαγή διαμόρφωση της πρωτεΐνης, αναστέλλοντας την απόκτηση της ενδόθερμης διαμόρφωσης της SecA. Άρα η δέσμευση στη SecYEG θέση ελαττώνεται και η SecA μπορεί να απομακρυνθεί από τη μεμβράνη. Η επίδραση της δέσμευσης του ATP στη SecA θα μπορούσε να είναι παρόμοια (με DLS προκύπτει ότι η δομή της ATP και ADP μορφής είναι αντίστοιχα

εκτεταμένη και συμπαγής, ενώ η εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη ευνοείται με AMP-PNP και αναστέλλεται με ADP) μ' αυτή της δέσμευσης του ADP, όπως συμβαίνει στην F1 ATPάση όπου τα α/β ετεροδιμερή είτε με ATP είτε με ADP παρουσιάζουν παρόμοια διαμόρφωση (σχήμα 62), αλλά διαφέρουν ως προς την θερμοδυναμική σταθερότητα της δομής της SecA. Έτσι η δομή της F1 με το ATP παρουσιάζει μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα από τη δομή με το ADP, και γι' αυτό και η F1 οδηγεί στη σύνθεση ATP (Abrahams et al., 1994; Menz et al., 2001). Ένας παρόμοιος μηχανισμός θα μπορούσε να χρησιμοποιείται από τη SecA, με τη δέσμευση του ATP και του ADP να οδηγεί σε παρόμοιες διαμορφώσεις, με μεγαλύτερη όμως θερμοδυναμική σταθερότητα να προσδίδεται από την ADP δομή. Επομένως η δέσμευση ATP αναμένεται να επάγει την απομάκρυνση της SecA από την SecYEG όταν ολοκληρωθεί η μεταφορά της πρωτεΐνης από τη μεμβράνη, αφού η SecA σταθεροποιείται στην συμπαγή διαμόρφωση με το ADP. Από την άλλη μεριά έχει προταθεί ότι και η SecE πρωτεΐνη διευκολύνει την εισαγωγή και εξαγωγή της SecA στη μεμβράνη, καθώς μπορεί και αλλάζει την τοπολογία της στη μεμβράνη κυκλικά όπως και η SecA (Nishiyama et al., 1996). Με το που εξάγεται όμως η SecA από τη μεμβράνη, αποκτά την αρχική περιφερειακή της θέση, που καταλαμβάνει κατά τη συγκρότηση του συμπλόκου της μεταθετάσης στην αρχή της διαδικασίας. Είναι πολύ πιθανό, ότι η SecA εντοπίζεται τώρα σε τέτοια θέση που της δίνει τη δυνατότητα να δεσμεύσει το επόμενο τμήμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (μέσω θερμικών ταλαντώσεων του υποστρώματος), και να επιτελέσει ανάλογη διαδικασία μεταφοράς του υποστρώματος.

Διαφαίνεται λοιπόν ότι η SecA δουλεύει ασυνεχώς, κατά βήματα, μεταφέροντας κάθε φορά διαμέσω της μεμβράνης 20-30 αμινοξικά κατάλοιπα (Schiebel et al., 1991; Uchida et al., 1995). Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στο μηχανισμό αναγνώρισης του υποστρώματος (Sato et al., 1997), ή στην φυσική απόσταση που διανύεται από τις περιοχές της SecA κατά την διάρκεια των αλλαγών στη διαμόρφωση τους (Economou et al., 1995; Den Blaauwen et al., 1996). Επιπλέον επειδή η μεταθετάση όπως ειπώθηκε προηγουμένως δεν αποχωρίζεται το προς μεταφορά υπόστρωμα και δρα εν εξελίξει (processively) (Economou 1998, 1999), μπορεί να φανταστεί κανείς ένα μηχανισμό hand-over-hand, με τον οποίο η SecA μπορεί και επιφέρει τη μεταφορά του υποστρώματος, τμηματικά, διαμέσου της μεμβράνης. Πάντως επειδή η μεταθετάση αναγνωρίζει πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων προβλέπεται ότι δεν αναγνωρίζει πλευρικές αλυσίδες αλλά σκελετούς α-ανθράκων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η SecA με την εξαγωγή της από την μεμβράνη μπορεί και να ανταλλάγει μ' άλλη κυτταροπλασματική SecA και να διασταθεί έτσι από την μεταθετάση. Συγκεκριμένα οι Economou and Wickner, 1994 έδειξαν με πειράματα παλμού και ώσης ότι σημασμένη με <sup>125</sup>I ή με <sup>35</sup>S SecA μπορεί να αντικατασταθεί από ελεύθερη κρύα SecA. Δεν είναι πάντως ακόμα γνωστό αν ένα ή περισσότερα μόρια SecA επιτελούν την μετατόπιση ενός μορίου υποστρώματος από τη μεμβράνη. Ενδέχεται από την άλλη η εξαγόμενη από την μεμβράνη SecA να μην ανταλλάσσεται από κυτταροπλασματική SecA, αλλά να διαχέεται πλευρικά στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Εξάλλου οι Chen et al., 1996 έχουν παρατηρήσει ότι ένα μεγάλο τμήμα της μεμβρανοσυνδεδεμένης SecA, που μπορεί να αντιστοιχεί σε SecA μη συνδεδεμένη με τη SecYEG, δεν ανταλλάσσεται με κυτταροπλασματική πρωτεΐνη.

Θ) Στάδιο "προώθησης μέσω διαμεμβρανικής βαθμίδωσης πρωτονίων (PMF)". Σε προχωρημένα και μόνο, στάδια της διαδικασίας μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από τις μεμβράνες, η πολυπεπτιδική αλυσίδα υπόκειται σε προς τα εμπρός μετακίνηση με την δράση της διαμεμβρανικής βαθμίδωσης πρωτονίων. Αυτό συμβαίνει εφόσον δεν δεσμεύεται στην SecA, ενώ μ' αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται και το γλύστρημα προς τα πίσω της μεταφερόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Schiebel et al., 1991; Driessen et al., 1992). Επιπλέον είδαμε ότι το PMF προωθεί την εξαγωγή της SecA από τη μεμβράνη (Nishiyama et al., 1999) επιταχύνοντας την κυκλική της διαδικασία. Αρα η διεγερτική δράση του PMF κατά την μετατόπιση των πρωτεϊνών τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, οφείλεται από τη μια στην προώθηση της προς τα εμπρός μετακίνησης του μεταφερόμενου υποστρώματος, απουσία SecA, και από την άλλη στην επιτάχυνση της κυκλικής διαδικασίας της SecA. Από την άλλη μεριά το PMF μπορεί να συντελέσει και στην απελευθέρωση των προϊόντων της υδρόλυσης του ATP (Shiozuka et al., 1990) από την εξαγόμενη SecA, μέσω πιθανής αλλαγής της διαμόρφωσης της SecY (Nouwen et al., 1996), προκειμένη η όλη διαδικασία να αρχίσει από την αρχή. Επιπλέον και η δέσμευση της προπρωτεΐνης στη SecA, στο διάλυμα, έχει δείξει ότι συντελεί στην απελευθέρωση ADP (Shinkai et al., 1991). Επομένως κάθε φορά που η προπρωτεΐνη που έχει απελευθερωθεί από την SecA στο κανάλι της μεταθετάσης επαναδεσμευτεί στη SecA, τα ADP+Pi προϊόντα αποδεσμεύονται και ο κύκλος δέσμευσης και υδρόλυσης ATP μπορεί να ξεκινήσει από την αρχή. Εξάλλου από την κρυσταλλογραφική

δομή της SecA, η απομάκρυνση του νουκλεοτιδίου οδηγεί σε ανοιχτή δομή μεταξύ των NBD-IRA2 περιοχών, και προκαλεί διάσπαση συγκεκριμένων περιοχών της SecA (βλέπε Κεφάλαιο: Αλλαγών στη διαμόρφωση της SecA παρουσία των διαφόρων υποκαταστατών της μετατόπισης). Έτσι επάγοντας την ενδόθερμη μετάπτωση της πρωτεΐνης προάγει τη δέσμευση της στη SecYEG στη μεμβράνη. Δεσμευόμενη όμως η SecA στη θέση SecYEG, αυξάνεται η ικανότητα της να υδρολύει ATP. Με τη δέσμευση όμως ATP και παρουσία και του μεταφερόμενου υποστρώματος, εισέρχεται στη μεμβράνη, και ο κύκλος ξεκινάει από την αρχή.

Ι) Στάδιο **"ώριμανσης της μεταφερόμενης πρωτεΐνης"**. Μετά την έναρξη της διαδικασίας μετατόπισης πραγματοποιείται και η αποκοπή των πεπτιδίων σηματοδοτών από την πεπτιδάση οδηγό (Paetzel et al., 2000). Έτσι η ώριμη πρωτεΐνη μπορεί και μετακινείται ελεύθερα μέσα στο κανάλι της μεταθετάσης (Driessen et al, 1992).

Κ) Στάδιο **"πολλαπλών καταλυτικών κύκλων της SecA (multiple catalytic turnovers)"**. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης επιμηκυσμένων υποστρωμάτων, (που εάν τεντωθούν είναι αρκετές φορές πιο μακριά όσο είναι η μεμβράνη φαρδιά) η SecA πρέπει να επιτελεί πολλαπλούς καταλυτικούς κύκλους (turnovers) (Schiebel et al., 1991; Economou and Wickner 1994; Economou et al., 1995).

Λ) Στάδιο **"απελευθέρωσης του υποστρώματος από την μεμβράνη"**. Με την έλευση των πρωτεϊνών στην *trans* μεριά της εσωτερικής μεμβράνης ξεκινά η αναδίπλωση τους στο χώρο. Είναι δυνατόν συστατικά της μεταθετάσης όπως το σύμπλοκο SecDF (Matsuyama et al., 1993) ή πρωτεΐνες συνοδοί του περιπλάσματος να επιταχύνουν το ρυθμό αναδίπλωσης και απελευθέρωσης *in vivo* (Rizzitello et al., 2001). Κάτι τέτοιο αναμένεται ίσως, από τον ρόλο της Hsp70 και της BiP στα μιτοχόνδρια (Matouschek et al., 2000), και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Johnson and van Waes 1999) αντίστοιχα. Η πλήρως αναδιπλωμένη ώριμη αλυσίδα απελευθερώνεται στον περιπλασματικό χώρο των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπου είτε διαμένει, είτε καθοδηγείται στην εξωτερική μεμβράνη. Στην περίπτωση των Gram θετικών βακτηρίων, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στον εξωκυτταρικό χώρο.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων του SAXS από τους Shilton et al., 1998, γέννησαν σωρεία ερωτημάτων, όσον αφορά το παραπάνω μοντέλλο. Έτσι ενώ το διμερές της SecA ενδέχεται να εισέρχεται στη μεμβράνη κάθετα ή παράλληλα στο επίπεδο της μεμβράνης, το μεγάλο μέγεθος της SecA (διαστάσεις 15X8nm), σε σχέση με το πάχος των 4nm της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, και τη διάμετρο των 7nm ενός ετεροτριμερούς SecYEG (από τις διαστάσεις αναλυμένων κρυσταλλογραφικά μεμβρανικών πρωτεϊνών), θέτουν σε σοβαρή αμφισβήτηση το εύρος της εισαγωγής της SecA στη μεμβράνη, τουλάχιστον όπως έχει παρουσιαστεί από τα πειράματα προστασίας από πρωτεάσες. Η SecA λοιπόν μπορεί να εισέρχεται στη μεμβράνη μέσω του ενός πρωτομερούς της, ή μέσω κεντρικών τμημάτων του διμερούς. Σε κάθε περίπτωση πάντως, μπορεί να επιτευχθεί ενδομοριακή ασυμμετρία, που είναι απαραίτητη για την εν εξελίξει (processive) διαδικασία της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα από τις μεμβράνες. Εξάλλου το μεγάλο μέγεθος της SecA επιτρέπει αλλαγές στο σχήμα, αλλά και στην στοιχειομετρία της μεταθετάσης. Έτσι ο αποκλεισμός της SecA από τα φωσφολιπίδια της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας, πιθανά επιτελείται από περισσότερα του ενός ετεροτριμερή της SecYEG (λόγω του μεγάλου μεγέθους της SecA), που ανακτώνται από τις αλλαγές στη διαμόρφωση του καναλιού που επιφέρει η δέσμευση της SecA. Εξάλλου όπως είδαμε στο Κεφάλαιο: Κανάλι SecYEG/Sec61, οι Manting et al., 2000 έδειξαν ότι η εισαγωγή της SecA στη μεμβράνη, συντελεί στο τετραμερισμό του διμερούς σε διάλυμα SecYEG συμπλόκου.

Από την άλλη μεριά το μεγάλο μέγεθος της SecA δυσκολεύει την απαιτούμενη ευλυγισία που απαιτείται από την SecA προκειμένου να αποκτήσει την πληθώρα των διαμορφώσεων που απαιτούνται, για να επιτελέσει την διαδικασία της μετατόπισης των πρωτεϊνών. Ενδέχεται όμως η ποικιλία των διαμορφώσεων που αποκτά η SecA να επιτυγχάνεται ευκολότερα μέσω της αλληλεπίδρασης με τους διάφορους υποκαταστάτες της παραπάνω διαδικασίας.

Στη συνέχεια οι Hunt et al., 2002, υποστήριξαν με βάση πειράματα φθορισμού και ανισοτροπίας PrID μεταλλαγμένων SecA, καθώς και από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της bsSecA παρουσία και απουσία ADP, ότι πρέπει να επιτελείται μετακίνηση ορισμένων τουλάχιστον περιοχών της SecA, κατά την διάρκεια των διαφόρων σταδίων της διαδικασίας μετατόπισης ( των HWD και SD περιοχών), στις οποίες πιθανά οφείλεται και η απόκτηση των διαφόρων διαμορφώσεων της SecA παρουσία της ποικιλίας των υποκαταστατών της μετατόπισης των πρωτεϊνών από τις μεμβράνες.

Τέλος οι Sharma et al., 2003 πρότειναν με βάση την κρυσταλλογραφική δομή της SecA από το *Mycobacterium tuberculosis* ότι η τελευταία πρέπει να λειτουργεί μ' έναν

ανάλογο μηχανισμό μ' αυτόν με τον οποίο δουλεύουν πρωτεΐνες κινητήρες όπως είναι οι μωσίνες. Σ' αυτές, μικρές αλλαγές στην θέση δέσμευσης του νουκλεοτιδίου, μεγενθύνονται ή αλλάζουν και προσανατολισμό μέσω α-ελικοειδών "μοχλών", που τελικά οδηγούν στις συντονισμένες κινήσεις που χαρακτηρίζουν τις παραπάνω πρωτεΐνες κινητήρες, μετά την δέσμευση ATP. Η SecA πρωτεΐνη προσεγγίζει δομικά, περισσότερο τους μοριακούς κινητήρες των DNA και RNA ελικασών στους οποίους παρατηρούνται ανάλογα φαινόμενα, αλλά η κίνηση των διαφόρων περιοχών δεν σχετίζεται με α-ελικοειδείς μοχλούς. Έτσι μπορεί η δομή της bsSecA και της tbSecA παρουσία και απουσία νουκλεοτιδίου, να μην παρουσιάζει κάποια αξιοπρόσεκτη αλλαγή, έχουν όμως διαπιστωθεί δομές ελικασών όπως της MJ0669 (SFII DEAD-box ελικάση), στην οποία απουσία νουκλεοτιδίου εντοπίζεται ένα μεγάλο άνοιγμα (περιστροφή μεταξύ των NBD-IRA2 περιοχών) στην περιοχή δέσμευσης του (σχήμα 62), ενώ και στην περίπτωση της PcrA ελικάσης διαπιστώνεται περιστροφή  $\sim 10^0$  μεταξύ των NBD-IRA2 περιοχών απουσία και παρουσία νουκλεοτιδίου (σχήμα 62). Επομένως αναμένεται μία ανάλογη τουλάχιστον περιστροφή  $\sim 10^0$  μεταξύ των NBD-IRA2 περιοχών στην SecA πρωτεΐνη, σε κάποια φάση του κύκλου λειτουργίας της παρουσία του νουκλεοτιδίου, δεδομένου ότι και τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τον γ-φώσφορο του ATP είναι συντηρημένα μεταξύ των δομών PcrA και tbSecA. Αυτή όμως η μικρή περιστροφή στην DEAD-περιοχή της SecA, πιθανά μετασχηματίζεται σε μεγαλύτερη μετακίνηση μεταξύ των NBD-IRA2 και των SSD, C-περιοχών της SecA, ή των motor και translocation περιοχών της αντίστοιχα, όπως αναφέρθηκαν από τους Sharma et al., 2003, που τελικά επιφέρουν αλλαγές τόσο στον πόρο της SecA που έδειξαν ότι δημιουργείται στο διμερές της, αλλά και στην προτεινόμενη θέση δέσμευσης του υποστρώματος SSD.

Στη παρούσα διατριβή θα παρουσιαστεί ένα επιπλέον μοντέλο συντονισμένης αλλαγής της διαμόρφωσης της SecA που συντελεί πιθανά στην επίτευξη της διαδικασίας μεταφοράς των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, βασισμένο και σε πειραματικά αποτελέσματα πέρα από τις παραπάνω μελέτες. Στη περίπτωση αυτή ρόλο κλειδί παίζει το IRA1 ρυθμιστικό στοιχείο. Το μοντέλο αυτό μπορεί να επεκταθεί περαιτέρω και στις ελικάσες και να ερμηνεύσει σημεία κλειδιά του μηχανισμού λειτουργίας τους. Η SecA όπως ειπώθηκε και προηγουμένως είναι μία ελικάση. Οι ελικάσες αποτελούνται από την καταλυτική περιοχή (με την χαρακτηριστική RecA διαμόρφωση σε απλή ή διπλή μορφή) και τις εξειδικευμένες περιοχές (Specificity domains), μία ή περισσότερες, που τους προσδίδουν την συγκεκριμένη κάθε φορά δραστηριότητα τους. Η SecA συγκεκριμένα αποτελείται από την καταλυτική περιοχή του DEAD κινητήρα και φέρει δύο εξειδικευμένες περιοχές: την SSD και την C-περιοχή. Αναπάντητο ερώτημα στις ελικάσες είναι πως η ενέργεια που δαπανάται από την καταλυτική περιοχή με την μορφή του ATP, μετατρέπεται σε μηχανικό έργο από τις εξειδικευμένες περιοχές τους (μετακίνηση των ελικασών κατά μήκος DNA ή RNA υποστρώματος ή και πρωτεΐνης όπως στην SecA). Ο παραπάνω μηχανισμός αναμένεται να στηρίζεται στην λειτουργική επικοινωνία της καταλυτικής με τις εξειδικευμένες περιοχές. Τα μέχρι στιγμής δεδομένα όμως από την SecA, υποστηρίζουν την βάση ενός τέτοιου μηχανισμού καθώς έχει βρεθεί ότι ο έλεγχος της υδρόλυσης ATP από την N-περιοχή βασίζεται στην επικοινωνία της με την C-ρυθμιστική περιοχή της SecA (Karamanou et al., 1999). Απουσία ισχυρής αλληλεπίδρασης της C-περιοχής με τον DEAD κινητήρα, όπως στην περίπτωση της απομονωμένης N-περιοχής, διαπιστώνεται ενεργοποίηση της υδρόλυσης ελλείψει των διαφόρων υποκαταστατών της διαδικασίας έκκρισης των πρωτεϊνών. Αντίστοιχα και ολόκληρη SecA με έλλειψη 12 αμινοξέων της περιοχής IRA1, στην οποία η επικοινωνία των N-/C-περιοχών διαταράσσεται, μετατρέπεται σε ενεργοποιημένη ATPάση. Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις όμως, παρά την αυξημένη διαθεσιμότητα ενέργειας, δεν πραγματοποιείται διέλευση πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Προτείνεται λοιπόν ότι η C-περιοχή της SecA μέσω του IRA1 μοριακού διακόπτη συνδέει την υδρόλυση του ATP με την μηχανική μετακίνηση της SecA κατά μήκος των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων που εξασφαλίζει την διέλευση τους μέσα από μεμβράνες.

Στην συγκεκριμένη μελέτη εξετάζεται περαιτέρω λοιπόν ο μηχανισμός δράσης του IRA1 διακόπτη. Συγκεκριμένα πραγματοποιήσαμε μία σειρά σημειακών μεταλλαγών στην περιοχή του IRA1 (**Κεφάλαιο 3.1**), ακολούθησε λειτουργική, φυσική (**Κεφάλαια 3.2, 3.3**) και δομική ανάλυση τους (**Κεφάλαιο 3.4**) με βάση τις κρυσταλλογραφικές δομές τόσο της bs όσο και της mtSecA και προέκυψε το ακόλουθο συμπέρασμα όσον αφορά το IRA1 στοιχείο: Η περιοχή IRA1 τοποθετούμενη σε στρατηγική θέση στην SecA πρωτεΐνη, επικοινωνεί με τις διάφορες υποπεριοχές της και έτσι "αισθάνεται" όταν έρθει η κατάλληλη στιγμή τις ενεργειακές ανάγκες της πρωτεΐνης για την διαδικασία έκκρισης των πρωτεϊνών. Εν συνεχεία μέσω των ίδιων αλληλεπιδράσεων, η περιοχή IRA1 ρυθμίζει την φυσική και λειτουργική επικοινωνία του

DEAD κινητήρα που υδρολύει ATP, με την C-περιοχή που ελέγχει τον ρυθμό της παραπάνω υδρόλυσης και προσδίδει στην SecA την ιδιαιτερότητα της να “γλιστράει” κατά μήκος πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Τροποποίηση των παραπάνω φυσικών αλληλεπιδράσεων της IRA1-περιοχής με τις άλλες υποπεριοχές της SecA από την μία μεριά συντελεί στην απρογραμματίστη “ευαισθητοποίηση” του IRA1 στοιχείου και από την άλλη στην ασυντόνιστη ρύθμιση όλων των καταλυτικών δραστηριοτήτων του DEAD κινητήρα. Προτείνουμε τελικά ότι μέσω του IRA1 διακόπτη που λειτουργεί ως γενικευμένος ρυθμιστής των αλλαγών στην διαμόρφωση της SecA πρωτεΐνης και κατά συνέπεια των καταλυτικών της δραστηριοτήτων, επιτυγχάνεται ο συντονισμός της δαπάνης ενέργειας με την διαδικασία της έκκρισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες. Πιθανότατα αντίστοιχος μηχανισμός να ενεδρεύει και στις διάφορες ελικάσες.

Με τη βοήθεια καινούργιων βιοφυσικών μεθόδων και ανάλυση δομών της SecA παρουσία υποστρωμάτων αλλά και άλλων υποκαταστατών αναμένεται μελλοντικά να επιβεβαιωθεί το παραπάνω μοντέλο.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.**

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ**

**ΜΕΘΟΔΟΙ**

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA.

Στην παρούσα διατριβή για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιούνται τα στελέχη της *Escherichia coli* DH5a [με τον γονότυπο των DH1:F<sup>-</sup>, *end* A1, *gyr* A96, *thi*-1, *hsd* R17(*rk*<sup>-</sup>, *mk*<sup>+</sup>) *sup* E44, *rel* A1, και F<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> 80D *lac* ZD M15, D (*lac*ZYA-*arg*F), U169], JM109 (επίσωμα F; α-συμπληρωματικότητα; καταστολέας *lac* I<sup>a</sup>, *rec* A<sup>-</sup>. Κατάλληλος για M13 και pGEM. e14(*mcr* A<sup>-</sup>), *rec* A1, *end* A1, *gyr* A96, *thi*-1, *hsd* R17 (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>*m<sub>k</sub>*<sup>-</sup>), *sup* E44, *rel* A1, Γ, D (*lac*-*pro*AB), [*F'**tra* D36, *pro* AB, *lac* I<sup>a</sup>ZD M15] και ποικιλία πλασμιδιακών φορέων από την Novagen, την Qiagen και την NEB. Η αύξηση των βακτηριακών στελεχών και οι γενετικοί χειρισμοί πραγματοποιούνται με βάση τα πρωτόκολλα του εργαστηριακού εγχειριδίου: Molecular Cloning, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor, 2<sup>nd</sup>. Ed (Sambrook et al., 1989). Η ταυτότητα όλων των κατασκευών DNA επιβεβαιώθηκε με αλληλούχηση του DNA και περιοριστική ανάλυση.

*Κατασκευή των SecA IRA1, μεταλλαγών:*

Οι διάφορες μεταλλαγές δημιουργήθηκαν με το kit Altered sites<sup>®</sup> από την Promega και με τον πλασμιδιακό φορέα pIMBB38 (το γονίδιο *secA* είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις BamHI-EcoRI του φορέα pALTER-EX1). Πιο συγκεκριμένα η SecAW775A δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το πλασμίδιο pIMBB38 και τον εκκινητή X61 (CAGGTGCTCTTTCCGCCAGGGAGTCAAG). Για τις SecAL785R, SecAI789R, SecAR792A, SecAP799A, SecAE802A, SecAY803A, SecAE806A, και SecAF811A χρησιμοποιούνται αντίστοιχα οι εκκινητές X62 (GATACCCTGACGCCGATAGTCCATCGC), X63 (GCCACGCAGGTGGCGACCCTGACGCAG), X64 (CTGTGCGTAGCCAGCCAGGTGGATACC), X65 (GTATTCCTGCTTCGCATCTTTCTGTGC), X66 (TTCACGTTTGTATGCCTGCTTCGGATC), X67 (CGATTCACGTTTGGCTTCCCTGCTTCGG), X68 (CATGGAGAACGATGCACGTTTGTATTTC), and X69 (CAGCATCGCTGCAGCCATGGAGAACGA). Για τον πρωτεϊνικό καθαρισμό των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών, NcoI κομμάτια 2.9 kb που φέρουν τις παραπάνω μεταλλαγές, αντικαθιστούν το αντίστοιχο κομμάτι της His-SecA στον φορέα pIMBB7, οπότε και δημιουργούνται οι pIMBB105, pIMBB106, pIMBB202, pIMBB107, pIMBB200, pIMBB108, pIMBB109, pIMBB110, και pIMBB201 πλασμιδιακοί φορείς αντίστοιχα.

*Κατασκευή των C34IRA1 μεταλλαγών:*

Οι C34IRA1 μεταλλαγές κατασκευάστηκαν μετά από αντικατάσταση του 0.83 kb EcoRI-MfeI τμήματος του pIMBB70 (pAK1/Hisp34) από το αντίστοιχο τμήμα της His-SecA από τον φορέα pIMBB105 (για την C34W775A), ή από τον φορέα pIMBB106 (για την C34L785R), ή από τον pIMBB 202 (για την C34I789R), ή από τον pIMBB107 (για την C34R792A), ή από τον pIMBB200 (για την C34P799A), ή από τον pIMBB108 (για την C34E802A), ή από τον pIMBB109 (για την C34Y803A), ή από τον pIMBB110 (για την C34E806A), και τέλος από τον φορέα pIMBB201 (για την C34F811A).

*Κατασκευή των διαφόρων παραγώγων του C34 :*

Τα παράγωγα C609-834, C669-834, και C757-834 κατασκευάστηκαν με την χρήση PCR, με μήτρα τον φορέα pIMBB7 και τους εκκινητές με κατεύθυνση προς τα εμπρός (forward primers) X110 (GGCCCGTACATATGAAACTGGGTATGAAGCCAGGC), X109 (GGCCCGTACATATGGTCAGCGATGTGAGCGAAACC), and X108 (GGCCCGTACATATGGTGGTTGGTGCTGAGATGATG) αντίστοιχα, και τον κοινό εκκινητή με κατεύθυνση προς τα πίσω (reverse primer) X107 (CGCGGATCCTTAAGGCATACGTACCTGAACCTTTG). Το παράγωγο C609-760 κατασκευάστηκε όπως και τα παραπάνω, με εκκινητή με κατεύθυνση προς τα εμπρός τον X110 (GGCCCGTACATATGAAACTGGGTATGAAGCCAGGC) και εκκινητή με κατεύθυνση προς τα πίσω τον X111 (CGCGGATCCTTACTCAGCACCAACCACTTCTTC). Τα καθαρισμένα από το πήκτωμα αгарόζης προϊόντα υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και BamHI, και τελικά εισήχθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET16b (Invitrogen), οδηγώντας στην δημιουργία των πλασμίων pIMBB203, pIMBB186, pIMBB188, και pIMBB185 αντίστοιχα. Σ' όλες τις παραπάνω περιπτώσεις τα παράγωγα του C34 διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο έξι ιστιδίνες. Παράλληλα όμως κατασκευάστηκαν και αντίστοιχα παράγωγα που διαθέτουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο τις έξι ιστιδίνες, όπως και παράγωγα που διαθέτουν στο αμινοτελικό τους άκρο την πρωτεΐνη σύμφυσης MBP. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιούνται οι ίδιοι με προηγουμένως εκκινητές με κατεύθυνση προς τα εμπρός, ενώ χρησιμοποιούνται οι ακόλουθοι δύο εκκινητές με κατεύθυνση προς τα πίσω X112 (CCGGACCTCGAGAGGCATACGTACCTGAACCTTTG) και X113 (CCGGACCTCGAGCTCAGCACCAACCACTTCTTC). Τα καθαρισμένα από το πήκτωμα αгарόζης προϊόντα υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI, και τελικά εισήχθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pET22b (Invitrogen), οδηγώντας στην δημιουργία των πλασμίων pIMBB187, pIMBB205, pIMBB204, και pIMBB206 αντίστοιχα. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται οι εκκινητές με κατεύθυνση προς τα εμπρός X105 (CCGGAATTCAAACTGGGTATGAAGCCAGGC), X104 (CCGGAATTCGTCAGCGATGTGAGCGAAACC) και X103 (CCGGAATTCGTGGTTGGTGCTGAGATGATG) αντίστοιχα, με τον εκκινητή με κατεύθυνση προς τα

πίσω X102 (CCCGTCTAGATTAAGGCATACGTACCTGAACTTTG), καθώς επίσης και ο εκκινητής με κατεύθυνση προς τα εμπρός X106 (CCCCGTCTAGATTACTCAGCACCAACCACTTCTTC). Τα καθαρισμένα από το πήκτωμα αγαρόζης προϊόντα υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και *xbaI*, και τελικά εισήχθησαν στον πλασμιδιακό φορέα pMAL-C2, οδηγώντας στην δημιουργία των πλαμιδίων pIMBB207, pIMBB190, pIMBB189, και pIMBB208 αντίστοιχα

## 2.2. Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών.

Όλες οι παρακάτω διαδικασίες πραγματοποιούνται σύμφωνα με τις προτάσεις από τα εργαστηριακά εγχειρίδια της Qiagen, Amersham, Novagen, Pharmacia, Biorad, και το Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor, 2nd Ed (Sambrook et al., 1989), αλλά και από τα επιστημονικά βιβλία, Methods in enzymology: Guide to protein purification (Abelson & Simon), Gel electrophoresis of proteins, a practical approach (Hames & Rickwood), Protein structure, a practical approach (Creighton), Protein purification (Scopes), και Protein purification methods, a practical approach (Harris & Angal).

Το πρώτο μέλημα για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας μιας πρωτεΐνης, είναι η κλωνοποίηση του γονιδίου που την εκφράζει στον κατάλληλο πρωτεϊνικό φορέα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ένα από τα πιο αξιόπιστα συστήματα για την κλωνοποίηση και την έκφραση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών στο βακτήριο *e.coli*, είναι το pET, με τον T7 υποκινητή, τον *lac* χειριστή, και ποικιλία χαρακτηριστικών όσον αφορά τον σκελετό του πρωτεϊνικού φορέα, όπως ανθεκτικότητα σε ποικιλία αντιβιοτικών, σινιάλων έναρξης της αντιγραφής, σινιάλα έκφρασης, τμήματα σύμφυσης, θέσεις περιοριστικών ενζύμων παραγωγή του καταστολέα *lacI*, κλπ, και είναι αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον και στην παρούσα διατριβή. Η στρατηγική με την οποία επιτελείται η δημιουργία της κατασκευής έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου αναφέρθηκε προηγουμένως.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό του παραπάνω φορέα στον κατάλληλο βακτηριακό ξενιστή που πολύ συχνά φέρει το γονίδιο της RNA πολυμεράσης του φάγου T7 στο γένωμα του (λυσιγόνο βακτήριο λDE3), και το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *lacUV5* υποκινητή και χειριστή. Το στέλεχος που χρησιμοποιείται κυρίως στην παρούσα διατριβή είναι το BL21(DE3) (Mitchel and Oliver, 1993), από το οποίο απουσιάζουν οι πρωτεάσες *lon* και *ompT* [*E.coli* B, F, *dcm*, *ompT*, *hsd S<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)], *gal I*(DE3)]. Έτσι παρουσία IPTG απομακρύνεται ο *lac* καταστολέας (που εκφράζεται από το γονίδιο *lacI*), από τον *lac* χειριστή, και μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης της *e.coli* στον *lac* υποκινητή, παράγεται T7 RNA πολυμεράση, που οδηγεί στην έκφραση του κλωνοποιημένου γονιδίου στον φορέα pET. Επειδή όμως είναι δυνατόν να παραχθεί μικρή ποσότητα T7 RNA πολυμεράσης ακόμα και χωρίς επαγωγή με IPTG, και έτσι να εκφραστεί το κλωνοποιημένο γονίδιο του φορέα pET, που ενδέχεται να είναι και τοξικό για το βακτηριακό κύτταρο, χρησιμοποιείται το παραπάνω βακτηριακό στέλεχος με το πλασμίδιο pLysS ή pLysE. Το τελευταίο κωδικοποιεί για την λυσοζύμη T7 που είναι φυσικός αναστολέας της T7 RNA πολυμεράσης και αδρανοποιεί περιορισμένο αριθμό μορίων της, οδηγώντας σε πιο αυστηρή έκφραση του γονιδίου στόχου σε μη επαγόμενα με IPTG κύτταρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις της παρούσας διατριβής όμως, χρησιμοποιείται ο βακτηριακός ξενιστής BL21.19 από τον οποίο λείπει μία επιπλέον πρωτεάση [*BL21.7*, *clpA319::kan*, *recA::cat*, *secA*, *Am13 ts*], αλλά μεγαλώνει στους 30°C, καθώς διαθέτει θερμοευαίσθητη SecA (ts).

Ακολούθως γίνεται ανάπτυξη καλλιέργειών των παραπάνω βακτηρίων (και από πολλές διαφορετικές αποικίες) σε μικρή κλίμακα, προκειμένου να εξεταστούν οι συνθήκες αύξησης και επαγωγής που προσδίδουν την μεγαλύτερη παραγωγή της ενδιαφερόμενης πρωτεΐνης σε συνδυασμό με μικρότερη πρωτεόλυση, αυξημένη σταθερότητα και διαλυτότητα. Όταν αυτές οι συνθήκες βρεθούν, ακολουθεί μικρής κλίμακας απομόνωση της πρωτεΐνης και ελέγχεται η καθαρότητα και η σταθερότητα της. Σ' αυτή την φάση εξετάζεται η προσθήκη επιπλέον σταδίων στο σύνηθες πρωτόκολλο καθαρισμού, η προσθήκη αναστολέων, η αναγκαιότητα επιτέλεσης όλων των διαδικασιών στους 4°C κλπ. Μόνο όταν όλες οι παραπάνω διαδικασίες επιτευχθούν προχωρούμε στην απομόνωση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα.

### 2.2.A. Συλλογή κυττάρων για αποθήκευση (cell nuggets).

Μετά την συγκέντρωση των κυττάρων από τις ανεπτυγμένες καλλιέργειες, το κυτταρικό ίζημα στεγνώνει από το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας και τελικά διαλυτοποιείται στον πάγο με διάλυμα 50mM Tris pH :8, και 20% γλυκερόλη (20ml από 1lt καλλιέργειας), με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία φουσκάλων. Στη συνέχεια τα διαλυτοποιημένα κύτταρα παγώνουν με μορφή νιφάδων με την στάγδην προσθήκη τους σε υγρό άζωτο, και τελικά φυλάσσονται στους -80°C.



## **2.2.B. Απομόνωση των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών από BL21.19 κύτταρα.**

Οι διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες κλωνοποιούνται όπως είδαμε προηγουμένως σαν προϊόντα σύμφυσης εξαισιτιδινών. Ο καθαρισμός τους πραγματοποιείται με βάση την πρόσδεση τους σε Ni-NTA (Nitrilotriacetic acid) κολώνας με σφαιρίδια αγαρόζης, όπως προτείνεται στο εγχειρίδιο της Qiagen για γρήγορη υγρή χρωματογραφία πρωτεΐνης (Fast protein liquid chromatography, FPLC). Συγκεκριμένα συλλέγεται κυτταρική πάστα (15-30 gr, ανάλογα με το είδος της IRA1 μεταλλαγής) μετά από επώαση με IPTG (0.5mM σε OD600=0.5-0.7) 15lt καλλιέργειών (εμβολιασμένες με καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί κατά την διάρκεια της νύχτας σε αραιώση 1/100) των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών σε θρεπτικό μέσο LB παρουσία Αμπικιλίνης (100μg/ml). Μετά την έκλουση από την Ni-NTA κολώνα οι πρωτεΐνες (από 100-1000mg) είναι συνήθως αρκετά συγκεντρωμένες (>5mg/ml) και καθαρές. Ορισμένες όμως από τις παραπάνω SecAIRA1 πρωτεΐνες εκλύονται σε χαμηλή συγκέντρωση (λόγω λανθασμένης επιλογής του ποσού της χρησιμοποιούμενης ρητίνης) και γι' αυτό ακολουθεί για όλες τις SecAIRA1 πρωτεΐνες (για λόγους ομοιότητας στην συμπεριφορά των πρωτεϊνών) συγκέντρωσή τους σε ανιοντοανταλλακτική κολώνα Q με βάση το πρωτόκολλο της Pharmacia. Τελικά ακολουθεί διαπίδυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε διάλυμα B με 50% γλυκερόλη και συλλέγονται πρωτεΐνες σε συγκέντρωση από 6-20mg/ml, και σε ποσότητα 40-200mg όπως φαίνονται στο σχήμα 108 στα αποτελέσματα.

## **2.2.Γ. Απομόνωση των διάφορων C34IRA1 πρωτεϊνών από BL21.19 κύτταρα.**

Ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο με προηγουμένως, με την διαφορά ότι επειδή ο φορέας έκφρασης είναι διαφορετικός (pAK1) η παραγόμενη πρωτεΐνη είναι λιγότερη, η έκφραση δεν είναι πάντα αξιόπιστη κάτω από τις ίδιες συνθήκες, και έτσι λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή στα ακόλουθα σημεία: α) Πάντα ξεκινάμε από εμβολιασμό τρυβλίου (LB+Amp) με βακτήρια από στοκ γλυκερόλης, και απ' αυτό το φρέσκο πιάτο εμβολιάζεται υγρή καλλιέργεια που την επόμενη μέρα θα επωάσει μεγάλη ποσότητα νέας υγρής καλλιέργειας (10-15lt), β) η διαδικασία καθαρισμού λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, όσο το δυνατόν συντομότερα και παρουσία αναστολέων (3mM PMSF και 3mM Pefabloc), γ) η ποσότητα της Ni-NTA ρητίνης είναι πολύ χαμηλή σε σχέση με τις συνηθισμένες περιπτώσεις (3-4mls ρητίνης για 15lt αρχικής καλλιέργειας), δ) η έκλουση της πρωτεΐνης από την ρητίνη πραγματοποιείται σε 300mM ιμιδαζολίου, και ε) το πρωτεϊνικό δείγμα φυλλάσσεται σε τουλάχιστον 10% γλυκερόλη και σε συγκέντρωση <3mg/ml για αποφυγή συσσωματωμάτων. Η τελική παραγωγή κυμαίνεται από 5-20mg, ανάλογα με την SecAIRA1 πρωτεΐνη και το προφίλ της φαίνεται στο σχήμα 7/ στα αποτελέσματα.

## **2.2.Δ. Απομόνωση των διάφορων παραγώγων του C34 από BL21.19 κύτταρα.**

Όπως στην περίπτωση των SecAIRA1 πρωτεϊνών. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση του πολυεπετιδίου C609-757, χρειάζεται να γίνει εξαντλητικό πλύσιμο της κολώνας, και με μεγαλύτερη από την συνήθη ποσότητα ιμιδαζολίου, όπως 30mM. Η C755-834 πρωτεΐνη δεν είναι σταθερή και δεν εκφράζεται.

## **2.2.E. Προσπάθεια απομόνωσης του MBPC755-834 παραγώγου του C34 από BL21.19 κύτταρα.**

Αναπτύσσονται καλλιέργειες του βακτηριακού στελέχους TB1 [*ara Δ(lac proAB) rpsL* (φ80 *lacZΔM15) hsdR*] που περιέχουν την κατάλληλη πλασμιδιακή κατασκευή που αναφέρθηκε προηγουμένως, και η MBPC755-834 πρωτεΐνη εκφράζεται όπως συνήθως με IPTG. Αφού γίνει σπάσιμο των περιουλελεγμένων κυττάρων, συγκεντρώνονται τελικά στο υπερκείμενο ~100mg από την ενδιαφερόμενη πρωτεΐνη και ακολουθεί καθαρισμός της με την χρήση κολώνας αμυλόζης, όπως αναφέρεται στο πρωτόκολλο της New England Biolabs. Στην αμυλόζη προσδέεται η πρωτεΐνη σύμφυσης με την MBP, ενώ όλες οι άλλες πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος εκλύονται από την κολώνα. Η προσδεμένη στην κολώνα πρωτεΐνη τελικά εκλύεται με μαλτόζη. Ακολουθεί διάσχιση από την MBP πρωτεΐνη της C755-834 με την χρήση του παράγοντα Xa, όπως αναφέρεται επίσης στο παραπάνω πρωτόκολλο. Σημειώνεται ότι το κόψιμο μεταξύ των δύο παραπάνω πρωτεϊνών δεν είναι πλήρες μετά από τρεις μέρες επώαση με τον παραπάνω παράγοντα, αλλά παρόλα αυτά προχωρούμε στο επόμενο στάδιο καθαρισμού (το κόψιμο δεν θα είναι ποτέ πλήρες) που είναι η απομάκρυνση της

MBP και του παράγοντα Χα από την C755-834 πρωτεΐνη. Προς τούτο χρησιμοποιείται κολώνα Q ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας, σύμφωνα πάλι με το πρωτόκολλο της NEB, στην οποία κατακρατείται η MBP, αλλά όχι η πρωτεΐνη σύμφυσης MBPC755-834 και η C755-834 πρωτεΐνη που συλλέγονται μαζί. Επομένως γίνεται προσπάθεια διαχωρισμού των MBPC755-834 και C755-834 πρωτεϊνών με την χρήση κολώνας υδροξυλαπατίτη, πάλι σύμφωνα με το πρωτόκολλο της NEB, ανεπιτυχώς (πιθανά συνέβει κατακρήμιση στο άλας φωσφορικού νατρίου των δύο πρωτεϊνών). Ακολούθησε προσπάθεια διαχωρισμού των δύο παραπάνω πρωτεϊνών με την χρήση συσκευής συγκέντρωσης Amicon με cut-off 10kDa, από την οποία θεωρητικά στον απελευθερούμενο όγκο πρέπει να εντοπίζεται η MBPC755-834 πρωτεΐνη και στον κατακρατούμενο η C755-834 (12kDa). Όμως πιθανά λόγω της δημιουργίας ολιγομερών από C755-834, οι δύο πρωτεΐνες συλλέγονται μαζί. Προκειμένου λοιπόν να διαχωριστούν, με την χρήση κολώνας μεγέθους αποκλεισμού, έγινε προσπάθεια συγκέντρωσης τους με κατακρήμιση με θειικό αμμώνιο 80%. Δεν πραγματοποιήθηκε όμως επαναδιάλυση του ιζήματος. Έτσι η προσπάθεια απομόνωσης της πρωτεΐνης τερματίστηκε. Πιθανά η χρήση κολώνας αμυλόζης μετά από την Q ή μετά την διάσχιση της πρωτεΐνης σύμφυσης από τον παράγοντα Χα και η χρήση κολώνας Q στην συνέχεια να οδηγούσε σε επιτυχή αποτελέσματα.

### **2.2.Z. Απομόνωση του N68 από BL21.19 κύτταρα.**

Όπως στην περίπτωση των SecAIRA1 πρωτεϊνών.

### **2.2.H. Απομόνωση της proOmpA από έγκλειστα σωματίδια (Inclusion bodies) κυττάρων W3110 IQ.**

Παγωμένα κύτταρα (5gr) από το παραπάνω στέλεχος που εκφράζουν proOmpA (τα κύτταρα περιέχουν το πλασμίδιο pTRC-Omp9) που έχουν διαλυθεί πριν παγώσουν σε διάλυμα 50mM Tris pH:8, 20% γλυκερόλης, λιώνουν σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία προστίθεται λυσοζύμη (450μl από 10mg/ml; 5'; 23°C) για να σπάσουν τα κυτταρικά τοιχώματα (μικρές τρύπες στα κύτταρα) και DNaseI (26μl από 1mg/ml) με MgCl<sub>2</sub> (26μl από 1M; 5'; 23°C) για να υδρολυθεί το εκλυόμενο DNA. Ακολουθεί αραίωση με διάλυμα κιτρικού οξέος (17ml; θα διευκολύνει την απομάκρυνση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών από τις κατακρημιζόμενες μεμβράνες και τα αδιάλυτα στοιχεία, όπως θα δούμε παρακάτω) και επιχειρείται σπάσιμο των κυττάρων με ομογενοποιητή (20-30 επαναλήψεις; Δημιουργούνται μεγαλύτερες τρύπες στα κύτταρα, οπότε και σπάνε σε μεγάλα κομμάτια). Ακολουθεί επώαση για 30' στους 23°C, και μετά κατακρήμιση μεμβρανών και εγλειστων σωματίων με φυγοκέντρηση για 15' σε 12000g (10000 rpm στον ρότορα SS34). Επιδιώκεται ήπιο σπάσιμο των κυττάρων έτσι ώστε να μην προκύψουν και πολλά μικρά κομμάτια που θα συμπαρασύρουν και τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες στο ίζημα. Ακολουθεί ξέπλυμα του παραπάνω ιζήματος από τις παγιδευμένες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες με το κιτρικό διάλυμα. Συγκεκριμένα το ίζημα διαλυτοποιείται σε 10ml κιτρικού διαλύματος (100mM) με λίγο vortex, αλλά κυρίως με ομογενοποίηση όπως και προηγουμένως και ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα μία φορά και μετά ακολουθεί διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών με τη βοήθεια του μη ιονικού απορρυπαντικού sarkosyl σε συγκέντρωση 1.5% (σε κιτρικό διάλυμα 100mM), πάλι με ομογενοποίηση μετά από επώαση 30' στους 23°C. Η φυγοκέντρηση πραγματοποιείται τώρα σε 30000 g για 15', και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 ακόμα φορές (χωρίς περίοδο επώασης). Την τελευταία φορά η διαλυτοποίηση πραγματοποιείται σε 5ml διαλύματος 50mM Tris-Cl pH:8, 2mM DTT. Ακολουθεί φυγοκέντρηση όπως και προηγουμένως και το καινούργιο ίζημα που περιλαμβάνει μόνο τα έγκλειστα σωματίδια με την proOmpA, διαλυτοποιείται σε 2ml διαλύματος 6M ουρίας, mM Tris-Cl pH:8, 2mM DTT. Το απορρυπαντικό απομακρύνεται εν συνεχεία με κατακρήμιση με TCA (τριχλωροοξικό οξύ). Συγκεκριμένα στο τελευταίο διάλυμα της proOmpA, προστίθεται ίσος όγκος TCA και ακολουθεί επώαση για 30' στον πάγο. Εν συνεχεία γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000g (σε ψυχόμενη erpendorf), το υπερκείμενο αναρροφάτε και το ίζημα ξεπλένεται σε 1ml ακετόνης. Η παραπάνω κατακρήμιση επαναλαμβάνεται, το ίζημα στεγνώνει για 5' στους 37°C, και διαλυτοποιείται στον επιθυμητό όγκο του παραπάνω διαλύματος ουρίας.

### **2.2.Θ. Απομόνωση της SecB από κύτταρα BL21.**

Κύτταρα (43gr) από 15lt καλλιέργειας κυττάρων BL21 (μεγαλωμένες και επαγόμενες με τον συνήθη τρόπο) που περιέχουν το κατάλληλο πλασμίδιο (pJW25) της SecB πρωτεΐνης συνοδού

(14kDa σαν μονομερές, αλλά είναι τετραμερές) λιώνουν στον πάγο. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 180ml διαλύματος B με 1mM DTT, και 0.1mM PMSF. Τα κύτταρα σπάνε με French press (8000 psi τρεις φορές) και ακολουθεί απομάκρυνση των κυτταρικών και μεμβρανικών υπολειμάτων με υπερφυγοκέντρηση στις 100000g (30000rpm) για 1 ώρα στους 4<sup>o</sup>C. Το υπερκείμενο των 180ml [μετά την επώαση με DNAάση (100μl από διάλυμα 1mg/ml) παρουσία MgCL<sub>2</sub> (100μl από διάλυμα 1M) για 30' στον πάγο) φορτώνεται σε ανιοντοανταλλακτική χρωματογραφία Q (γρήγορης ροής; 50ml ρητίνη εξισσοροποιημένη με 20 mM Tris-Cl pH 7.4, 0.2M NaCl, και 0.1mM PMSF) προκειμένου να επιτευχθεί ένας γρήγορος καθαρισμός της SecB πρωτεΐνης μετά την έκλουση της από την κολώνα με την χρήση βαθμίδωσης NaCl (200-680 mM). Συγκεντρώνεται έτσι ένας μεγάλος όγκος πρωτεϊνικού δείγματος (150ml) που περιέχει σε μεγάλο ποσοστό την SecB και ο οποίος συγκεντρώνεται εν συνεχεία με την συσκευή Amicon (το cut-off της μεμβράνης είναι 30kDa) στα 40ml. Ακολουθεί μία επιπλέον προσπάθεια καθαρισμού της SecB στο παραπάνω πρωτεϊνικό δείγμα, με την κατακρήμνιση της με 45% θειικό αμμώνιο (προσθήκη της απαραίτητης ποσότητας σκόνης θειικού αμμωνίου σιγά σιγά και επώαση του δείγματος στον πάγο για όλη την νύχτα). Μετά την φυγοκέντρηση στα 200000g (13000rpm σε ρότορα SS34) για 30' στους 4<sup>o</sup>C, ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1.2ml Tris-Cl pH 7.4 και 0.1mM PMSF. Ακολουθεί φόρτωμα του παραπάνω δείγματος σε παρασκευαστική κολώνα μοριακής διήθησης S300 (200gr υγρών σφαιριδίων) εξισοροπημένη με 20mM Tris-Cl pH 7.4, και 0.3M NaCl στην οποία το πρωτεϊνικό δείγμα καθαρίζεται περαιτέρω και ταυτόχρονα αφαλατώνεται (περιέχει σημαντική ποσότητα θειικού αμμωνίου). Μετά από αραίωση 1:2 του συνόλου των κλασμάτων της παραπάνω κολώνας που περιέχουν την SecB με διάλυμα 20mM Tris-Cl pH 7.4 (τελική συγκέντρωση NaCl 150mM) ακολουθεί επιπλέον καθαρισμός με την χρήση ανιοντοανταλλακτικής χρωματογραφίας και συγκεκριμένα με την κολώνα MonoQ (σφαιρίδια συγκεκριμένης διαμέτρου που βοηθούν στην πιο εξειδικευμένη έκλουση από την κολώνα). Σημειώνεται ότι πραγματοποιείται έκλουση της πρωτεΐνης από την κολώνα με την χρήση βαθμίδωσης NaCl (200-600 mM), η οποία κοντά στην αλατότητα που εκλούεται η πρωτεΐνη (350-400mM) είναι παρατεταμένη (hold gradient). Προκειμένου να συγκεντρωθεί το εκλουσμένο δείγμα με την SecB, επαναλαμβάνεται το φόρτωμα στην MonoQ (μετά από διαπίδυση σε διάλυμα με μειωμένη αλατότητα) με την διαφορά ότι ακολουθεί έκλουση σ' ένα βήμα της SecB από την κολώνα με 600mM NaCl (step elution). Τελικά ο καθαρισμός βελτιστοποιείται με την χρησιμοποίηση της S300 κολώνας μοριακής διήθησης, απ' όπου η SecB εκλούεται αφαλατωμένη συγκεντρωμένη και καθαρή.

## **2.3. Ανίχνευση της καθαρότητας μιας πρωτεΐνης, του μεγέθους της, της αλληλουχίας των αμινοξέων της και της ολιγομερικής της κατάστασης.**

### **2.3.A. Ηλεκτροφόρηση πρωτεΐνης σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).**

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται όπως προτείνεται στο εγχειρίδιο της BIO-RAD, στο οποίο δίνονται και οι συνταγές για τα διάφορα πηκτώματα ακρυλαμίδης. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα πηκτώματα περιέχουν ουρία (ιδίως στην περίπτωση κυτταρικών εκχυλισμάτων και μεμβρανικών πρωτεϊνών), ενώ χρησιμοποιούνται και μεγάλες συσκευές ηλεκτροφόρησης με μεγάλα γυάλινα πιάτα, πάντα για καλύτερο διαχωρισμό των πρωτεϊνών, σύμφωνα με τις οδηγίες των επιστημονικών εγχειριδίων *Methods in enzymology: Guide to protein purification* (Abelson & Simon), *Gel electrophoresis of proteins, a practical approach* (Hames & Rickwood), *Protein structure, a practical approach* (Creighton), *Protein purification* (Scopes), και *Protein purification methods, a practical approach* (Harris & Angal). Τέλος σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται SDS πηκτώματα με τρουσίνη αντί για γλυκίνη για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών εύρους 1-100kDa, όπως αναφέρεται από τους Schagger and Jagow, 1987.

### **2.3.B. Ανίχνευση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.**

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών που έχουν τρέξει σε πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιείται είτε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue (R-250), ή με χρώση αργύρου (silver staining), που παρουσιάζει 50 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία (0.1ng/mm<sup>2</sup>) ή με φλουορογραφία αν πρόκειται για ραδιενεργές πρωτεΐνες. Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται μοριακοί δείκτες της BIO-RAD, της Pharmacia, ή της MBI Fermentas, χρωματισμένοι ή όχι για να γίνει διαπίστωση του μεγέθους της πρωτεΐνης.

### **2.3.Γ. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης-Western blotts.**

Ακολουθείται η διαδικασία που αναγράφεται στο εγχειρίδιο της BIORAD. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται είναι πολυκλωνικά και παράγονται από κουνέλια σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του επιστημονικού εγχειριδίου: Antibodies a laboratory manual, Ed Harlow AND David Lane. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνήθως antirabbit ή antimouse IgG και είναι συζευγμένο με horse radish peroxidase που οξειδώνει το ένζυμο peracid (μέρος του ECL αντιδραστηρίου της Amersham) το οποίο οξειδώνει την λουμινόλη (μέρος του ECL αντιδραστηρίου) ενώ παράλληλα εκλύεται φως (χημифωταύγεια) μαυρίζει το φιλμ και ανιχνεύονται οι πρωτεΐνες που αντιδρούν με τα διάφορα αντισώματα.

### **2.3.Δ. Αμινοτελική αλληλούχιση πρωτεϊνών.**

Κατάλληλη ποσότητα του πεπτιδίου (τουλάχιστον τόση που να ανιχνεύεται με Coomassie-Brilliant-Blue) φορτώνεται σε 10% Tris-Tricine SDS πήκτωμα ακρυλαμίδης, ή σπανιότερα (για αποφυγή αμινοτελικού μπλοκαρίσματος του πεπτιδίου για αμινοτελική αλληλούχιση) σε 17.5% ηκτώματα ακρυλαμίδης με ουρία (6M), για καλύτερο διαχωρισμό ορισμένων πρωτεϊνών, και ακολουθείται το πρωτόκολλο της Alta Bioscience η οποία και επιτελεί την αμινοτελική αμινοξική αλληλούχιση των πρωτεϊνών.

### **2.3.Ε. Τρέξιμο των πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (NATIVE PAGE).**

Προκειμένου να βγουν συμπεράσματα για την ολιγομερική κατάσταση μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται μη αποδιατακτικά ηκτώματα ακρυλαμίδης, στα οποία οι πρωτεΐνες τρέχουν με βάση το μέγεθος το σχήμα αλλά και το φορτίο τους. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι αντίστοιχη με το φόρτωμα πρωτεϊνών σε οποιοδήποτε ηκτώμα ακρυλαμίδης με την διαφορά ότι δεν περιέχεται σ' αυτό SDS, ενώ το SDS απουσιάζει και από το διάλυμα τρεξίματος, και το διάλυμα φορτώματος του πρωτεϊνικού δείγματος. Το τρέξιμο του ηκτώματος λαμβάνει χώρα στους 4°C. Σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν και τα Phast μη αποδιατακτικά ηκτώματα διαβάθμισης ακρυλαμίδης της Pharmacia, με βάση τις οδηγίες της εταιρείας.

### **2.3.Ζ. Τρέξιμο των πρωτεϊνών σε μπλε μη αποδιατακτικό ηκτώμα ακρυλαμίδης (Blue NATIVE PAGE).**

Οι πρωτεΐνες στο παραπάνω μη αποδιατακτικό ηκτώμα είναι αρνητικά φορτισμένες, αλλά όχι αποδιαταγμένες, καθώς στο διάλυμα της καθόδου υπάρχει Coomassie Brilliant Blue g-250 όπως και στο διάλυμα φορτώματος του πρωτεϊνικού δείγματος στο ηκτώμα ακρυλαμίδης. Έτσι όλες οι πρωτεΐνες τρέχουν στο ηκτώμα με το ίδιο φορτίο και επομένως το τρέξιμο τους εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα τους, και μπορούν να εξαχθούν πιο αξιόπιστα συμπεράσματα όσον αφορά την ολιγομερική τους δομή, μετά την σύγκριση τους με πρότυπους πρωτεϊνικούς δείκτες που τρέχουν παράλληλα με τις υπό μελέτη πρωτεΐνες. Ακολουθείται το πρωτόκολλο που αναφέρεται από τους Tokatlidis et al., >??.

### **2.3.Η. Ανάλυση των πρωτεϊνών με χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού.**

Χρησιμοποιώντας τις προπακεταρισμένες κολώνες Superdex 200 ή 75 της Pharmacia μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την κατάσταση ολιγομερισμού της υπό εξέταση πρωτεΐνης, καθώς αυτή τρέχει με βάση το μέγεθος και το σχήμα της. Έτσι αν φορτωθούν στην ίδια κολώνα διαδοχικά και διάφοροι πρωτεϊνικοί μάρτυρες, υπό τις ίδιες συνθήκες (ίδια διαλύματα, ίδιος ρυθμός έκλουσης κλπ), τότε μπορεί να προσδιοριστεί κατά προσέγγιση η ολιγομερική δομή της πρωτεΐνης ακολουθώντας τις οδηγίες του εγχειριδίου της Pharmacia.

### **2.3.Θ. Ανάλυση της ολιγομερικής δομής της πρωτεΐνης μετά από χημική διασύνδεση (Chemical crosslinking).**

Στην παρούσα διατριβή γίνεται χρήση διαφόρων ειδών χημικών διασυνδετών από την Pierce (DSP, DTSSP, SADP, Sulfo-SADP, SAND, DMP, DMA, DMS, DTBP, DPDPB), είτε ομολεειτουργικών (όπως αναφέρθηκε προηγουμένως), είτε ετερολειτουργικών (EDC-NHS) ενώ χρησιμοποιείται επίσης γλουταραλδεΐδη. Έτσι ακολουθώντας τις οδηγίες είτε της εταιρείας Pierce, είτε του επιστημονικού εγχειριδίου : Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, έγιναν προσπάθειες διασύνδεσης μορίων διαλυτών πρωτεϊνών, ή πρωτεϊνών με μεμβρανικές πρωτεΐνες. Περισσότερες λεπτομέρειες αναγράφονται στα αποτελέσματα.

### **2.3.Ι. Αναλυτική υπερφυγοκέντρωση.**

Η αναλυτική υπερφυγοκέντρωση είναι ο απόλυτος τρόπος προσδιορισμού του Μοριακού Βάρους μιας πρωτεΐνης και της ολιγομερικής της κατάστασης με ποσοτικό τρόπο. Εάν ένα πρωτεϊνικό διάλυμα καθιζάνει για αρκετές ώρες σε χαμηλή ταχύτητα του ρότορα, θα αποκατασταθεί ισορροπία μεταξύ της τάσης των μορίων να καθιζάνουν και της τάσης τους να διαχυθούν προς τα πίσω. Τελικά μία σταθερή βαθμίδωση συγκέντρωσης των μορίων της πρωτεΐνης θα αποκατασταθεί, και η γνώση αυτής της συγκέντρωσης για κάθε απόσταση από τον μηνίσκο του διαλύματος στον οποίο φορτώνεται η πρωτεΐνη, δίνει με κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς το μοριακό βάρος της, αλλά και τους ολιγομερικούς πλυθυσμούς των μορίων της πρωτεΐνης.

## **2.4. Φασματοσκοπικές μέθοδοι για την μελέτη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών σε διάλυμα.**

Η απόλυτη μέθοδος για τον καθορισμό της τριτοταγούς διαμόρφωσης των πρωτεϊνών είναι η περίθλαση των ακτίνων Χ μόνο όμως σε κρυσταλλικά μόρια. Κάτι τέτοιο δεν είναι πάντα εφικτό αλλά ούτε και δίνει πληροφορίες για τις αλλαγές στην διαμόρφωση των πρωτεϊνών σαν ανταπόκριση σε αλλαγές στο μοριακό τους περιβάλλον. Έτσι χρησιμοποιείται πληθώρα μεθόδων που επιτρέπουν την μελέτη των μορίων στην διαλυτή τους κατάσταση. Ένας αριθμός απ' αυτές ομαδοποιείται στην κατηγορία των φασματοσκοπικών τεχνικών που θ' αναφερθούν παρακάτω.

### **2.4.A. Φασματοσκοπία απορρόφησης.**

Οι πρωτεΐνες απορροφούν ακτινοβολία σ' ένα μεγάλο εύρος του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Μ' αυτόν τον τρόπο είτε μεταβαίνουν από την κατάσταση ηρεμίας στην διεγερμένη κατάσταση, είτε μετατοπίζονται από μία κατάσταση ταλάντωσης σε άλλη μέσα σε κάθε διακριτή ενεργειακή κατάσταση. Η πιο συχνή χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών στην Βιολογία χρησιμοποιεί την περιοχή του υπεριώδους του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, στην οποία και απορροφούν ισχυρά οι πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα μεταξύ 270-290nm συμβαίνει απορρόφηση από την αρωματική πλευρική αλυσίδα της φαινυλαναίνης της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης. Έτσι η απορρόφηση στα 280nm χρησιμοποιείται για την μέτρηση της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού δείγματος με βάση τον νόμο του Beer. Για την μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιείται πιο συγκεκριμένα η δοκιμασία της Bio-Rad που στηρίζεται στην διαπίστωση ότι η μέγιστη απορρόφηση ενός όξινου διαλύματος Coomassie Brilliant Blue G-250, μετατοπίζεται από τα 465 στα 595nm με την δέσμευση σε πρωτεΐνη, ενώ ο συντελεστής  $\epsilon_{595}$  του συμπλόκου χρωστικής και αλβουμίνης είναι σταθερός για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, οπότε και η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης σύμφωνα με τον νόμο του Beer. Ακολουθείται το πρωτόκολλο της Bio-Rad.

### **2.4.B. Φθορισμός.**

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα μόρια των πρωτεϊνών που έχουν διεγερθεί, όπως αναφέραμε προηγουμένως, επιστρέφουν στην κατάσταση ηρεμίας ενώ η ενέργεια διέγερσης

μεταφέρεται στα διπλανά μόρια με την μορφή θερμότητας. Ευκαιρικά όμως ένα μόριο μπορεί να χάσει μέρος μόνο της ενέργειας διέγερσης του μέσω μεταφοράς ενώ επαναακτινοβολεί το υπόλοιπο, φαινόμενο που αποκαλείται φθορισμός. Στις πρωτεΐνες οι κύριες ομάδες φθορισμού είναι η τυροσίνη και η φαινυλανανίνη, και ανάλογα με το κάθε φορά περιβάλλον τους τροποποιείται η ένταση του φθορισμού τους και έτσι αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μετρηθούν αλλαγές στην συγκέντρωση της πρωτεΐνης, να προσδιοριστεί η συγγένεια της πρωτεΐνης για διάφορους υποκαταστάτες, ή να μελετηθούν αλλαγές στην διαμόρφωση της με την θερμοκρασία. Επιπρόσθετα διέγερση του φθορισμού από επίπεδο πολωμένου φως δίνει την δυνατότητα για επιπλέον μελέτη της δυναμικής της δομής της πρωτεΐνης, υπό διάφορες συνθήκες ακόμα και απουσία αλλαγών στον φθορισμό της πρωτεΐνης υπό τις παρούσες συνθήκες. Εάν τα διεγερμένα μόρια μπορούν να μετακινηθούν ή να περιστραφούν πριν την επαναεκπομπή του φθορίζοντος φωτός, ο φθορισμός θα αποπολωθεί σε κάποιο βαθμό (μέτρηση ανισοτροπίας του δείγματος).

Στην παρούσα διατριβή οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιούνται στο σπεκτροφωτόμετρο φθορισμού Cary Eclipse της Varian που διαθέτει ένα πολυκυτταρικό peltier που συνδέεται μ' ένα ελεγκτή θερμοκρασίας με κατάλληλες κιουβέτες (fluorescence-grade quartz cuvettes; 1ml της Helma). Η δέσμευση στην SecA (εύρος συγκεντρώσεων 0.025-5μM; σε διάλυμα B) MANT-ADP (0.1 μM; Molecular Probes) μετρήθηκε από την καταγραφή του φάσματος εκπομπής του τελευταίου από τα 380-550nm (διέγερση στα 356nm; slit στα 2.5 και 20nm). Η σταθερά διάστασης  $K_D$  στους 4<sup>o</sup> και στους 37<sup>o</sup>C, υπολογίστηκε από τις  $(F_1-F_0)/F_0$  ακέραιες τιμές ( $F_0$ =απουσία SecA) σε συνάρτηση με την συγκέντρωση της SecA (διάγραμμα). Με προσθήκη κρούς ADP, προσδιορίζεται ακόμα η σταθερά απελευθέρωσης  $k_{off}$  ( $\text{min}^{-1}$ ), καθώς και η σταθερά δέσμευσης του ADP  $k_{on}$  ( $\text{Mxmin}^{-1}$ ). Από την άλλη μεριά η εκπομπή του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών καταγράφηκε στα 345nm (διέγερση στα 297nm; το διάλειμμα συλλογής δεδομένων είναι 0.5 λεπτά) τόσο για την SecA όσο και για τα διάφορα παράγωγα του C34 (0.25μM σε διάλυμα B), σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας (4-82<sup>o</sup>C; με ρυθμό 0.8<sup>o</sup>C/min), παρουσία και απουσία ADP (2mM). Τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε σιγμοειδή καμπύλη και απ' αυτήν προσδιορίστηκαν τα  $T_{m_{app}}$  (από τον προσδιορισμό της παραγώγου σε κάθε σημείο της καμπύλης). Σημειώνεται ότι τα πειράματα φθορισμού πραγματοποιήθηκαν από την Λίλη Καραμάνου στο εργαστήριο.

#### **2.4.Γ. Κυκλικός διχρωϊσμός (Circular dichroism, CD).**

Μολονότι τόσο η φασματοσκοπία απορρόφησης και φθορισμού βοηθούν στην παρακολούθηση μοριακών αλλαγών των πρωτεϊνών, εντούτοις οι μετρήσεις αυτές δεν μπορούν να ερμηνεύσουν αλλαγές στη δευτεροταγή δομή τους. Για το λόγω αυτό είναι πολύ σημαντικές τεχνικές που κάνουν χρήση του πολωμένου φωτός και συγκεκριμένα όχι του επίπεδου πολωμένου φωτός, αλλά του κυκλικά πολωμένου φωτός, στο οποίο το ηλεκτρικό πεδίο περιστρέφεται σύμφωνα ή αντίθετα από την φορά των δεικτών του ρολογιού. Καθώς οι πρωτεΐνες είναι ασύμμετρα μόρια (δεξιόστροφες και αριστερόστροφες α-έλικες, L, D αμινοξέα) δεν απορροφούν το ίδιο στο δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένο φως και αυτή η διαφορά στην απορρόφηση  $\Delta A$ , καλείται κυκλικός διχρωϊσμός. Για λόγους σύμβασης το μέγεθος που μετράται είναι η ελλειπτικότητα (ellipticity)  $\theta$  (deg), ή η μοριακή ελλειπτικότητα  $[\theta]$  ( $\text{degX dL/molXdm}$ ) κατά περίπτωση, αντί για το  $\Delta A$  ( $\Delta A = \theta/32.98$ ). Με τον κυκλικό διχρωϊσμό μπορεί να εκτιμηθεί η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης και να παρακολουθηθούν αλλαγές στην διαμόρφωση της (για παράδειγμα σε μια πρωτεΐνη που αποδιατάσσεται οι α-έλικες και οι β-πτυχωτές επιφάνειες μετατρέπονται σε ξετυλιγμένες δομές τυχαίου σπειράματος. Για την ακρίβεια με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων προσδιορίζεται το ποσοστό συμμετοχής κάθε τύπου δευτεροταγής δομής στη συνολική στερεοδομή του μορίου. Επιπλέον η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού χρησιμοποιείται για την μελέτη της αντοχής της πρωτεΐνης στην θερμική αποδιάταξη. Με χρήση ειδικού λογισμικού του οργάνου παρακολουθείται η ελλειπτικότητα σ' ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (συνήθως 222nm) ενώ η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 50<sup>o</sup>C/h. Με την διαδικασία αυτή λαμβάνονται σιγμοειδείς καμπύλες. Η πρώτη παράγωγος συναρτήσεων με τέτοια γραφήματα χρησιμοποιείται προκειμένου να φανεί πιο καθαρά και να προσδιοριστεί το σημείο τήξης μιας δομικής περιοχής, που αντιστοιχεί στην θερμοκρασία στην οποία η περιοχή αυτή μεταβαίνει από μία κατάσταση που διατηρεί δομή σε μία άλλη που είναι αποδιαταγμένη. Σημειώνεται ότι η συμπεριφορά αυτή αντανακλά την θερμοδυναμική σταθερότητα της συγκεκριμένης περιοχής. Είναι δυνατόν επίσης να προσδιοριστεί η αλλαγή του ποσοστού ελικοειδούς δομής μιας πρωτεΐνης με την θερμοκρασία, από την καταγραφή της ελλειπτικότητας από 190-250nm (η ελλειπτικότητα στα 222nm σχετίζεται κατευθείαν με το ποσοστό α-ελικοειδούς δομής) σε διάφορες θερμοκρασίες. Περισσότερες λεπτομέρειες για τις συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα κυκλικού διχρωϊσμού στην παρούσα διατριβή αναγράφονται στα αποτελέσματα

Παρόλα τα παραπάνω ο κυκλικός διχρωϊσμός δεν μπορεί να μας πει τι συμβαίνει σ' ένα συγκεκριμένο σημείο μιας πρωτεΐνης. Τέτοια δυνατότητα παρέχεται από τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) όπως αποκαλείται το φαινόμενο κατά το οποίο η μικροκυματική ακτινοβολία σ' ένα μαγνητικό πεδίο μετατοπίζει τον πυρήνα ορισμένων ισοτόπων ορισμένων ατόμων (που έχει την ιδιότητα του spin και συμπεριφέρεται σαν μαγνήτης) από μία ενεργειακή κατάσταση σε άλλη (διαφορετικοί προσανατολισμοί του πυρηνικού spin έχουν διαφορετικές ενέργειες σ' ένα μαγνητικό πεδίο). Είναι προφανές ότι τα ενεργειακά επίπεδα των παραπάνω πυρήνων με spin σ' ένα μαγνητικό πεδίο παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο περιβάλλον από το οποίο περιβάλλεται το κάθε μελετούμενο άτομο. Έτσι διαφορετικά υδρογόνα σε μία ένωση θα φτάσουν σε συντονισμό σε διαφορετικές εντάσεις μαγνητικού πεδίου (το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διατηρείται σταθερό, ενώ ποικίλει η ένταση του μαγνητικού πεδίου στην οποία επιτυγχάνεται συντονισμός για τα διάφορα υδρογόνα. Αυτές οι διαφορές ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ). Με μεγάλα NMR μηχανήματα μπορεί να επιτευχθεί συντονισμός (διακριτός) για όλα σχεδόν τα πρωτόνια σε μία πρωτεΐνη, οπότε στην συνέχεια ακολουθεί η προσπάθεια ταυτοποίησης των διάφορων συντονισμών. Στην παρούσα διατριβή δεν έγινε προσπάθεια μαγνητικού συντονισμού, ούτε σε τμήμα της SecA πρωτεΐνης, όπως το C34 ή τα διάφορα παράγωγα του C34.

## 2.5. Χρησιμοποίηση ακτίνων- X για την μελέτη της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών σε διάλυμα.

Μολονότι η περίθλαση ακτίνων X μας δίνει την ακριβή τοποθεσία κάθε ατόμου στην πρωτεΐνη, αυτή αναφέρεται σε μία συγκεκριμένη διαμόρφωση της πρωτεΐνης η οποία και κρυσταλλώθηκε. Με την χρησιμοποίηση όμως της σκέδασης ακτίνων-X σε διάλυμα της πρωτεΐνης (σκέδαση ακτίνων-X υπό μικρή γωνία, small angle X-ray scattering SAXS) μπορούν να προκύψουν άμεσα συμπεράσματα (και όχι έμμεσα όπως στην περίπτωση του φθορισμού των τρυπτοφανών της πρωτεΐνης) αλλαγών στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα παρουσία διαφόρων υποκαταστατών. Το διάλυμα του πρωτεϊνικού δείγματος τοποθετείται σε κιουβέττα και ακτινοβολείται με ακτίνες-X. Ακολουθεί σκέδαση των ακτίνων-X υπό διαφορετικές γωνίες ανάλογα με την περιοχή της πρωτεΐνης που δέχεται την ακτινοβολία και όλες αυτές οι σκεδάσεις συλλέγονται σ' ένα ανιχνευτή. Παρατηρείται ακτινωτή συμμετρικά σκέδαση η ένταση της οποίας εξαρτάται από την απόσταση από το κέντρο του πιάτου ή καλύτερα από την δέσμης ακτινοβολίας. Μ' άλλα λόγια η ένταση της σκέδασης της ακτινοβολίας από κάθε σημείο της πρωτεΐνης εξαρτάται από την γωνία  $\theta$  υπό την οποία αποκλίνει η σκεδαζόμενη ακτινοβολία σε σχέση με την απ' ευθείας ακτινοβολία. Συνήθως παριστάνεται η ένταση της ακτινοβολίας  $[\log I/I(0)]$ ; Όπου  $I$  η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία  $\theta$  και  $I(0)$  η ένταση υπό  $0$  γωνία] σε σχέση με την  $2\sin\theta/\lambda=s$  (όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας). Είναι φανερό ότι αν οι διάφοροι υποκαταστάτες προκαλούν αλλαγές στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης και η σκέδαση της ακτινοβολίας από διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης θα είναι διαφορετική. Επίσης για μικρές γωνίες σκέδασης η παραπάνω καμπύλη είναι ευθεία και από την κλίση της μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για την ποσότητα  $R_G$  (Radius of gyration) που παρέχει πληροφορίες για τις διαστάσεις και το φυσικό μέγεθος του μορίου. Για πιο μεγάλες γωνίες η παραπάνω καμπύλη έχει πιο περίπλοκο σχήμα με ελάχιστα και μέγιστα που δίνουν με κατάλληλη επεξεργασία επιπλέον πληροφορίες για το σχήμα του μορίου.

Έτσι με το SAXS μπορούν ακόμα να προκύψουν πληροφορίες για την χοντρική δομή του μορίου τις διαστάσεις και το μέγεθος του και παρουσία της κρυσταλλογραφικής δομής της SecA, μπορούν να γίνουν πιο ακριβείς οι διάφορες μοντελοποιήσεις. Σημειώνεται ότι όλα τα SAXS πειράματα πραγματοποιήθηκαν από τον Brian Shilton στο Πανεπιστήμιο του Western Ontario, στον Καναδά.

## 2.6. Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών και λιπιδίων με το συντονισμό του επιφανειακού plasmon (Surface Plasmon Resonance).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών μπορούν να μελετηθούν είτε με GST ή Ni-NTA-pull down πειράματα, είτε με δοκιμασία μη αποδιατακτικού πηκτώματος ηλεκτροφόρησης, είτε με χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού, είτε με πειράματα χημικής διασύνδεσης είτε με φασματοσκοπία φθορισμού ή κυκλικού διχρωϊσμού, με διαπίδυση ισορροπίας, καθώς και με ισοθερμική πιλοδότηση θερμοδομετρίας. Η πλειονότητα των παραπάνω μεθόδων έχει εφαρμοστεί

στην παρούσα διατριβή (περισσότερες λεπτομέρειες στα αποτελέσματα), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί ακόμα και μία άλλη μέθοδος άμεσης (real-time) ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης διαφόρων μακρομορίων μεταξύ τους, που στηρίζεται στο φαινόμενο του συντονισμού επιφανειακών κυμάτων ηλεκτρονίων (plasmons) μεταλλικής επιφάνειας που εντοπίζεται στην μεσόφαση υλικών μεγάλου και μικρού δείκτη διάθλασης. Με λίγα λόγια το φως που αντανακλάται στην μεσόφαση των δύο παραπάνω υλικών που διαχωρίζονται από μία λεπτή στοιβάδα αγώγιμου υλικού (όπως ο χρυσός), θα συντονιστεί (διέγερση των ηλεκτρονίων του αγώγιμου υλικού) υπό μία συγκεκριμένη γωνία, και θα μειωθεί κατά συνέπεια η ένταση του ανακλούμενου φωτός υπό αυτή την γωνία. Η γωνία αυτή επηρεάζεται από αλλαγές στον δείκτη διάθλασης του λιγότερου πυκνού μέσου, και άρα από τις αλληλεπιδράσεις ακινητοποιημένων βιομορίων με ελευθερα βιομόρια (αύξηση της μάζας) στην αντίθετη πλευρά του προσπίπτοντος και ανακλούμενου φωτός. Στην παρούσα διατριβή έγινε μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων μέσω της ακινητοποίησης σε καρβοξυλιωμένο ειδικό δίσκο (Ibis chip) της μιας εκ των δύο μελετούμενων πρωτεϊνών. Η ακινητοποίηση, όπως και η μετέπειτα διαδικασία της μελετούμενης αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών μορίων πραγματοποιείται σύμφωνα με τα ειδικά πρωτόκολλα της Xantec. Ακολουθώντας κατάλληλα πρωτόκολλα της Xantec πραγματοποιήθηκε και ακινητοποίηση λιποσωμάτων σε επίπεδη και υδρόφοβη επιφάνεια τώρα προκειμένου να μελετηθεί η αλληλεπίδραση λιπιδίων με πρωτεΐνες.

## 2.7. Παρασκευή ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων.

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή προκύπτουν είτε από KM9 κύτταρα (*unc::Tn10, relA1, spoT1, metB1*) που δεν διαθέτουν F1FOATPάση, είτε από BL21 κύτταρα που φέρουν πλασμίδιο που εκφράζει το SecYEG σύμπλοκο, είτε από BL31 κύτταρα στα οποία το πλασμίδιο Pet640 υπερεκφράζει το SecYEG σύμπλοκο. Γενικά ακολουθούνται οι οδηγίες που προτείνονται από τους Chang et al., 1978; Shiebel et al., 1991; Klionsky et al., 1984; Driessen AND Wickner, 1990; van der Does et al., 1998. Συγκεκριμένα από 20lt BL31/pET640 κυτταρικής καλλιέργειας σε LB (που έχει εμβολιαστεί με 200ml ο/η καλλιέργειας 500ml που έχει με τη σειρά της εμβολιαστεί με μία αποικία από το παραπάνω στέλεχος) συγκεντρώνονται (μετά από επαγωγή με IPTG σε  $OD_{600}=0.5$  για 2 ώρες) 32.5gr κυτταρικής πάστας. Η πάστα διαλυτοποιείται σε αναλογία 1:1 (w/v) σε διάλυμα A: 50mM Tris pH 8, 20% γλυκερόλη και παγώνουν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , κατά την διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα λιώνουν στον πάγο (70ml εναιώρημα), και αραιώνονται με ίσο όγκο διαλύματος A εμπλουτισμένου με DNase (50μg/ml), RNase (10μg/ml) PMSF (1mM), και β-Μερκαπτοαιθανόλη 10mM. Ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με French Press στα 8000psi (3X; προκειμένου να δημιουργηθούν ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια), και το δείγμα αραιώνεται με ίσο όγκο διαλύματος A, για καλύτερο διαχωρισμό των μεμβρανικών κυστιδίων απο τα κυτταρικά υπολείμματα μετά από φυγοκέντρηση 10' σε 4000g (GS3 ρότορας). Το υπερκείμενο (στο οποίο εντοπίζονται οι μεμβράνες) φυγοκεντρείται στα 40000g για 90' και οι κατακρημνιζόμενες μεμβράνες διαλυτοποιούνται σε διάλυμα A (10-30ml) πριν φορτωθούν σε βαθμίδωση σουκρόζης (step gradient) σε 50mM Tris pH 8 (1.9, 1.7, 1.5, 1.3, 1.1M) με 6ml σε κάθε βήμα. Η ακόλουθη φυγοκέντρηση σε SW28 ρότορα σε 24000rpm για 16 ώρες στους  $2^{\circ}\text{C}$ , οδηγεί στον διαχωρισμό των μεμβρανικών κυστιδίων της εσωτερικής μεμβράνης (εντοπίζονται σε μία καφετί ζώνη), από τις εξωτερικές μεμβράνες (εντοπίζονται χαμηλότερα σε μία άσπρη ζώνη). Αφού περισυνελλεγούν τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια της εσωτερικής μεμβράνης αραιώνονται 5 φορές σε διάλυμα A (για να απομακρυνθεί πιο εύκολα η σουκρόζη) και επανακατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στα 40000g για 90'. Τελικά διαλυτοποιούνται σε διάλυμα A σε τελική συγκέντρωση  $\sim 20\text{mg/ml}$  και αποθηκεύονται σε μικρές ποσότητες (20μl) στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.7.A. Απομάκρυνση της SecA από τα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια της εσωτερικής μεμβράνης.

Προκειμένου τα παραπάνω κυστίδια να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα ενζυμικών δοκιμασιών χρειάζεται να απαλλαγούν από την SecA που αλληλεπιδρά με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG. Προς τούτο επωάζονται καταρχήν με IgG anti-SecA (200μg/ml; Διώχνει την SecA από την μεμβράνη) για 90' στους  $4^{\circ}\text{C}$  με ανακίνηση. Εν συνέχεια το δείγμα των μεμβρανών επωάζεται με ουρία (6M) για 35' στους  $4^{\circ}\text{C}$  (αποδιατάσσει και έτσι διαταράσσει την αλληλεπίδραση της SecA με την SecYEG), και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30' στις 100000rpm (φυγόκεντρος TLX της Beckman) πάνω από διάλυμα 0.2M σουκρόζης, 50mM TrisCl pH 8, και 50mM KCl ( $\frac{1}{2}$  του όγκου τους) το οποίο



απομακρύνει την ουρία και καθαρίζει τις μεμβράνες από τις διάφορες πρωτεΐνες (cushion). Εν συνεχεία οι μεμβράνες ξεπλένονται με 1XB με 1mM DTT και διαλυτοποιούνται στο ίδιο διάλυμα (στο 1/2 του αρχικού τους όγκου), με ομογενοποίηση, sonication και vortex.

### **2.7.B. Διαλυτοποίηση και καθαρισμός του SecY<sub>HIS</sub>EG συμπλόκου από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια.**

Τα παραπάνω ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (25mg; που δεν έχουν επωαστεί με IgG anti-SecA και ουρία), διαλυτοποιούνται στον πάγο σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml σε 1.25% Octyl glucoside (OG), 10mM TrisCl pH 8, 20% γλυκερόλη, 0.5mg/ml φωσφολιπιδίων από την E.coli, 1mM DTT και 1 Mm PMSF (διάλυμα B). Με φυγοκέντρωση στα 40000g για 30' απομακρύνονται οι αδιάλυτες πρωτεΐνες και τα διάφορα συσσωματώματα ενώ το υπερκείμενο με τις διαλυτοποιημένα SecYEG μόρια φορτώνεται σε DE52 κολώνα (25ml; τα σφαιρίδια εξισορροπούνται σε pH 8 και η κολώνα πακετάρεται σύμφωνα με τις οδηγίες της Pharmacia) εξισορροπημένης με το παραπάνω διάλυμα B. Σ' αυτήν την σχετικά ασθενή ανιοντοανταλλακτική κολώνα (σε σχέση με την Q), προσδένεται το σύμπλοκο SecYEG, το οποίο μετά το πλύσιμο της κολώνας με 2 όγκους διαλύματος B εκλούεται με βαθμιδωση άλατος KCl από 0-300mM σε διάλυμα B σε 3 όγκους κολώνας. Το απελευθερούμενο SecYEG σύμπλοκο (κλάσματα των 2.5ml) προστίθεται κατευθείαν με την έκλουση του σε 87% γλυκερόλη και 1.25% OG προς τελική συγκέντρωση 40% (ανά κλάσμα των 2.5ml προστίθενται 700μl γλυκερόλη και 350μl 12.5% OG) και αποθηκεύεται στους -80°C. Ακολουθεί ανάλυση των κλασμάτων σε 15% SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση και των τριών πρωτεϊνών του SecYEG με τα αντίστοιχα αντισώματα anti-SecY, anti-SecE, και anti-SecG. Αφού διαπιστωθεί η ακεραιότητα τους ανασυστώνται σε λιποσώματα και η δραστηκότητα τους ελέγχεται με την μέτρηση της ATPάσης που επάγουν στην SecA πρωτεΐνη.

### **2.7.Γ. Ανασύσταση του συμπλόκου SecY<sub>HIS</sub>EG σε πρωτεολιποσώματα.**

Το διαλυτοποιημένο σύμπλοκο SecYEG (100-300μl; 0.25-0.5mg/ml) αναμιγνύεται με 20-40 μl λιπιδίων E.coli (20mg/ml) και επωάζεται για 5' στον πάγο. Εν συνεχεία το δείγμα αραιώνεται σε 4-12 ml διαλύματος 50mM TrisCl pH 8, και 50mM KCl, και επωάζεται στον πάγο για 5'. Τα πρωτεολιποσώματα συλλέγονται με φυγοκέντρωση (30' στις 50000rpm ;TLX σε swing ρότορα; 4°C), και επαναδιαλύονται σε 100μl 50mM TrisCl pH 8, και 50mM KCl. Τα ανασυστάμενα SecYEG πρωτεολιποσώματα παγώνονται και αποθηκεύονται σε μικρούς όγκους (20-50μl) στους -80°C, ενώ πριν την χρήση τους λιώνουν στους 37°C και υφίστανται sonication 3 φορές για 10'' σε υγρό sonicator.

## **2.8. Ενζυματικές δοκιμασίες μέτρησης της δραστηκότητας των πρωτεϊνών.**

### **2.8.A. Μέτρηση της δραστηκότητας ATPάσης της SecA.**

Η SecA πρωτεΐνη ανάλογα με το αν βρίσκεται μόνη της στο διάλυμα, αν αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο SecYEG, ή κατά την διάρκεια της αντίδρασης μεταφοράς υποστρώματος μέσα από μεμβράνες, παρουσιάζει τρία είδη ATPάσης την Βασική (Basal), την μεμβρανική (Membrane) και την ATPάση Μετατόπισης (Translocation ATPase) αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό της κάθε μίας από τις παραπάνω δραστηκότητες ATPάσης χρησιμοποιείται είτε κρύο ATP, οπότε η ανίχνευση του απελευθερούμενου ανόργανου φωσφόρου πραγματοποιείται με την χρωματογραφική μέθοδο MGR (Malachite Green Reagent) όπως προτείνεται από τους Lanzetta et al., 1978, είτε ραδιενεργό α-<sup>32</sup>P ή γ-<sup>32</sup>P ATP, οπότε τα προϊόντα υδρόλυσης μελετώνται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) και την χρήση Phosphorimager. Έτσι στην πρώτη περίπτωση ετοιμάζονται αντιδράσεις 50μl σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH:8, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και 1mM DTT), με 1mg/ml BSA και 1mM ATP. Εν συνέχεια προστίθεται η πρωτεΐνη (1μg) ή απλά αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος B (τυφλό δείγμα για τον θόρυβο του ATP), και το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 20'. Η αντίδραση σταματά με επώαση στον πάγο για 5' και στη συνέχεια ακολουθείται το πρωτόκολλο από τους Lanzetta et al., 1978 για την φασματοφωτομετρική ανίχνευση του ανόργανου φωσφόρου και κατ' επέκταση τον προσδιορισμό της Βασικής ATPάσης της πρωτεΐνης. Για τον

προσδιορισμό της μεμβρανικής ATPάσης προστίθενται και 6μg IMVs στο παραπάνω πρωτεϊνικό δείγμα, ή απλά σε διάλυμα B (τυφλό δείγμα για τον θόρυβο που προκαλούν στην ATPάση οι μεμβράνες), ενώ για τον προσδιορισμό της ATPάσης μετατόπισης προστίθενται και 3μg proOmpA (πάλι ετοιμάζουμε κατάλληλο τυφλό δείγμα για τον προσδιορισμό του θορύβου που προκαλούν στην ATPάση οι μεμβράνες μαζί με την proOmpA). Στη συνέχεια τα δείγματα επεξεργάζονται με τον ίδιο τρόπο όπως και στην περίπτωση της Βασικής ATPάσης. Σημειώνεται ότι σ' όλα τα παραπάνω δείγματα πρέπει να προστεθεί και αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος ουρίας (4M, στο οποίο είναι διαλυμένη η proOmpA), αν δεν υπάρχει το υπόστρωμα της proOmpA, για να μπορούν να συγκριθούν τα επαγόμενα αποτελέσματα.

Στην περίπτωση που η μέτρηση της Βασικής, της Μεμβρανικής και της ATPάσης μετατόπισης πραγματοποιείται με την παρακολούθηση των προϊόντων υδρόλυσης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, πραγματοποιούνται αντιδράσεις 20μl σε διάλυμα B με 1mg/ml BSA. Εν συνεχεία προστίθενται 50μg/ml SecA, 200μg/ml ανασυστάμενα με SecYEG πρωτεολιποσώματα (ή διάλυμα B), και τέλος 0.2mg/ml proOmpA (ή διάλυμα ουρίας). Για να προσδιοριστούν οι σταθερές  $K_m$  (M) και  $K_{cat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) σταθερής κατάστασης των παραπάνω ειδών ATPάσης, στα παραπάνω δείγματα προστίθενται και ποικιλία συγκεντρώσεων ATP από 0.01-1005μM (με ιχνηθέτη ραδιενεργό [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, 0.01μM), και μετά την επώαση των αντιδράσεων στους 37°C, οι αντιδράσεις υδρόλυσης σταματούν με προσθήκη πρωτεϊνάσης K (1mg/ml; 10'; 4°C). Τελικά τα δείγματα (3μl) ακινητοποιούνται σε PEI φύλλα κυτταρίνης (Merck), και διαχωρίζονται με τρέξιμο σε διάλυμα φωσφορικού καλίου pH :3.4. Τα ραδιενεργά προϊόντα της υδρόλυσης (ραδιενεργό ATP, ADP, και Pi) μετρώνται με την χρήση phosphorimager, μετά το στέγνωμα του φύλλου κυτταρίνης.

## **2.8.B. Δοκιμασία *in vitro* της μετατόπισης της proOmpA μέσα από ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (IMVs) ή ανασυστάμενα με το σύμπλοκο SecYEG πρωτεολιποσώματα.**

Στην δοκιμασία αυτή χρησιμοποιείται ραδιενεργά σηματοδοτημένη  $^{35}\text{S}$ -proOmpA, που έχει συντεθεί μετά από μεταγραφή και μετάφραση *in vitro* με την βοήθεια του kit της Promega (TnT<sup>®</sup> T7/T3 coupled reticulocyte system). Σημειώνεται ότι η  $^{35}\text{S}$ -proOmpA απαλλάσσεται από την μη ενσωματωμένη μεθειονίνη με την χρήση κολώνας G-50 μοριακής διήθησης, ενώ τα ριβοσώματα του ερυθροκυτταρικού συστήματος του kit απομακρύνονται με υπερφυοκέντρωση στις 100000rpm (TLX). Η  $^{35}\text{S}$ -proOmpA που έχει μετατοπιστεί στον αυλό των ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων (πρωτεολιποσωμάτων) προφυλλάσσεται από εξωγενώς προστιθέμενη πρωτεάση και ανιχνεύεται σε SDS-πηκτώματα ακρυλαμίδης σαν πρωτεϊνική ζώνη μετακινούμενη πιο γρήγορα από την  $^{35}\text{S}$ -proOmpA λόγω της πέψης από την Πεπτιδάση Οδηγό του πεπτιδίου σηματοδότη της (μόνο στην περίπτωση των ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων). Συγκεκριμένα ετοιμάζονται αντιδράσεις 50μl σε διάλυμα B με 0.4mg/ml BSA, 1mM DTT, 2mM ATP, 0.02mg/ml SecB, 0.04mg/ml SecA, και 0.2mg/ml IMVs που έχουν επεξεργαστεί με ουρία για να μην υπάρχει ενδογενής SecA (ή 2μl πρωτεολιποσωμάτων μετά από τον συνήθη παρασκευή τους). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη  $^{35}\text{S}$ -proOmpA (έτσι ώστε η συγκέντρωση ουρίας στο διάλυμα να μην ξεπερνά την συγκέντρωση των 0.3M στην οποία είναι λειτουργική η SecA). Ακολουθεί επώαση για 15' στους 37°C, και η αντίδραση σταματά τελικά με επώαση στον πάγο για 5'. Στην συνέχεια επιδρούμε με πρωτεϊνάση K (1mg/ml) για 15' στον πάγο, και κατόπιν κατακρημνίζουμε τις πρωτεΐνες με TCA (25%w/v) σε τελική συγκέντρωση 12.5% για 20' στους 4°C. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 8' στα 16000g, και το υπερκείμενο απομακρύνεται με αναρρόφηση. Τα ιζήματα ξεπλένονται με ακετόνη, και μετά το στέγνωμα τους (37°C, 5'), διαλυτοποιούνται με 20-30μl διαλύματος φορτώματος (SDS sample buffer). Οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύονται με φλουορογραφία. Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι απαραίτητη η παρουσία δείγματος χωρίς ATP, στο οποίο δεν πραγματοποιείται μετατόπιση, για σύγκριση του με τα δείγματα στα οποία λαμβάνει χώρα μεταφορά  $^{35}\text{S}$ -proOmpA από μεμβράνες, καθώς και δείγματος στο οποίο προστίθεται πριν από την πρωτεϊνάση K 1% Triton X-100, για να επιβεβαιωθεί ότι η προστασία της  $^{35}\text{S}$ -proOmpA από πρωτεάση οφείλεται στο πέρασμα της μέσα από τα μεμβρανικά κυστίδια και όχι σε δημιουργία συσσωματωμάτων. Χρησιμοποιώντας δε περίσσεια εξωγενούς SecAIRA1, στην περίπτωση που τα IMVs δεν έχουν επεξεργαστεί με ουρία και επομένως διαθέτουν ενδογενή SecA, πραγματοποιούνται πειράματα συναγωνισμού της δράσης της SecAWT από τις διάφορες SecAIRA1 μεταλλαγές.

## **2.9. Μέτρηση της συγγένειας της SecA και των SecAIRA1 πρωτεϊνών με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG.**

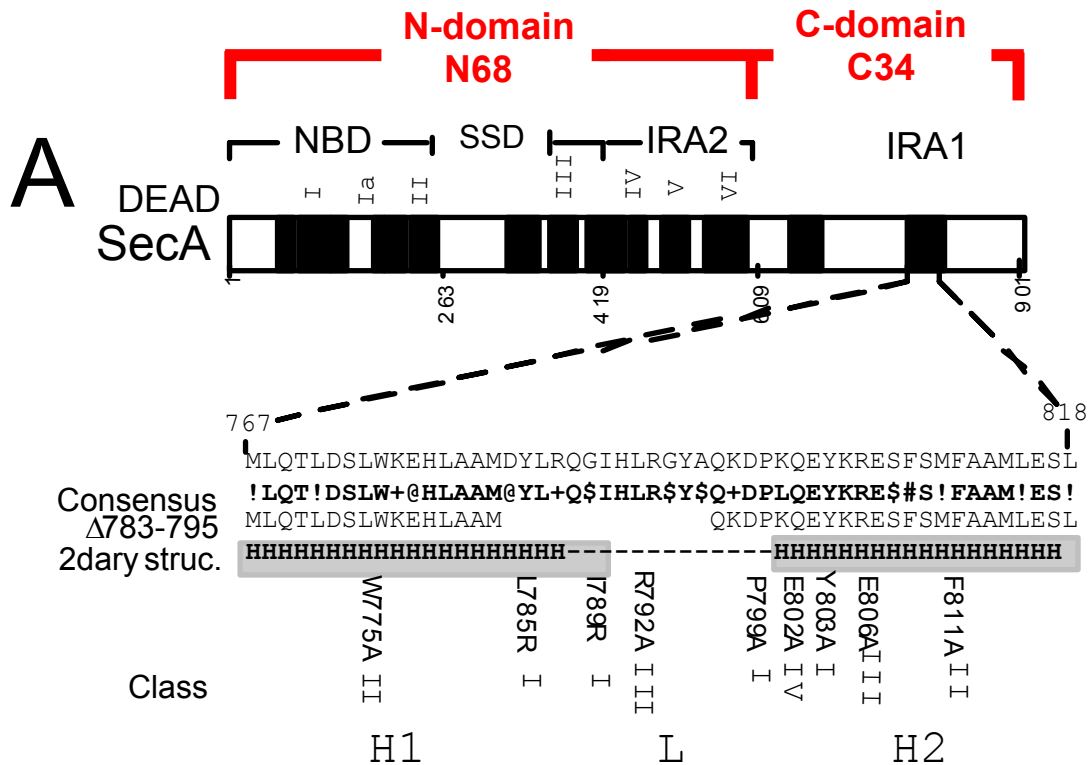
Η SecA πρωτεΐνη σημαίνεται με  $^{35}\text{S}$ -met με την χρησιμοποίηση του συνδυασμένου ερυθροκυτταρικού συστήματος μεταγραφής και μετάφρασης της Promega (TnT<sup>®</sup> T7/T3 coupled reticulocyte system). Ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες του πρωτοκόλλου της εταιρείας και επιτυγχάνεται ειδική ενεργότητα  $\sim 0.84 \times 10^6$  cpm/pmol, ενώ η συγκέντρωση της πρωτεΐνης κυμαίνεται από 0.01-0.5nM. Προκειμένου να βρεθεί η συγγένεια της SecA με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG, αναμιγνύονται ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (Inner Membrane Vesicles, IMVs; 64μg/ml), που έχουν υποστεί επεξεργασία με ουρία, για απομάκρυνση της ενδογενούς SecA, με αυξανόμενες συγκεντρώσεις SecA. Συγκεκριμένα ετοιμάζονται περί τα 20 δείγματα με σταθερή συγκέντρωση  $^{35}\text{S}$ -SecA (0.01-0.5nM) αλλά μεταβαλλόμενη συγκέντρωση κρύας SecA, η οποία αυξάνεται από 1 μέχρι 2000nM, σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH:8, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και 1mM DTT) με 1mg/ml BSA σε τελικό όγκο 20μl. Μετά από 15' επώαση στον πάγο το δείγμα επικάθεται σε ίσο όγκο διαλύματος B που περιέχει 0.2M σουκρόζη και 1mg/ml BSA και οι μεμβράνες κατακρημνίζονται στις 32000g για 30' στους 4°C, σε σωληνάκια που έχουν μπλοκαριστεί με BSA (μετά από επώαση και ξέπλυμα με διάλυμα B με 2mg/ml BSA). Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα B (2X 100μl) μετά από εκτεταμένο πιπετάρισμα και sonication. Τα διαλυτοποιημένα ιζήματα, αλλά και η συνολική ποσότητα ραδιενεργούς πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα, φορτώνονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με την χρήση της συσκευής Bio-Dot<sup>®</sup> Microfilter. Η ραδιενέργεια σε κάθε κουκίδα στη μεμβράνη μετράται με την χρήση phosphorimager (Molecular dynamics), ενώ τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό Graph pad Prism (Graph Pad Software, Inc.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

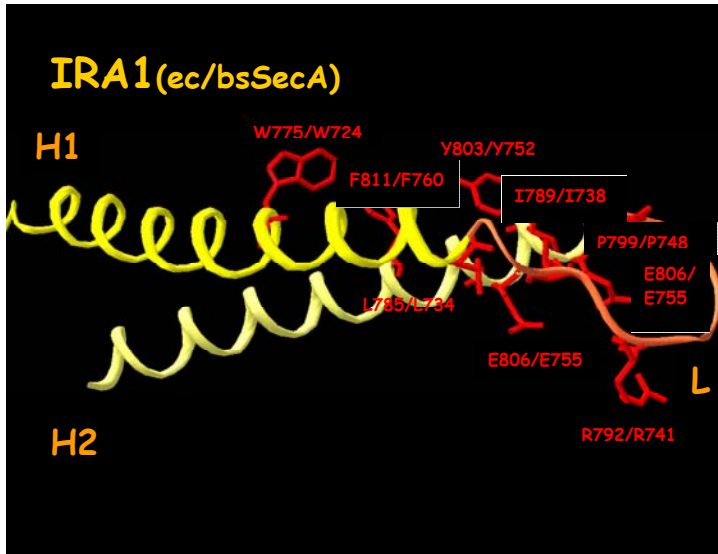
### 3.1. Σημειακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη

Προκειμένου να συλλέξουμε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο και τον τρόπο δράσης του IRA1 ρυθμιστικού στοιχείου, επιτελέστηκε μία σειρά σημειακών μεταλλαγών σε εννέα πολύ συντηρημένα αμινοξέα του IRA1 (>95% ταυτότητα και ομοιότητα; Karamanou et al., 1999; βλέπε και εισαγωγή), όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 53.



Σχήμα 53: Χάρτης της SecA, στον οποίο αναγράφονται οι διάφορες περιοχές από τις οποίες αποτελείται ο DEAD (N68) κινητήρας (NBD, SSD, IRA2-βλέπε και εισαγωγή), ενώ σημειώνεται και το IRA1 στοιχείο της C-περιοχής. Σ' όλο το μήκος της SecA, αναπαριστώνται με μαύρα κουτιά τα 13 συντηρημένα της μοτίβα, ενώ τα μοτίβα των DEAD ελικασών, αναγράφονται με λατινικούς αριθμούς πάνω από τον χάρτη της SecA. Κάτω από τον χάρτη, σημειώνονται οι κύριες θέσεις των αμινοξέων στις οποίες επιδρά η θρυψίνη, μετά από περιοριστική πρωτεόλυση της SecA (βλέπε και αποτελέσματα κεφάλαιο II). Το δεκατοστό συντηρημένο μοτίβο της SecA, είναι το IRA1, του οποίου η αλληλουχία των αμινοξέων σημειώνεται αναλυτικά από την θέση 767, μέχρι την 818 (από την δομή της bsSecA, προκύπτει ότι το IRA1 στην ecSecA, εκτείνεται από την θέση 756, μέχρι την θέση 777). Στο παραπάνω σχήμα, σημειώνεται επιπλέον η συναινετική αλληλουχία της παραπάνω αλληλουχίας των αμινοξέων του IRA1, καθώς και η προβλεπόμενη, αλλά και η κρυσταλλογραφική δευτεροταγής δομή του IRA1. Αυτή περιλαμβάνει μία έλικα, μία λούπα και μία δεύτερη έλικα, H1-L-H2. Τέλος αναγράφονται οι διάφορες σημειακές μεταλλαγές, καθώς και οι τάξεις στις οποίες ομαδοποιούνται (βλέπε επόμενο κεφάλαιο)

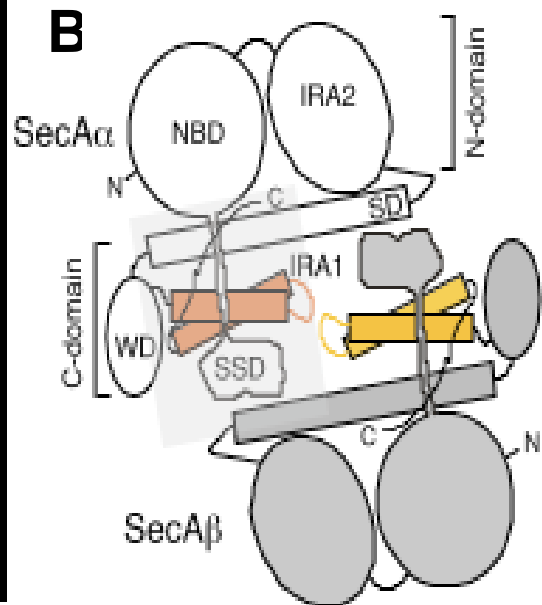
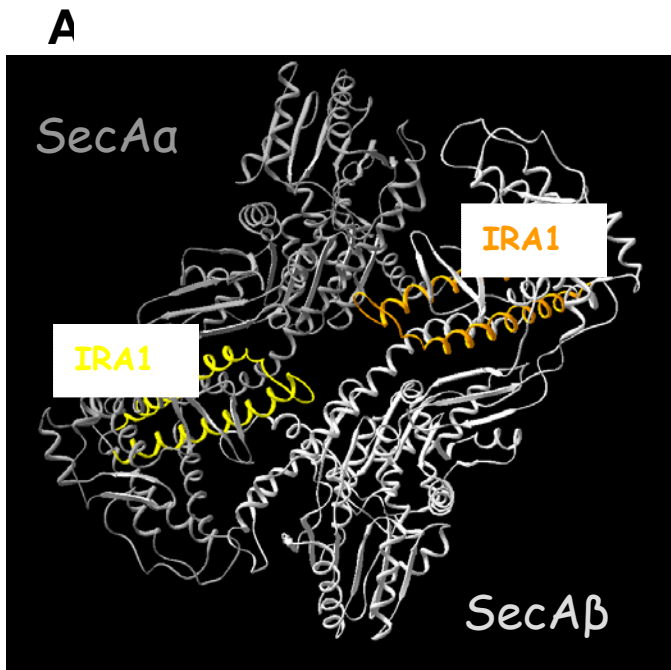
Περιοριστήκαμε στην δημιουργία ήπιων αντικαταστάσεων προς αλανίνες, εκτός από την αντικατάσταση της λευκίνης, στη θέση 785, και της ισολευκίνης, στην θέση 789 προς αργινίνινες (για την δημιουργία των σημειακών μεταλλαγών, βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τόσο με βάση τις προβλέψεις της δευτεροταγούς δομής (Rost and Buchard, ?), όσο και από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της SecA από το *Bacillus subtilis* (Hunt et al., 2002; Εισαγωγή σχήμα 34), και από το *Mycobacterium tuberculosis* (Sharma et al., 2003; Εισαγωγή σχήμα 38), προκύπτει ότι η IRA1-περιοχή, συνιστά μία δομή α-έλικας/λούπας/α-έλικας (από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως H1-L-H2 (α-Helix1/Loop/α-Helix2), η οποία παρουσιάζεται στο σχήμα 54. Η δομή αυτή εντοπίζεται σε μία κεντρική θέση στις παραπάνω αναλυμένες SecA, (σχήμα 55), με αποτέλεσμα το IRA1 στοιχείο να εμπλέκεται σ' ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων σχεδόν μ' όλες τις υπόλοιπες περιοχές της SecA. Συγκεκριμένα, κατ' αναλογία με την δομή της bsSecA, τα αμινοξέα του IRA1 στην ecSecA αναμένεται να παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τις SSD, SD, WD, IRA1 και CT-περιοχές του ενός πρωτομερούς, αλλά και με τις NBD, και SD-περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα



Σχήμα 54: Δομή της IRA1 περιοχής από την κρυσταλλογραφική ανάλυση της *bsSecA*. Σημειώνονται οι θέσεις των σημειακών μεταλλαγών των αμινοξέων στην *ec* αλλά και στην *bsSecA*. Ανάλογη εικόνα του IRA1, προκύπτει και από την δομή της *mtSecA* (βλέπε σχήμα 57B).

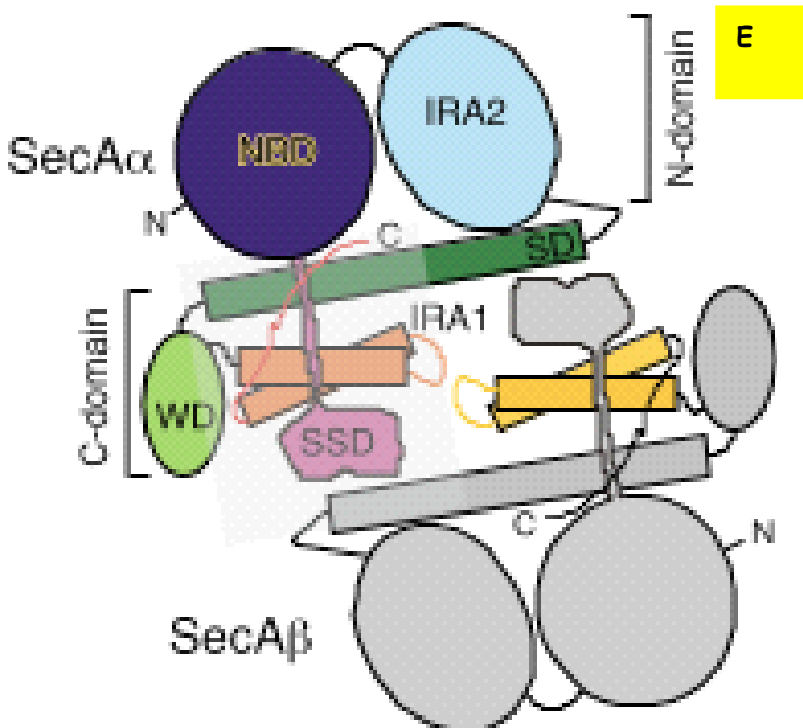
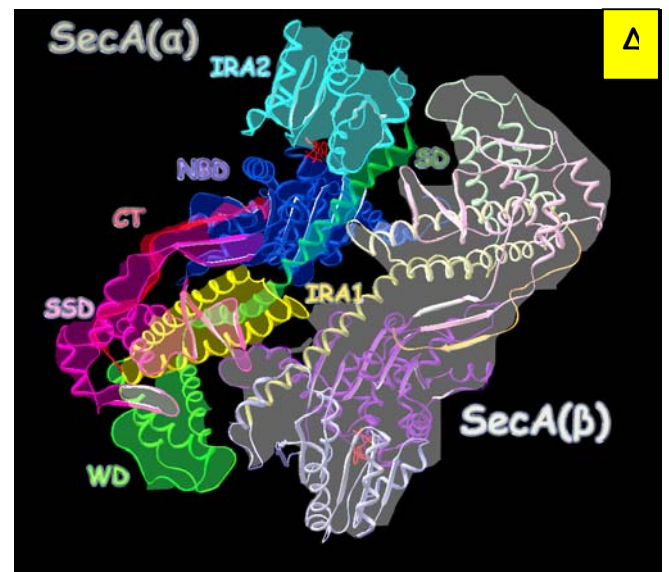
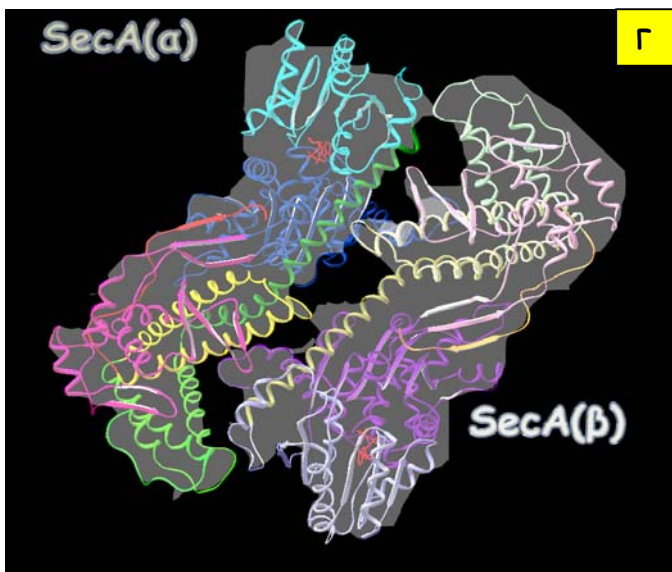
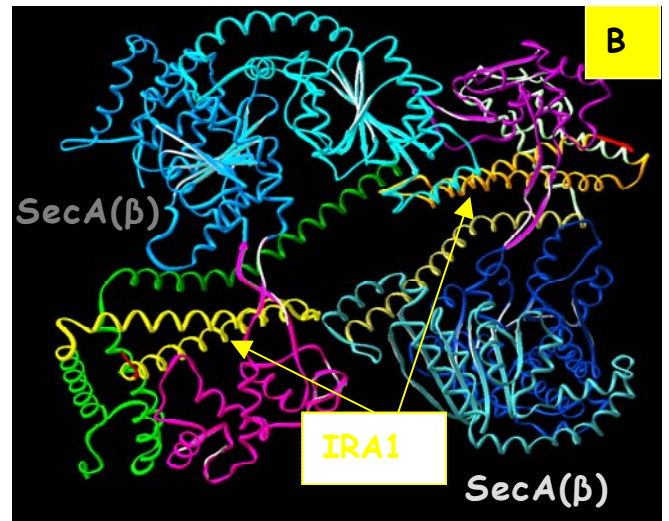
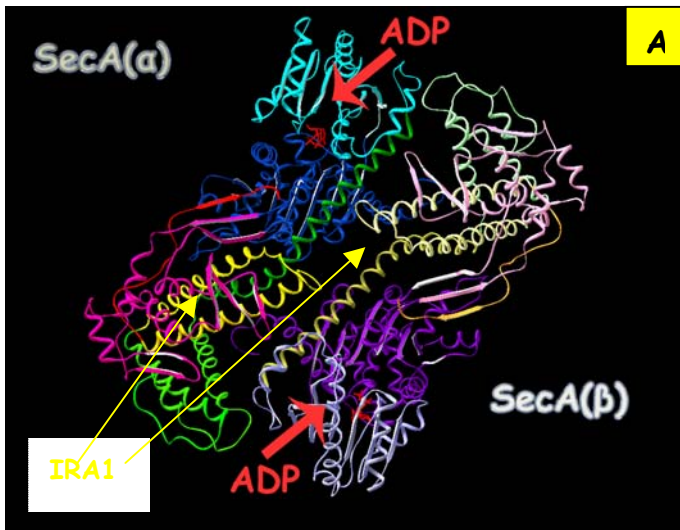
επικοινωνία του IRA1 με την περιοχή SD, στην τάξη III τα αμινοξέα με τα οποία πραγματοποιείται η σύνδεση με την περιοχή SSD, και τέλος στην τάξη IV ανήκουν τα αμινοξέα με τα οποία ο IRA1 διακόπτει αλληλεπιδρά με την SD-περιοχή του δεύτερου πρωτομερούς (Αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 3.4 των αποτελεσμάτων). Παρά την πληθώρα των παραπάνω αλληλεπιδράσεων η IRA1-περιοχή διαθέτει και τμήματα (για παράδειγμα σημαντικό μέρος της H1) ελεύθερα για αλληλεπίδραση με τον διαλύτη ή με τα διάφορα υποστρώματα (τελεστές) της αντίδρασης μετατόπισης των

56A, Γ, Δ και Ε και Κεφάλαιο 3.4 των αποτελεσμάτων). Επιπλέον με βάση την δομή της *mtSecA*, τα αμινοξέα του IRA1 στην *ecSecA* αναμένεται να παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τις SSD, SD, WD, και IRA1-περιοχές του ενός πρωτομερούς, αλλά και με τις IRA2, και SD-περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα 56B και Κεφάλαιο 3.4 των αποτελεσμάτων). Ανάλογα με το είδος των αλληλεπιδράσεων στις οποίες μετέχουν τα αμινοξέα του IRA1 στοιχείου ταξινομούνται σε τέσσερις τάξεις. Έτσι στην τάξη I ανήκουν τα αμινοξέα που μετέχουν στις αλληλεπιδράσεις εντός της περιοχής IRA1, στην τάξη II τα αμινοξέα που συντελούν στην



Σχήμα 55: Κεντρική τοποθέτηση του IRA1 (κίτρινο χρώμα) ρυθμιστικού στοιχείου στην κρυσταλλογραφική δομή της διμερούς *bsSecA* (A). Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της *mtSecA* (σχήμα 57B). Β) Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων δομών της *bsSecA* (βλέπε και εισαγωγή σχήμα 34). Ο IRA1 διακόπτης χρωματίζεται με πορτοκαλί και κίτρινο χρώμα στο πρωτομέρες α και β αντίστοιχα.

πρωτεϊνών (σχήμα 57). Εξάλλου όπως θα αναφερθεί στην συζήτηση ενδέχεται η μεταφερόμενη κατά την έκκριση προπρωτεΐνη να εντοπίζεται μεταξύ της περιοχής IRA1 και της περιοχής SSD που την αγκαλιάζει.



Σχήμα 56: Κρυσταλλογραφική και σχηματική αναπαράσταση της διμερούς *bsSecA* A) και *mtSecA* B). A) Απεικόνιση της *bsSecA* με μορφή ταινίας (ribbon diagram), στην οποία οι διάφορες περιοχές της χρωματίζονται με διαφορετικό χρώμα, ενώ διακρίνεται και το ADP (στο μονομερές *SecA(β)*), οι αντίστοιχες περιοχές χρωματίζονται με πιο ανοιχτά χρώματα). B) Αντίστοιχη απεικόνιση της *mtSecA*. Γ) Η *bsSecA* αποτελείται από δύο μονομερή, το *SecA(α)* και το *SecA(β)*. Δ) Ονομασία των διαφόρων περιοχών στο *SecA(α)* μονομερές. NBD-περιοχή (μπλε χρώμα), IRA2-περιοχή (γαλάζιο χρώμα), SSD-περιοχή (ροζ χρώμα), SD-περιοχή (λαδί χρώμα), WD-περιοχή (λαχανί χρώμα), IRA1-περιοχή (κίτρινο χρώμα), και CT-περιοχή (κόκκινο χρώμα). E) Σχηματική αναπαράσταση της *bsSecA*.



Σχήμα 57: Η IRA1-περιοχή επικοινωνεί σχεδόν με όλες τις περιοχές της SecA, αλλά διαθέτει και περιοχές που βλέπουν στον διαλύτη, όπως η H1.

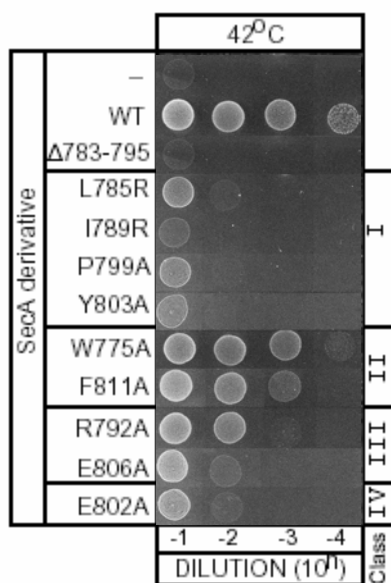




## 3.2. Λειτουργική ανάλυση

### 3.2.A. Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την κατάλυση της μετατόπισης των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες.

Όπως ειπώθηκε και στην εισαγωγή, μερική έλλειψη της IRA1 περιοχής (SecA $\Delta$ 783-795; Jarosik and Oliver, 1991), προκαλεί θνησιμότητα (Karamanou et al., 1999). Προκειμένου λοιπόν να μελετήσουμε την επίδραση των παραπάνω IRA1 σημειακών μεταλλαγών στη βιωσιμότητα του βακτηριακού κυττάρου (χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος BL21.19-βλέπε υλικά και μέθοδοι), ελέγχθηκε η ικανότητα τους να συμπληρώνουν την θερμοευαίσθητη SecA (SecA<sub>ts</sub>) ενός χρωμοσωμικού *secA* γονιδίου, στους 42°C (σχήμα 58; Mitchel and Oliver, 1992; Karamanou et al., 1999; βλέπε και υλικά και μέθοδοι). Παρατηρούμε ότι καμία από τις παραπάνω σημειακές IRA1 μεταλλαγές, δεν είναι τόσο αποτελεσματική στην επανόρθωση της αύξησης των κυττάρων, όσο η αγρίου τύπου SecA. Παρόλα αυτά οι IRA1 μεταλλαγές

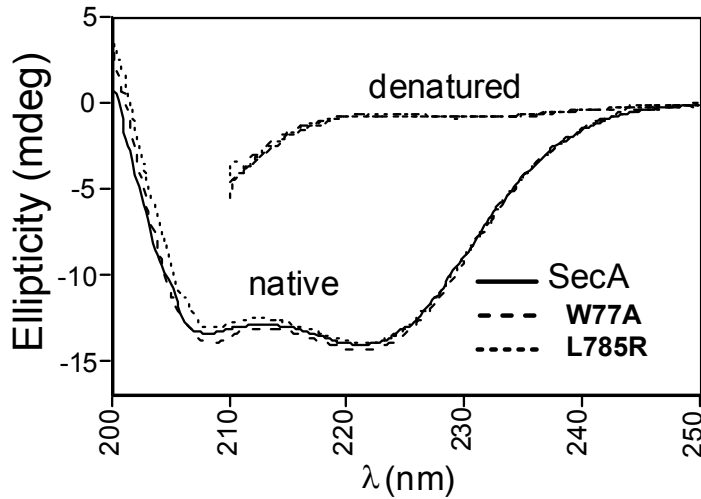


Σχήμα 58: Γενετική συμπληρωματικότητα. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται καλλιέργειες του στελέχους BL21.19 (που φέρουν χρωμοσωμικό γονίδιο για την έκφραση θερμοευαίσθητης SecA, *tsSecA*), ίδιας κυτταρικής πυκνότητας, που φέρουν πλασμιδιακά παράγωγα του φορέα έκφρασης pET5. Συγκεκριμένα ο φορέας αυτός, είτε δεν περιέχει κλωνοποιημένο κανένα γονίδιο (-), είτε περιέχει κλωνοποιημένο το γονίδιο *secA* για την αγρίου τύπου SecA (WT), ή για τις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες, όλων των τάξεων, όπως φαίνεται στην εικόνα. Οι βακτηριακές καλλιέργειες υπόκεινται σε διαδοχικές αραιώσεις και με τη μορφή σταγόνας (15  $\mu$ l) τοποθετούνται σε πιάτο με θρεπτικό υλικό Luria-Bertani και αμπικιλίνη. Το πιάτο επωάζεται στους 42°C (θερμοκρασία αναστολής της δράσης της *tsSecA*) ή στους 30°C (πιάτο αναφοράς). Το πιάτο των 30°C που δεν φαίνεται στο σχήμα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ομοιόμορφης ανάπτυξης των διαφόρων καλλιεργειών σ' όλες τις αραιώσεις.

τάξης II (SecAW775A και SecAF811A), καθώς και η SecAR792A, που είναι IRA1 μεταλλαγή τάξης III, συμπληρώνουν την SecA<sub>ts</sub> σε σημαντικό βαθμό (διαπιστώνεται αύξηση κυττάρων μέχρι την τέταρτη, τρίτη και δεύτερη αραιώση αντίστοιχα, σχήμα 58). Οι υπόλοιπες IRA1 μεταλλαγμένες SecA, μόλις και μετά βίας επιτρέπουν την ανάπτυξη των κυττάρων, με εντονότερο το πρόβλημα, στην περίπτωση της SecAI789R και SecAY803A.

Για να αποκλειστεί η πιθανότητα αστάθειας-πρωτεόλυσης των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών, ως η αιτία του παραπάνω *in vivo* φαινοτύπου, έγινε προσπάθεια καθαρισμού των παραπάνω μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν παράγωγα τους, με αμινοτελικές συμπηξίσεις ολιγοιστιδινών (βλέπε υλικά και μέθοδοι), οπότε και ακολούθησε σχετικά εύκολος καθαρισμός τους (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Διαπιστώθηκε ότι όλες οι μεταλλαγμένες SecAIRA1 πρωτεΐνες είναι σταθερές χρωματογραφικά, ενώ όταν μελετήθηκαν με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (*farUV CD*; Βλέπε υλικά και μέθοδοι), παρατηρήθηκε η δυτεροταγής  $\alpha$ -ελικοειδής δομή τους (σχήμα 59). Επομένως οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, με τις παραπάνω μεθόδους τουλάχιστον, δεν φαίνεται να παρουσιάζουν κάποιο πρόβλημα αστάθειας ή δομής και εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν σε πληθώρα βιοχημικών αναλύσεων.

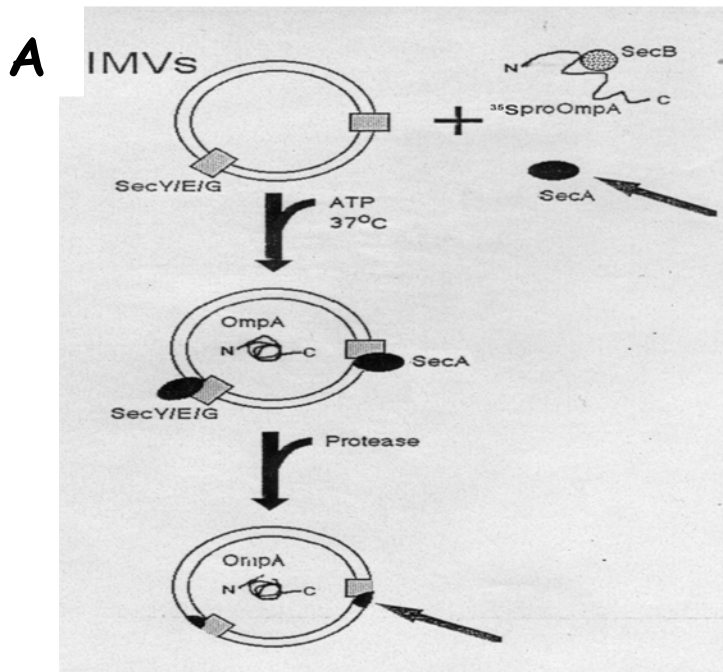
Προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω αν ο προβληματικός φαινότυπος *in vivo* των διαφόρων SecAIRA1 πρωτεϊνών, οφείλεται στην ανικανότητά τους να επιτελέσουν μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες, και όχι σε κάποια άσχετη πλειοτροπική αντίδραση, ελέγχθηκε η απόδοση της μεταφοράς πρωτεϊνών στο εσωτερικό ανασυστάμενων πρωτεολιποσωμάτων με SecYEG παρουσία των παραπάνω μεταλλαγών (βλέπε υλικά και μέθοδοι), σε μία στανταρισμένη διαδικασία μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες *in vitro* (σχήμα 60; Brundage et al., 1990; Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Εκτός από την SecAW775A, καμία άλλη από τις μεταλλαγμένες



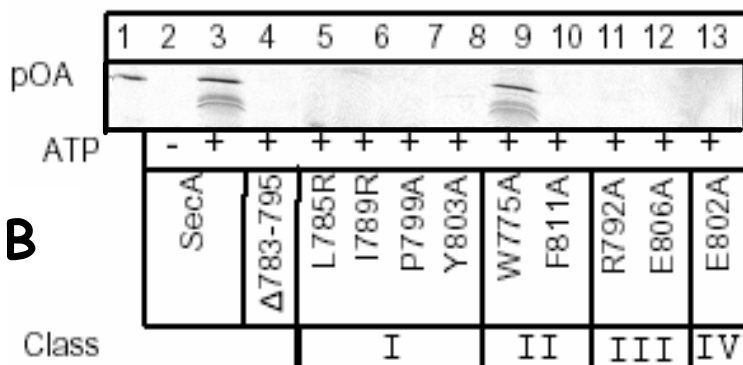
Σχήμα 59: Φάσμα υπεριώδους κυκλικού διχρωσμού της SecA και δύο τυχαίων IRA1 μεταλλαγών, της SecAW775A και της SecAL785R. Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε τυχαίες θερμοκρασίες και τα δείγματα κανονικοποιούνται όσον αφορά τις συγκεντρώσεις τους. Απεικονίζονται ίχνη αναδιπλωμένων και αποδιαταγμένων με GnHCL πολυπεπτιδίων. Σημειώνεται ότι αυξημένος θόρυβος λόγω GnHCL, αποκλείει την συλλογή δεδομένων κάτω από τα 210nm.

SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν μπορεί να υποστηρίξει μεταφορά πρωτεϊνών μέσα από τα SecYEG πρωτεολιποσώματα.

Εν συνεχεία χρησιμοποιήθηκαν και ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια αντί για SecYEG πρωτεολιποσώματα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ανικανότητα σχεδόν όλων των IRA1 σημειακών μεταλλαγών να επιτελέσουν μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από τα λιπιδικά κυστίδια *in vitro*, αναστέλεται παρουσία



Σχήμα 60: A) Σχηματική ανάλυση της πειρατικής διαδικασίας μετατόπισης πρωτεϊνών *in vitro*. B) Μετατόπιση πρωτεϊνών *in vitro*. Οι διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες (εκτός από την SecAW775A) είναι ανίκανες να επιτελέσουν μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από μεμβρανικά κυστίδια *in vitro*. Αντιδράσεις (50 λ σε διάλυμα B), που περιέχουν 40μg/ml SecA (ή κάθε μία από τις SecAIRA1 όλων των τάξεων), [<sup>35</sup>S]-proOmpA (~50 000 c.p.m.), 2mMATP, 20μg/mlSecB και πρωτεολιποσώματα ανασυστάμενα με SecYEG, επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί θρυψινόλυση (15 λεπτά, 1mg/ml, 0°C), κατακρήμνιση με TCA (τριχλωροξικό οξύ) και ανάλυση των δειγμάτων σε SDS-πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Η αυτοραδιογραφία που προκύπτει απεικονίζεται στο σχήμα, όπου στο πρώτο πηγαδάκι τοποθετείται το 10% της [<sup>35</sup>S]-proOmpA (pOA), που χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση.



και των διάφορων άλλων πρωτεϊνών της μεμβράνης εκτός από το σύμπλοκο SecYEG. Διαπιστώθηκε ότι ακόμα και παρουσία των SecDFYajC, αλλά και των υπολοίπων πρωτεϊνών της βακτηριακής μεμβράνης δεν επιτυγχάνεται μετατόπιση πρωτεϊνών *in vitro* σχεδόν ξανά για όλες τις παραπάνω μεταλλαγές. Εξαιρέση αποτελούν πάλι η SecAW775A, ενώ παρατηρείται και σ' ένα μικρό ποσοστό μετατόπιση της ProOmpA από την SecAR792A,

ενώ ακόμα μικρότερο ποσοστό μετατόπισης πραγματοποιείται από την SecAF811A. Εξάλλου οι τρεις παραπάνω μεταλλαγές παρουσιάζουν και τους λιγότερο δραματικούς φαινοτύπους *in vivo* (σχήμα 58), και κατά συνέπεια αναμένεται να επιτελούν έκκριση πρωτεϊνών *in vivo*, αν και λιγότερο ή περισσότερο περιορισμένη σε σχέση με την SecAWT (για την SecAW775 και SecAF811A, SecAR792A αντίστοιχα). Ίσως η προσθήκη και ενέργειας με τη μορφή του PMF (Proton Motive Force) στα παραπάνω μεμβρανικά κυστίδια κατά την δοκιμασία της μετατόπισης *in vitro*, να βοηθούσε στην προσομοίωση ακόμα περισσότερο των φαινοτύπων *in vivo* και *in vitro*.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η IRA1 περιοχή στην SecA πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την κατάλυση τις μεταφοράς των πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες.

### 3.2.B. Η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την αποδοτική υδρόλυση ATP από την SecA.

Προκειμένου να εξεταστεί αν η παραπάνω προβληματική διαδικασία της μεταφοράς πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες *in vitro*, οφείλεται σε ελαττωματική κατάλυση ATP, ελέγχθηκαν οι τρεις δραστηκότητες ATPάσης (Lill et al., 1990 και σχήμα 17 στην Εισαγωγή) για κάθε μία από τις παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγές. Συγκεκριμένα μετρήθηκε η βασική ATPάση (Basal ATPase), η επαγόμενη από το σύμπλοκο SecYEG μεμβρανική ATPάση (Membrane ATPase), και η επαγόμενη από το σύμπλοκο SecYEG και την προπρωτεΐνη ATPάση μετατόπισης (Translocation ATPase), πίνακας I (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Σημειώνεται ότι στις συγκεκριμένες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν πρωτεολιποσώματα ανασυστάμενα με το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG (βλέπε υλικά και μέθοδοι), και ότι οι διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες βρίσκονται σε 1.25 φορές περίσσεια σε σχέση με την συγγένεια των ~200 nM που διαθέτουν για την SecYEG (Κεφάλαιο IV). Διαπιστώνεται ότι ο βασικός ρυθμός

#### Πίνακας I

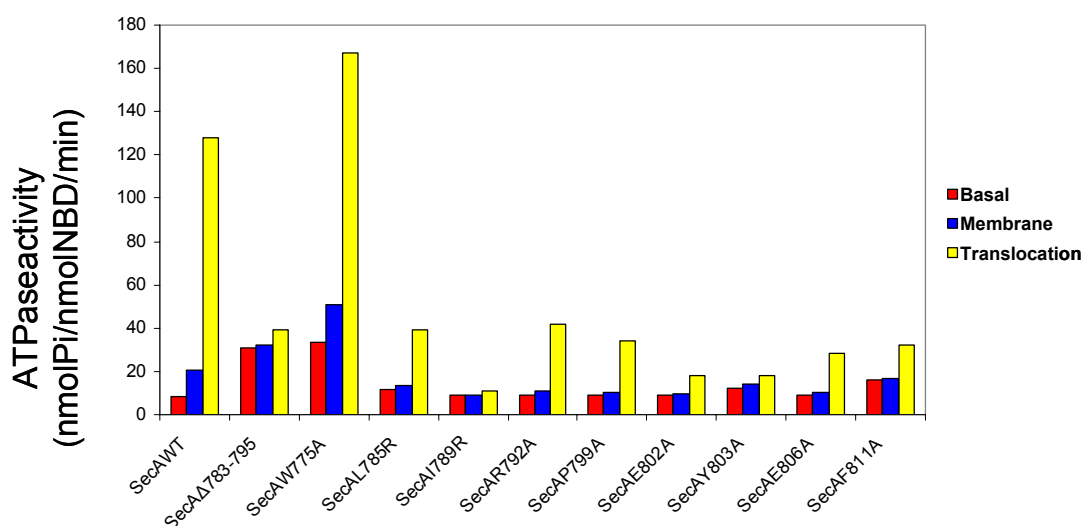
Κινητικές σταθερές στάσιμης κατάστασης (Steady-state kinetic constants), της δραστηκότητας ATPάσης των SecAIRA1 μεταλλαγών. Αυτές είναι η  $k_{cat}$  που αντιπροσωπεύει τον ρυθμό ανακύκλωσης των προϊόντων υδρόλυσης ανά μονάδα ενζύμου ανά μονάδα χρόνου και η  $k_m$  που αντιπροσωπεύει την συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα υδρόλυσης του ενζύμου αποκτά την μισή της μέγιστης τιμής της. Οι παρακάτω τιμές προσδιορίστηκαν με ανάλυση χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography analysis) των προϊόντων υδρόλυσης  $^{32}\text{P}$ -ATP των παραπάνω πρωτεϊνών στο διάλυμα (Basal ATPase), ή παρουσία SecYEG κυστιδίων (Membrane ATPase), ή παρουσία SecYEG κυστιδίων και υποστρώματος (Translocation ATPase) όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι; Sianidis et al., 2001.

SecA derivative		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		
			Basal	Basal	Membrane
<b>WT</b>	-	16	3.7	6.2	25
<b>I</b>	L785R	23	5.7	4.6	6.8
	I789R	17	3	3	2.6
	P799A	21	5.2	3.2	9
	Y803A	32	8.4	7.3	7
<b>II</b>	W775A	131	50.4	54	76
	F811A	74	18.7	32	54
	R792A	19	4.3	16	24.7

SecA derivative		$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )		
<b>III</b>	R792A	19	4.3	16	24.7
<b>IV</b>	E806A	28	5.7	5.3	3.4

ανακύκλωσης του ATP, είναι αλλαγμένος για όλες τις SecAIRA1 μεταλλαγές. Οι μεταλλαγές τάξης II (SecAW775A και SecAF811A) παρουσιάζουν αυξημένη βασική δραστικότητα ATPάσης (>14 φορές και >5 φορές αντίστοιχα) που προσεγγίζει την Βασική ATPάση του DEAD κινητήρα (>12 φορές; Karamanou et al., 1999). Αλλά και όλες οι υπόλοιπες SecAIRA1 μεταλλαγές (εκτός από την SecAI789R), παρουσιάζουν επίσης αυξημένη βασική ATPάση (από 1.1-2.3 φορές). Εντυπωσιακή είναι η παρατήρηση ότι μόνο τρεις από τις SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν σε κάποιο βαθμό (όχι σαν την WTSecA, της οποίας η ATPάση αυξάνεται κατά 100% με SecYEG κυστίδια) αύξηση της Μεμβρανικής τους ATPάσης, παρουσία κυστιδίων με SecYEG. Σ' όλες τις άλλες περιπτώσεις (εκτός από την SecAI789R) η επώαση με τα SecYEG πρωτεολιποσώματα καταστέλλει την Βασική ATPάση των SecAIRA1 μεταλλαγών. Από την άλλη μεριά η Μεμβρανική ATPάση των περισσότερων SecAIRA1 μεταλλαγών διεγείρεται παρουσία των προπρωτεϊνικών υποστρωμάτων (εκτός από την SecAI789R και την SecAY803A). Παρόλα αυτά, εκτός από την περίπτωση των μεταλλαγών τάξης II και της SecAR792A πρωτεΐνης, αυτή η διέγερση, ή δεν οδηγεί σε αύξηση της Βασικής ATPάσης των SecAIRA1 μεταλλαγών, ή οδηγεί σε οριακά μόλις επίπεδα αύξησης πάνω από την Βασική τους ATPάση. Σ' όλες τις περιπτώσεις πάντως η ATPάση Μετατόπισης είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτήν της WTSecA (εκτός από τις μεταλλαγές τάξης II και την SecAR792A).

Αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιώντας αντί για SecYEG πρωτεολιποσώματα ανεστραμμένα μεμβρανικά κυστίδια (με υπερεκφρασμένη SecYEG; βλέπε υλικά και μέθοδοι) και την κλασσική δοκιμασία υπολογισμού των διαφόρων ειδών ATPάσης (χρήση μόνο μιας συγκέντρωσης ATP (1 $\mu\text{M}$ ), και ανίχνευση του απελευθερούμενου φωσφόρου με την φωτομετρική μέθοδο που κάνει χρήση του αντιδραστηρίου πράσινο του μαλαχίτη; βλέπε



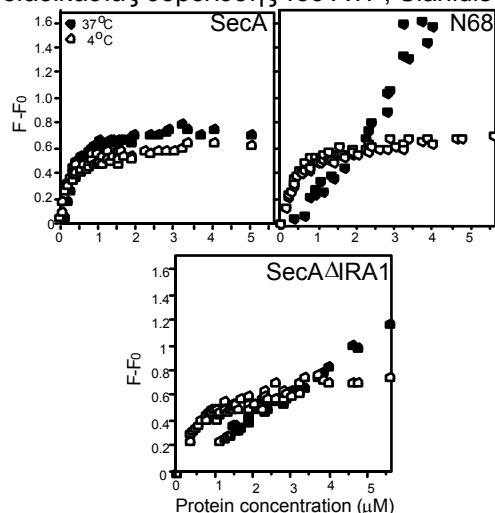
Σχήμα 61: Δραστικότητα ATPάσης των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών. Βασική (κόκκινη στήλη), Μεμβρανική (μπλε στήλη), και ATPάση Μετατόπισης (κίτρινη στήλη) των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών, όπως καθορίζεται με βάση την κλασσική δοκιμασία υπολογισμού της ATPάσης (χρήση μιας μόνο συγκέντρωσης ATP, και μέτρηση του απελευθερούμενου φωσφόρου φωτομετρικά με την χρήση του αντιδραστηρίου πράσινο του μαλαχίτη; βλέπε υλικά και μέθοδοι; Lill et al., 1990). Συγκεκριμένα πραγματοποιούνται αντιδράσεις 50 $\mu\text{l}$  με 0.1 $\mu\text{M}$  SecA, 0.02mg/ml ανεστραμμένων μεμβρανικών κυστιδίων, και 0.06mg/ml proOmpA σε διάλυμα B (50mM Tris-CL, 50mM KCL, 5mM MgCL2, και 1 mM DTT) παρουσία 1mg/ml BSA και 1 $\mu\text{M}$  ATP, οι οποίες επωάζονται για 20' στους 37 $^{\circ}\text{C}$ , και εν συνεχεία προσδιορίζεται με φωτομέτρηση παρουσία πρασίνου του μαλαχίτη η ποσότητα του απελευθερούμενου φωσφόρου από την υδρόλυση. Αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα και μετά την

υλικά και μέθοδοι), δεν διαπιστώνεται μεμβρανική ATPάση παρά μόνο για την SecAW775A (σχήμα 61 μπλε στήλη). Από την άλλη μεριά ATPάση μετατόπισης, ενώ δεν υφίσταται για τις πρωτεΐνες SecAΔ783-795, SecAI789R, SecAE802A, και SecAY803A, για τις υπόλοιπες SecAIRA1 πρωτεΐνες παρατηρείται τρεις φορές αύξηση της ATPάσης μετατόπισης τους σε σχέση με την Μεμβρανική ATPάση τους (σχήμα 61, κίτρινη στήλη σε σύγκριση με την μπλε στήλη). Η τιμή όμως αυτής της ATPάσης Μετατόπισης εξακολουθεί να είναι πάρα πολύ μικρή σε σχέση με την ATPάση Μετατόπισης της SecAWT [η ATPάση Μετατόπισης των παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγών δεν ξεπερνά το 30% της ATPάσης Μετατόπισης της SecAWT]. Έτσι το πρόβλημα των SecAIRA1 πρωτεϊνών παραμένει ακόμα και παρουσία των υπολοίπων μεμβρανικών πρωτεϊνών, απλά προσομοιάζει περισσότερο στον φαινότυπο τους *in vivo*. Εκτός από τις SecAΔ783-795, SecAI789R και SecAY803A, οι υπόλοιπες SecAIRA1 πρωτεΐνες παρουσιάζουν λιγότερο έντονα προβλήματα στην ανάπτυξη τους *in vivo*; Σχήμα 59, και με βάση τις παραπάνω μετρήσεις των διαφόρων ειδών ATPάσης τους παρουσία μεμβρανών αντί πρωτεολιποσωμάτων, υποδηλώνεται ακόμα περισσότερο το κινητικό πρόβλημα που πιθανότατα προκαλούν στην διαδικασία της έκκρισης των πρωτεϊνών (περισσότερες λεπτομέρειες στη συζήτηση).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η IRA1 περιοχή απαιτείται *in trans* για την βελτιωμένη και πιο αποδοτική κατάλυση του ATP από τον DEAD κινητήρα, σ' όλη την διάρκεια των φάσεων της κατάλυσης ATP (κυτταρόπλασμα-μεμβράνη κατά την διαδικασία έκκρισης των πρωτεϊνών) από την SecA.

### 3.2.Γ. Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει τον ρυθμό ανακύκλωσης νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα.

Για να διερευνηθεί η μοριακή βάση της ρύθμισης της κατάλυσης του ATP από την IRA1 περιοχή, έγιναν προσπάθειες μεγαλύτερης διερεύνησης της Βασικής καταρχήν ATPάσης της SecA. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας περίσσεια ραδιενεργού ATP ( $^{32}\gamma$ -ATP, ή  $^{32}\alpha$ -ATP; για μεγαλύτερη ευαισθησία των αποτελεσμάτων, βλέπε υλικά και μέθοδοι) δεν διαπιστώθηκε πρόβλημα στην υδρόλυση καμίας από τις SecAIRA1 πρωτεΐνες, όπως ειπώθηκε και προηγουμένως. Αλλά και πειράματα κινητικής της υδρόλυσης, δεν έδειξαν κανένα σοβαρό τουλάχιστον πρόβλημα για την ταχύτητα της υδρόλυσης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών. Εν συνεχεία χρησιμοποιώντας στοιχειομετρικές ποσότητες ραδιενεργού ATP και πρωτεΐνης, δεν παρατηρήθηκε καταλυτικό πρόβλημα, για καμία από τις SecAIRA1 πρωτεΐνες επίσης (όπως συνέβη με ορισμένες SecAIRA2 πρωτεΐνες, βλέπε Εισαγωγή). Αξίζει να τονιστεί βέβαια, ότι όταν χρησιμοποιείται σε στοιχειομετρική ποσότητα  $^{32}\alpha$ -ATP, ενώ σχεδόν όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες μετατρέπουν το ATP σε ADP, όπως και η SecAWT, η SecAE802A το μετατρέπει σε φωσφορο, υποδηλώνοντας ίσως ένα εν δυνάμει πρόβλημα κατακράτησης του ADP. Όταν όμως πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της υδρόλυσης του ATP για κάθε μία από τις SecAIRA1 πρωτεΐνες στους 4°C, στην θερμοκρασία δηλαδή που εμποδίζει την υδρόλυση ATP από την SecAWT (βλέπε υλικά και μέθοδοι), δεν ανιχνεύθηκε υδρόλυση ATP από καμία από τις SecAIRA1 πρωτεΐνες, που θα ήταν ενδεικτική προβλήματος στην κατακράτηση του παραγόμενου ADP (αργό στάδιο της καταλυτικής διαδικασίας υδρόλυσης του ATP; Sianidis et al., 2000).



Περαιτέρω μελέτη της μοριακής βάσης της ρύθμισης της κατάλυσης του ATP από την IRA1 περιοχή, πραγματοποιήθηκε από την Λίλη

Σχήμα 62: Μέτρηση της αλλαγής του φθορισμού του φθορίζοντος ATP παραγώγου MANT-ADP παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων SecA (Α), N68 (Β) και SecAΔIRA1 (Γ), σε σχέση με τον φθορισμό του απουσία πρωτεΐνης, τόσο στους 4°C (ανοιχτοί κύκλοι), όσο και στους 37°C (κλειστοί κύκλοι).

Καραμάνου στο εργαστήριο, και διερευνήθηκε η επίδραση της περιοχής αυτής στην δέσμευση του ADP νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα

(Sianidis et al., 2001).

Συγκεκριμένα η ποσοτικοποίηση της δέσμευσης του ADP, τόσο από την SecA, όσο και από τις SecAIRA1 μεταλλαγές, στηρίχθηκε στην μέτρηση της αλλαγής του φθορισμού ενός φθορίζοντος μορίου ADP, του MANT-ADP [ $2'-(\text{ή } 3')\text{-O-(N-Methylanthraniloyl)adenosine } 5'\text{-diphosphate}$ ], παρουσία της SecA, του DEAD κινητήρα ή των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών (Πίνακας II; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 4 και στους 37°C, δηλαδή σε συνθήκες που από την μία οι ρυθμοί υδρόλυσης είναι χαμηλοί και μπορεί να διαφανεί ευκολότερα το πρόβλημα από τις IRA1 μεταλλαγές, αλλά και στην θερμοκρασία στην οποία δουλεύει η πρωτεΐνη. Έτσι στους 4°C το MANT-ADP δεσμεύεται στην SecA με μεγάλη συγγένεια (0.14μM; σχήμα 62 και Πίνακας II). Σημειώνεται ότι οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν προκύψει με μη φθορίζοντα νουκλεοτίδια (Mitchel and Oliver, 1993; Den Blaauwen et al., 1999). Η δέσμευση MANT-ADP στους 37°C μειώνεται δύο φορές ( $K_{D(\text{SecA})} = 0.28\mu\text{M}$ ), εξηγώντας την μειωμένη ικανότητα της SecA να κρατάει το ADP στους 37°C σε σχέση με τους 4°C (Sianidis et al., 2001). Από την άλλη μεριά η δέσμευση του MANT-ADP στον DEAD κινητήρα (N68; σχήμα 62; Karamanou et al., 1999) μπορεί να μειώνεται δύο φορές στους 4°C, σε σχέση με την δέσμευση του στην SecA (Πίνακας II), μειώνεται όμως σημαντικά (πάνω από 100 φορές) και δεν μπορεί να μετρηθεί στις συνθήκες του πειράματος ( $K_{D(\text{SecA})} = 30\mu\text{M}$ ) στους 37°C. Είναι ολοφάνερο λοιπόν ότι η ενδοθερμική μετάπτωση του DEAD κινητήρα από την "κλειστή"/υψηλής συγγένειας στην "ανοιχτή"/χαμηλής συγγένειας δομική κατάσταση (Sianidis et al., 2001; βλέπε και εισαγωγή), ρυθμίζεται από την C-περιοχή.

Και η ίδια η περιοχή του IRA1 όμως, είναι σημαντική για την ρύθμιση, μέσω της C-περιοχής, της συγγένειας του DEAD κινητήρα για το ADP. Και αυτό γιατί η δέσμευση του MANT-ADP από την SecAIRA1 μειώνεται κατά πέντε (4°C) και τριάντα φορές (37°C) σε σχέση με την δέσμευση από την WTSecA (σχήμα 62 και Πίνακας II). Όμοια οι περισσότερες SecAIRA1 μεταλλαγές (εκτός από την SecAW775A και την SecAL785R), παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια δέσμευσης ( $K_D$ ), για το MANT-ADP στους 4°C (~0.5-8 φορές; Πίνακας II). Αλλά και στους 37°C οι μετρούμενες σταθερές διαστάσεως υποδηλώνουν ακόμα πιο έντονες βλάβες στη δέσμευση του ADP (Πίνακας II). Συγκεκριμένα οι SecAW775A, SecAL785R, SecAY803A και SecAF811A, παρουσιάζουν σημαντική μείωση της δέσμευσης ADP (από 6-20 φορές). Από την άλλη, οι συγγένειες δέσμευσης για τις SecAR792A, SecAI789R, SecAE802A και SecAE806A, είτε δεν αλλάζουν, είτε μειώνονται σε σχέση με τις τιμές τους στους 4°C. Τέλος η συγγένεια δέσμευσης για την SecAP799A παρουσιάζει μείωση μόνο κατά δύο φορές.

Ακολούθως εξετάστηκαν οι ρυθμοί δέσμευσης και απελευθέρωσης του MANT-ADP (βλέπε υλικά και μέθοδοι), σε μία προσπάθεια ακριβέστερου εντοπισμού του σταδίου ρύθμισης της ανακύκλωσης του νουκλεοτιδίου από την IRA1 περιοχή. Έτσι για την WTSecA διαπιστώθηκε, όπως έχει ειπωθεί και προηγουμένως (βλέπε εισαγωγή; Sianidis et al., 2001), ότι η απελευθέρωση του ADP στον πάγο αναστέλλεται ( $k_{off} = 10^{-5}/\text{min}$ ), ενώ γίνεται εφικτή, κατά ένα μέτριο βαθμό όμως στους 37°C ( $k_{off} = 1/\text{min}$ ). Στην περίπτωση του DEAD κινητήρα όμως, από τον οποίο απουσιάζει η C-περιοχή, δεν μπορεί να γίνει αποτελεσματική κατακράτηση ADP στους 4°C ( $k_{off} = 0.24/\text{min}$ ), ενώ το ADP απελευθερώνεται πλήρως στους 37°C. Επίσης η έλλειψη του IRA1 στην SecAIRA1 πρωτεΐνη, προσδίδει μία παρόμοια ανικανότητα κατακράτησης του ADP, τόσο στους 4°C ( $k_{off} = 0.048/\text{min}$ ), όσο και στους 37°C ( $k_{off} = 16/\text{min}$ ), και επομένως η IRA1 περιοχή της ευρύτερης C-περιοχής, αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο για την συγκεκριμένη ρύθμιση της απελευθέρωσης του ADP από τον DEAD κινητήρα.

Παράλληλα ο ρυθμός δέσμευσης ADP, απουσία της C-περιοχής στον DEAD κινητήρα, αυξάνεται στους 4°C ( $k_{on} = 0.85 \times 10^6/\text{M}/\text{min}$ ), σε σχέση με την WTSecA ( $k_{on} = 0.67 \times 10^2/\text{M}/\text{min}$ ), ενώ μειώνεται, σε βαθμό τέτοιο που δεν μπορεί να προσδιοριστεί με την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, στους 37°C, σε σχέση με την αύξηση που παρουσιάζει ο ρυθμός δέσμευσης ADP στην περίπτωση της WTSecA ( $k_{on} = 0.364 \times 10^7/\text{M}/\text{min}$ ). Η έλλειψη του IRA1 στην SecAIRA1 πρωτεΐνη, προκαλεί αντίστοιχη αύξηση του ρυθμού δέσμευσης του ADP στους 4°C ( $k_{on} = 0.64 \times 10^5/\text{M}/\text{min}$ ), αλλά δεν προκαλεί μείωση σε σημαντικό βαθμό του ίδιου ρυθμού στους 37°C ( $k_{on} = 0.19 \times 10^7/\text{M}/\text{min}$ , ο ρυθμός δέσμευσης είναι της ίδιας τάξης με τον ρυθμό της WTSecA). Επομένως η IRA1 περιοχή, αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο για την ρύθμιση της απελευθέρωσης αλλά και της δέσμευσης του ADP στον DEAD κινητήρα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι SecAIRA1 μεταλλαγές επηρεάζουν είτε τον ρυθμό δέσμευσης ( $k_{on}$ ), είτε τον ρυθμό απελευθέρωσης ( $k_{off}$ ) του νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα στους 4°C (Πίνακας II). Στους 37°C οι ρυθμοί δέσμευσης και απελευθέρωσης για τις SecAIRA1 πρωτεΐνες, προσεγγίζουν αυτούς της



WTSecA. Συγκεκριμένα, ενώ οι ρυθμοί δέσμησης τους πλησιάζουν κατά 35-85% το ποσοστό αύξησης της δέσμησης του ADP από τον DEAD κινητήρα, κατά την μετάβαση από τους 4 στους 37°C, οι ρυθμοί απελευθέρωσης του νουκλεοτιδίου ορισμένων από τις SecAIRA1 μεταλλαγές (της SecAL785R, της SecAI789R, της SecAW775A, της SecAF811A και της SecAE806A) αποκλίνουν σημαντικά από τον αντίστοιχο ρυθμό στην περίπτωση της WTSecA (οι υπόλοιπες SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν παρόμοιους ρυθμούς απελευθέρωσης του ADP νουκλεοτιδίου, οι οποίοι αυξάνονται σε σχέση με τους 4°C).

Απ' όλα τα παραπάνω λοιπόν συμπεραίνουμε ότι η IRA1 περιοχή, ασκεί μία πολύ ευαίσθητη ρύθμιση τόσο της δέσμησης, όσο και της απελευθέρωσης του ADP νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα.

## Πίνακας II

Σταθερές πρόσδεσης (Binding constants) της SecA και παραγώγων της για το MANT-ADP (βλέπε υλικά και μέθοδοι).

SecA derivative	mutation	4°C			37°C		
		$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{on}$ ( $M \cdot \text{min}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{on}$ ( $M \cdot \text{min}^{-1}$ )	$k_{off}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>SecA</b>	-	0.14 (+/- 0.02)	$0.67 \times 10^2$	$0.94 \times 10^{-5}$	0.28 (+/- 0.03)	$0.364 \times 10^7$	1.02
<b>N68</b>	-	0.28 (+/- 0.03)	$0.85 \times 10^6$	0.24	>30	NM	NM
<b>SecAIRA1</b>	□775-789	0.75 (+/- 0.1)	$0.64 \times 10^5$	0.048	8.18 (+/- 2.5)	$0.19 \times 10^7$	16.08
<b>Class I</b>	L785R	0.12 (+/- 0.03)	$0.54 \times 10^3$	$0.65 \times 10^{-4}$	1.9 (+/- 0.25)	$0.27 \times 10^7$	5.23
	I789R	1.02 (+/- 0.02)	$0.3 \times 10^6$	0.313	0.7 (+/- 0.02)	$0.18 \times 10^7$	1.3
	P799A	0.23 (+/- 0.05)	$0.27 \times 10^3$	$0.62 \times 10^{-4}$	0.46 (+/- 0.03)	$0.21 \times 10^7$	0.99
	Y803A	0.69 (+/- 0.13)	$0.12 \times 10^2$	$0.85 \times 10^{-5}$	1.58 (+/- 0.11)	$0.3 \times 10^7$	4.8
<b>Class II</b>	W775A	0.17 (+/- 0.04)	$0.14 \times 10^7$	0.24	4.58 (+/- 1.1)	$0.31 \times 10^7$	14.4
	F811A	1.13 (+/- 0.14)	$0.73 \times 10^7$	$0.83 \times 10^{-5}$	10.83 (+/- 2.5)	$0.14 \times 10^7$	15.83
<b>Class III</b>	R792A	0.4 (+/- 0.08)	$0.48 \times 10^2$	$0.19 \times 10^{-4}$	0.38 (+/- 0.02)	$0.26 \times 10^7$	0.99
	E806A	0.26 (+/- 0.06)	$0.11 \times 10^7$	0.3	0.25 (+/- 0.02)	$0.31 \times 10^7$	0.79
<b>Class IV</b>	E802A	0.61 (+/- 0.14)	$0.23 \times 10^2$	$0.14 \times 10^{-4}$	0.45 (+/- 0.05)	$0.2 \times 10^7$	0.94

### 3.2.Δ. Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση του DEAD κινητήρα από το ADP.

Είδαμε προηγουμένως ότι η IRA1 περιοχή ελέγχει τόσο τη δέσμευση όσο και την απελευθέρωση ADP από τον DEAD κινητήρα. Στη συνέχεια μελετήθηκε αν η IRA1 περιοχή επηρεάζει και την σταθεροποίηση του DEAD κινητήρα από το ADP. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η θερμική αποδιάταξη των IRA1 μεταλλαγών, παρουσία και απουσία ADP, με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (far-UV CD). Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (βλέπε σχήμα 42), τόσο η SecA, όσο και ο DEAD κινητήρας (N68), λιώνουν σε δύο χαρακτηριστικά σημεία (melting points), κατά την θερμική τους αποδιάταξη ( $T_{m1,app}=39.6^{\circ}\text{C}$   $T_{m2,app}=48.9^{\circ}\text{C}$ ; Sianidis et al., 2001; Πίνακας III). Το σημείο μετάπτωσης  $T_{m2,app}$  αποδύθηκε

Πίνακας III

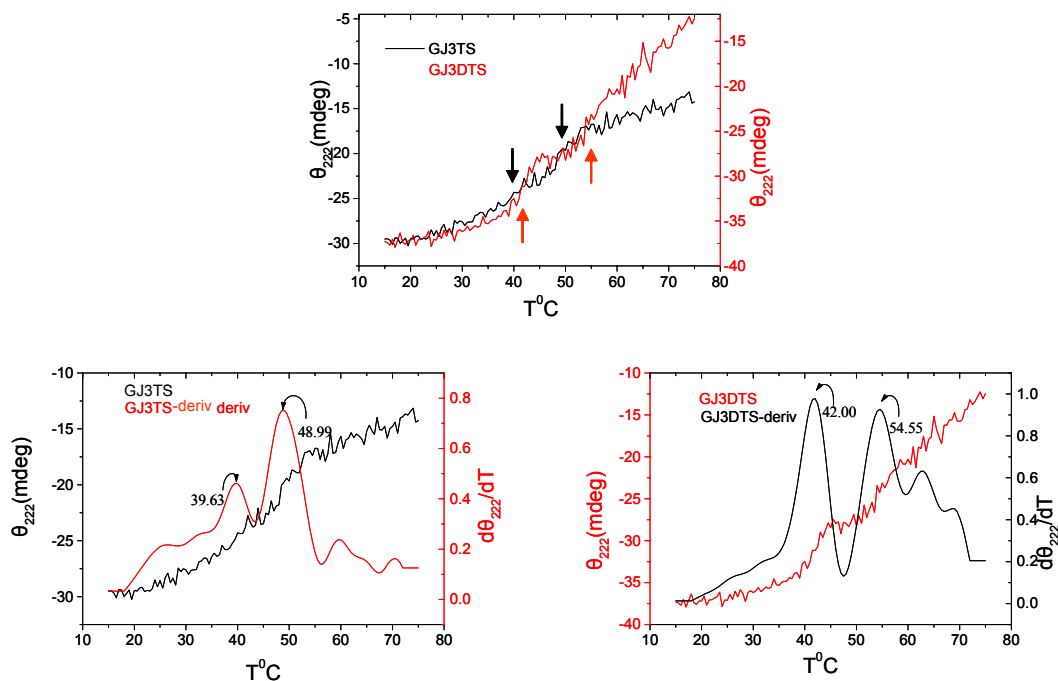
Θερμοκρασίες θερμικής αποδιάταξης (melting points) των SecA IRA1 μεταλλαγών. Η ellipticity στα 225 nm προέκυψε από τον κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (far UV-CD) των καμπύλων θερμικής αποδιάταξης, όπως περιγράφηκε από Karamanou et al., 1999.

Τάξεις SecAIRA1 μεταλλαγών	Πολυπεπτίδιο	$T_{m1 (app)}$			$T_{m2 (app)}$		
		-ADP	+ADP	$\Delta T_{m1}$	-ADP	+ADP	$\Delta T_{m2}$
WT	SecA	39.6	44.9	5.3	48.9	58.0	9.1
	N68	39.2	39.6	0.4	48.5	58.0	9.5
	SecAΔIRA1	39.63	42.0	2.37	49.0	54.6	5.6
I	L785R	38.0	41.9	3.9	50.5	52.8	2.3
	I789R	34.3	39.6	5.3	49.2	54.1	4.9
	P799A	38.1	43.8	5.7	48.5	53.6	5.1
	Y803A	39.0	42.5	3.5	50.0	53.8	3.8
II	W775A	38.8	42.0	3.2	49.5	51.4	1.9
	F811A	39.6	40.9	2.1	51.5	58.0	7.0
III	R792A	37.9	45.4	7.5	45.5	56.0	10.5
	E806A	40.4	45.9	5.5	52.6	57.7	5.1
IV	E802A	40.1	46.5	6.4	45.9	52.1	6.2

στην αποδιάταξη της NBD περιοχής, και το  $T_{m1,app}$  στην αποδιάταξη της IRA2 περιοχής (Sianidis et al., 2001; βλέπε και Εισαγωγή). Παρουσία ADP διαπιστώθηκε σταθεροποίηση του  $T_{m2,app}$  (και επομένως της περιοχής NBD), τόσο της SecA όσο και του DEAD κινητήρα (N68) (κατά  $9^{\circ}\text{C}$ ; Sianidis et al., 2001; Πίνακας III), αλλά το  $T_{m1,app}$  (και επομένως και η IRA2 περιοχή) σταθεροποιήθηκε μόνο στην ολόκληρη πρωτεΐνη (κατά  $\sim 5^{\circ}\text{C}$ ), υποδηλώνοντας την σημασία της C- περιοχής για την εξαρτώμενη από το ADP σταθεροποίηση του  $T_{m1,app}$ . Η μελέτη στη συνέχεια της θερμικής αποδιάταξης της SecAΔIRA1, έδειξε ότι η πρωτεΐνη, ενώ λιώνει όπως η SecA και ο DEAD κινητήρας σε δύο βήματα με παρόμοια σημεία μετάπτωσης

$Tm1_{app}$  και  $Tm2_{app}$  (Πίνακας III), παρουσία ADP, σταθεροποιεί μόνο το  $Tm2_{app}$  και όχι το  $Tm1_{app}$  (σχήμα 63 και Πίνακας III), όπως και ο DEAD κινητήρας στον οποίο έχει απομακρυνθεί η C-περιοχή. Επομένως η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την αποδοτικότερη σταθεροποίηση από το ADP του  $Tm1_{app}$ , και του  $Tm1_{app}$ , και άρα και της IRA2- και NBD-περιοχής αντίστοιχα.

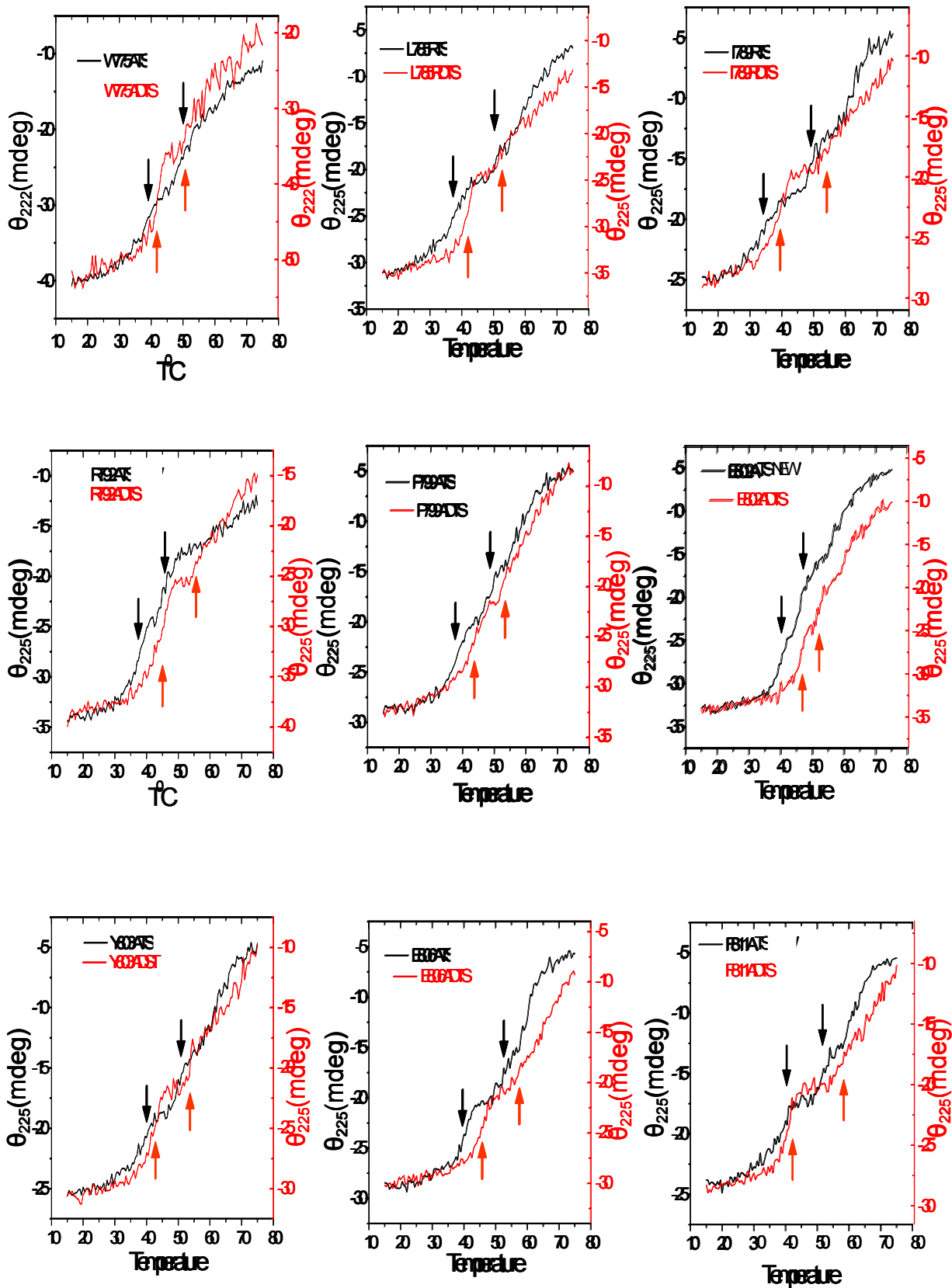
Ακολουθώντας, η παρατηρούμενη με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους, θερμική



Σχήμα 63: Καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της SecAIRA1 (GJ3), απουσία (μαύρη καμπύλη; GJ3TS) και παρουσία ADP (κόκκινη καμπύλη; GJ3DTS). Οι παραπάνω καμπύλες αποκτήθηκαν μετά από μέτρηση της ellipticity ( $\theta$ ) στα 222 nm με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους (CD), σύγχρονα με την θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων (120μl, 417μg/ml σε διάλυμα 20mM MOPS pH 8, 5mM NaCl, και 5mM  $MgCl_2$ ) με 50°C/hr, και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε, Karamanou et al., 1999. Τα μαύρα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία μετάπτωσης ( $Tm1_{app}$ , και  $Tm2_{app}$ ) της πρωτεΐνης απουσία ADP, ενώ τα κόκκινα τα σημεία μετάπτωσης παρουσία ADP. Όλα τα παραπάνω σημεία μετάπτωσης προκύπτουν από τις μεγαλύτερες κορυφές της παραγώγου  $d\theta_{222}/dT$  σε συνάρτηση με την θερμοκρασία για κάθε καμπύλη (κάτω διάγραμμα αριστερά για την GJ3TS, και κάτω διάγραμμα δεξιά για την GJ3DTS).

αποδιάταξη των διάφορων σημειακών SecAIRA1 μεταλλαγών, αποκάλυψε ότι το πρώτο σημείο μετάπτωσης τους  $Tm1_{app}$ , είναι παρόμοιο με αυτό της WTsecA (σχήμα 64, Πίνακας III). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η SecA1789R, στην οποία το  $Tm1_{app}$  παρουσιάζεται μειωμένο κατά 5°C. Αντίστοιχα, για τις περισσότερες SecAIRA1 μεταλλαγές, το δεύτερο σημείο μετάπτωσης  $Tm2_{app}$  είναι επίσης παρόμοιο με αυτό της WTsecA, εκτός από τις αποκλίσεις προς αυξημένη σταθεροποίηση του  $Tm2_{app}$  στις SecAE806A και SecAF811A, ή προς αποσταθεροποίηση του  $Tm2_{app}$  στις SecAE802A και SecAR792A μεταλλαγών (σχήμα 64, Πίνακας III). Κατά συνέπεια οι περισσότερες SecAIRA1 μεταλλαγές, διαθέτουν μία συνολική διαμόρφωση απουσία νουκλεοτιδίου, πολύ κοντά σ' αυτήν της WTsecA. Σημειώνουμε ότι η απόκτηση θερμικής μετάπτωσης από τις διάφορες SecAIRA1 μεταλλαγές διαφάνηκε και από την απουσία κρουοευσθησίας τους στους 22°C, όπως και στην περίπτωση της SecAWT (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Η κρουοευσθησία που παρουσιάζουν ορισμένες SecA μεταλλαγές οφείλεται στην προβληματική επανεξόδο τους από την μεμβράνη κατά την διάρκεια του κύκλου δράσης της SecA (Cycling model; Economidou and Wickner, 1994; Economidou et al., 1995) σε χαμηλή θερμοκρασία, λόγω της δυσκολίας απόκτησης της διαμόρφωσης της ενδόθερμης μετάπτωσης τους (Ramamurthy et al., 1998).

Η θερμική αποδιάταξη των SecAIRA1 μεταλλαγών εν συνεχεία, παρουσία ADP [σε συγκέντρωση 2mM, έτσι ώστε να μην υπάρχει πρόβλημα δέσμευσης του νουκλεοτιδίου από τον DEAD κινητήρα, υποδηλώνει ότι όλες οι SecAIRA1 μεταλλαγές μετά την δέσμευση του



νουκλεοτιδίου, σταθεροποιούν και τις δύο θερμικές μεταπτώσεις, όπως και η WTSecA, αλλά με σημαντικές ποσοτικές διαφορές (σχήμα 64, Πίνακας III). Διαπιστώνεται λοιπόν ότι το  $Tm_{1_{app}}$  παρουσία ADP της SecAW775A, της SecAF811A, της SecAY803A και της

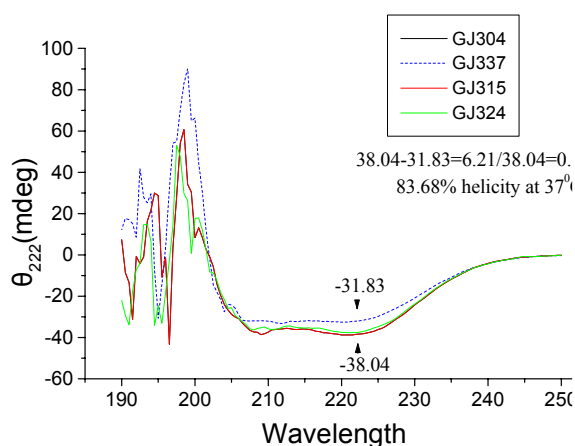
Σχήμα 64: Καμπύλη θερμικής αποδιάταξης των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών, απουσία (μαύρη καμπύλη, TS) και παρουσία ADP (κόκκινη καμπύλη, DTS). Οι παραπάνω καμπύλες αποκτήθηκαν μετά από μέτρηση της ellipticity ( $\theta$ ) στα 225 nm με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους (CD), σύγχρονα με την θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων (120μl, 417μg/ml σε διάλυμα 20mM MOPS pH 8, 5mM NaCl, και 5mM MgCl<sub>2</sub>) με 50°C/hr, και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε, Karamanou et al., 1999. Τα μαύρα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία μετάπτωσης ( $T_{m1_{app}}$ , και  $T_{m2_{app}}$ ) της πρωτεΐνης απουσία ADP, ενώ τα κόκκινα τα σημεία μετάπτωσης παρουσία ADP.

SecAL785R είναι χαμηλότερο απ' αυτό της WTSecA, όπως και το  $T_{m2_{app}}$  όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών, εκτός από την SecAR792A. Κατά συνέπεια παρουσία ADP, είτε η μία είτε και οι δύο θερμικές μεταπτώσεις όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών, είναι διαφορετικές από αυτές της WTSecA (Πίνακας III).

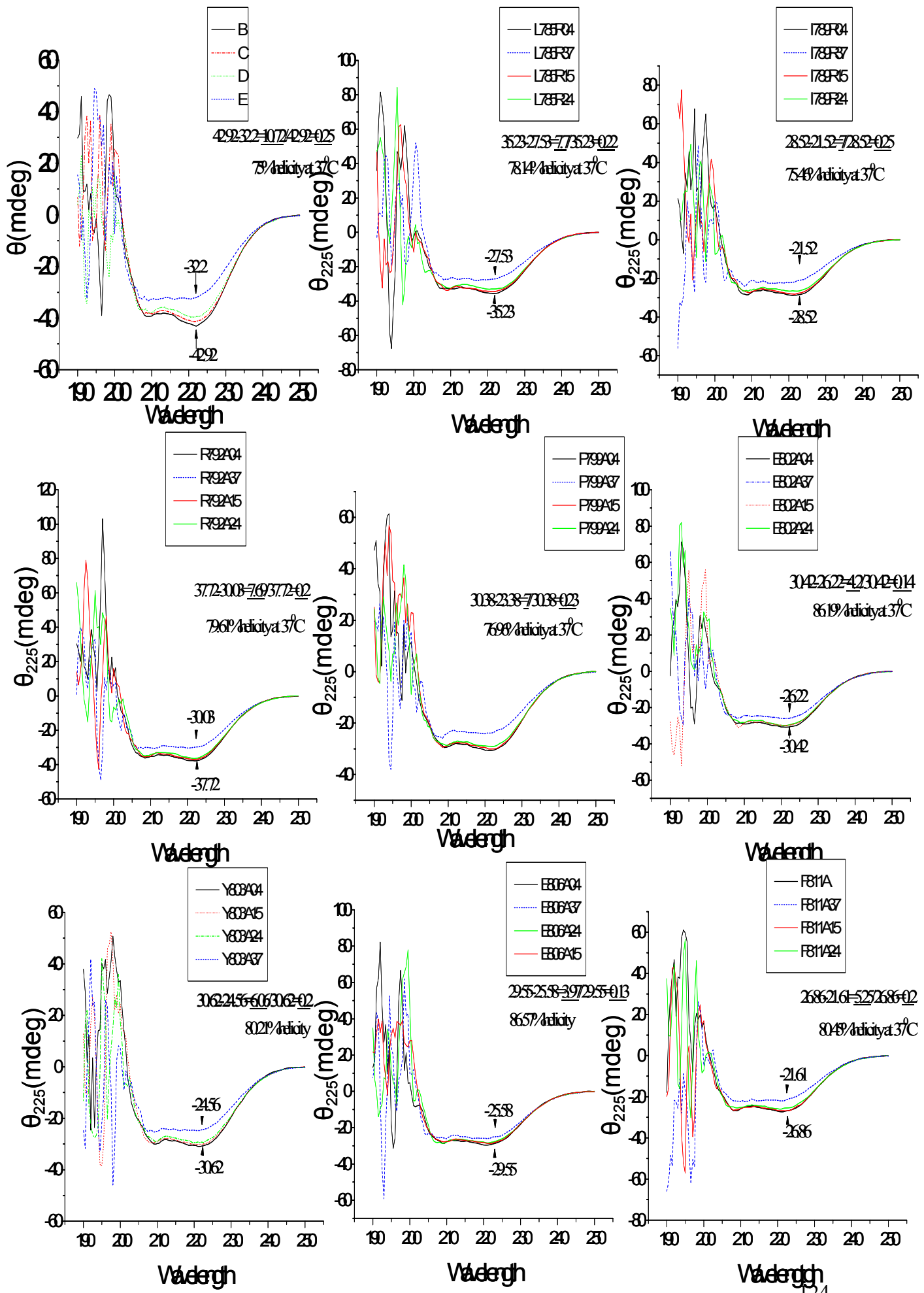
Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ότι το δεσμευμένο ADP, δεν σταθεροποιεί αποτελεσματικά την μία, ή και τις δύο θερμικές μεταπτώσεις του DEAD κινητήρα όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών. Επομένως το στοιχείο IRA1, επηρεάζει την ευρύτερη περιοχή του DEAD κινητήρα, και τροποποιεί και την NBD και την IRA2 περιοχή (περισσότερο την NBD περιοχή, όπως φαίνεται από το  $T_{m2_{app}}$  παρουσία ADP, όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών) συντελώντας έτσι στην ασθενέστερη σταθεροποίηση τους από το ADP.

Η επίδραση της IRA1-περιοχής στην διαμόρφωση της IRA2-περιοχής φάνηκε και από τις αλλαγές της α-ελικοειδούς δομής από τους 4 στους 37°C των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών σε σύγκριση με την SecAWT (σχήμα 65). Συγκεκριμένα μετρήθηκαν τα φάσματα για όλες τις παραπάνω πρωτεΐνες από τα 190-250nm, στους 4, 15, 22, και 37°C με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους, και η ellipticity ( $\theta$ ) στα 225nm αντιστοιχήθηκε κατευθείαν με το α-ελικοειδές περιεχόμενο κάθε πρωτεΐνης. Θεωρώντας 100% το ποσοστό της α-ελικοειδούς δομής στους 4°C, υπολογίστηκε τελικά το ποσοστό της α-ελικοειδούς δομής που παραμένει στους 37°C. Διαπιστώθηκε ότι ενώ για την περίπτωση της SecAWT (Sianidis et al., 2001) το ποσοστό της α-ελικοειδούς δομής στους 37°C πέφτει στο 49%, λόγω της ευκινησίας της IRA2-περιοχής, όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες υφίστανται πολύ μικρότερη μείωση του ποσοστού της α-ελικοειδούς δομής τους (μόνο μέχρι και 75%), που αντανακλά επίδραση της περιοχής IRA1 στην ευκινησία-διαμόρφωση της IRA2-περιοχής.

Σημειώνεται ότι η IRA1-περιοχή επηρεάζει όπως θα δούμε παρακάτω και την διαμόρφωση της SSD-περιοχής του DEAD κινητήρα (πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης απουσία και παρουσία ADP, που υποδηλώνουν αλλαγές σ' όλες τις περιοχές του DEAD κινητήρα).



Σχήμα 65: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού υπεριώδους (far-UV CD) για τις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες στους 4, 15, 24, και 37°C. Η ellipticity ( $\theta$ ) στα 225 nm σχετίζεται κατευθείαν με το ποσό α-ελικοειδούς δομής. Η α-ελικοειδής δομή στους 4°C εκφράζεται σαν 100% ποσοστό, οπότε οι τιμές της σε υψηλότερες θερμοκρασίες κανονικοποιούνται ανάλογα, και υπολογίζεται τελικά το ποσοστό α-ελικοειδούς δομής που μένει για κάθε SecAIRA1 πρωτεΐνη στους 37°C.



### 3.2.E. Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την σταθεροποίηση και της C-περιοχής της SecA από το ADP.

Η σταθεροποίηση της SecA από το ADP, μελετήθηκε και από την Λίλη Καραμάνου στο εργαστήριο, με την μέτρηση του φθορισμού των τρυπτοφανών των SecAIRA1 μεταλλαγών κατά την θερμική τους αποδιάταξη (σχήμα 66). Στην περίπτωση της WTSecA παρατηρείται μία θερμική μετάπτωση με  $T_{m,app}=42.9^{\circ}\text{C}$  (καμία σχέση με το  $T_{m,app}$  από το CD), η οποία σταθεροποιείται πάλι όπως προηγουμένως παρουσία ADP, και παρουσιάζει  $T_{m,app}=47.5^{\circ}\text{C}$  (σχήμα 67). Σημειώνεται ότι ο φθορισμός της SecA οφείλεται κυρίως στις τρυπτοφάνες που εντοπίζονται στην περιοχή WD (σχήμα 66). Επομένως η σταθεροποίηση της θερμικής μετάπτωσης της WTSecA με ADP, υποδηλώνει σταθεροποίηση του φθορισμού των τρυπτοφανών της WD περιοχής, και κατά συνέπεια και σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της συγκεκριμένης περιοχής. Προφανώς η σταθεροποίηση του DEAD κινητήρα, και συγκεκριμένα των NBD και IRA2 τουλάχιστον περιοχών (σε επόμενο Κεφάλαιο θα διαπιστωθεί και σταθεροποίηση της SSD υποπεριοχής), προκαλεί σταθεροποίηση εντέλει και της WD περιοχής η οποία αντανάκλαται στην σταθεροποίηση του φθορισμού των τρυπτοφανών της. Εξάλλου με πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης έχει δείχθει ότι μαζί με τον DEAD κινητήρα, η δέσμευση του νουκλεοτιδίου ADP σταθεροποιεί και την ευρύτερη C-περιοχή της SecA (Karamanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή, σχήμα 41), και άρα αναμένονται σταθεροποιήσεις των διάφορων υποπεριοχών της. Η σταθεροποίηση της C-περιοχής εξηγήθηκε μέσω της αλληλεπίδρασης της με την περιοχή του DEAD κινητήρα (Karamanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή), η οποία συμφωνεί και με την δομή τόσο της *bsSecA* (Hunt et al., 2002), όσο και της *mtSecA* (Sharma et al., 2003).

Η θερμική αποδιάταξη του DEAD κινητήρα παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ καμπύλης φθορισμού σε σχέση με την καμπύλη φθορισμού που παρατηρείται κατά την θερμική αποδιάταξη της WTSecA (σχήμα 67; ενώ και η ένταση του φθορισμού είναι πολύ ασθενής σε σχέση με τον φθορισμό που αποδίδει η C-περιοχή), αν και διαπιστώνεται μετάπτωση με  $T_m=43.74^{\circ}\text{C}$ , η οποία σταθεροποιείται με ADP κατά 1.5 βαθμό ( $T_m=45.32^{\circ}\text{C}$ ). Έτσι γίνεται σύγκριση της θερμικής αποδιάταξης των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών, που σαν ολόκληρες πρωτεΐνες παρουσιάζουν παρόμοιο προφίλ φθορισμού με την WTSecA κατά την θερμική τους αποδιάταξη (σχήμα 68, και Πίνακας IV). Διαπιστώνεται ότι ενώ οι μισές SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν θερμική μετάπτωση με  $T_{m,app}$  κοντά στο σημείο μετάπτωσης της WTSecA (SecAW775A, E802ASecA, E806ASecA, SecAF811A και SecAΔIRA1; Πίνακας IV), οι υπόλοιπες εκδηλώνουν διπλή θερμική μετάπτωση (όπως και οι PriD μεταλλαγές; Hunt et al., 2002; Πίνακας IV). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι SecAIRA1 μεταλλαγές που παρουσιάζουν διπλή θερμική μετάπτωση, επηρεάζουν καταρχήν την δομή του IRA1 στοιχείου (μεταλλαγές τάξης I, εκτός από την SecAR792A, που φαίνεται όμως να συμβάλλει στην δομή του IRA1 στοιχείου σύμφωνα με την δομή της *mtSecA*). Επομένως η περιοχή IRA1 επηρεάζει την διαμόρφωση και κατ' επέκταση και τον φθορισμό των τρυπτοφανών της WD τουλάχιστον περιοχής, της ευρύτερης C-περιοχής. Παρουσία ADP διαπιστώνεται σταθεροποίηση της μετάπτωσης και μετατροπή της σε απλή (εκτός από την περίπτωση της SecAI789R), με ποσοτικές όμως διαφορές στο  $T_m$ , σε ορισμένες περιπτώσεις (SecAW775A, SecAL785R, SecAY803A, SecAF811A και SecAΔIRA1; Πίνακας IV). Επομένως η περιοχή IRA1 επηρεάζει την σταθεροποίηση με ADP της WD περιοχής και κατά συνέπεια και της ευρύτερης C-περιοχής.

Όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα σε επόμενο Κεφάλαιο η IRA1-περιοχή επηρεάζει και την SD-περιοχή της C-περιοχής.

Σχήμα 66: Απεικόνιση τρυπτοφανών στην *ecSecA*. Α) Αμινοξική αλληλουχία της *ecSecA*, στην οποία σημειώνονται οι διάσπαρτες τρυπτοφάνες με κόκκινα γράμματα ενώ απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στις διάφορες περιοχές της (βλέπε δεξιό πάνελ). Στο διπλανό πάνελ απεικονίζονται οι διάφορες περιοχές της *bs*, *ec*, και *mtSecA* με τα συγκεκριμένα χρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί και στο σχήμα 4, όπως και τα αμινοξέα από τα οποία αποτελούνται σε κάθε είδος βακτηρίου. Β) Απεικόνιση στην κρυσταλλογραφική δομή της *bsSecA* των τρυπτοφανών της *ecSecA*. Με κόκκινες σφαίρες και γράμματα σημειώνονται οι θέσεις των τρυπτοφανών της *ecSecA* που απαντούν και στην *bsSecA*, και με πορτοκαλί οι εν δυνάμει θέσεις των τρυπτοφανών της *ecSecA* που δεν απαντούν στην *bsSecA*.

A

## SecA\_ecoli

10 | | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |  
 MLIKLLTKVF GSRNDRTLRR MRKVVNIINA MEPEMEKLSD EELKGTAEF RARLEKGEVL  
 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |  
 ENLIPEAFV VREASKRVFG MRHFDVQLLG GMVLNERCIA EMRTGEGKTL TATLPAYLNA  
 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |  
 LTGKGVHVVY VNDYLAQRDA ENNRPLFEFL GLTVGINLPG MPAPAKREAY AADITYGTNN  
 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |  
 EYGFYLRDN MAFSPEERVQ RKLHYALVDE VDSILLDEAR TPLIIISGPAE DSSEMYKRNV  
 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |  
 KIIPHLIRQE KEDESETFQGE GHFSVDEKSR QVNLTERGLV LIEELLVKEG IMDEGESLIYS  
 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |  
 PANIMLMHHV TAALRAHALF TRDVDYIVKD GEVIVDEHT GRIMQGRWS DGLHQAVEAK  
 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |  
 EGVQIQENENQ TIASITTFQNY FRLYEKLAGM TGTADTEAFE FSSIIYKLDIV VVPTNRPIMR  
 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |  
 KDLFPLVYMT EAEKIQALIE DIKERTAKGQ PVIIVGTISIE KSELVSNELT KAGIKHNVLN  
 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |  
 AKFHANEAAI VAQAGYPAAV TIATNMAGRQ TDIVLGGSWQ AEVAALLENPT AEQIEKIKAD  
 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |  
 WQVVRHDVDE AGGLHIIIGTE RHESSRIDNQ LRGRSGRQGD AGSSRFYLSM EDALMRIFAS  
 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |  
 DRVSGMMRKL GMKPGEATEH FVVTKALANA QRKVESRNFV IRKQLLEYDD VANDQRRAIY  
 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |  
 SQRNELLDYS DVSETINSIR EDVFKATIDA YIPPOSLIEM WDIPGLQERL KNDFDLDLPI  
 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |  
 AEWLDKEPEL HEETLRERIL AQSIEVYQRK EEVVGAMMR HFEKGVMLQT LDSIMKEHLA  
 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 |  
 AMDYLROGTH IRGYAOKDPK QEYKRESFSM FAAMLESLKY EVISTLSKVQ VRMPPEVEEL  
 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |  
 EQQRMEAEAR LAQMQLSHQ DDDSSAAAAAL AAQTGERKVG RNDPCFCGSG KKYKQCHGRL

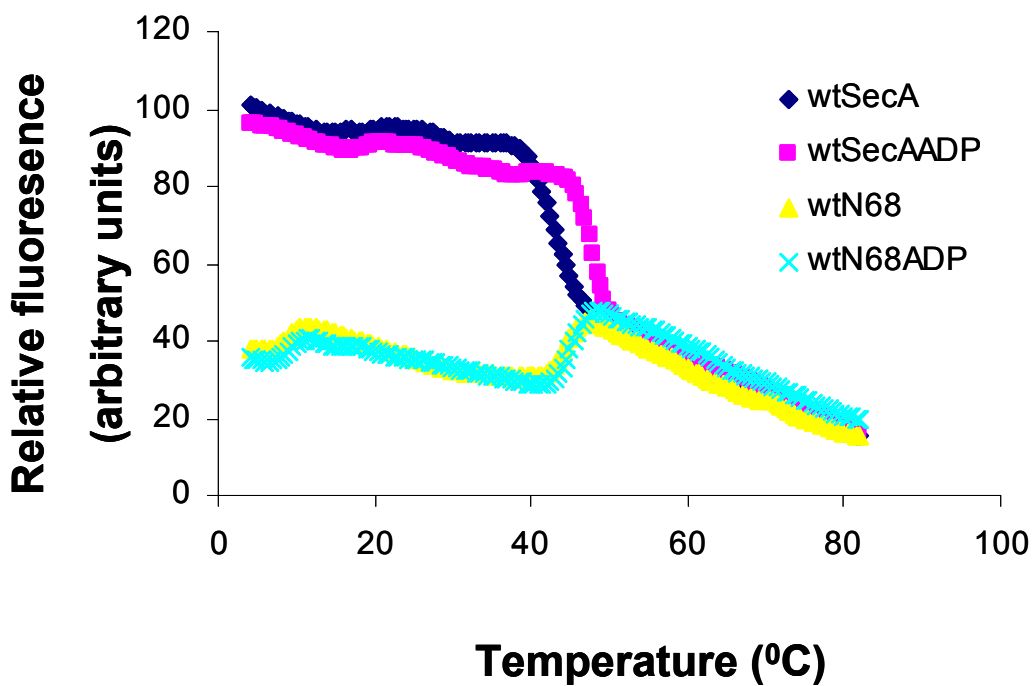
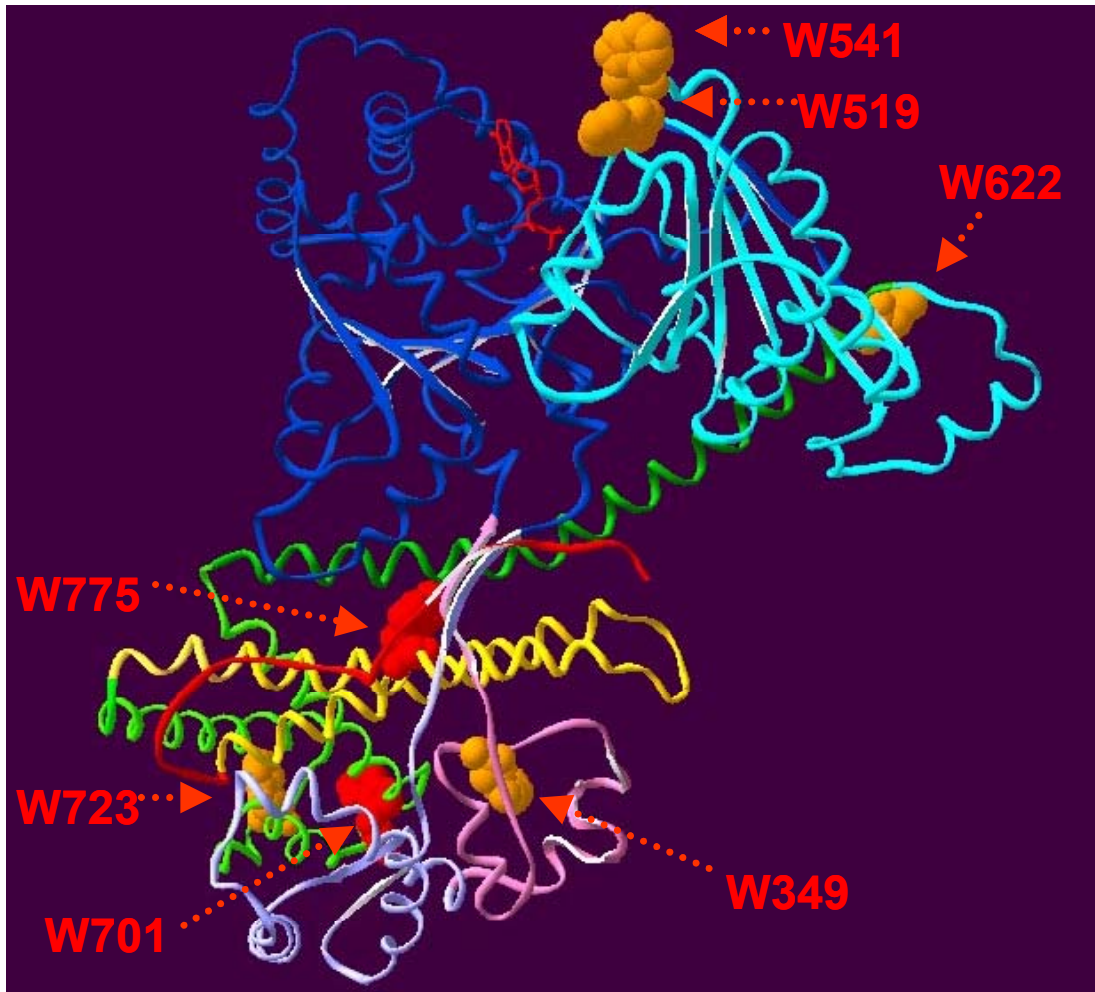
Q

## SecA domains

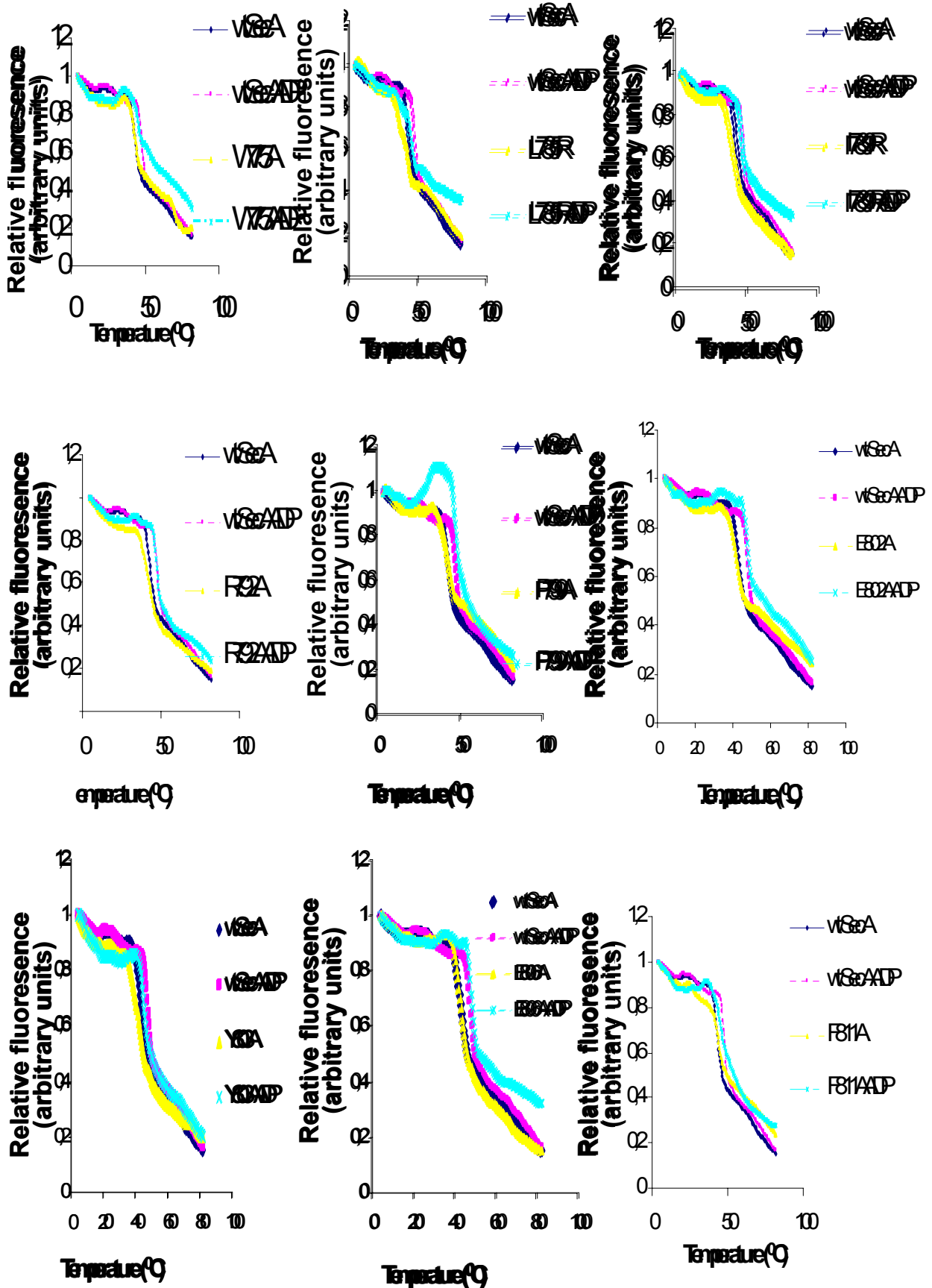
		B. subtilis	E. coli	Myc tub
DEAD motor	NBD	1-217+ 355-402	1-222+ 387-416	1-221+ 357- 396
	SSD	218-354	223-386	222- 356
	IRA2	403-570	417-621	397- 616
C-domain	SD	571-621	622-669	617- 665
	WD	622-705	670-755	666- 754
	IRA1	706-777	756-827	754- 832
	CT	778-802	828-901	833-

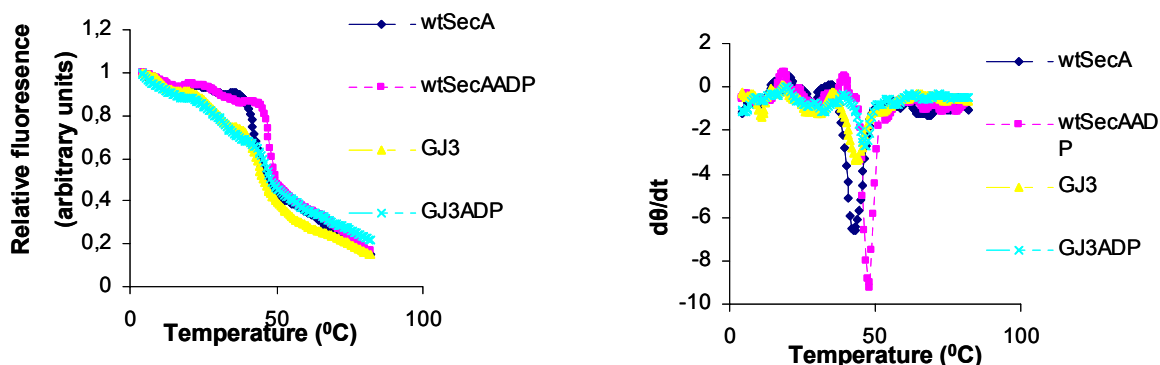


## B *SecA*( $\alpha$ )



Σχήμα 67: Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της SecAWT και του N68, που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Στο ίδιο διάγραμμα απεικονίζεται η καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της SecAWT απουσία και παρουσία ADP (μπλε και ροζ καμπύλη αντίστοιχα), και του N68 απουσία και παρουσία ADP (κίτρινη και τυρκουάζ καμπύλη αντίστοιχα).





Σχήμα 68: Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα σε διάλυμα..... Σε κάθε περίπτωση απεικονίζεται στο ίδιο διάγραμμα η καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της SecAWT απουσία και παρουσία ADP (μπλε και ροζ καμπύλη αντίστοιχα), και της κάθε μιας από τις SecAIRA1 πρωτεΐνες απουσία και παρουσία ADP (κίτρινη και τουρκουάζ καμπύλη αντίστοιχα). Σημειώνεται ότι έχει γίνει κανονικοποίηση των καμπύλων θερμικής αποδιάταξης, έτσι ώστε να ξεκινούν από την ίδια ένταση φθορισμού, και να γίνονται πιο εύκολες συγκρίσεις των σημείων μεταπτώσεως τους. Στο τελευταίο διάγραμμα απεικονίζεται ενδεικτικά η πρώτη παράγωγος της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης της GJ3SecA σε συνάρτηση με την θερμοκρασία, απ' όπου προκύπτουν οι τιμές των σημείων μετάπτωσης  $-/+ADP$  (ψηλότερες κορυφές). Αναλυτικά οι τιμές αυτές για όλες τις SecAIRA1 πρωτεΐνες απεικονίζονται στον πίνακα IV.

Πίνακας IV: Σημεία μετάπτωσης (apparent  $T_m$ ) της θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών, η οποία παρακολουθείται μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών σε διάλυμα με  $Mg^{2+}$   $-/+ADP$ .

Πρωτεΐνη	Διάλυμα $Mg^{2+}$	Διάλυμα $Mg^{2+}$ -ADP	Σταθεροποίηση από τοADP του κύριου $T_m$ ( $^{\circ}C$ )
SecAWT	42.95	48.01	5.06
N68WT	Διαφορετική καμπύλη από αυτή των SecA/C34  44.6	Διαφορετική καμπύλη από αυτή των SecA/C34  45.24	0.64
C34WT	49.38 50.61*	51.2	-
SecAW775A	42.96	45.5	2.54
SecAL785R	$T_m1:36.04$	45.5	2.45

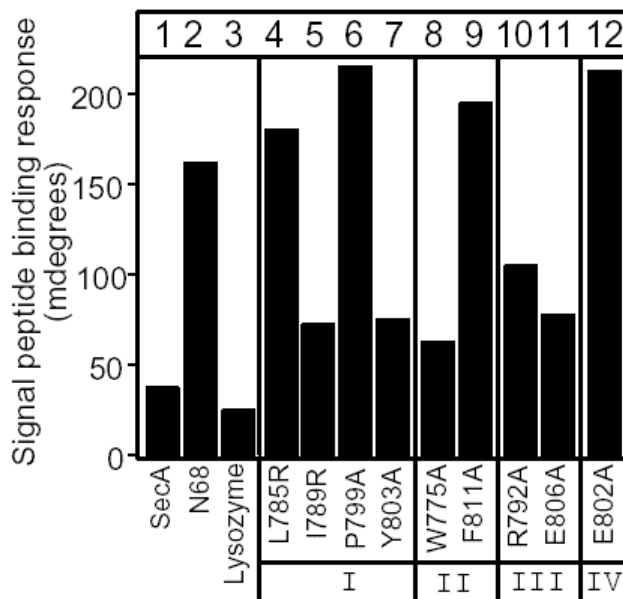
	Tm2:43.05*		
SecAI789R	Tm1:38.7* Tm2:42.5	46.79	8.09* 4.29
SecAR792A	Tm1:38.98 Tm2:42.9*	47.5	4.6
SecAP799A	Tm1:36.45 Tm2:43.06*	47.47	4.41
SecAE802A	41.52	47.55	6.03
SecAY803A	Tm1:38.11 Tm2:42.43*	45.5	3.07
SecAE806A	42.6	48.06	5.46
SecAF811A	43.7	45.5	1.8
SecAΔIRA1	44.01	47.05	3.04
SecAG510A	35.2+43	44.0	1.0
SecAR577K	43.5	46.0	2.5

\* Σημειώνεται το κύριο Tm (υψηλότερη κορυφή της παραγώγου)

### 3.2.Z. Η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την δέσμευση του DEAD κινητήρα για το πεπτιδίο σηματοδότη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, αλλά και για την θέση SecYEG στη μεμβράνη.

Για να διαπιστωθεί εάν η ρύθμιση από την IRA1 περιοχή περιορίζεται μόνο στον ρυθμό ανακύκλωσης του νουκλεοτιδίου, ή επεκτείνεται και στις υπόλοιπες λειτουργίες του DEAD κινητήρα, μελετήθηκε η ικανότητα των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών να δεσμεύουν πεπτιδίο σηματοδότη και να αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο SecYEG.

Έτσι στην επιφάνεια ενός οπτικού βιοαισθητήρα ακινητοποιήθηκε ένα μοντέλο πεπτιδίο σηματοδότη (3K7L; βλέπε υλικά και μέθοδοι; Baud et al., 2002), και μετρήθηκε η δέσμευση σ' αυτό των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών (σχήμα 69). Έχει διαπιστωθεί (Baud et al., 2002; βλέπε και Εισαγωγή), ότι η θέση δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη (SBD:

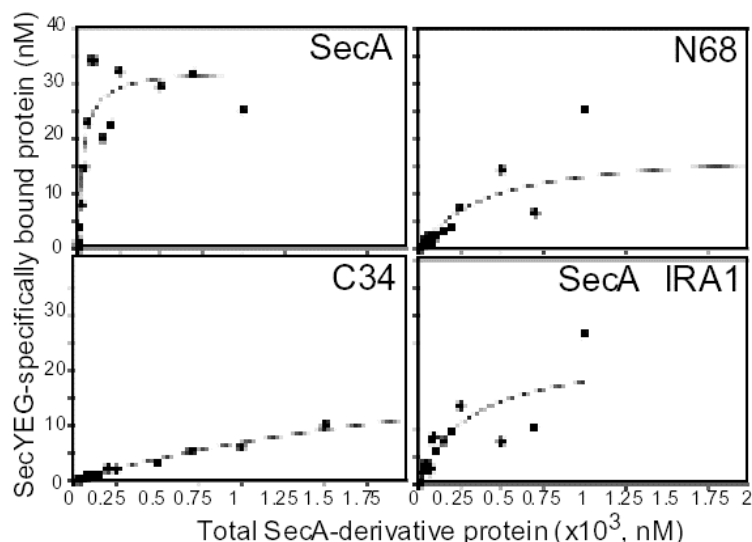


Σχήμα 69: Δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη στις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα SecA και μεταλλαγμένα παράγωγα της (2μM σε διάλυμα 50mM Hepes, pH 8, 50mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και DTT 1mM) προστίθενται στην επιφάνεια συντονισμού plasmon (surface plasmon resonance) ενός οπτικού βιοαισθητήρα που διαθέτει ακινητοποιημένο πεπτιδίο σηματοδότη (3K7L), όπως περιγράφηκε από τους Baud et al., 1999. Η αλλαγή στον δείκτη διαθλάσεως παρακολουθείται με τον χρόνο, και η απόκριση δέσμευσης στην ισορροπία (t=200s; εκφρασμένη σε millidegrees) φαίνεται στο παραπάνω σχήμα.

Signal peptide Binding Domain) εντοπίζεται στην 1-263 NBD-περιοχή, με εντελώς απαραίτητα αμινοξέα τα aa 220-240. Αυτά είτε συνιστούν την περιοχή που αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο σηματοδότη (που χρειάζεται όμως να αποτελεί τμήμα μιας ευρύτερης περιοχής για να αποκτά την κατάλληλη διαμόρφωση), είτε η περιοχή δέσμευσης του πεπτιδίου σηματοδότη είναι μία σύνθετη επιφάνεια αποτελούμενη τόσο από την 1-227 NBD-περιοχή, όσο και από την 220-263-περιοχή. Έτσι μελετήθηκε αν η IRA1 περιοχή *in trans*, επηρεάζει αυτή την δέσμευση. Παρατηρήθηκε ότι τόσο η SecAIRA1, όσο και όλες οι SecAIRA1 σημειακές μεταλλαγές δεσμεύονται εντονότερα στο πεπτιδίο σηματοδότη απ' ό,τι η WTSecA (50-200%; στήλες 4-12 στο σχήμα 69). Μάλιστα σε μερικές περιπτώσεις η δέσμευση είναι ίδια ή και μεγαλύτερη (στήλες 4, 6, 9,

και 12) από την δέσμευση του DEAD κινητήρα (στήλη 2). Αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και μετά από χημική διασύνδεση τριτωμένου πεπτιδίου σηματοδότη (<sup>3</sup>H]-3K7L) με κάθε μία από τις παραπάνω SecAIRA1 πρωτεΐνες, τρέξιμο σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης των δειγμάτων, αυτοραδιογραφία και ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με την χρήση phosphorimager (Baud et al., 2002; βλέπε υλικά και μέθοδοι).

Εν συνεχεία μελετήθηκε ο εν δυνάμει ρυθμιστικός ρόλος της IRA1 περιοχής, στην δέσμευση του DEAD κινητήρα στο SecYEG σύμπλοκο σε κυστίδια εσωτερικών μεμβρανών (inner membrane vesicles, IMVS; Hartl et al., 1990; Brundage et al., 1990; Douville et al., 1995; Dapic and Oliver, 2000; Βλέπε και υλικά και μέθοδοι). Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή η SecA δεσμεύεται με μεγάλη συγγένεια στο σύμπλοκο SecYEG ( $K_{D(SecA)}=31nM$ ; σχήμα 70; Πίνακας V; Hartl et al., 1990), ενώ η δέσμευση του DEAD κινητήρα (N68) είναι 10 φορές μειωμένη ( $K_{D(N68)}=300nM$ ; σχήμα 70; Πίνακας V; Dapic and Oliver, 2000). Από την άλλη η δέσμευση της απομονωμένης C-περιοχής, στο σύμπλοκο SecYEG, δεν είναι μετρήσιμη (σχήμα 70; Dapic and Oliver, 2000), υποδηλώνοντας ή ότι δεν αλληλεπιδρά απ' ευθείας με την θέση SecYEG, ή ότι μακριά από τον DEAD κινητήρα αποκτά μία διαμόρφωση



που δεν δεσμεύει SecYEG. Η SecAΔIRA1 παρουσιάζει συγγένεια για την θέση SecYEG που είναι παρόμοια μειωμένη με την συγγένεια του DEAD κινητήρα (σχήμα 70; Πίνακας V). Ομοίως και όλες οι SecAIRA1 μεταλλαγές δεσμεύονται 6-10 φορές ασθενέστερα στο σύμπλοκο SecYEG, εκτός από την SecAW775A που η συγγένεια της ελαττώνεται λιγότερο

Σχήμα 70: Καμπύλες δέσμευσης της SecA, N68, C34, και της SecAΔIRA1 στο σύμπλοκο SecYEG. Συγκεκριμένα σε κυστίδια εσωτερικών μεμβρανών (IMVS; 64μg/ml) με υπερεκφρασμένο το SecYEG σύμπλοκο (βλέπε υλικά και μέθοδοι), προστίθενται αυξημένες ποσότητες από κάθε μία από τις παραπάνω πρωτεΐνες [<sup>35</sup>S-πρωτεΐνη (0.5-0.8X10<sup>6</sup> cpm/ρμολ; Χρησιμοποιείται σαν ιχνηθέτης, με συγκέντρωση ~0.5nM) και κρύα πρωτεΐνη από 0.5nM μέχρι 2000nM] σε διάλυμα B (50mM Tris-HCL, pH 8, 50mM KCL, 5Mm MgCL<sub>2</sub>, και 1mM DTT), με 1mg/ml BSA, σε συνολικό όγκο 20μl. Μετά από 15' στον πάγο οι αντιδράσεις φορτώνονται σε ίσο όγκο διαλύματος B, με 0.2M σουκρόζη και 1mg/ml BSA, και φυγοκεντρώνονται στις 320.000Xg για 30' στους 40C (βλέπε υλικά και μέθοδοι; Hartl et al., 1990). Το υπερκείμενο από κάθε σωληνάκι απομακρύνεται και το ίζημα διαλυτοποιείται σε διάλυμα B (2X100μl). Εν συνέχεια τα διαλυτοποιημένα ιζήματα φορτώνονται σε συσκευή μικροφίλτρου, μαζί με την ποσότητα του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται σε κάθε πείραμα, και η οποία δεν έχει υποστεί την παραπάνω διαδικασία (χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας για τους διάφορους υπολογισμούς), και η μεμβράνη στην οποία ακινητοποιούνται τα παραπάνω δείγματα (δημιουργία ραδιενεργών κηλίδων) στεγνώνει στον αέρα. Η ραδιενέργεια στην μεμβράνη μετράται με την χρήση phosphorimager (Molecular dynamics) και τα δεδομένα αναλύονται με το λογισμικό πρόγραμμα Graph pad Prism 3.0 (Graph Pad Software, Inc) όπως περιγράφηκε από τους Darpic and Oliver, 2000. Σημειώνεται ότι οι τιμές δέσμευσης αποτελούν μέσους όρους τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων επιτελούμενων πάνω από τέσσερις φορές. Οι συγγένειες αναγράφονται στον πίνακα VIII.

από δύο φορές. Αξίζει να σημειωθεί ότι πειράματα συναγωνισμού της μετατόπισης πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες *in vitro*, από την SecAWT παρουσία υπεραφθονίας των διαφόρων SecAIRA1 πρωτεϊνών, που θα λειτουργούσε ως μέτρηση της δέσμευσης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στην θέση SecYEG όπου επιτελείται η μετατόπιση, δεν στέφθηκαν με επιτυχία. Επίσης δεν ήταν ξεκάθαρα τα αποτελέσματα της χημικής διασύνδεσης των διαφόρων SecAIRA1 πρωτεϊνών είτε με SecYEG πρωτεολιποσώματα, είτε με βακτηριακά μεμβρανικά κυστίδια.

Από τα παραπάνω δεδομένα λοιπόν προκύπτει ότι η IRA1 περιοχή καταστέλλει την δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη από την SecA στο κυτταρόπλασμα. Αυτό συμβαίνει επειδή η συγγένεια του DEAD κινητήρα (N68), για το πεπτιδίο σηματοδότη είναι μεγαλύτερη από την συγγένεια της ολόκληρης SecA, και ο IRA1 διακόπτης είναι ανοιχτός (αλληλεπίδραση N68-C34-περιοχών της SecA; Karamanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή). Επιπρόσθετα όλες οι SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια για το πεπτιδίο σηματοδότη. Από την άλλη μεριά η IRA1 περιοχή βελτιώνει τη δέσμευση του DEAD κινητήρα στην θέση SecYEG, αφού η συγγένεια του DEAD κινητήρα (N68) για το σύμπλοκο SecYEG παρουσιάζεται μειωμένη σε σχέση με την συγγένεια της WTSecA, ενώ και το ίδιο συμβαίνει και για όλες τις SecAIRA1 μεταλλαγές.

Αξίζει να σημειώσουμε ότι παρουσία νουκλεοτιδίων ελαττώνεται η συγγένεια της SecAWT για το σύμπλοκο SecYEG (Πίνακας V). Συγκεκριμένα η συγγένεια πέφτει ~6 φορές παρουσία ATP, και >13 φορές παρουσία ADP, όταν η πρωτεΐνη αποκτά την συμπαγή διαμόρφωση της και εξέρχεται από την μεμβράνη (βλέπε Εισαγωγή).

Σημειώνουμε ότι οι διάφορες προσπάθειες μέτρησης της δέσμευσης ολόκληρης της προπρωτεΐνης στις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες στο διάλυμα, ή παρουσία SecYEG πρωτεολιποσωμάτων/μεμβρανών, προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της IRA1-περιοχής στην διαδικασία της μετατόπισης στη μεμβράνη, ήταν ανεπιτυχείς. Συγκεκριμένα πειράματα χημικής διασύνδεσης (χωρίς ή με πρωτεολιποσώματα/μεμβράνες) με την χρήση [<sup>3</sup>H]-πεπτιδίου σηματοδότη/[<sup>35</sup>S]-proOmpA (και αυτοραδιογραφίας), ή κρύας proOmpA [και ανοσοεντοπισμού (western με α-proOmpA ή α-SecA)], δεν έδωσαν ξεκάθαρα αποτελέσματα

(χαμηλή απόδοση διασύνδεσης στην περίπτωση των πρωτεολιποσωμάτων, ή πληθώρα πρωτεϊνικών ζωνών στην περίπτωση των μεμβρανών). Εξάλλου οι παραπάνω μέθοδοι δεν θα μπορούσαν να ήταν και ποσοτικές. Προς τούτο ακολουθείται τώρα στο εργαστήριο μία ποσοτική προσέγγιση μέτρησης της δέσμευσης της προπρωτεΐνης στην SecAWT στο διάλυμα καταρχήν, με την χρήση φθορίζοντος υποστρώματος ή με την χρήση φθορίζουσας SecAWT και κρύου υποστρώματος, και μέτρησης της αλλαγής του φθορισμού σε κάθε περίπτωση σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων της κρύας πρωτεΐνης.

#### Πίνακας V

Σταθερές διάστασης (Dissociation constants) της SecA και των διάφορων μεταλλαγμένων παραγώγων της για το SecYEG σύμπλοκο (βλέπε υλικά και μέθοδοι).

<b>SecA derivative</b>	<b>mutation</b>	<b><math>K_D</math> (SecYEG) (nM)</b>
		<b>4°C</b>
<b>SecA</b>	-	31
<b>N68</b>	-	110
<b>SecAΔIRA1</b>	Δ783-795	130
<b>Class I</b>	L785R	107
	I789R	170
	P799A	190
	Y803A	140
<b>Class II</b>	W775A	51
	F811A	185
<b>Class III</b>	R792A	195
	E806A	110
<b>Class IV</b>	E802A	135
<b>SecA+ADP</b>	-	<b>&gt;400</b>
<b>SecA+ATP</b>	-	<b>190</b>

### 3.3. ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

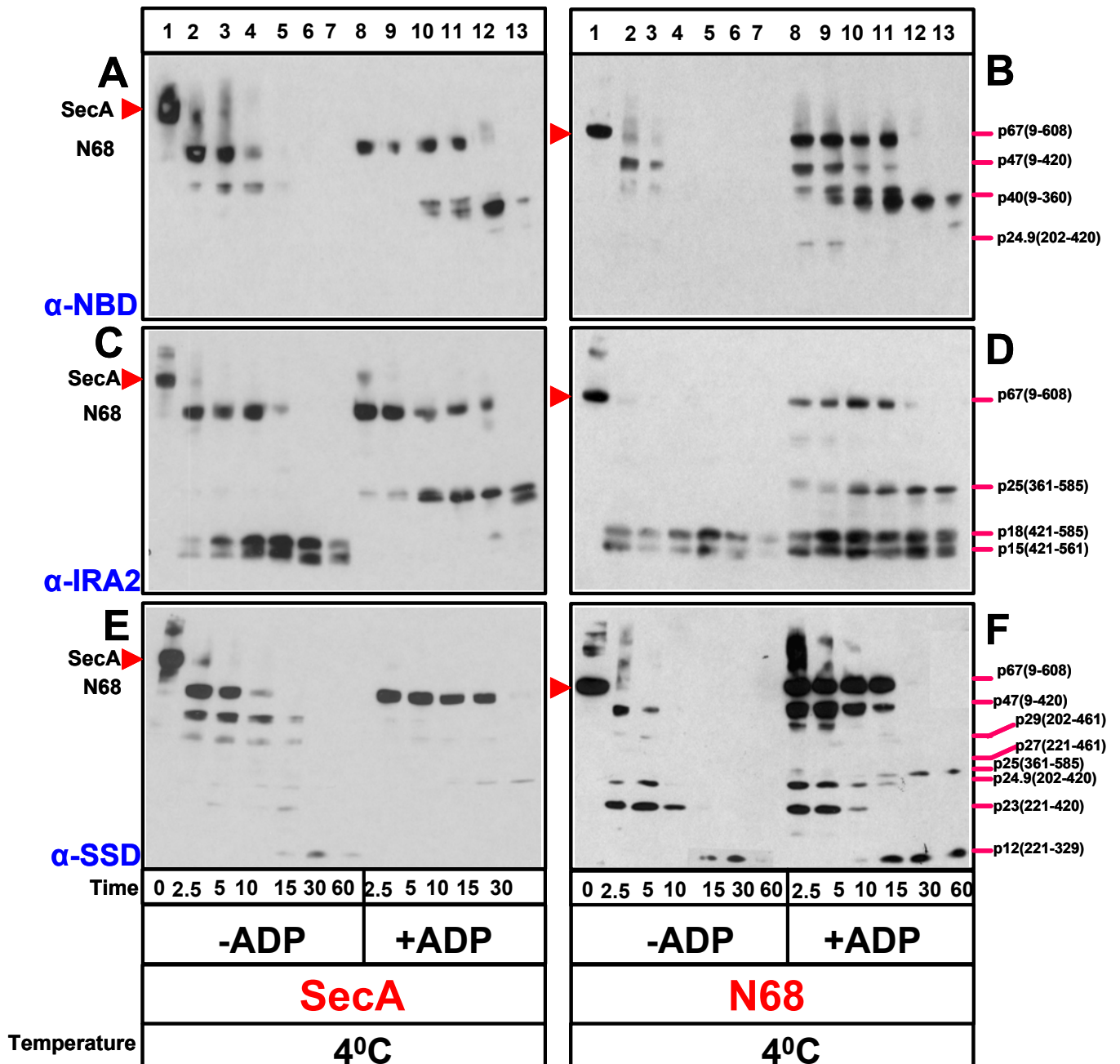
#### 3.3.A. Η C-περιοχή της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα διαδεικνύουν ότι ο IRA1 διακόπτης της ευρύτερης C-περιοχής αποτελεί ένα γενικό ρυθμιστή όλων των γνωστών δραστηριοτήτων του DEAD κινητήρα (δέσμευση νουκλεοτιδίου, βελτιωμένη και αποτελεσματικά ρυθμιζόμενη υδρόλυση του, δέσμευση πεπτιδίου σηματοδότη, και συγκρότηση της SecA στη μεμβράνη στη θέση SecYEG), αν και είναι δομικά ανέξαρτητος από τον DEAD κινητήρα (σχήμα 56). Η C-περιοχή όμως, στην οποία ανήκει η IRA1 περιοχή, είναι δομικά παρακείμενη στον DEAD κινητήρα (σχήμα 56; Karamanou et al., 1999; Sianidis et al., 2001; Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003; βλέπε και Εισαγωγή), και επομένως μία σοβαρή πιθανότητα εξήγησης των παραπάνω εκτεταμένων επιδράσεων της IRA1 περιοχής, θα μπορούσε να είναι η τροποποίηση της διαμόρφωσης του DEAD κινητήρα και των υποπεριοχών του. Η υπόθεση αυτή εξετάστηκε άμεσα παρακάτω.

Πρώτα απ' όλα έγινε σύγκριση της διαμόρφωσης του DEAD κινητήρα παρουσία [SecA; σχήμα 71A), C) και E) και σχήμα 72 ] και απουσία [N68; σχήμα 71 B), D) και F), και σχήμα 73] της C-περιοχής (που εμπεριέχει την IRA1 περιοχή) της SecA. Χρησιμοποιήθηκε περιοριστική πρωτεόλυση (ειδικότερα θρυψινόλυση) για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός των προκυπτόντων πρωτεολυτικών πεπτιδίων, με αντισώματα ειδικά για κάθε μία από τις τρεις υποπεριοχές του DEAD κινητήρα, δηλαδή για την NBD περιοχή [σχήμα 71 A) και B)], την IRA2 περιοχή [σχήμα 71 C) και D)], και την SSD περιοχή [σχήμα 71 E) και F)], (βλέπε υλικά και μέθοδοι; Baud et al., 2002). Διαπιστώθηκε καταρχήν ότι ο DEAD κινητήρας (N68), απουσία της C-περιοχής, είναι πιο ευαίσθητος στην πρωτεόλυση απ' ό,τι στην SecA [σύγκριση των πηγαδιών 2-5 των σχημάτων 71 A), C), και E), με τα αντίστοιχα πηγαδάκια των 71 B), D), και F); Karamanou et al., 1999]. Εν συνεχεία, όπως έχει παρατηρηθεί από τους Karamanou et al., 1999, διαπιστώθηκε ότι ο DEAD κινητήρας τόσο της SecA όσο και του N68, υφίσταται ειδική πρωτεόλυση από την θρυψίνη στην R420 [σχήμα 72 A), B), C), D), E), και F)], πηγαδάκια 2-7), που εντοπίζεται στην "άρθρωση" που συνδέει τις περιοχές NBD και IRA2 (στην αρχή του IRA2; Σχήμα 72 και 73; Karamanou et al., 1999; Hunt et al., 2001; Sharma et al., 2003). Η ειδική αυτή πρωτεόλυση οδηγεί στην παραγωγή των παρακάτω πεπτιδίων: α. p47 (αα 9-420; Karamanou et al., 1999; σχήμα 71A), B), E) και F), και σχήμα 72 και 73], β. p18 (αα 421-585; σχήμα 71 C) και D), και σχήμα 72 και 73], και γ. p15 (αα 421-561; σχήμα 71 C) και D), και σχήμα 72 και 73]. Παράλληλα με τα πεπτίδια που προκύπτουν από την πρωτεόλυση τόσο της SecA, όσο και του N68, εντοπίζονται και τρία πεπτίδια που είναι μοναδικά της πρωτεόλυσης του DEAD κινητήρα (στην πραγματικότητα διακρίνονται και στην περίπτωση της πρωτεόλυσης της SecA, αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες, σχήμα 71E, πηγαδάκια 2-7). Τα πεπτίδια αυτά προκύπτουν από πρωτεόλυση στην NBD και στην SSD περιοχή και συγκεκριμένα στην R201 ή στις R220 και K329 αντίστοιχα [λίγο πριν το Walker B, ή στην αρχή της SSD περιοχής και συγκεκριμένα της δομής του στελέχους (stem), αλλά και στην μέση της SSD περιοχής αντίστοιχα; σχήμα 73 και σχήμα 71F), πηγαδάκια 2-7] και είναι τα ακόλουθα: δ. p24.9 (αα 202-420), ε. p23 (αα 221-420), και ζ. p12 (αα 221-329).

Ο DEAD κινητήρας λοιπόν, απουσία της C-περιοχής με την οποία αλληλεπιδρά (Karamanou et al., 1999), 1) γίνεται περισσότερο ευαίσθητος στην πρωτεόλυση (γρήγορη εξαφάνιση του N68 στην περίπτωση της πρωτεόλυσης του DEAD κινητήρα, που είναι ορατή με τα αντισώματα έναντι και των τριών περιοχών του), ενώ 2) παράλληλα εκθέτει και καινούργια αμινοξέα της NBD και της SSD περιοχής προς πρωτεόλυση (παραγωγή των πεπτιδίων δ., ε., και ζ). Και τα δύο παραπάνω αποτελέσματα όμως, υποδηλώνουν αλλαγή της διαμόρφωσης του DEAD κινητήρα. Πιθανότατα απουσία της C-περιοχής, οι περιοχές NBD-IRA2 περιοχές

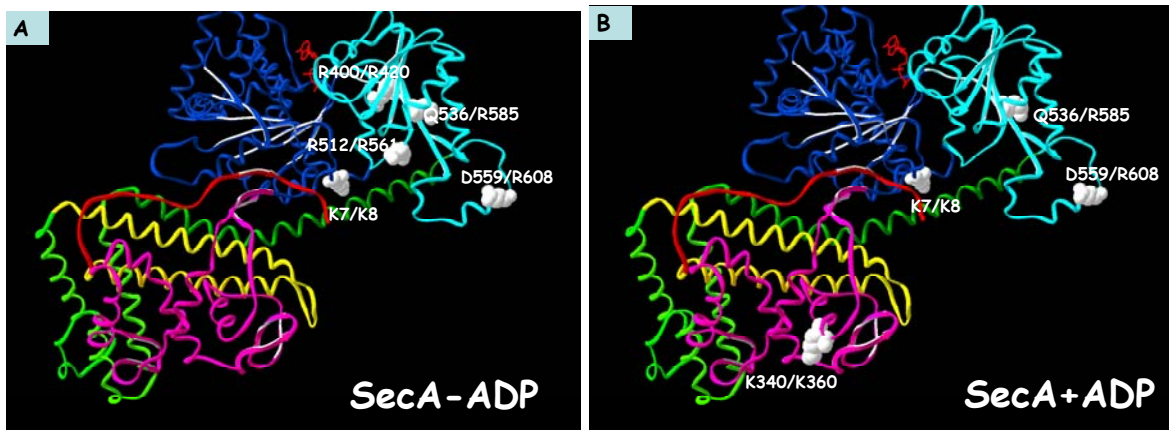




Σχήμα 71: Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και του N68 στους 4°C. Συγκεκριμένα η SecAWT και το N68 (1.25mg/ml) επωάζονται χωρίς (πηγαδάκια 1-7) ή με ADP (1mM; πηγαδάκια 8-13), σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), για 5' στον πάγο. Η προστιθέμενη θρυψίνη (0.1 mg/ml), σε τελικό όγκο 100μl, αδρανοποιείται μετά από 2.5, 5, 10, 15, 30, και 60' στους 4°C, με Pefabloc (40mM; 4°C). Τα προκύπτοντα πολυπεπτιδία αναλύονται σε 17% SDS-PAGE με 6M ουρία (φορτώνονται 4.5μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε πηγαδάκι), και ανιχνεύονται με αντισώματα για τις τρεις περιοχές του DEAD κινητήρα NBD, IRA2, και SSD (πάνω, μεσαία, και κάτω πάνελ αντίστοιχα). Η ταυτότητα των διαφόρων πεπτιδίων καθορίζεται είτε με N-τελική αλληλούχιση (N-terminal sequencing), ενώ οι καρβοξυτελικές θέσεις πρωτεόλυσης προσδιορίζονται από τα προφανή μοριακά βάρη και την πρωτοταγή αλληλουχία. Τα ονόματα των πεπτιδίων προκύπτουν από τα μετρούμενα μοριακά τους βάρη με βάση το πρόγραμμα Protparam tool.

είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένες [η SecAG510A (Sianidis et al., 2001; βλέπε και Εισαγωγή) στην οποία η αλληλεπίδραση N68-C34 είναι περιορισμένη (όπως εδώ απουσιάζει στον απομονωμένο DEAD κινητήρα), παρουσιάζει ασθενέστερη αλληλεπίδραση και των NBD-IRA2 περιοχών], και άρα ευπρόσβλητες από την πρωτεάση, ενώ και το στέλεχος της SSD περιοχής, αλλά και η ευρύτερη περιοχή γύρω απ' αυτό, πιθανά πάλι απουσία της C-περιοχής με την οποία γειτνιάζει (σχήμα



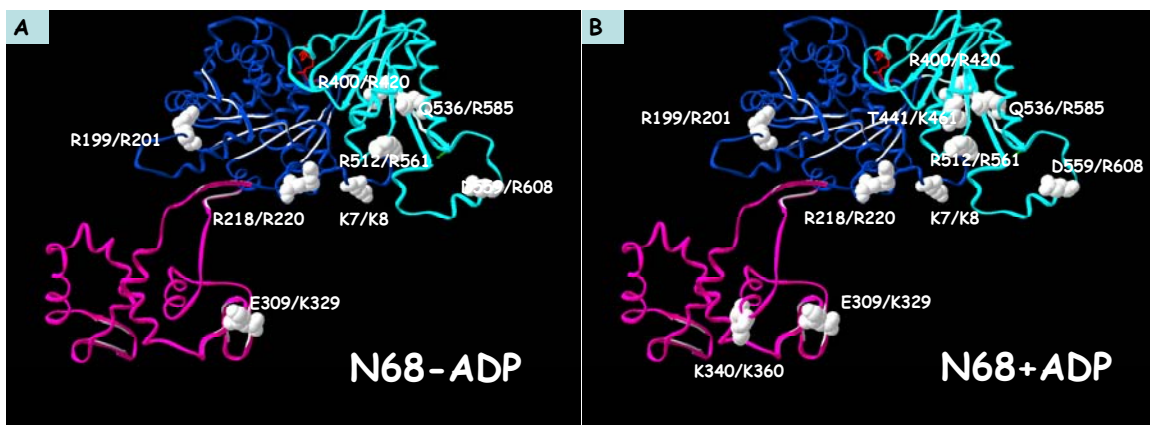


Σχήμα 72: Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης της SecAWT απουσία (A), και παρουσία ADP (B), με θρυψίνη (4°C), στην κρυσταλλογραφική δομή της της *bsSecA*. Σημειώνεται ότι οι αργινίνες ή οι λυσίνες μετά τις οποίες πρωτεολύει η θρυψίνη, υποδηλώνονται με την μορφή άσπρων σφαιρών, ενώ πρώτα αναγράφεται το όνομα του αμινοξέος στην *bsSecA* (που μπορεί και να μην είναι αργινίνη ή λυσίνη), και στη συνέχεια στην *ecSecA*, κατ' αναλογία, όπου πραγματοποιείται και η πρωτεόλυση. Οι διάφορες περιοχές της *bsSecA* χρωματίζονται όπως έχει πραγματοποιηθεί στο σχήμα 57 και στο σχήμα 35 στην Εισαγωγή.

72, και 73), αποκαλύπτει αμινοξέα για πρωτεόλυση.

Παρουσία ADP, είδαμε ότι ο DEAD κινητήρας (N68) υφίσταται θερμική σταθεροποίηση (Sianidis et al., 2001), ενώ σύμφωνα με τους Karamanou et al., 1999 σταθεροποιείται και πρωτεολυτικά [σχήμα 71 A), B), C), D), E), και F), πηγαδάκια 8-13]. Με την πρόσδεση ADP η SecA υφίσταται μία αλλαγή στη διαμόρφωση του DEAD κινητήρα, που έχει σαν αποτέλεσμα η R420 (τέλος NBD-περιοχής) να μην είναι πια προσιτή στη θρυψίνη, όπως και η R561 (IRA2-περιοχή) [σχήμα 72 A), πηγαδάκια 8-13, και σχήμα 72 και 73], ενώ αποκαλύπτεται στην πρωτεάση η K360, που εντοπίζεται στην SSD περιοχή (λίγο πριν την β-αλυσίδα του στελέχους που εισέρχεται στην NBD περιοχή; σχήμα 72 και 73), μαζί με την R585 (IRA2-περιοχή; εκτίθεται στην πρωτεάση και απουσία ADP). Έτσι εξαφανίζονται τα πρωτεολυτικά πεπτιδία α., β., και γ., και προκύπτουν τα πεπτιδία στ. p40 [αα 9-360; σχήμα 71A), πηγαδάκια 10-13, και σχήμα 72 και 73; Baud et al., 2002], η. p25 [αα 361-585; σχήμα 71 C), πηγαδάκια 8-13, και σχήμα 72 και 73; Baud et al., 2002].

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι παρουσία ADP στην SecA, επέρχονται αλλαγές τόσο στην NBD, και στην IRA2-περιοχή (δεν παρατηρείται πρωτεόλυση στην R420,

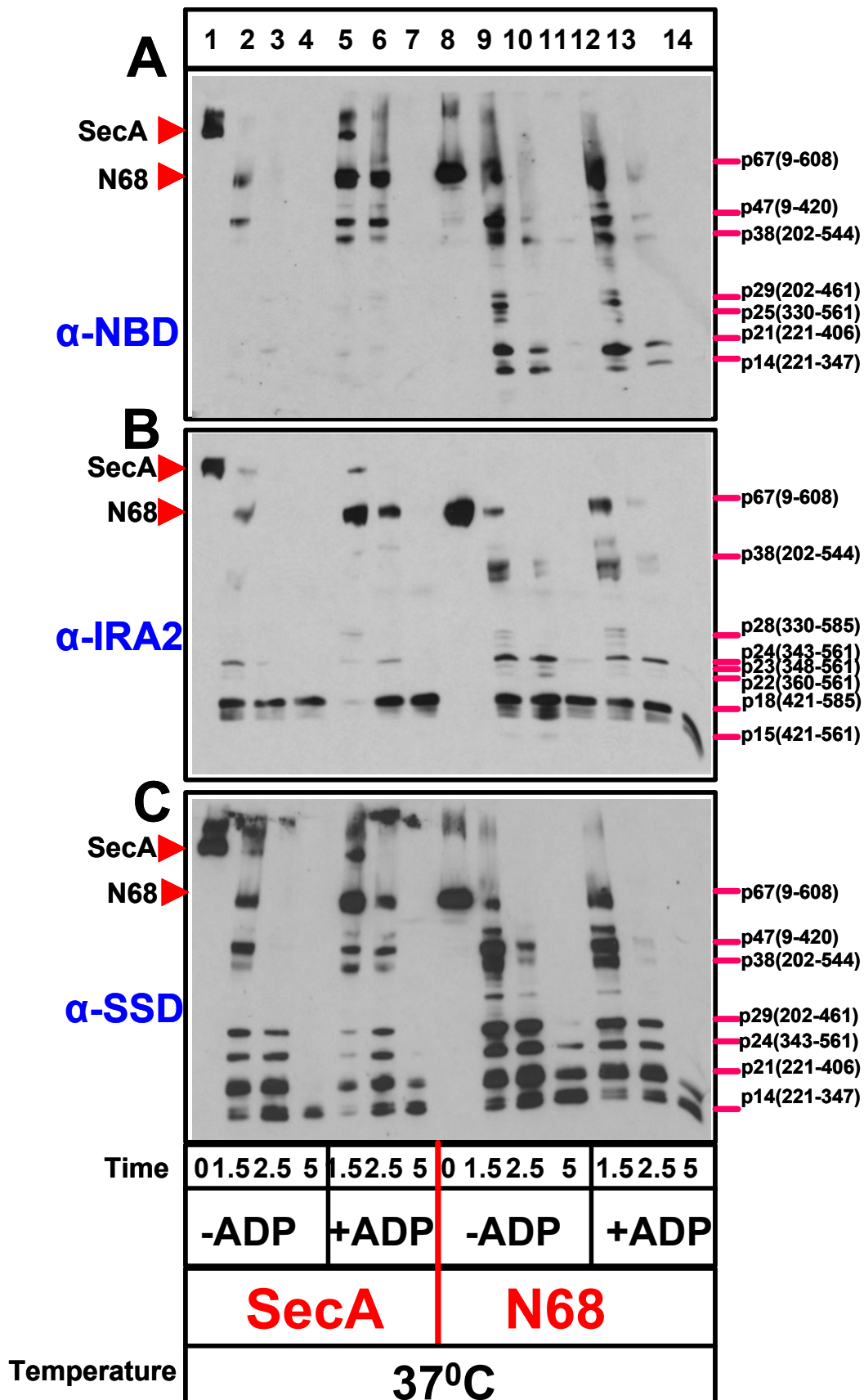


Σχήμα 73: Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης του N68 απουσία (A), και παρουσία ADP (B), με θρυψίνη στους 4°C, στην κρυσταλλογραφική δομή του N68 της *bsSecA*. Σημειώνεται ότι οι αργινίνες ή οι λυσίνες μετά τις οποίες πρωτεολύει η θρυψίνη, υποδηλώνονται με την μορφή άσπρων σφαιρών, ενώ πρώτα αναγράφεται το όνομα του αμινοξέος στο N68 της *bsSecA* (που μπορεί και να μην είναι αργινίνη ή λυσίνη), και στη συνέχεια στο N68 της *ecSecA*, κατ' αναλογία, όπου πραγματοποιείται και η πρωτεόλυση. Οι διάφορες περιοχές του N68 της *bsSecA* χρωματίζονται όπως έχει πραγματοποιηθεί στο σχήμα 56 και στο σχήμα 34 στην Εισαγωγή.

ούτε στην R561, αλλά εξακολουθεί να υφίσταται πρωτεόλυση στην R585), αλλά και στην SSD-περιοχή (πρωτεόλυση στην K360). Αλλαγή λοιπόν στη διαμόρφωση της SSD περιοχής παρατηρείται, όχι μόνο απουσία της C-περιοχής (όπως είδαμε προηγουμένως), αλλά και μετά την πρόσδεση ADP στην ολόκληρη πρωτεΐνη. Και στις δύο περιπτώσεις η αλλαγή της SSD περιοχής εντοπίζεται κοντά στην ευρύτερη περιοχή της δομής του στελέχους του (R220 και K360). Αντίθετα κατά την πρωτεόλυση του N68 παρουσία ADP, διαπιστώνονται μεν τα στ., και η πρωτεολυτικά τμήματα [σχήμα 71 B), D) και F), πηγαδάκια 8-13], και άρα αποκαλύπτεται στην θρυψίνη η K360 και η R585, προκύπτουν όμως μαζί και τα πεπτιδία α., β., και γ. [σχήμα 71 B, D και F, πηγαδάκια 8-13], που υποδηλώνουν την έκθεση στην πρωτεάση και των R420 και R561. Κατά συνέπεια η αλλαγή στην διαμόρφωση του DEAD κινητήρα (και στις τρεις περιοχές του) που παρατηρείται με την δέσμευση ADP στην SecA, δεν πραγματοποιείται αποτελεσματικά στην περίπτωση του N68. Μπορούμε λοιπόν να μιλάμε για μεγαλύτερη κινητικότητα της διαμόρφωσης των NBD, IRA2 και SSD-περιοχών, όταν ο DEAD κινητήρας δεν γειτνιάζει με την C-περιοχή. Πιθανότατα απουσία της C-περιοχής, η αλληλεπίδραση των NBD-IRA2 με το δεσμευμένο ADP, δεν είναι τόσο σταθερή, και έτσι η πρωτεάση έχει πρόσβαση στην R420 (NBD-IRA2-περιοχή) και R561 (IRA2-περιοχή). Επιπλέον διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση του N68 παρουσία ADP, η πρωτεόλυση στην SSD περιοχή στην R220 θέση, επαναλαμβάνεται όπως και απουσία ADP [προκύπτουν τα πρωτεολυτικά πεπτιδία δ., ε., και ζ. [σχήμα 71 F), πηγαδάκια 8-11]. Κατά συνέπεια η SSD περιοχή του DEAD κινητήρα, τόσο στην SecA όσο και στο N68, τροποποιείται με την δέσμευση ADP (παραγωγή πεπτιδίων στ., η., και θ.), αλλά απουσία της C-περιοχής παρουσιάζει και μία επιπλέον τροποποίηση, αφού στην περίπτωση του N68 προκύπτουν τα πεπτιδία δ., ε., και ζ. Δηλαδή η SSD περιοχή του N68, από τη μία μεριά αντιλαμβάνεται το ADP όπως και η WTSecA, με πρωτεόλυση στην R360, εξακολουθεί όμως να διατηρεί απουσία της C-περιοχής και μία ήδη τροποποιημένη διαμόρφωση (πρωτεόλυση στην R220 και στην K329).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η διαμόρφωση του DEAD κινητήρα (και των τριών υποπεριοχών του), τόσο απουσία όσο και παρουσία ADP ρυθμίζεται από την C-περιοχή.

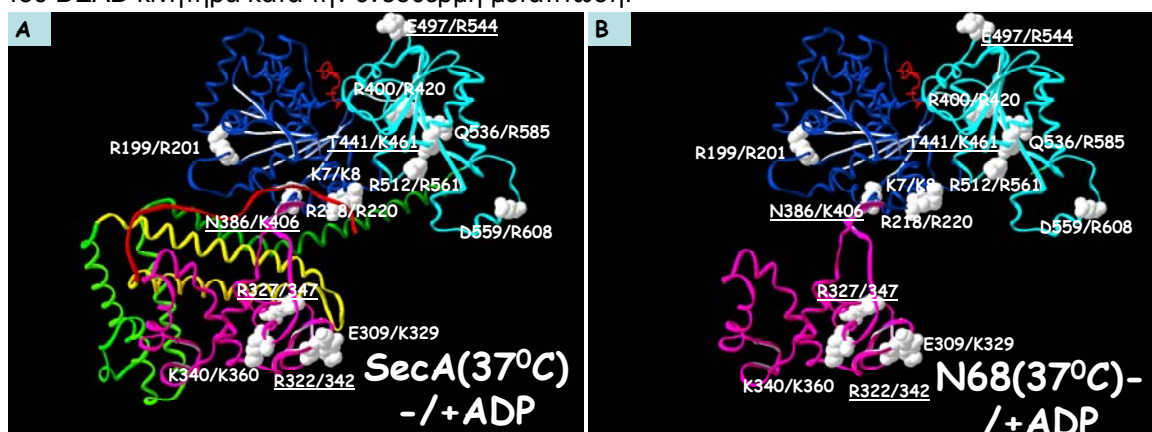
3.3.B. Στους 37°C η ρύθμιση του DEAD κινητήρα από την C-περιοχή περιορίζεται.



Σχήμα 74: Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και του N68 στους 37°C. Συγκεκριμένα η SecAWT και το N68 (0.3mg/ml) επωάζονται χωρίς (πηγαδάκια 1-4 και 8-11) ή με ADP (1mM; πηγαδάκια 5-7 και 12-14), σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), για 5' στον πάγο. Η προστιθέμενη θρυψίνη [0.0025 mg/ml (SecAWT), ή 0.00125mg/ml (N68)], σε τελικό όγκο 100μl, αδρανοποιείται μετά από 1.5, 2.5 και 5' στους 37°C, με Pefabloc (9mM; 4°C). Τα προκύπτοντα πολυπεπτιδία αναλύονται σε 17% SDS-PAGE με 6M ουρία (φορτώνονται 4μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε πηγαδάκι), και ανιχνεύονται με αντισώματα για τις τρεις περιοχές του DEAD κινητήρα NBD, IRA2, και SSD (πάνω, μεσαία, και κάτω πάνελ αντίστοιχα). Η ταυτότητα των διαφόρων πεπτιδίων καθορίζεται είτε με N-τελική αλληλούχηση (N-terminal sequencing), είτε εικάζεται από τα προφανή μοριακά τους βάρη, την ανίχνευση τους με αντισώματα έναντι των τριών περιοχών του N68, και από τις συγκρίσεις πρωτεόλυσης στους 4°C και στους 37°C, ενώ οι καρβοξυτελικές θέσεις πρωτεόλυσης προσδιορίζονται από τα προφανή μοριακά βάρη και την πρωτοταγή αλληλουχία. Τα ονόματα των πεπτιδίων προκύπτουν από τα μετρούμενα μοριακά τους βάρη με βάση το πρόγραμμα ProtParam tool.

Στους 37°C ο DEAD κινητήρας υφίσταται όπως είδαμε σε προηγούμενο Κεφάλαιο ενδόθερμη μετάπτωση (Κεφάλαιο I.IV). Η μετάπτωση αυτή απεικονίζεται και με την περιοριστική πρωτεόλυση της SecA και του N68 στους 37°C (σχήμα 74, και 75). Διαπιστώνεται ότι το πρωτεολυτικό προφίλ που αντιστοιχεί στην διαμόρφωση της SecA και του N68 κατά την ενδόθερμη μετάπτωση τους, είναι αρκετά κοντά στο πρωτεολυτικό προφίλ που παρατηρείται απουσία της C-περιοχής στους 4°C (σύγκριση σχήματος 71, 72 και 73 με σχήμα 74, και 75), με την διαφορά ότι συμβαίνει περισσότερη πρωτεόλυση και στις τρεις υποπεριοχές του DEAD κινητήρα. Δηλαδή παρατηρείται πρωτεόλυση στις R201, και R220, K329 (των NBD και SSD-περιοχών αντίστοιχα), αλλά τα πεπτιδία που προκύπτουν είναι ελαφρώς τροποποιημένα, μιας και δεν συμβαίνει μόνο πρωτεόλυση στην R420 (της μεσόφασης των NBD-IRA2), αλλά και στις K406 (NBD-περιοχή), ή στις K461, R544 (IRA2-περιοχή), και στις R342, R347 (SSD-περιοχή). Διατηρείται δηλαδή η πρόσβαση της πρωτεάσης στην SSD-περιοχή, η οποία και ενισχύεται, αλλά επιτείνεται και η πρωτεόλυση στην IRA2-περιοχή (K461, και R544, πλην της συνήθους εκτομής στις R585, και R561), και στην NBD-περιοχή (R420, και K406). Έτσι παράγονται τα πεπτιδία p38, p29, p24, p21, και p14, αντί των p24.9, p23, και p12 (σύγκριση σχημάτων 74 με 71 και 75 με 72 και 73). Από αυτά το p24 ανιχνεύεται όχι μόνο με αντίσωμα έναντι της SSD-περιοχής (σχήμα 75C), αλλά και με αντίσωμα έναντι της IRA2-περιοχής (σχήμα 74B). Εκτός από καινούργια SSD πεπτιδία, προκύπτουν και καινούργια IRA2-πεπτιδία, τα p28, p24, p23, και p22 (σχήμα 74B), καθώς δεν πραγματοποιείται μόνο πρωτεόλυση στην R420, και στις R585, και R561, αλλά και στις K329, R342, R347, και K360 της SSD-περιοχής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρουσία ADP, παρατηρείται μια πολύ μικρή σταθεροποίηση της DEAD-περιοχής τόσο στην περίπτωση της SecA όσο και στην περίπτωση του N68 (σχήμα 74A, B, και C, πηγαδάκια 5-7 και 12-14 σε σύγκριση με τα 2-4 και 9-11), αλλά στην ουσία το πρωτεολυτικό προφίλ είναι σχεδόν ταυτόσημο απουσία και παρουσία ADP και στις δύο παραπάνω πρωτεΐνες. Αλλά και το πρωτεολυτικό προφίλ μεταξύ των SecA και N68 είναι το ίδιο στους 37°C, γεγονός που υποστηρίζει την συμβολή της C-περιοχής στην διαμόρφωση του DEAD κινητήρα κατά την ενδόθερμη μετάπτωση.



Σχήμα 75: Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης της SecA (A) και του N68 (B) απουσία και παρουσία ADP, με θρυψίνη (37°C), στην κρυσταλλογραφική δομή της της *bsSecA*. Σημειώνεται ότι οι αργινίνες ή οι λυσίνες μετά τις οποίες πρωτεολύει η θρυψίνη, υποδηλώνονται με την μορφή άσπρων σφαιρών, ενώ πρώτα αναγράφεται το όνομα του αμινοξέος στην *bsSecA* (που μπορεί και να μην είναι αργινίνη ή λυσίνη), και στη συνέχεια στην *ecSecA*, κατ' αναλογία, όπου πραγματοποιείται και η πρωτεόλυση. Οι διάφορες περιοχές της *bsSecA* χρωματίζονται όπως έχει πραγματοποιηθεί στο σχήμα 56. Αξίζει να σημειωθεί ότι το προφίλ πρωτεόλυσης του DEAD κινητήρα στους 37°C, τόσο στην SecA, όσο και στο N68, μοιάζει με το πρωτεολυτικό προφίλ του N68 στους 4°C (σχήμα 73), με την διαφορά ότι η πρωτεόλυση του τώρα είναι εντονότερη. Συγκεκριμένα τα επιπλέον αμινοξέα στα οποία γίνεται πρωτεόλυση σημειώνονται με μία γραμμή.

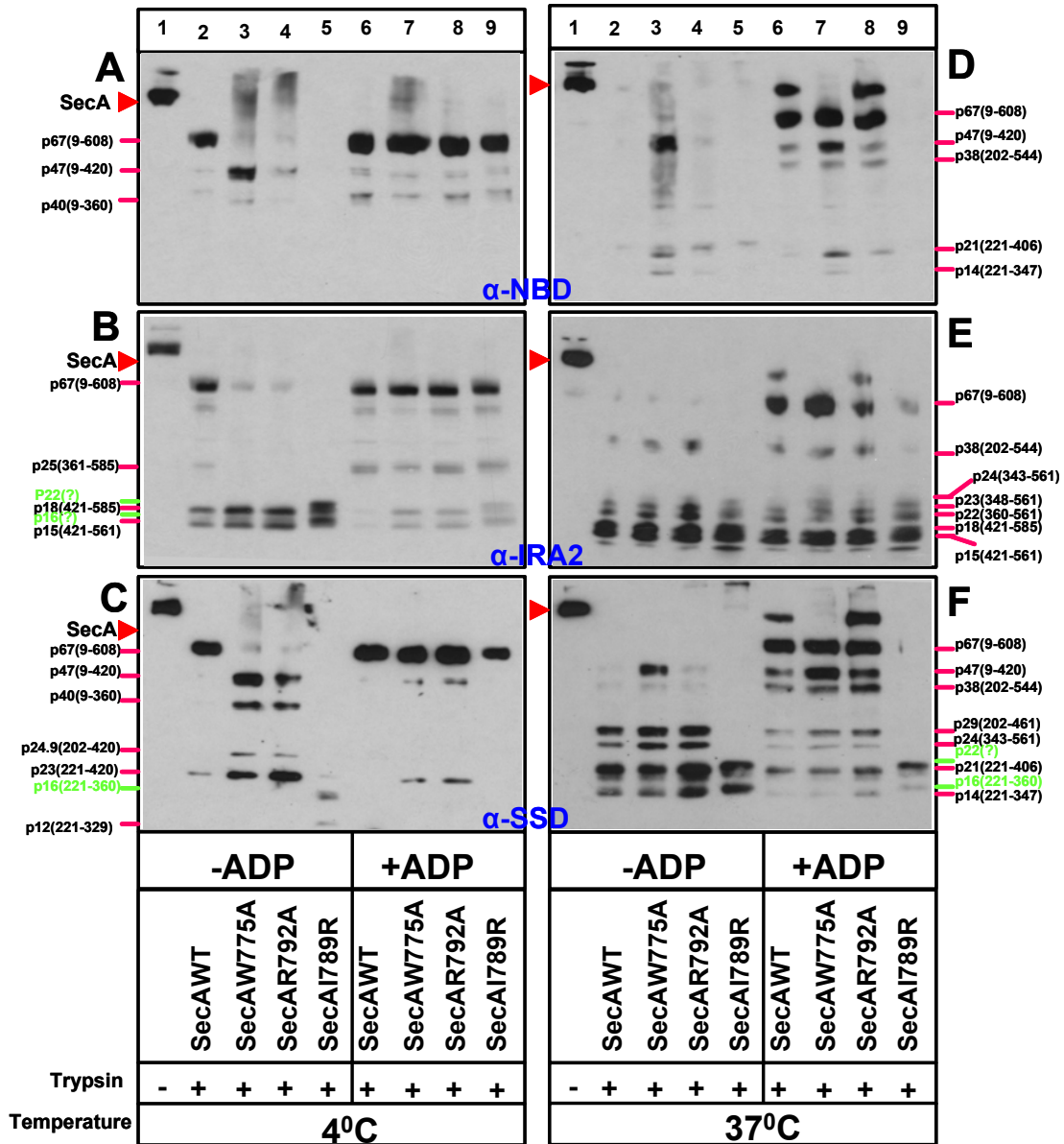
### **3.3.Γ. Η IRA1 υποπεριοχή της C-περιοχής της SecA ρυθμίζει την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα.**

Προκειμένου να εξεταστεί αν η ρυθμιζόμενη από την C-περιοχή διαμόρφωση του DEAD κινητήρα προκαλείται ειδικά από την υποπεριοχή IRA1, επιτελέστηκαν πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης για τρεις ενδεικτικά SecAIRA1 σημειακές μεταλλαγές, την SecAW775A, την SecAR792A, και την SecAI789R, που παρουσιάζουν διαβάθμιση (ολοένα και μειούμενη αντίστοιχα) όσον αφορά την αύξηση και την λειτουργικότητα τους *in vivo* (πείραμα συμπληρωματικότητας, σχήμα 58). Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε περιοριστική πρωτεόλυση των παραπάνω SecAIRA1 σημειακών μεταλλαγών, παρουσία και απουσία ADP, αλλά για ένα μόνο χρονικό διάστημα, (απλοποίηση των αποτελεσμάτων; βλέπε υλικά και μέθοδοι), και τα διάφορα πρωτεολυτικά πεπτιδία διαπιστώθηκαν με ανοσοεντοπισμό, με τα αντισώματα α-NBD [σχήμα 76 A)], α-IRA2 [σχήμα 76 B)], και α-SSD [σχήμα 76 C)]. Από την πρωτεόλυση απουσία ADP, διαπιστώθηκε καταρχήν ότι ο DEAD κινητήρας, p68, όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών, όπως και στην περίπτωση του N68, είναι πρωτεολυτικά πιο ευαίσθητος [σχήμα 76A), B), και C), πηγαδάκια 3, 4, και 5, και σχήμα 77], σε σχέση με αυτόν της WTSecA [σχήμα 76 A), B), και C), πηγαδάκι 2]. Μάλιστα το πεπτιδίο p68 είναι πιο ευαίσθητο σε πρωτεόλυση, στην περίπτωση των SecAIRA1 μεταλλαγών τάξης I [σχήμα 76 A), B), και C), πηγαδάκι 4] και III [σχήμα 76 A), B), και C), πηγαδάκι 5]. Έπειτα στην περίπτωση της SecAI789R διαπιστώνεται πρωτεόλυση της IRA2 περιοχής και σε καινούργια θέση, αφού πέραν των τμημάτων β. p18 (βλέπε προηγούμενο Κεφάλαιο) που σημαίνεται με το α-IRA2 αντίσωμα, σημαίνεται ένα μεγαλύτερο πεπτιδίο το p22, και ένα μικρότερο το p16 (πράσινη παύλα) [σχήμα 76B), πηγαδάκι 5], ενώ δεν σημαίνεται το p15 (δεν πραγματοποιείται πρωτεόλυση στην R561). Επομένως η IRA1 περιοχή επιδρά στη διαμόρφωση όχι μόνο ολόκληρου του DEAD κινητήρα, αλλά και της υποπεριοχής IRA2 ειδικότερα. Τέλος στην περίπτωση των SecAIRA1 μεταλλαγών, παρατηρείται όπως και στην περίπτωση του N68, πρωτεόλυση στην NBD και στην SSD περιοχή, στις R201 και R220 αντίστοιχα, αφού προκύπτουν τα πεπτιδία δ. p24.9 και ε. p23 [σχήμα 76C), πηγαδάκια 3, και 4, βλέπε και προηγούμενο Κεφάλαιο, και σχήμα 77). Η SecAI789R μεταλλαγή, λόγω της μεγάλης αποσταθεροποίησης του DEAD κινητήρα που προκαλεί δεν δίνει σχεδόν καθόλου σήμα, ούτε με το α-NBD, ούτε με το α-SSD αντισώματα. Εντούτοις στην περίπτωση της SecAI789R πρωτεΐνης η πρωτεόλυση στην SSD-περιοχή, επεκτείνεται και στην K360, εκτός από την R220, οπότε και προκύπτει το πεπτιδίο p16 (αα 221-360; Σχήμα 76, πηγαδάκι 5, όπου απεικονίζεται με πράσινα γράμματα, και σχήμα 29), ενώ διαπιστώνεται πρωτεόλυση και στην K329, οπότε και προκύπτει το πεπτιδίο p12 (αα 221-329; Σχήμα 76, πηγαδάκι 5, όπου απεικονίζεται με πράσινα γράμματα, και σχήμα 77).

Επομένως η IRA1 περιοχή εκτός από την διαμόρφωση ολόκληρου του DEAD κινητήρα ρυθμίζει την διαμόρφωση όλων των υποπεριοχών του όπως και στο N68, η απουσία της C-περιοχής. Γι' αυτό και οι SecAIRA1 πρωτεΐνες προσδίδουν πρωτεολυτικό προφίλ απουσία ADP παρόμοιο με αυτό του N68.

Στη συνέχεια η περιοριστική πρωτεόλυση των SecAIRA1 μεταλλαγών παρουσία ADP, οδηγεί σε σταθεροποίηση του πεπτιδίου p68 [σχήμα 76 A), B), και C), πηγαδάκια 7-9, και σχήμα 77], όπως και στην περίπτωση της WTSecA [σχήμα 76 A), B), και C), πηγαδάκι 6, και σχήμα 77], λόγω ακριβώς της δέσμευσης του ADP. Παράλληλα διαπιστώνεται και πρωτεόλυση στην K360 (παραγωγή των πεπτιδίων p40 και p25; Σχήμα 76 A) και B), πηγαδάκια 7-9, και σχήμα 77), πάλι όπως και στην περίπτωση της SecAWT (Σχήμα 76A) και B), πηγαδάκι 5, και σχήμα 77). Από την άλλη μεριά όμως, η R420 (στη μεσόφαση των NBD-IRA2) και η R561 (IRA2-περιοχή), οι οποίες παρουσία ADP στην περίπτωση της WTSecA κρύβονται από την θρυψίνη, παραμένουν προσιτές σε πρωτεόλυση σε σημαντικό βαθμό από τις τρεις SecAIRA1 μεταλλαγές [σχήμα 76B), πηγαδάκια 7-9; Πεπτιδία p18 και p15, και σχήμα 77]

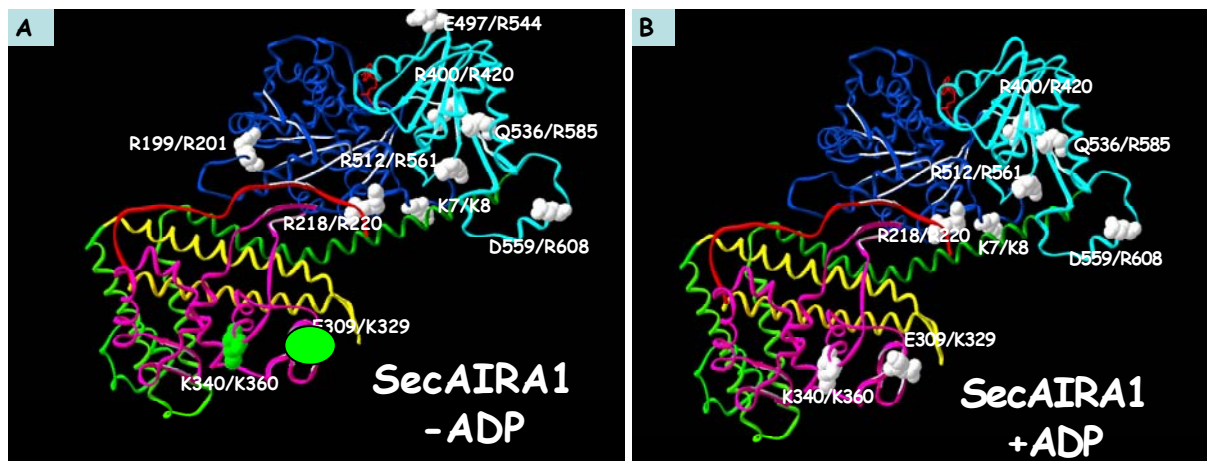
Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι SecAIRA1 μεταλλαγές, υφίστανται αλλαγή στην διαμόρφωση του DEAD κινητήρα μετά την δέσμευση ADP, [υφίστανται πρωτεόλυση στην K360 (SSD-περιοχή) και στην R585 (IRA2-περιοχή)], όπως η WTSecA, αλλά με μικρότερη αποτελεσματικότητα, καθώς πρωτεολύονται και στην R420 και στην R561, όπως και ο απελευθερωμένος από την C-περιοχή DEAD κινητήρας. Σημειώνουμε ότι παρουσία ADP η πρωτεόλυση των SecAIRA1 μεταλλαγών στην R220 (SSD-περιοχή) παραμένει, αλλά δεν είναι τόσο έντονη [σχήμα 76C), πηγαδάκια 7 και 8, και σχήμα 77], πιθανότατα λόγω της επίδρασης του ADP στην SSD-περιοχή παρουσία της C-περιοχής.



Σχήμα 76: Περιοριστική θρυψινόλυση των SecAIRA1 πρωτεϊνών. Στα A), C), και E), η πρωτεόλυση πραγματοποιείται στους 4°C ενώ στα B), D), και F) στους 37°C. Συγκεκριμένα η SecAWT και οι τρεις παραπάνω ενδεικτικές σημειακές IRA1 μεταλλαγές (0.3mg/ml) επωάζονται χωρίς (πηγαδάκια 1-5) ή με ADP (1mM; πηγιάκια 6-9), σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), για 5' στον πάγο. Η προστιθέμενη θρυψίνη [0.0025 mg/ml (4°C), ή 0.00025mg/ml (37°C)], σε τελικό όγκο 100μl, αδρανοποιείται μετά από 13.5' (4°C) ή 5' (37°C) με Pefabloc (9mM). Τα προκύπτοντα πολυπεπτίδια αναλύονται σε 17% SDS-PAGE με 6M ουρία (φορτώνονται 4μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε πηγιάκι), και ανιχνεύονται με αντισώματα για τις τρεις περιοχές του DEAD κινητήρα NBD, IRA2, και SSD (πάνω, μεσαία, και κάτω πάνελ αντίστοιχα). Η ταυτότητα των διαφόρων πεπτιδίων καθορίζεται με N-τελική αλληλούχιση (N-terminal sequencing), ενώ οι καρβοξυτελικές θέσεις πρωτεόλυσης προσδιορίζονται από τα προφανή μοριακά βάρη και την πρωτοταγή αλληλουχία. Τα ονόματα των πεπτιδίων προκύπτουν από τα μετρούμενα μοριακά τους βάρη με βάση το πρόγραμμα ProtParam tool. Σημειώνεται ότι για ορισμένα πεπτίδια, η ταυτότητα τους δεν προκύπτει από N-τελική αλληλούχιση, αλλά εικάζεται από τα προφανή μοριακά τους βάρη, την ανίχνευση τους με αντισώματα εναντί συγκεκριμένων περιοχών του N68, και από τις συγκρίσεις πρωτεόλυσης στους 4°C και στους 37°C. Συγκεκριμένα όσον αφορά την πρωτεόλυση στους 4°C τα παραπάνω ισχύουν για τα p22, και p16 πεπτίδια της SecAI789R (που περιλαμβάνουν τμήμα της IRA2-περιοχής). Από την άλλη όσον αφορά την πρωτεόλυση στους 37°C, τα παραπάνω ισχύουν για το πεπτίδιο p38 (που εμπεριέχει τμήματα από την NBD, IRA2, και την SSD-περιοχή), για τα πεπτίδια p24 και, p22 (που εμπεριέχουν τμήμα μόνο της IRA2-περιοχής), για τα p21 και p14 (που περιέχουν τμήμα της NBD και της SSD-περιοχής), για το p23 (που περιέχει τμήμα και της IRA2 και της SSD-περιοχής), και για το p22 πεπτίδιο της SecAI789R (που περιέχει τμήμα της περιοχής IRA2).

Επομένως απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει, ότι οι SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν ένα παρόμοιο προφίλ θρυψινόλυσης, μ' αυτό του DEAD κινητήρα, που



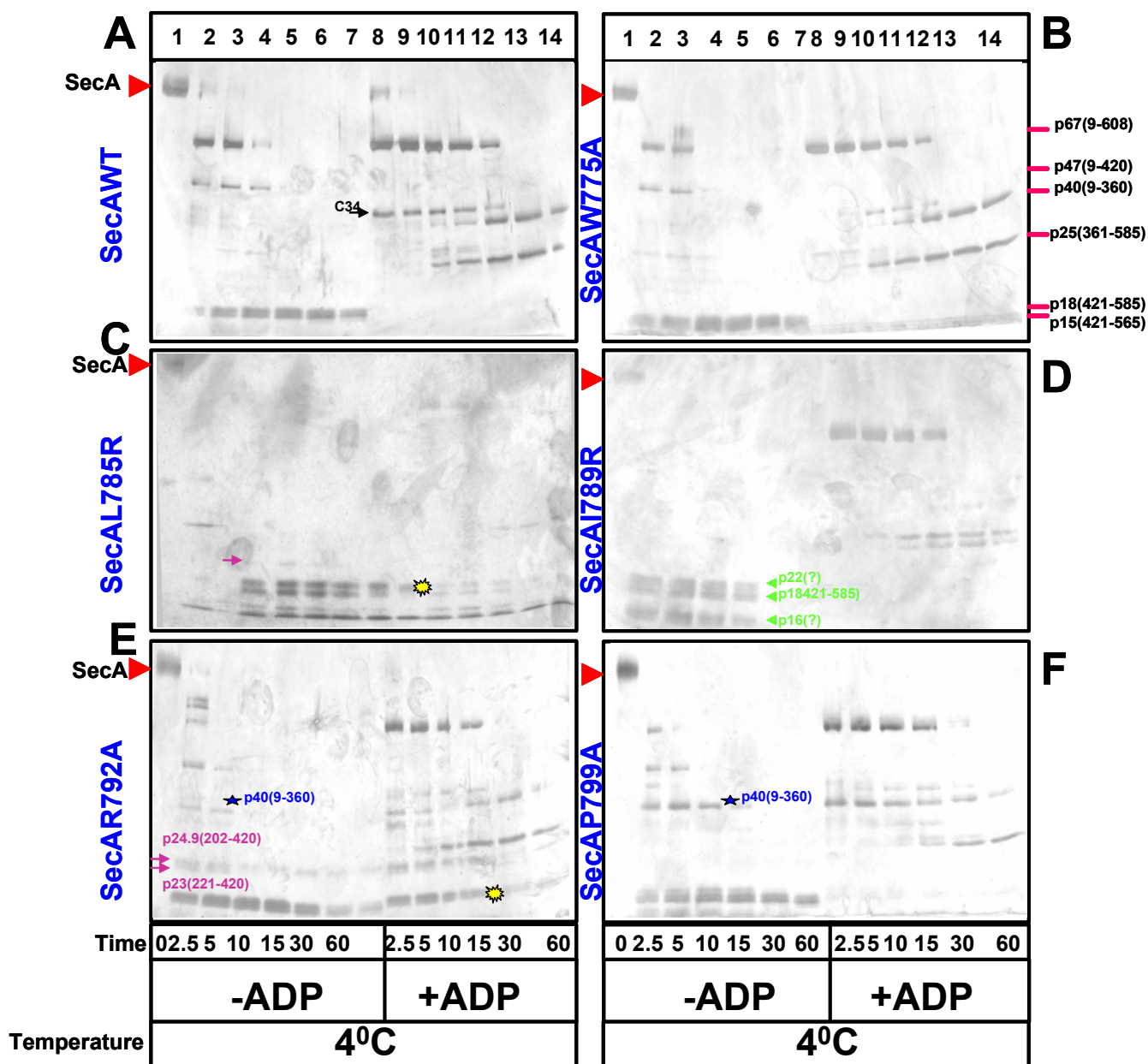


Σχήμα 77: Αναγραφή των θέσεων πρωτεόλυσης των SecAIRA1 πρωτεϊνών απουσία (A), και παρουσία ADP (B), με θρυψίνη (4°C), στην κρυσταλλογραφική δομή της *bsSecA*. Σημειώνεται ότι οι αργινίνες ή οι λυσίνες μετά τις οποίες πρωτεολύει η θρυψίνη, υποδηλώνονται με την μορφή άσπρων σφαιρών, ενώ πρώτα αναγράφεται το όνομα του αμινοξέος στην *bsSecA* (που μπορεί και να μην είναι αργινίνη ή λυσίνη), και στη συνέχεια στην *ecSecA*, κατ' αναλογία, όπου πραγματοποιείται και η πρωτεόλυση. Οι διάφορες περιοχές της *bsSecA* χρωματίζονται όπως έχει πραγματοποιηθεί στο σχήμα 4. Στο σχήμα A) με πράσινη σφαίρα σημειώνονται τα αμινοξέα στα οποία γίνεται πρωτεόλυση απουσία ADP, μόνο στην SecAI789R.

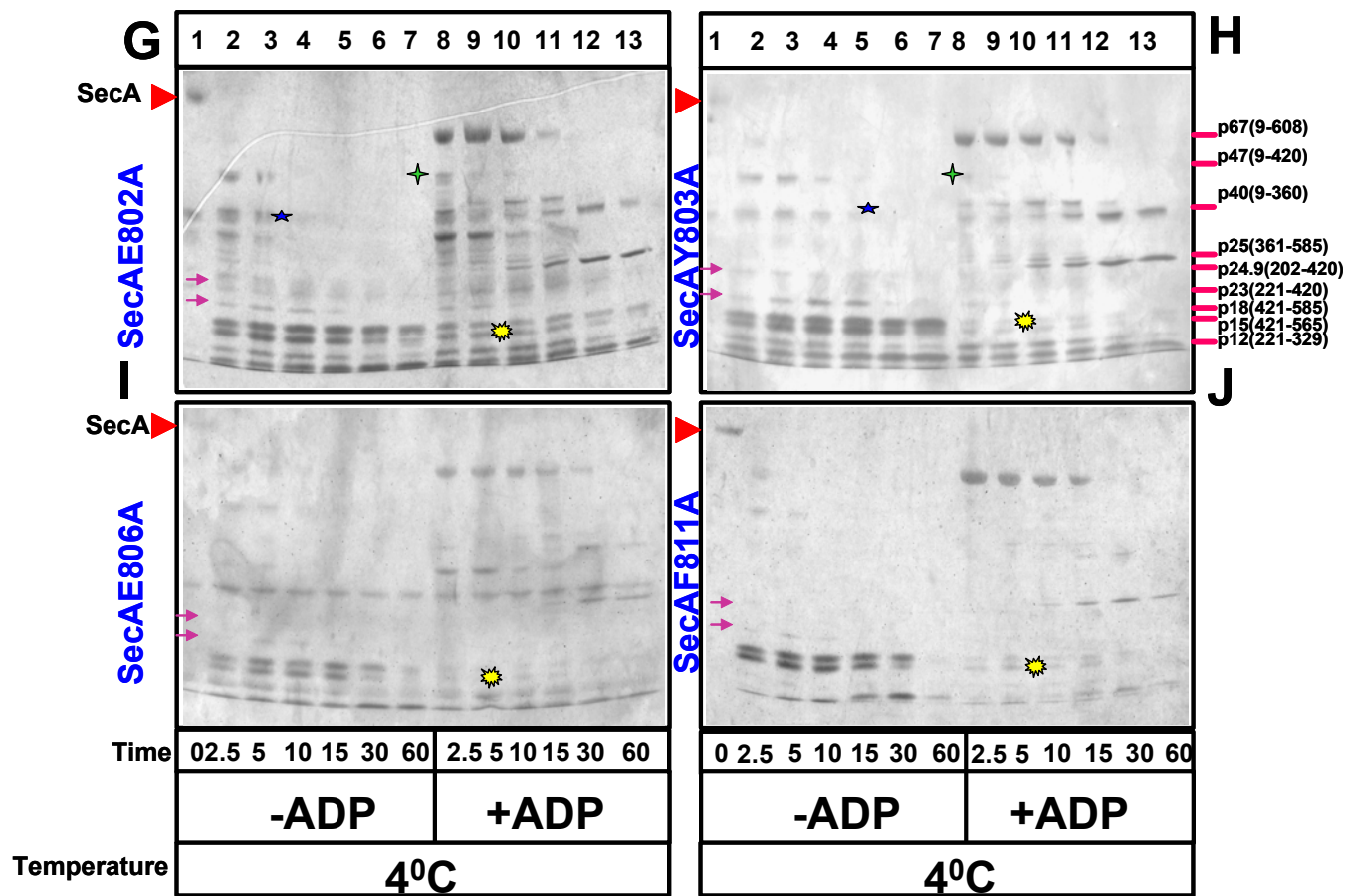
αναφέρθηκε στο προηγούμενο Κεφάλαιο [σχήμα 71 B), D), F)].

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα παραπάνω ισχύουν και για τις υπόλοιπες SecAIRA1 πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής πρωτεόλυσης για όλες αυτές τις πρωτεΐνες στα οποία όμως τα διάφορα πεπτιδία ανιχνεύονται με χρώση αργύρου (silver staining; Βλέπε υλικά και μέθοδοι) για συντόμηση της διαδικασίας (σχήμα 78 A-J). Συμπεραίνουμε ότι όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες παρουσιάζουν περισσότερο ή λιγότερο παρόμοιο πρωτεολυτικό προφίλ μ' αυτό του N68. Έτσι διαπιστώνεται σ' όλες τις περιπτώσεις αυξημένη ευαισθησία του DEAD κινητήρα απουσία ADP (σχήμα 78 B- J, πηγαδάκια 2-7), αλλά και μειωμένη σταθεροποίηση του, παρουσία ADP (σχήμα 78 B- J, πηγαδάκια 8-14), σε σχέση με την SecAWT (σχήμα 78A, πηγαδάκια 2-7 και 8-14). Από την άλλη μεριά, παρουσία ADP δεν πραγματοποιείται αποτελεσματικά η αλλαγή στη διαμόρφωση του DEAD κινητήρα (διακοπή πρωτεόλυσης στην R220 και R561, και έναρξη πρωτεόλυσης στην K360), όπως και στην περίπτωση του N68. Έτσι είτε παράγονται τα πεπτιδία p18 (αα421-585) και p15 (421-561), όπως συμβαίνει στις SecAL785R, SecAR792A, SecAE802A, SecAY803A, SecAE806A, και SecAF811A [Σχήματα 78 C), E), και G)-J), κίτρινο αστεράκι], είτε παράγεται και/ή το p47 πεπτιδίο (αα9-420) όπως συμβαίνει στις SecAE802A, και SecAY803A [Σχήματα 78 G) και H), πράσινο αστεράκι]. Αντίστοιχα, και απουσία ADP η διαμόρφωση του DEAD κινητήρα σε κάποιες SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν είναι σταθερή καθώς προκύπτει και το πεπτιδίο p40 (αα9-360), εκτός από το p47 (αα9-420), όπως συμβαίνει στις SecAR792A, SecAP799A, SecAE802A, και στην SecAY803A [Σχήματα 78E), F), G), και H), μπλε αστεράκι]. Τέλος παρατηρείται παραγωγή σε ορισμένες περιπτώσεις και των p24.9 (202-420) και p23 (αα221-420) SSD-πεπτιδίων που είναι χαρακτηριστικά της πρωτεόλυσης του DEAD κινητήρα απουσία της C-περιοχής, όπως συμβαίνει στις SecAL785R, SecAR792A, SecAE802A, και στην SecAY803A, SecAE806A, και SecAF811A [Σχήματα 78C), E), και G)-J, μοβ βέλη].

Απ' όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ο DEAD κινητήρας των SecAIRA1 μεταλλαγών παρουσιάζει διαφορετικό πρωτεολυτικό προφίλ σε σχέση με το προφίλ της WTSecA. Η IRA1 περιοχή προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση και των τριών υποπεριοχών του DEAD κινητήρα, NBD, IRA2 και SSD, όπως και ολόκληρη η C-περιοχή, αλλά και η πρόσδεση του ADP στην μεσόφαση των NBD-IRA2. Η πλαστικότητα κατά συνέπεια του DEAD κινητήρα ρυθμίζεται όχι μόνο από το δεσμευμένο σ' αυτόν ADP, αλλά και από τον δομικά παρακείμενο IRA1 διακόπτη *in trans*.



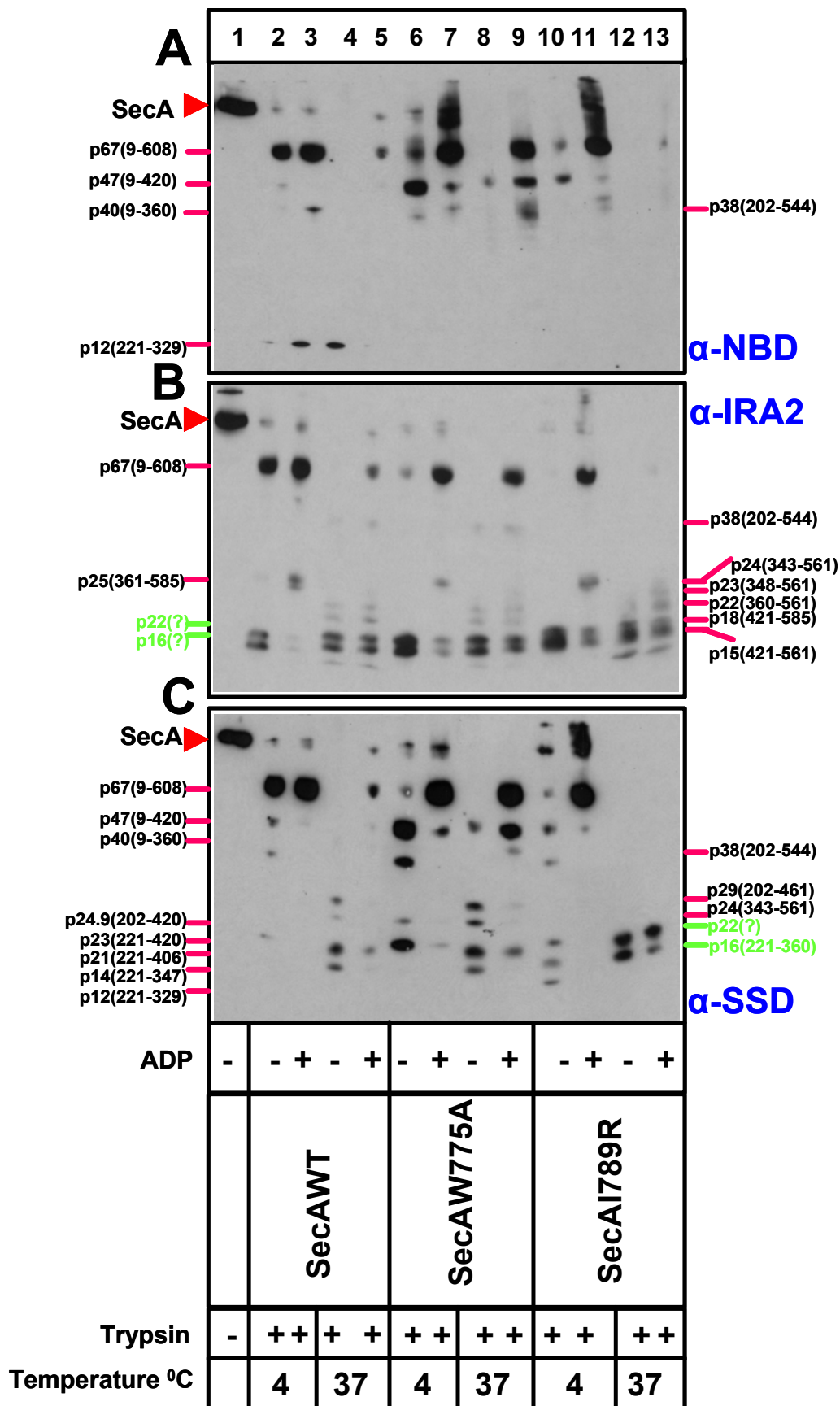
Σχήμα 78: Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και των υπολοίπων SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4°C. Συγκεκριμένα οι παραπάνω πρωτεΐνες (0.3mg/ml) επάωζονται χωρίς (πηγαδάκια 1-7) ή με ADP (1mM; Πηγαδάκια 8-14), σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl pH 8, 50mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT), για 5' στον πάγο. Η προστιθέμενη θρυψίνη (0.025 mg/ml), σε τελικό όγκο 100μl, αδρανοποιείται μετά από 2.5, 5, 10, 15, 30, και 60' στους 37°C, με Pefabloc (10mM; 4°C). Τα προκύπτοντα πολυπεπτιδία αναλύονται σε 17% SDS-PAGE με 6M ουρία (φορτώνονται 4μg συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε πηγαδάκι), και ανιχνεύονται με αντισώματα για τις τρεις περιοχές του DEAD κινητήρα NBD, IRA2, και SSD (πάνω, μεσαία, και κάτω πάνελ αντίστοιχα). Η ταυτότητα των διαφόρων πεπτιδίων καθορίζεται είτε με N-τελική αλληλούχιση (N-terminal sequencing), ενώ οι καρβοξυτελικές θέσεις πρωτεόλυσης προσδιορίζονται από τα προφανή μοριακά βάρη και την πρωτοταγή αλληλουχία. Τα ονόματα των πεπτιδίων προκύπτουν από τα μετρούμενα μοριακά τους βάρη με βάση το πρόγραμμα ProtParam tool. Σημειώνεται ότι η ταυτότητα των παραγόμενων πεπτιδίων αναγράφεται μόνο για το B και H διάγραμμα, ενώ είναι ανάλογη και για τα υπόλοιπα διαγράμματα. Για την SecAI789R τα πεπτιδία r22 και r16 είναι γνωστό μόνο ότι περιέχουν τμήμα της IRA2-περιοχής. Με κίτρινο αστεράκι σημειώνονται τα r18 και r15 πεπτιδία που εντοπίζονται και παρουσία ADP σε ορισμένες SecAIRA1 πρωτεΐνες. Με μπλε αστεράκι σημειώνεται το r40 πεπτιδίο που εντοπίζεται και απουσία ADP σε ορισμένες SecAIRA1 πρωτεΐνες. Με μοβ βέλη σημειώνονται τα r24.9 και r23 πεπτιδία που φυσιολογικά απαντώνται μόνο κατά την πρωτεόλυση του N68. Τέλος με πράσινο αστεράκι σημειώνεται το r47 πεπτιδίο που απαντάται και παρουσία ADP σε ορισμένες SecAIRA1 πρωτεΐνες.

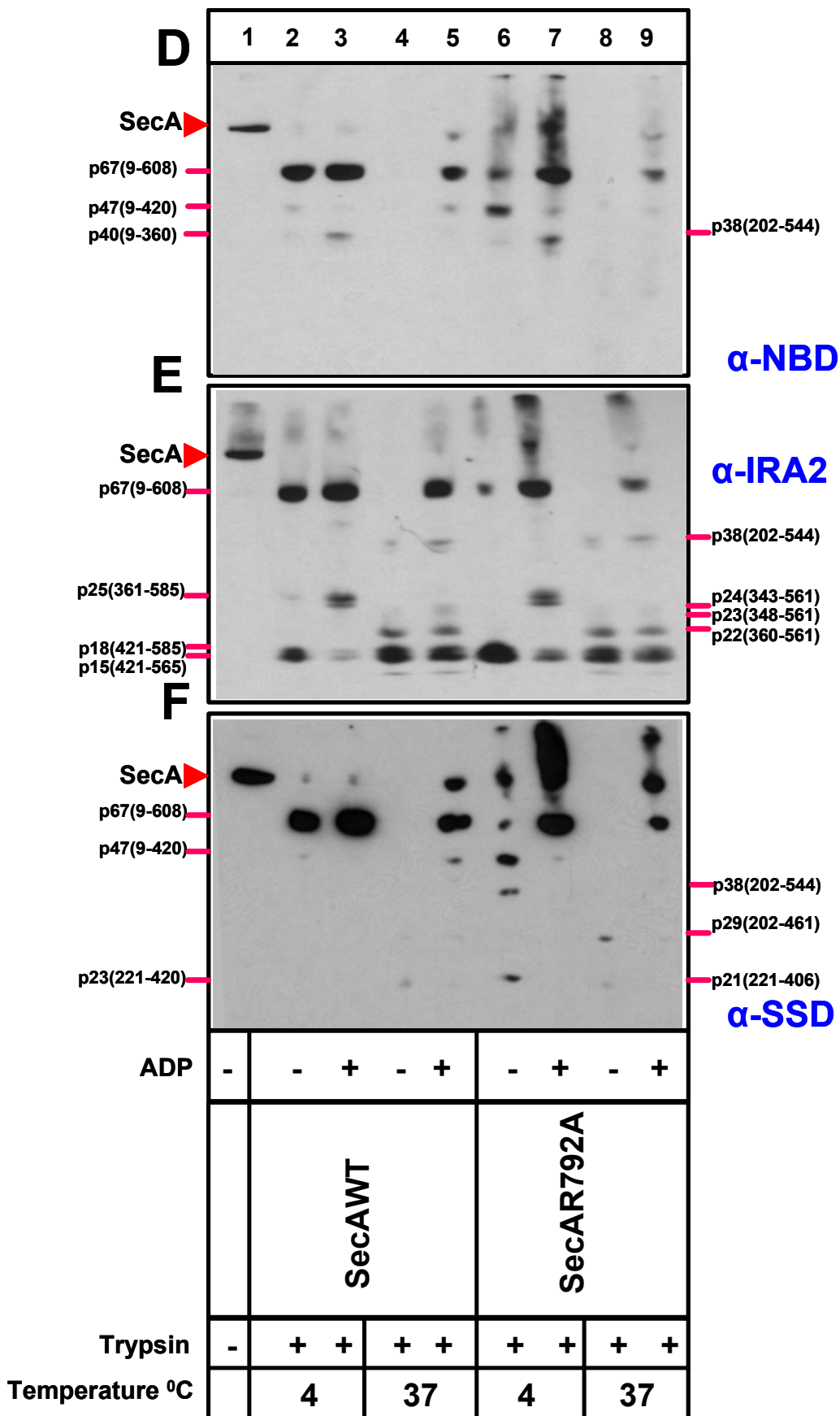


### **3.3.Δ. Οι SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν υφίστανται την ενδόθερμη μετάπτωση της SecAWT κατά την μετάβαση από τους 4<sup>0</sup>C στους 37<sup>0</sup>C.**

Επιτελώντας πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης όπως στα σχήματα 76 A), B), και C), για τις διάφορες SecAIRA1 πρωτεΐνες, αλλά τώρα στους 37<sup>0</sup>C [σχήμα 76 D), E), και F) και σχήμα 79, όπου στο ίδιο πήκτωμα φορτώνονται τα προϊόντα πρωτεόλυσης των SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4 και στους 37<sup>0</sup>C), διαπιστώθηκε ότι το πρωτεολυτικό προφίλ τους είναι ίδιο με της SecAWT και του N68 στους 37<sup>0</sup>C. Επειδή όμως το πρωτεολυτικό προφίλ των SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4<sup>0</sup>C είναι παρόμοιο με προφίλ του N68 επίσης στους 4<sup>0</sup>C, και το τελευταίο όπως αναφέρθηκε προηγουμένως είναι το χαρακτηριστικό προφίλ της διαμόρφωσης της SecAWT κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της (απλά στους 37<sup>0</sup>C πραγματοποιείται περισσότερη πρωτεόλυση σ' όλες τις υποπεριοχές του DEAD κινητήρα), συμπεραίνουμε ότι οι SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν υφίστανται ουσιαστική αλλαγή στη διαμόρφωση τους κατά την παραπάνω μετάπτωση (όπως είδαμε και για το N68). Φαίνεται ότι η αλλαγή στη διαμόρφωση του DEAD κινητήρα στους 37<sup>0</sup>C, που συντελείται μέσω της C-περιοχής (αφού παρατηρείται παρόμοιο προφίλ του N68 στους 4<sup>0</sup>C και στους 37<sup>0</sup>C) είναι ατύχηστη στις SecAIRA1 μεταλλαγές. Αυτές όπως και το N68 (όπου απουσιάζει η C-περιοχή), μοιάζουν να έχουν μία ενισχυμένη προδιάθεση της διαμόρφωσης της ενδόθερμης μετάπτωσης τους ήδη από τους 4<sup>0</sup>C.

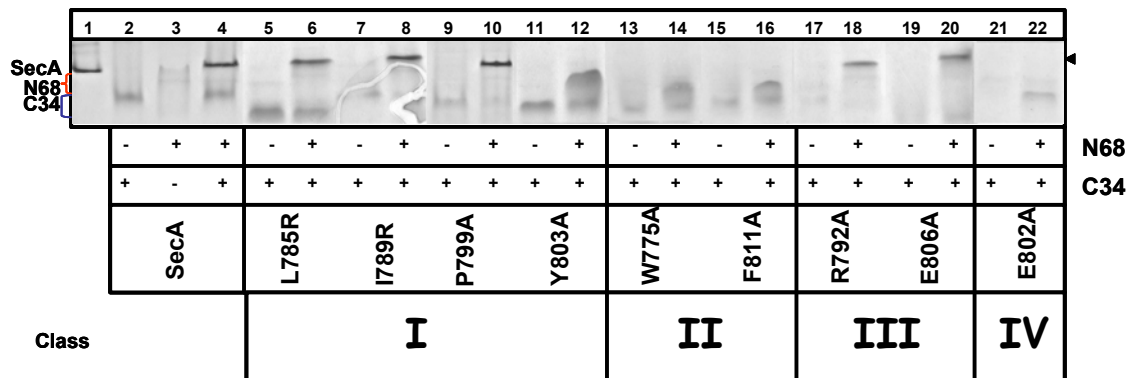
Σχήμα 79: Περιοριστική θρυψινόλυση της SecAWT και τριών αντιπροσωπευτικών SecAIRA1 πρωτεϊνών στους 4<sup>0</sup> και στους 37<sup>0</sup>C. Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται όπως φαίνεται στο προηγούμενο σχήμα, με την διαφορά ότι τώρα τα δείγματα των 4<sup>0</sup> και των 37<sup>0</sup> φορτώνονται στο ίδιο αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (17% SDS-PAGE και 6M ουρία). Στα πάνελ A), B), και C) απεικονίζεται η πρωτεόλυση των SecAWT, SecAW775A, και SecA1789R, ενώ στα D), E), και F) η πρωτεόλυση των SecAWT SEcAR792A.





### 3.3.E. Φυσική βάση της διαμόρφωσης και της λειτουργίας του DEAD κινητήρα από τον IRA1 διακόπτη.

Το ερώτημα που προκύπτει τώρα είναι πως η IRA1 περιοχή ασκεί την παραπάνω δομική και λειτουργική δραματική επίδραση στον DEAD κινητήρα *in trans*, χωρίς να αποτελεί δομικό του στοιχείο. Εξετάστηκε καταρχήν αν η αλληλεπίδραση της C-περιοχής με τον DEAD κινητήρα η οποία υφίσταται στην περίπτωση της WTSecA (Karamanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή), διαταράσσεται στην περίπτωση των SecAIRA1 μεταλλαγών, κάτι που θα μπορούσε να ερμηνεύσει την αλλαγή της διαμόρφωσης και της λειτουργίας του DEAD κινητήρα, από την IRA1 υποπεριοχή της C-περιοχής. Γι' αυτό το σκοπό οι παραπάνω μεταλλαγές εισήχθησαν στο γονίδιο του c34 που κωδικοποιεί για έξι ιστιδίνες στο αμινοτελικό άκρο της C34 πρωτεΐνης (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Εν συνεχεία ελέγχθηκε η ικανότητα των διάφορων καθαρισμένων C34 τμημάτων (αα 610-901) των SecAIRA1 μεταλλαγών (βλέπε υλικά και μέθοδοι) να δεσμεύουν N68, από την ανασύσταση ολόκληρης SecA από τα

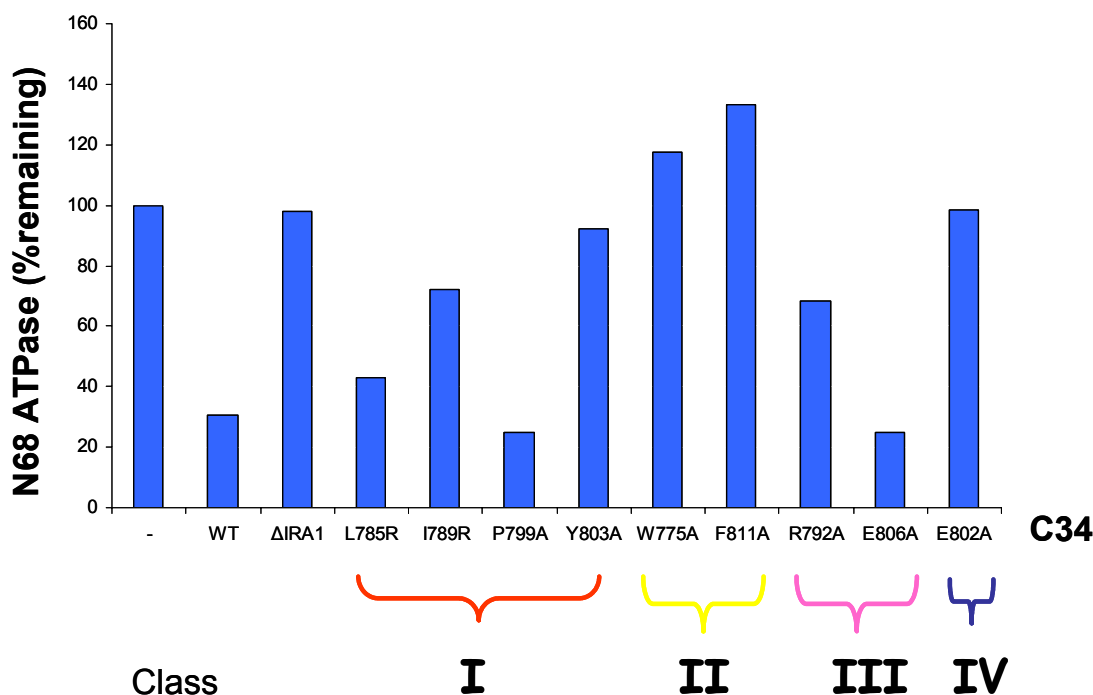


παραπάνω αυτά πεπτιδία σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (NATIVE-PAGE; βλέπε υλικά

Σχήμα 80: Ανασύσταση διμερούς SecA από καθαρισμένα N68 και C34IRA1 πεπτιδία. Συγκεκριμένα το N68 (0.003mg) αναμειγνύεται σε αναλογία 1:12 με C34WT ή με τα διάφορα C34IRA1 πεπτιδία (0.009mg) σε διάλυμα B (50mM Tris-Cl, 50mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και 2mM DTT) σε αντιδράσεις 20μl, και ακολουθεί επώαση για 5' στους 4°C. Τα αναμειγμένα πολυπεπτιδία αναλύονται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% (Native PAGE), και χρωματίζονται με coomassie Blue όπως περιγράφεται από τους Karamanou et al., 1999. Το μαύρο βέλος υποδεικνύει το ανασυστάμενο σύμπλοκο του N68 με το C34WT (πηγαδάκι 4) ή με ορισμένα από τα C34IRA1 πεπτιδία (πηγαδάκια 6, 8, 10, 18, και 20)

και μέθοδοι; σχήμα 80). Έτσι πετυχημένες και σταθερές συνδέσεις του DEAD κινητήρα με το C34WT ή τα C34IRA1 πεπτιδία, έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καινούργιου ηλεκτροφορητικού είδους, που μετακινείται πιο αργά από ότι μόνα τους τα πεπτιδία N68 και C34, και εντοπίζεται σε τοποθεσία παρόμοια μ' αυτήν της διμερούς SecA (σχήμα 80, πηγαδάκι 4, για την WTSecA, και μαρκάρισμα με μαύρο βέλος). Σημειώνεται ότι το πολυπεπτιδίο C34E802A, πρωτεολύεται κατά την διάρκεια της παρασκευής του, στην K643 (SD-περιοχή; πραγματοποιήθηκε αμινοτελική αμινοξική αλληλούχιση του προκύπτοντος πεπτιδίου; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Έτσι ενώ φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον DEAD κινητήρα (N68), αφού προκύπτει ένα καινούργιο ηλεκτροφορητικό είδος μετά την ανάμιξη των N68 και p30 (αα 644-901) πεπτιδίων, αυτό δεν τρέχει στο ύψος της ανασυστάμενης διμερούς SecA, αλλά σε χαμηλότερο (σχήμα 80, πηγαδάκι 22). Όσον αφορά τώρα τις SecAIRA1 μεταλλαγές τάξης II (SecAW775A και SecAF811A), αλλά και την τάξης I μεταλλαγή, SecAY803A (που παρουσιάζει, όπως και οι μεταλλαγές τάξης II, αλληλεπίδραση με την SD-περιοχή; Κεφάλαιο III), φαίνεται ότι αποτυγχάνουν στον σχηματισμό σταθερών μορφών ανασυστάμενης SecA. Σχηματίζεται μάλλον μία ευρεία ζώνη (σχήμα 80, πηγαδάκια 14, 16, και 12 αντίστοιχα), η οποία τρέχει γρηγορότερα από την ανασυστάμενη διμερή SecA (σχήμα 80, πηγαδάκι 4, σκούρο βέλος), υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των N68 και C34 περιοχών των παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγών, είναι ασθενής. Η ευρεία αυτή ζώνη πολύ πιθανά αντιπροσωπεύει μία συλλογή ενδιάμεσων συμπλόκων. Όλα τα υπόλοιπα C34IRA1 πεπτιδία σχηματίζουν ανασυστάμενη SecA με N68 (σχήμα 80, πηγαδάκια 6, 8, 10, 18, και 20), αλλά η ένταση της δέσμευσης παρουσιάζεται μειωμένη κατά 10-40% σε μερικές περιπτώσεις, σε σχέση με την δέσμευση στην SecAWT (σχήμα 80, πηγαδάκι 4). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ του DEAD κινητήρα και της C-περιοχής, και σ' αυτές τις IRA1 μεταλλαγές είναι διαταραγμένη.

Προκειμένου να εξεταστεί αν η παραπάνω διαταραγμένη αλληλεπίδραση μεταξύ των C34IRA1 παραγώγων και του N68 οδηγεί και σε αλλαγμένη λειτουργικότητα του DEAD κινητήρα, και άρα αποτελεί τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιείται η ρύθμιση της δραστηριότητας του DEAD κινητήρα από τον IRA1 διακόπτη, ποσοτικοποιήθηκε η καταστολή της ATPάσης του N68 μετά την προσθήκη των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων (σχήμα 81; Karamanou et al., 1999; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Οι Karamanou et al., 1999 έδειξαν ότι όταν το C34WT πεππίδιο δεσμεύσει N68 και ανασυσταθεί η διμερής SecAWT, καταστέλλεται η



Σχήμα 81: Καταστολή της ATPάσης της N-περιοχής από τα C34IRA1 πεπτιδία. Συγκεκριμένα τα διάφορα C34IRA1 πεπτιδία (0.006mg) προστίθενται σε 50 μl αντιδράσεις που περιέχουν N68 (0.001mg) σε αναλογία 12:1 αντίστοιχα (βλέπε υλικά και μέθοδοι), και επωάζονται όπως περιγράφεται από τους Karamanou et al., 1999. Εν συνεχεία προσδιορίζεται η Βασική ATPάση κάθε αντίδρασης (Lill et al., 1990). Σε κάθε περίπτωση αφαιρείται ο θόρυβος από το εκάστοτε C34 πεππίδιο.

υψηλή δραστηριότητα ATPάσης του DEAD κινητήρα (σχήμα 32), κάτι που δεν συμβαίνει στην περίπτωση του C34ΔIRA1 (σχήμα 81). Όσον αφορά τώρα όλα τα C34IRA1 μεταλλαγμένα πεπτιδία, αυτά είτε δεν καταστέλλουν την DEAD ATPάση (SecAW775A, SecAF811A, και SecAY803A), είτε την καταστέλλουν, αλλά με μικρότερη απόδοση (SecAI789R, SecAR792A, και SecAL785R), είτε με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (SecAE806A, και SecAP799A) απ' ότι η SecAWT (σχήμα 81). Επειδή όπως διαπιστώνεται στο παραπάνω πείραμα το πρωτεολυμένο πεππίδιο C34E802A, δεν καταστέλλει την δραστηριότητα ATPάσης του DEAD κινητήρα (σχήμα 81, στήλη 12), ενώ φαίνεται ότι αλληλεπιδρά με αυτόν (σχήμα 80, πηγαδάκι 22), το τμήμα 610-643 της C-περιοχής που λείπει από το παράγωγο C34E802A, πρέπει να ευθύνεται γι' αυτή την καταστολή. Το τμήμα όμως αυτό αλληλεπιδρά με την IRA2 περιοχή του DEAD κινητήρα (Κεφάλαιο III), η οποία και ρυθμίζει την υδρόλυση του.

Κατά συνέπεια οι διάφορες SecAIRA1 μεταλλαγές διαταράσσουν σε μεγαλύτερο, ή μικρότερο βαθμό την επικοινωνία της C-περιοχής (δομική και λειτουργική) με τον DEAD κινητήρα, και πιθανότατα έτσι η IRA1-περιοχή ρυθμίζει την διαμόρφωση και την λειτουργία του DEAD κινητήρα.



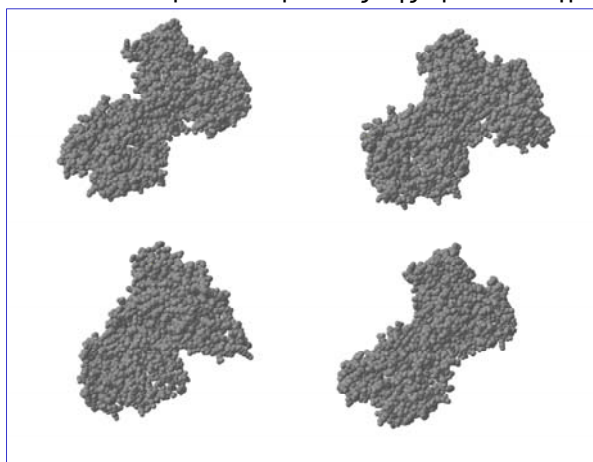
### 3.3.Z. Διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών και υποπεριοχών της SecA.

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την επίδραση των SecAIRA1 μεταλλαγών στην επικοινωνία μεταξύ των διάφορων περιοχών της SecA, μελετήσαμε λεπτομερέστερα τα διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών και υποπεριοχών καταρχήν στην SecAWT.

### 3.3.H.I. C-περιοχή της SecA επικοινωνεί με τις NBD, και IRA2-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα.

Τόσο από την δομή της *bsSecA* (Hunt et al., 2002; Εισαγωγή σχήμα 34, και Κεφάλαιο I των αποτελεσμάτων σχήμα 56), την δομή της *ecSecA* (Sharma et al., 2003; Εισαγωγή σχήμα 38, και Κεφάλαιο I των αποτελεσμάτων σχήμα 56), αλλά και σύμφωνα με πιο εμπειριστατωμένες μελέτες των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών της SecA, που θ' αναφερθούν στο Κεφάλαιο III των αποτελεσμάτων, αναμένεται ότι η C-περιοχή της SecA αλληλεπιδρά (μέσω της SD-υποπεριοχής της), τόσο με την NBD-, όσο και με την IRA2-περιοχή (δημιουργούνται αρκετοί δεσμοί άλατος; Κεφάλαιο III των αποτελεσμάτων). Από την άλλη μεριά δεν αναμένεται ισχυρή και σταθερή αλληλεπίδραση της C-περιοχής με την SSD-περιοχή, καθώς οι αλληλεπιδράσεις των διάφορων υποπεριοχών της C-περιοχής με την SSD-περιοχή [η C-περιοχή επικοινωνεί με την SSD-περιοχή μέσω της IRA1-υποπεριοχής της, μέσω της SD-υποπεριοχής (λίγες αλληλεπιδράσεις τόσο στην *bs* όσο και στην *mtSecA*), μέσω της WD-υποπεριοχής (μόνο όμως στην *bsSecA*), και μέσω της CT-υποπεριοχής; Κεφάλαιο III] δεν πραγματοποιούνται από πληθώρα αμινοξέων, ενώ η SSD-περιοχή χαρακτηρίζεται επιπλέον και από μεγάλη κινητικότητα (υψηλοί B παράγοντες; βλέπε Εισαγωγή), και είναι γεμάτη κοιλότητες (σχήμα 82).

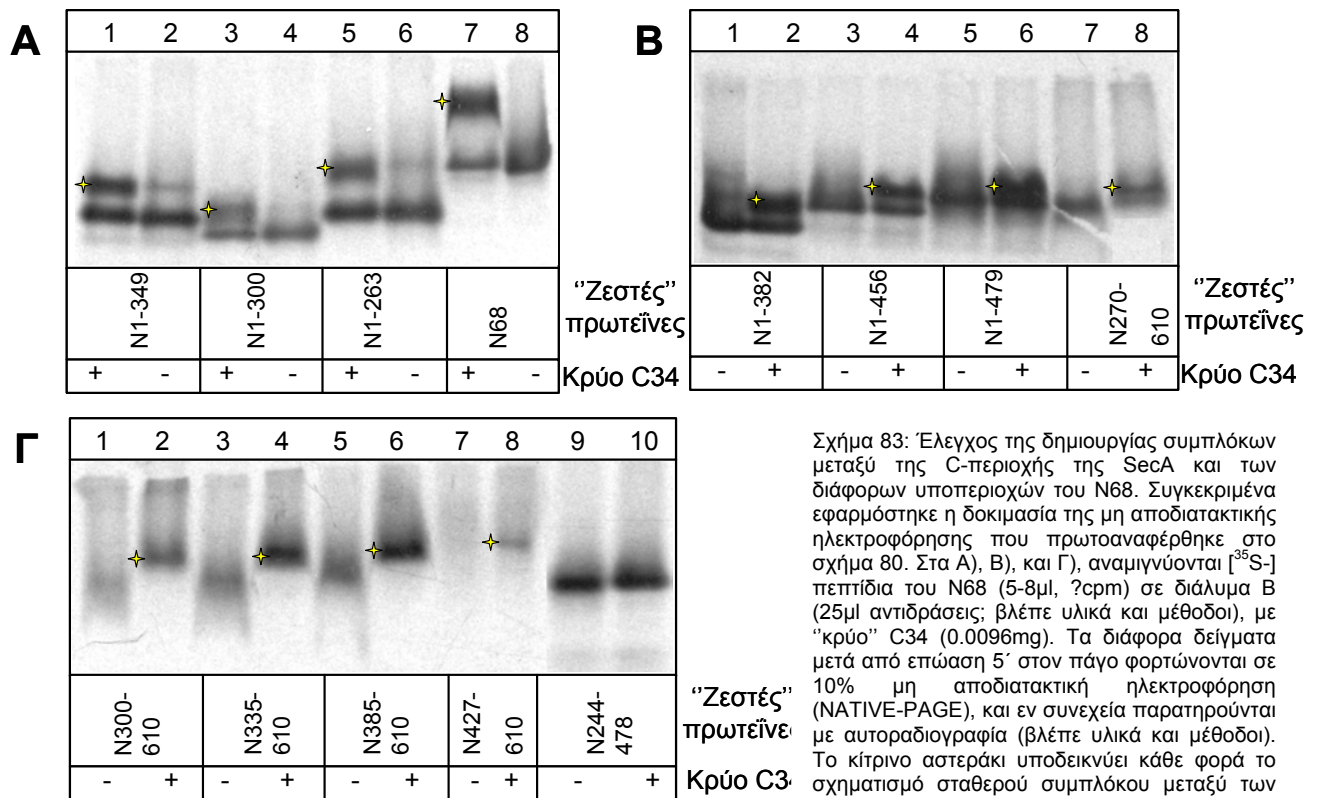
Οι παραπάνω μελέτες της κρυσταλλογραφικής δομής της SecA, υποστηρίζονται και



Σχήμα 82: Αναπαράσταση της κρυσταλλογραφικής δομής της *bsSecA* με την μορφή σφαιρών. Στην SSD-περιοχή διακρίνονται με κόκκινα βέλη οι κοιλότητες που την χαρακτηρίζουν

με βιοχημικά πειράματα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ραδιοσημασμένα πεπτιδία του N68 που περιέχουν την NBD (<sup>35</sup>SN1-263, <sup>35</sup>SN1-300, <sup>35</sup>SN1-349, <sup>35</sup>SN1-382, <sup>35</sup>SN1-456, και <sup>35</sup>SN1-479), την SSD (<sup>35</sup>SN244-478), ή την IRA2-περιοχή του (<sup>35</sup>SN270-610, <sup>35</sup>SN300-610, <sup>35</sup>SN355-610, <sup>35</sup>S385-610, και <sup>35</sup>SN427-610), τα οποία αναμίχθηκαν με περίσσεια "κρύου" C34, όπως αναφέρεται στα υλικά και μέθοδοι. Η δημιουργία ή όχι σταθερών συμπλόκων μεταξύ των διαφόρων παραγώγων του N68 και του C34 αναλύθηκε με την δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που αναφέρθηκε και προηγουμένως (σχήμα 83 A, B, και Γ). Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε δημιουργία σταθερού συμπλόκου μεταξύ της NBD-περιοχής και του C34 (σχήμα 83A, πηγαδάκια 1 με 2, 3 με 4, και 5 με 6, αλλά και σχήμα 83B, πηγαδάκια 1 με 2, 3 με 4, και 5 με 6; Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο

σημειώνεται κάθε φορά με κίτρινο αστεράκι), όπως και μεταξύ της IRA2-περιοχής και του C34 (σχήμα 83B, πηγαδάκια 7, και 8, και σχήμα 83Γ, πηγαδάκια 1 με 2, 3 με 4, 5 με 6, και 7 με 8; Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο σημειώνεται κάθε φορά με κίτρινο αστεράκι), αλλά όχι μεταξύ της SSD-περιοχής και του C34 (σχήμα 83Γ, πηγαδάκια 9, και 10; Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο σημειώνεται κάθε φορά με κίτρινο αστεράκι).

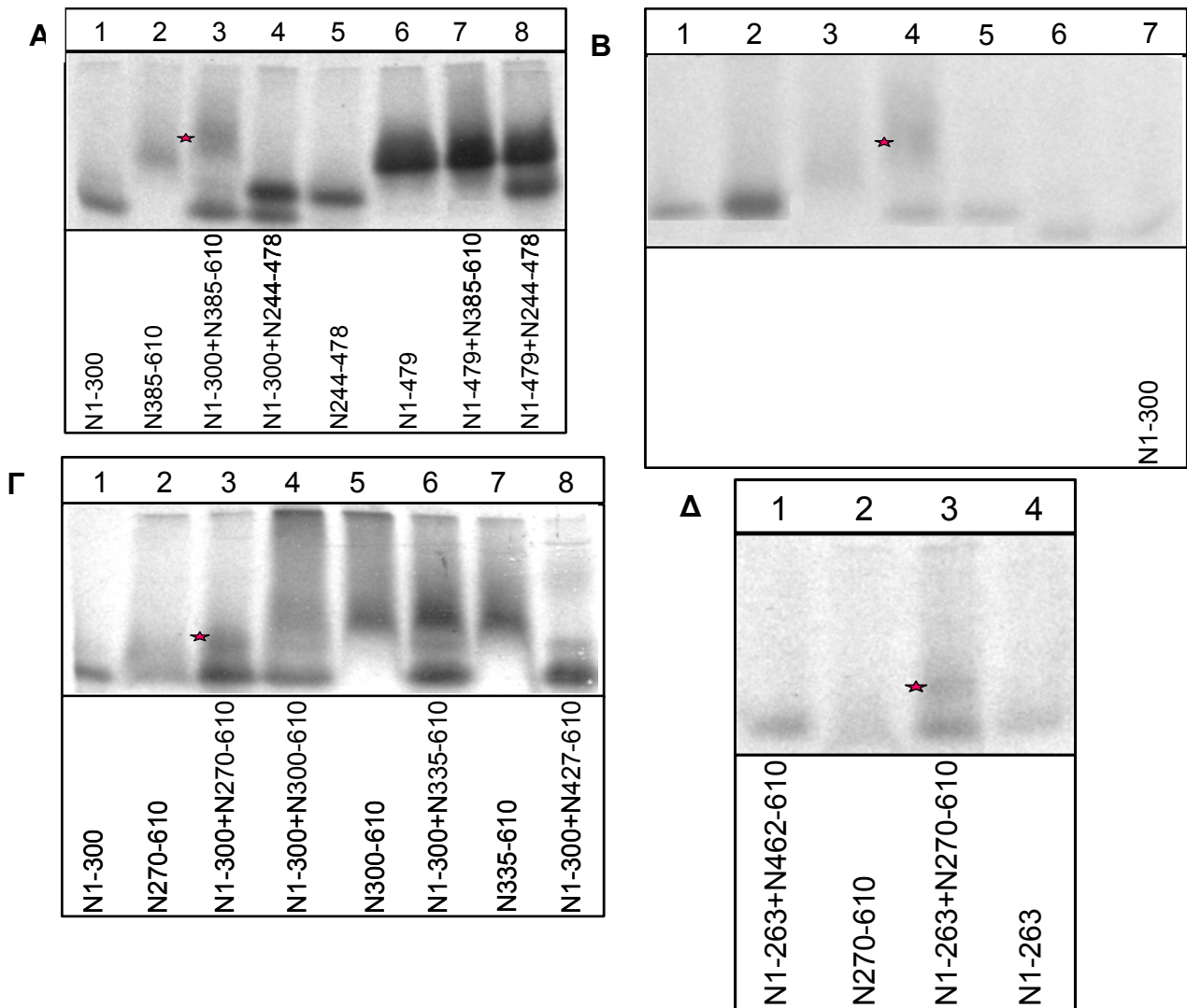


Σχήμα 83: Έλεγχος της δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ της C-περιοχής της SecA και των διάφορων υποπεριοχών του N68. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που πρωτοαναφέρθηκε στο σχήμα 80. Στα A), B), και Γ), αναμιγνύονται [<sup>35</sup>S-] πεπτιδία του N68 (5-8μl, ?cpm) σε διάλυμα B (25μl αντιδράσεις; βλέπε υλικά και μέθοδοι), με “κρύο” C34 (0.0096mg). Τα διάφορα δείγματα μετά από επώαση 5’ στον πάγο φορτώνονται σε 10% μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (NATIVE-PAGE), και εν συνεχεία παρατηρούνται με αυτοραδιογραφία (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Το κίτρινο αστεράκι υποδεικνύει κάθε φορά το σχηματισμό σταθερού συμπλόκου μεταξύ των διάφορων πεπτιδίων του N68 και του C34.

### 3.3.H.II. Οι NBD και IRA2-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα επικοινωνούν μεταξύ τους.

Τόσο από την δομή της *bsSecA* (Hunt et al., 2002; Εισαγωγή σχήμα 34 και σχήμα 56, όσο και από την δομή της *mtSecA* (Sharma et al., 2003; Εισαγωγή σχήμα 38, και πρώτο Κεφάλαιο αποτελεσμάτων σχήμα 56), είναι προφανής η αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών NBD-IRA2 της SecA, όπως και η απουσία επικοινωνίας μεταξύ αυτών και της SSD-περιοχής του DEAD κινητήρα. Πληθώρα βιοχημικών πειραμάτων στο εργαστήριο αποδεικνύουν του λόγου το αληθές. Συγκεκριμένα η Λίλη Καραμάνου έδειξε ότι το τμήμα N1-300 του N68 (που περιλαμβάνει την NBD-περιοχή) σχηματίζει σταθερό σύμπλοκο με το πεπτιδίο N385-610 (που περιέχει την IRA2-περιοχή). Προς τούτο εφάρμοσε την δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που αναφέρθηκε και προηγουμένως, χρησιμοποιώντας τις παραπάνω πρωτεΐνες, αμέσως μετά από την αποδιάταξη τους με ουρία (επειδή τα διάφορα πεπτιδία του N68 σχηματίζουν ολιγομερή), και την άμεση από κοινού επαναδιάταξη τους κατά την διάρκεια της διαδικασίας διαπίδυσης. Σχηματισμός συμπλόκου όμως διαπιστώθηκε και μεταξύ των πεπτιδίων N1-479 και N385-610. Μεγαλύτερα πεπτιδία παρουσιάζονται προβληματικά για τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ NBD-IRA2, πιθανά λόγω των ευρύτερων περιοχών πέρα των βασικών τμημάτων NBD και IRA2. Δεν παρατηρήθηκε καμία αλληλεπίδραση πάντως μεταξύ των παραπάνω πεπτιδίων που περιέχουν τις NBD και IRA2-περιοχές και του πεπτιδίου N244-478 που περιέχει την SSD-περιοχή, κάτι που επιβεβαιώνεται και από τις κρυσταλλογραφικές απεικονίσεις της SecA, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα με την χρήση όμως [<sup>35</sup>S-] ραδιοσημασμένων πεπτιδίων του N68, που λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης τους δεν ευνοούν τον σχηματισμό ολιγομερών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πεπτιδία N1-263, N1-300, N244-478, N270-610, N335-610, και N385-610 σε διάφορους συνδυασμούς (σχήμα 84A, B, Γ, και Δ). Τα πειράματα έδειξαν δημιουργία σταθερού συμπλόκου μεταξύ του N1-263 που περιλαμβάνει την NBD-περιοχή και των N270-610 και N385-610-περιοχών που περιέχουν την IRA2-περιοχή (σχήμα

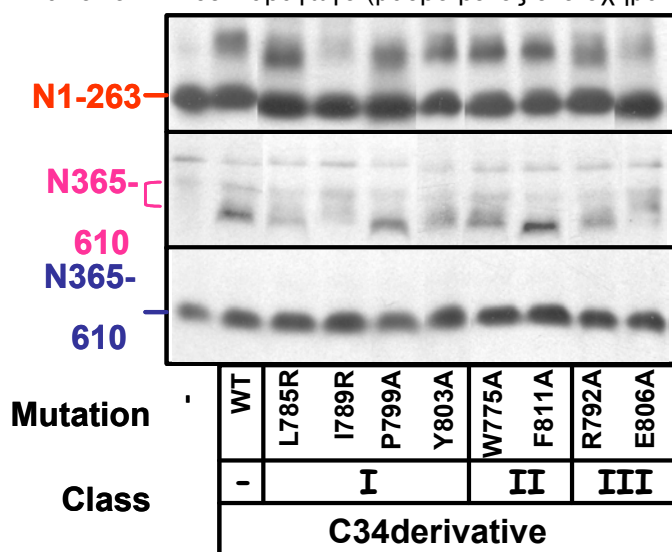


Σχήμα 84: Ανασύσταση της περιοχής του DEAD κινητήρα από ποικιλία αμινοτελικών πεπτιδίων του, με την δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης που πρωτοαναφέρθηκε στο σχήμα 32. Συγκεκριμένα στα Α), Β), Γ), και Δ) αναμιγνύονται [<sup>35</sup>S-] αμινοτελικά πεπτίδια σε διάλυμα Β (25μl αντιδράσεις; βλέπε υλικά και μέθοδοι), σε διάφορους συνδυασμούς. Τα διάφορα δείγματα μετά από επώαση 5' στον πάγο φορτώνονται σε 10% μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (NATIVE-PAGE), και εν συνεχεία παρατηρούνται με αυτοραδιογραφία (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Το ροζ αστεράκι υποδεικνύει κάθε φορά το σχηματισμό σταθερού συμπλόκου μεταξύ των διάφορων πεπτιδίων του N68.

84Δ, πηγαδάκι 3, όπου το δημιουργούμενο σύμπλοκο σημειώνεται με ροζ αστεράκι, και σχήμα 84B, πηγαδάκι 4, όπου πάλι το δημιουργούμενο σύμπλοκο σημειώνεται με ροζ αστεράκι αντίστοιχα). Επίσης πραγματοποιήθηκε ανασύσταση της περιοχής του DEAD κινητήρα μετά από ανάμιξη των πεπτιδίων N1-300, που περιλαμβάνει την NBD-περιοχή και των N270-610 και N385-610-περιοχών πάλι που περιέχουν την IRA2-περιοχή (σχήμα 84Γ, πηγαδάκι 3, το δημιουργούμενο σύμπλοκο σημειώνεται με ροζ αστεράκι, και σχήμα 84A, πηγαδάκι 3, όπου πάλι το δημιουργούμενο σύμπλοκο σημειώνεται με ροζ αστεράκι αντίστοιχα). Αντίστοιχα δεν παρατηρείται αλληλεπίδραση μεταξύ των N1-263 και N244-478-περιοχών (σχήμα 84B, πηγαδάκι 2).

### 3.3.Θ. Οι SecAIRA1 μεταλλαγές διαταράσσουν την επικοινωνία της C-περιοχής με τις NBD και IRA2 υπομονάδες του DEAD κινητήρα.

Επειδή είναι γνωστό ότι η C-περιοχή της SecA αλληλεπιδρά και με την NBD και με την IRA2 περιοχή του DEAD κινητήρα (Κεφάλαιο II VI; Sianidis et al., 2001; Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003), εξετάστηκε αν η διαταραγμένη επικοινωνία της C-περιοχής των SecAIRA1 πρωτεϊνών με τον DEAD κινητήρα, οφείλεται ειδικότερα, στην διαταραχή της επικοινωνίας της με την NBD ή με την IRA2 περιοχή, ή και με τις δύο. Προς τούτο ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων με τα τμήματα N1-263, που εμπεριέχει την NBD-περιοχή (Sianidis et al., 2001), και με το N365-610, που εμπεριέχει την IRA2-περιοχή (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Το C34E802A παράγωγο επειδή είναι πρωτεολυμένο, δεν χρησιμοποιείται στο συγκεκριμένο πείραμα. Συγκεκριμένα τα παράγωγα N1-263 (σχήμα 85A), και N365-610 (σχήμα 85B) ραδιοσημάνθηκαν με <sup>35</sup>S-met, (μετά από μεταγραφή και μετάφραση *in vitro*; βλέπε υλικά και μέθοδοι), προστέθηκαν σε αντιδράσεις που περιέχουν καθαρισμένα τα διάφορα C34IRA1 πεπτίδια ("κρύα"), και στη συνέχεια εξετάστηκαν οι αλληλεπιδράσεις των παραγώγων του N68 και των παραγώγων του C34 με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. Σαν πεπτίδιο αναφοράς (control) στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο N244-469 (σχήμα 85C), του DEAD κινητήρα, που δεν αλληλεπιδρά με την C-περιοχή (Sianidis et al., 2001). Διαπιστώνεται ότι τα περισσότερα C34IRA1 πεπτίδια αλληλεπιδρούν με το N1-263 τμήμα (σχήμα 85, πηγαδάκια 3, 5-9), σχεδόν όπως και το C34WT (σχήμα 85, πηγαδάκι 2), αφού προκύπτει ένα ηλεκτροφορητικό πρωτεϊνικό είδος που μετακινείται πιο αργά στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα από το N1-263 παράγωγο (μαύρο βέλος στο σχήμα 85A). Παρόλα αυτά το C34I789R (σχήμα



**A** Σχήμα 85: Αλληλεπίδραση των C34IRA1 πεπτιδίων με τις διάφορες υποπεριοχές του DEAD κινητήρα. Συγκεκριμένα τα <sup>35</sup>S-N1-263, <sup>35</sup>S-N385-610, και <sup>35</sup>S-N244-478 ραδιοσημασμένα πεπτίδια του N68 συντίθενται μετά από μεταγραφή και μετάφραση *in vitro*, και προσθέτονται (3μl από το καθένα, ??cpm) σε αντιδράσεις 20μl που περιέχουν τα διάφορα κρύα C34IRA1 πεπτίδια (0.005mg), σε διάλυμα B με 1mM DTT (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τα αναμεμιγμένα πολυπεπτίδια αναλύονται σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης 10% και παρατηρούνται με αυτοραδιογραφία.

85A, πηγαδάκι 4) και το C34E806A (σχήμα 85A, πηγαδάκι 10) πεπτίδια είτε δεν σχηματίζουν, είτε σχηματίζουν σύμπλοκο με το N1-263 τμήμα αλλά σε πολύ χαμηλά ποσά, υποδηλώνοντας ότι η επικοινωνία της C-περιοχής με το πεπτίδιο N1-263 στις παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγές, αναστέλλεται σε σημαντικότατο βαθμό.

Από την άλλη μεριά το πεπτίδιο N365-610, τρέχει σαν μία αχνή και θολή μπάντα (σχήμα 85B, πηγαδάκι 1), η οποία γίνεται διακριτή και έντονη με την δέσμευση του C34WT (σχήμα 85B, πηγαδάκι 2, δεύτερο μαύρο βέλος). Με την εξαίρεση του πεπτιδίου C34P799A, που σχηματίζει ευδιάκριτη ζώνη με το N365-610, η οποία τρέχει στο ίδιο ύψος με την πρωτεϊνική ζώνη που σχηματίζει το C34WT (σχήμα 85B, πηγαδάκι 5), τα υπόλοιπα C34IRA1 πεπτίδια σχηματίζουν με το N365-610 παράγωγο ζώνες είτε αχνές και μειωμένης έντασης [σχήμα 85C, πηγαδάκια 3 (C34L785R), 6 (C34Y803A), 7(C34W775A), και 9 (C34R792A)], είτε ζώνες αλλαγμένης θέσης στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα [σχήμα 85C, πηγαδάκι 8 (C34F811A)], είτε δεν σχηματίζουν σύμπλοκα και άρα ευδιάκριτες ζώνες [σχήμα 85C, πηγαδάκια 4 (C34I789R) και 10 (C34E806A)].

Όσον αφορά το πεπτίδιο N244-479, όπως αναμένεται, δεν σχηματίζει σύμπλοκο ούτε με το πεπτίδιο C34WT (σχήμα 85B, πηγαδάκι 2), αλλά ούτε και με τα μεταλλαγμένα C34IRA1 πεπτίδια (σχήμα 86B, πηγαδάκια 3-10).

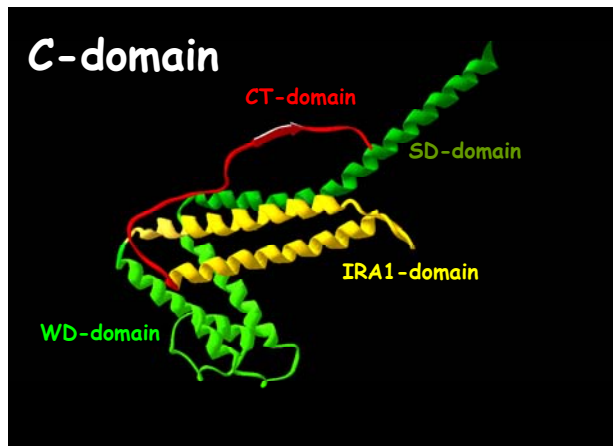
Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι οι IRA1 μεταλλαγές επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της C-περιοχής της SecA με τον DEAD κινητήρα επειδή διαταράσσουν τουλάχιστον δύο αλληλεπιδράσεις της με αυτόν τον κινητήρα. Τροποποιούν λοιπόν την επικοινωνία της C-περιοχής με την NBD, αλλά και πολύ περισσότερο με την IRA2 υποπεριοχή του N68 και έτσι επηρεάζουν την διαμόρφωση και την λειτουργία του DEAD κινητήρα.

### **3.3.1. Επίδραση των SecAIRA1 μεταλλαγών στην επικοινωνία της C-περιοχής με την SSD περιοχή του DEAD κινητήρα.**

Μπορεί με την παραπάνω μέθοδο να μην διαπιστώνεται καμία αλλαγή στην αλληλεπίδραση των C34IRA1 πεπτιδίων με την SSD-περιοχή (στην ουσία δεν διαφαίνεται αλληλεπίδραση ούτε του C34WT, αλλά ούτε και των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων με το N244-478 πεπτίδιο), όμως, όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 3.4, επικοινωνία της C-περιοχής με την περιοχή SSD υφίσταται (είναι ασθενής όμως), και διαταράσσεται στην περίπτωση ορισμένων SecAIRA1 μεταλλαγών (όπως στις μεταλλαγές τάξης III-Κεφάλαιο 3.4). Έτσι οι IRA1 μεταλλαγές επηρεάζουν την επικοινωνία της C-περιοχής και με την SSD-περιοχή του DEAD κινητήρα.

### 3.3.K. Η IRA1 περιοχή λειτουργεί μόνο παρουσία της C-περιοχής της SecA.

Είπαμε προηγουμένως ότι η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την λειτουργία του DEAD κινητήρα ρυθμίζοντας τη διαμόρφωση του. Η παραπάνω ρύθμιση πραγματοποιείται μέσω της τροποποιημένης αλληλεπίδρασης της C-περιοχής (στην οποία ανήκει η υποπεριοχή IRA1) με τον DEAD κινητήρα, και μάλιστα και με τις τρεις υποπεριοχές του, NBD, IRA2, και SSD. Στην προσπάθεια να εμβαθύνουμε περισσότερο στον τρόπο δράσης του IRA1, θεωρήσαμε δύο υποθέσεις: Η IRA1 περιοχή είτε δρα με απ' ευθείας αλληλεπίδραση στη δομή και στη λειτουργία του N68, είτε δουλεύει επηρεάζοντας τις υπόλοιπες τρεις υποπεριοχές της C-περιοχής (σχήμα 86). Μπορεί η πρώτη υπόθεση να θεωρείται αβέβαιη, σύμφωνα με την δομή



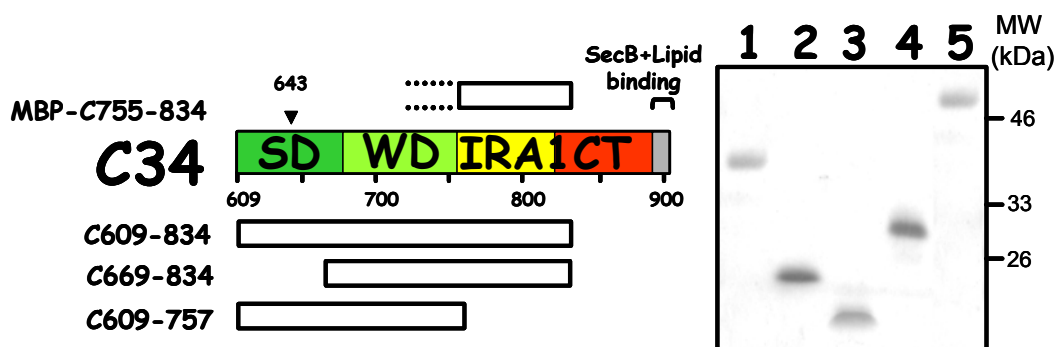
Σχήμα 86: Κρυσταλλογραφική απεικόνιση της C-περιοχής της *bsSecA* (Hunt et al., 2002), και κατ' αναλογία της *ecSecA*, στην οποία διακρίνονται οι τέσσερις περιοχές της. Η SD-περιοχή [αα572-620/621-669 (*bs/ecSecA*), με λαδί χρώμα], η WD-περιοχή (αα621-704/670-755, με λαχανί χρώμα), η IRA1-περιοχή (αα705-777/756-828, με κίτρινο χρώμα), και η CT-περιοχή (αα778-841/829-901, με κόκκινο χρώμα).

της *bs* και *mtSecA* (σχήμα 34 και 38 της Εισαγωγής; Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003; Σχήμα 56 στο Κεφάλαιο I των αποτελεσμάτων). Δεν παύει όμως να αποτελεί μία πιθανότητα, καθώς η απουσία αλληλεπίδρασης της IRA1-περιοχής με τον DEAD κινητήρα, δεν στηρίζεται σε βιοχημικά δεδομένα αλλά είναι απόρροια μελέτης της κρυσταλλογραφικής δομής της *SecA*, απουσία άλλων υποκαταστατών πλην του  $Mg^{2+}$ -ADP. Εξάλλου ασθενής αλληλεπίδραση της περιοχής IRA1 με την SSD-περιοχή υφίσταται, όπως θα

δούμε στο Κεφάλαιο III, και μάλιστα προβλέπεται ότι διαταράσσεται στην περίπτωση των *SecAIRA1* πρωτεϊνών τάξης III, αλλά και ορισμένων από τις πρωτεΐνες τάξης I, δηλαδή των *SecAL785R SecAI789R*.

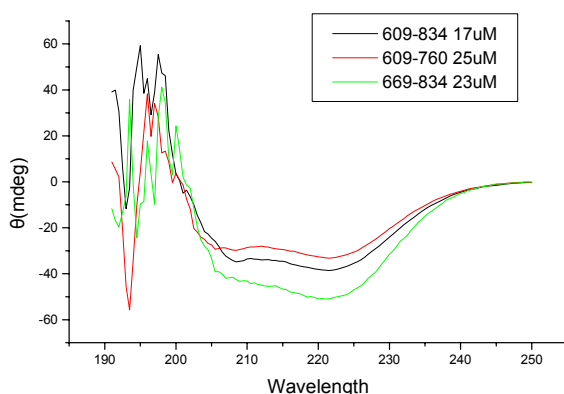
Προκειμένου να μελετηθούν λοιπόν οι παραπάνω υποθέσεις, κατασκευάστηκαν τέσσερα παράγωγα

της C-περιοχής (σχήμα 87; βλέπε και υλικά και μέθοδοι). Τα παράγωγα αυτά, σύμφωνα με την δομή της *bsSecA* (Hunt et al., 2002), περιλαμβάνουν είτε ολόκληρη την C-περιοχή πλην του καρβοξυτελικού τμήματος [Carboxy Terminal domain, CT; αα 778-841/829-901 (*bs/ecSecA*)], όπως το πεπτιδίο C609-834, είτε περιλαμβάνουν μόνο την SD και WD περιοχή (αα 572-620/621-669 και αα 621-704/670-755 αντίστοιχα), όπως το πεπτιδίο C609-757, είτε την WD και IRA1 περιοχή (αα 621-704/670-755 και αα 705-777/756-828 αντίστοιχα), όπως το πεπτιδίο C669-834, είτε μόνο την IRA1 περιοχή (αα 705-777/756-828), όπως το πεπτιδίο C755-834 (το πεπτιδίο αυτό μπόρεσε να απομονωθεί μόνο ως προϊόν σύμφυσης με την πρωτεΐνη MBP, σχήμα 87; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τα παραπάνω πεπτιδία απομονώθηκαν σε ομοιογένεια (κύρια σαν παράγωγα εξαισιτιδινών; σχήμα 87; βλέπε υλικά και μέθοδοι), και τα φάσματα τους μελετήθηκαν με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (σχήμα 88), οπότε και



Σχήμα 87: Χάρτης των διαφόρων παραγώγων του C34. Σχηματική αναπαράσταση της C-περιοχής (C34), των διάφορων υποπεριοχών της, και των παραγώγων του C34. Τα παράγωγα αυτά εκφράζονται (βλέπε υλικά και μέθοδοι) σαν παράγωγα εξιστιδινών [C609-834 (29kDa), C669-834 (22kDa), και C609-757 (20kDa)] ή της πρωτεΐνης MBP [MBP-C755-834 (43+12.3=55.3kDa)]. Στο δεξιό πάνελ του σχήματος παρουσιάζονται τα παραπάνω καθαρισμένα παράγωγα (1.3μg), μετά από τρέξιμο σε 18% αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδής με 6M urea (SDS-PAGE), και χρώση αργύρου (silver staining).

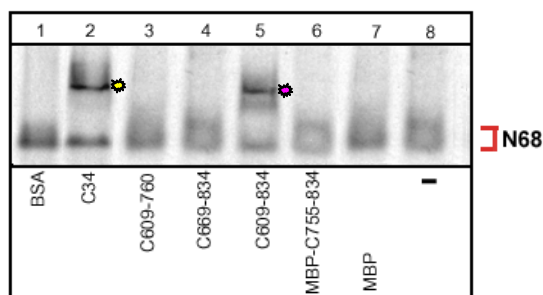
διαπιστώθηκε ότι δεν είναι αποδιαταγμένα, και όπως και ολόκληρη η C-περιοχή (C34; Karamanou et al., 1999), παρουσιάζουν εκτεταμένη α-ελικοειδή δομή.



Το ερώτημα που τίθεται λοιπόν, είναι αν μπορεί η IRA1 περιοχή να αλληλεπιδράσει άμεσα με τον DEAD κινητήρα και να επηρεάσει την λειτουργία του ή χρειάζεται την συμμετοχή και των υπόλοιπων περιοχών της C-περιοχής. Έτσι χρησιμοποιώντας την δοκιμασία της μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (που αναφέρθηκε και προηγουμένως), διαπιστώθηκε καταρχήν ότι η μη συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, που λείπει από το πεπτιδίο C609-834, [η αλληλουχία δηλαδή 835-901, που περιλαμβάνει την μη απαραίτητη θέση δέσμευσης της SecB (Breukink et al., 1995)], μπορεί να απομακρυνθεί χωρίς να επηρεαστεί η δέσμευση του προκύπτοντος πεπτιδίου 609-834 στον DEAD κινητήρα (σχήμα 89, πηγαδάκια 2, 5, και 8,

Σχήμα 88: Μελέτη της δευτεροταγούς δομής των διαφόρων παραγώγων του C34 με την μελέτη των φασμάτων με κυκλικό διχρωισμό υπεριώδους (Far-UV CD). Για καθ' ένα από τα παράγωγα του C34 μετρήθηκαν τα φάσματα της ellipticity ( $\theta$ ) σε διάφορα μήκη κύματος (από 190-250nm). Συγκεκριμένα οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 20mM MOPS pH 8, 5mM NaCl, και 5mM MgCl<sub>2</sub> στους 4°C, και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε, Karamanou et al., 1999; Sianidis et al. Το φάσμα για το C609-834 (χρησιμοποιούνται 17μM) απεικονίζεται με μαύρη γραμμή, για το C609-760 (χρησιμοποιούνται 25μM) με κόκκινη γραμμή, ενώ το φάσμα του C669-834 (χρησιμοποιούνται 23μM) απεικονίζεται με πράσινη γραμμή. Σημειώνεται ότι η ελάχιστη ellipticity στα 222 nm είναι χαρακτηριστική της παρουσίας ελικοειδούς δομής.

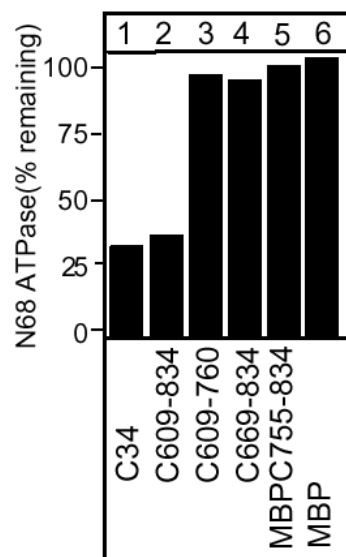
με κίτρινο αστεράκι σημειώνεται το σύμπλοκο C34-N68, ενώ με ροζ το



σύμπλοκο C609-834-N68). Ομοίως δεν επηρεάζεται και η ικανότητα του C609-834 πεπτιδίου να καταστέλλει την ATPάση του DEAD κινητήρα, όπως και ολόκληρη η C-περιοχή (σχήμα 90, στήλες 1 και 2). Αντίθετα όσον αφορά τα πεπτιδία C609-760 (SD+WD), C669-834 (WD+IRA1), αλλά και το MBP-C755-834 (MBP-IRA1), δεν ανιχνεύεται δέσμευση τους στον DEAD κινητήρα (σχήμα 89, πηγαδάκια 3, 4, 6, 7, και 8), και γι' αυτό δεν καταστέλλουν την δραστηριότητα ATPάσης του (σχήμα 90, στήλες 3, 4, 5, και 6).

Σχήμα 89: Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των παραγώγων του C34 με τον DEAD κινητήρα. Το <sup>35</sup>S-N68, μετά από μεταγραφή και μετάφραση in vitro παρουσία <sup>35</sup>S μεθειονίνης (3μl από 50μl αντίδραση; βλέπε υλικά και μέθοδοι), αναμιγνύεται (αντιδράσεις 20μl) με τα καθαρισμένα ("κρύα") παράγωγα του C34 (10μM), ή με BSA (10μM; Χρησιμοποιείται σαν αρνητικός μάρτυρας) σε διάλυμα B (50mM TrisCl, 150mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και 2.5mM DTT), και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 4°C για 5' (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τα δείγματα φορτώνονται εν συνεχεία σε 10% μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδής, και εν συνεχεία πραγματοποιείται αυτοραδιογραφία. Στην περίπτωση του MBPC753-834 πεπτιδίου (πηγαδάκι 6), χρησιμοποιείται σαν αρνητικός μάρτυρας, μόνο MBP (πηγαδάκι 7), προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επίδραση του C753-834, στην αλληλεπίδραση με το N68. Το "ζεστό" N68 (πηγαδάκι 8) τρέχει σαν μία όχι ευκρινής, αλλά περισσότερο διευρυμένη ζώνη (κόκκινη αγκύλη).

Στα ίδια συμπεράσματα καταλήξαμε και μετά από την χρησιμοποίηση των παραγώγων του C34 σε μοριακή αναλογία 48:1 σε σχέση με το N68, αλλά και όταν τα παράγωγα χρησιμοποιήθηκαν αμέσως μετά το τέλος της



Σχήμα 90: Διερεύνηση της καταστολής της ATPάσης του DEAD κινητήρα από τα διάφορα παράγωγα του C34. Συγκεκριμένα το N68 αναμιγνύεται με τα διάφορα C34 παράγωγα όπως αναφέρθηκε στο σχήμα 81, με την διαφορά ότι στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιούνται μόνο "κρύες" πρωτεΐνες, και η μοριακή αναλογία C34 παραγώγου προς N68 είναι 12:1. Μετά την επώαση στον πάγο μετράται η ATPάση του N68 με την χρήση του αντιδραστήριου πράσινο του μαλαχίτη (βλέπε υλικά και μέθοδοι).

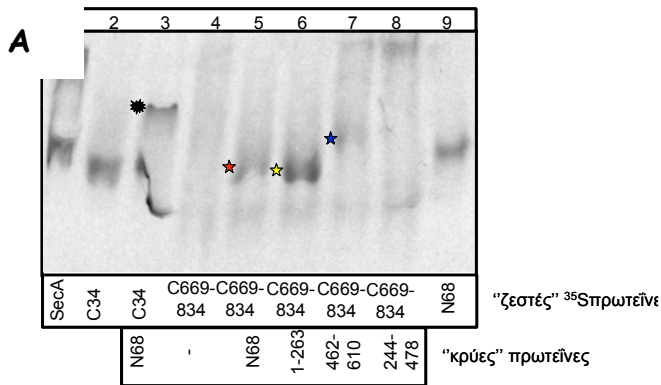
διαδικασίας αποδιάταξης τους με ουρία και επαναδιάταξης τους (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Η τελευταία διαδικασία ακολουθήθηκε προκειμένου να ελαττωθεί ο πληθυσμός των ολιγομερών, τουλάχιστον για το C669-834

πεπτιδίο (βλέπε Κεφάλαιο ρόλου της C34-περιοχής στον διμερισμό της SecA), ή των πιθανών συσσωματωμάτων και των υπολοίπων C34 παραγώγων, που ενδέχεται να μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση τους με το N68, και την καταστολή της ATPάσης του. Τονίζεται ότι για κανένα από τα C669-834, C609-757, και MBPC753-834 πεπτιδία, δεν παρατηρήθηκε κάποια, έστω και στοιχειώδη μείωση της ATPάσης του N68, για μία σειρά μοριακών αναλογιών (από 1:1, έως 12:1) του εκάστοτε παραγώγου C34 προς το N68, ακόμα και σε πειράματα ανίχνευσης της υδρόλυσης ATP μεγαλύτερης ευαισθησίας, όπως με την χρησιμοποίηση περίσσειας ραδιενεργού [<sup>32</sup>P-α]ATP ή [<sup>32</sup>P-γ]ATP, και τρέξιμο των προϊόντων υδρόλυσης σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC.

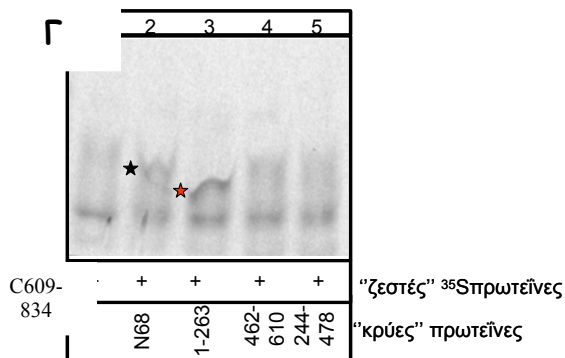
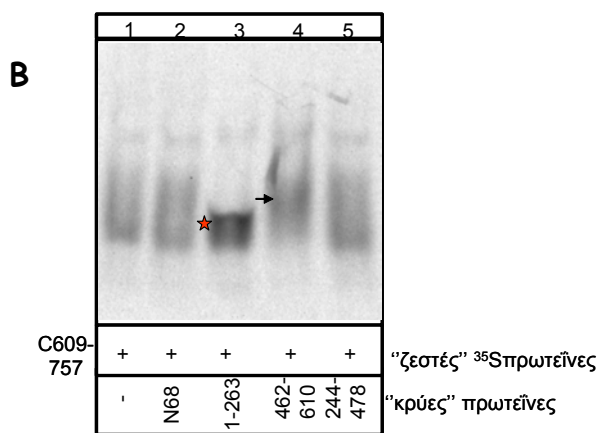
Αξίζει να σημειώσουμε ότι τα πειράματα διερεύνησης της φυσικής αλληλεπίδρασης των διαφόρων C34 παραγώγων, με την χρησιμοποίηση μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, πραγματοποιήθηκαν είτε με την χρησιμοποίηση ραδιενεργά σηματοδοτημένου, "ζεστού" DEAD κινητήρα, <sup>35</sup>SN68 (βλέπε υλικά και μέθοδοι), και "κρύων" C34 παραγώγων, όπως στο σχήμα 89, είτε με την χρησιμοποίηση μόνο "κρύων" πρωτεϊνών, με αντίστοιχα αποτελέσματα (πειράματα καταστολής της ATPάσης του N68 από τα C34 παράγωγα, σχήμα 90). Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιήθηκαν "ζεστά" C34 παράγωγα, και "κρύο" N68, σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης, βαθμίδωσης 4-20% (σχήμα 91), ενώ τα περισσότερα από τα παραπάνω αποτελέσματα επαναλαμβάνονται (για το παράγωγο C609-757, βλέπε σχήμα 91B, πηγαδάκια 1, και 2, ενώ για το παράγωγο C609-834, βλέπε σχήμα 91Γ, πηγαδάκια 1, και 2; Το σύμπλοκο N68-C609-834 σημειώνεται με μαύρο αστεράκι), παρατηρήθηκε πιθανή αλληλεπίδραση του C669-834 με το N68 (σχήμα 91A, πηγαδάκι 4 και 5; το πιθανό σύμπλοκο σημειώνεται με κόκκινο αστεράκι). Μία πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ο περιορισμός της δημιουργίας από το συγκεκριμένο πεπτιδίο ολιγομερών και συσσωματωμάτων, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του (χρησιμοποιείται ως "ζεστή" πρωτεΐνη), που επιτρέπει την παραγωγική αλληλεπίδραση με τον DEAD κινητήρα. Τα πειράματα αυτά όμως απαιτούν περαιτέρω επαναλήψεις, οι οποίες δεν έγιναν, και έτσι δεν μπορούν να θεωρηθούν επισφαλής.

Από την άλλη μεριά, η προσπάθεια να επιβεβαιωθούν τα τελευταία αποτελέσματα με την προσθήκη των διαφόρων C34 παραγώγων σε οπτικό βιοισθητήρα Surface Plasmon Resonance, (SPR), με ακινητοποιημένο N68 (το N68 ακινητοποιείται σε ειδική επιφάνεια; βλέπε υλικά και μέθοδοι) και μέτρηση της αλλαγής του δείκτη διαθλάσεως, δεν στέφθηκε με επιτυχία. Επιπλέον επειδή τα διάφορα πεπτιδία του C34 εκφράστηκαν και σαν παράγωγα της πρωτεΐνης MBP (βλέπε υλικά και μέθοδοι), εξετάστηκε η ικανότητα αλληλεπίδρασης τους με το N68, μετά την ακινητοποίηση τους σε σφαιρίδια αгарόζης, στα οποία προσδένεται η MBP πρωτεΐνη, αλλά και τα παράγωγα της (MBP-pull downs πειράματα). Τα αποτελέσματα όμως ήταν αρνητικά ακόμα και για την πρωτεΐνη αναφοράς MBP-C34.





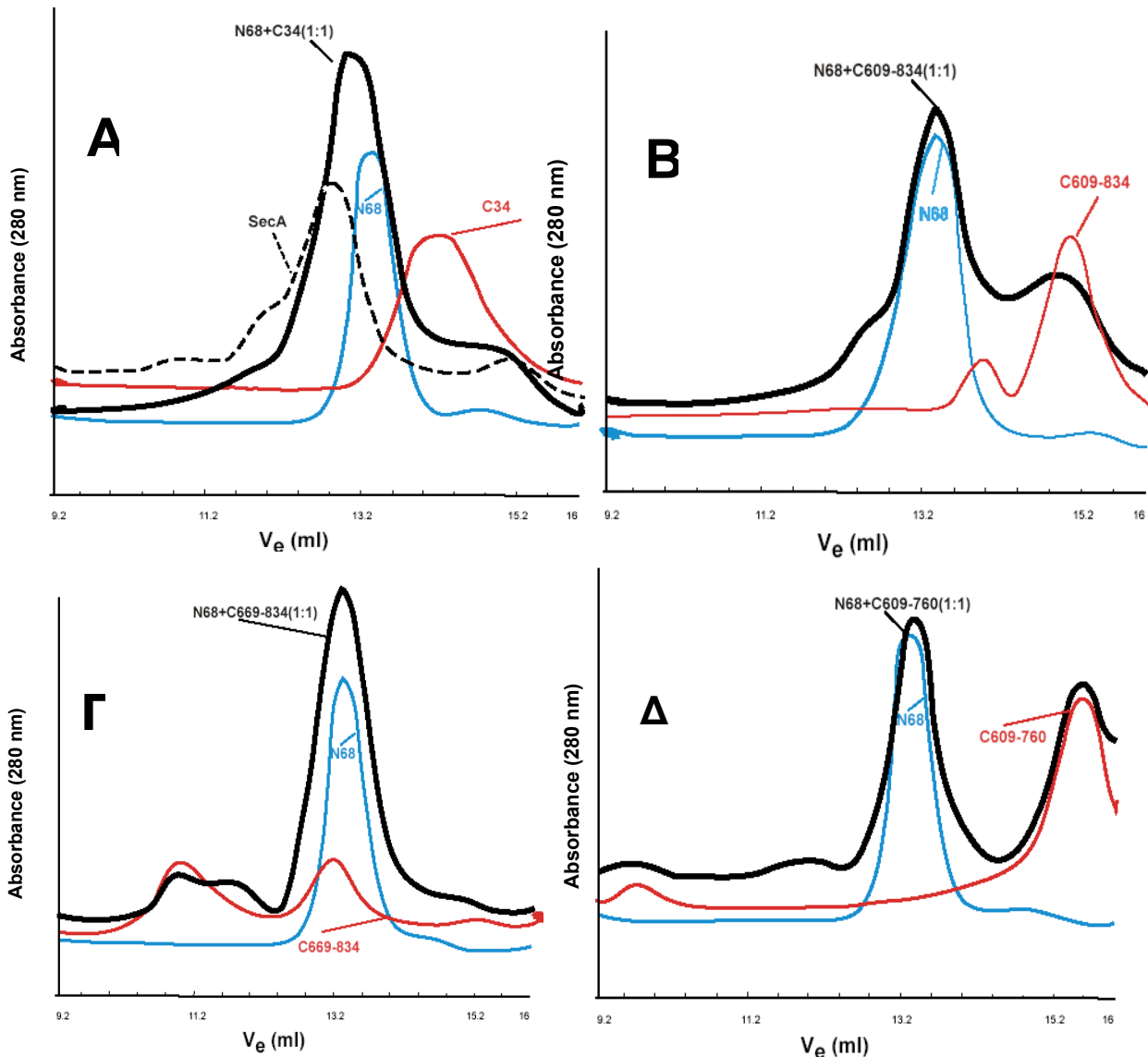
Σχήμα 91: Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των παραγώγων του C34 με ολόκληρο τον DEAD κινητήρα, και τις διάφορες υποπεριοχές του. Το N68 (4.4μΜ), ή αντίστοιχα το 1-263 (15.5 μΜ), ή το 462-610 (28μΜ) ή το 244-478 (17μΜ), αναμιγνύεται με τα διάφορα παράγωγα του C34 σε "ζεστή" μορφή (προκύπτουν μετά από μεταγραφή και μετάφραση in vitro παρουσία <sup>35</sup>S μεθειονίνης; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Συγκεκριμένα τόσο ο DEAD κινητήρας, όσο και οι διάφορες υποπεριοχές του προστίθενται (αντιδράσεις 10μl) στο <sup>35</sup>SC669-834 (3μl από 50μl αντίδραση; A), στο <sup>35</sup>SC609-757 (6μl από 50μl αντίδραση; B), και στο <sup>35</sup>SC609-834 (3μl από 50μl αντίδραση; Γ), σε διάλυμα B (50mM TrisCl, 150mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, και 5mM DTT), και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 4°C για 5' (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τα δείγματα φορτώνονται εν συνεχεία σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης βαθμίδωσης 4-20%, και ακολούθως πραγματοποιείται αυτοραδιογραφία. Στο σχήμα A φορτώνονται επίσης <sup>35</sup>SsecA (8μl; πηγαδάκι 1), <sup>35</sup>SC34 (7μl; πηγαδάκι 2), και <sup>35</sup>SN68 (4μl; πηγαδάκι 9), ενώ στο πηγαδάκι 3 φορτώνεται το μίγμα <sup>35</sup>SC34 με "κρύο" N68, που χρησιμοποιείται σαν θετικός μάρτυρας της δημιουργίας συμπλόκου του DEAD κινητήρα με τα διάφορα C34 παράγωγα (το σύμπλοκο N68-C34 σημειώνεται με μαύρο αστεράκι).



Τέλος έγινε διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των διάφορων C34 παραγώγων με το N68 με την χρήση χρωματογραφίας μεγέθους αποκλεισμού, αλλά πάλι τα αποτελέσματα δεν ήταν ξεκάθαρα (σχήμα 92). Συγκεκριμένα σε κολώνα Superdex 200, φορτώνονται διαδοχικά SecA, N68, όλα τα C34 παράγωγα, καθώς και μίγματα καθ' ενός από τα παραπάνω παράγωγα του C34

με το N68 σε αναλογία 1:1, σε διάλυμα 50mM Tris-CL, 300mM NaCL, και 1mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, με ρυθμό έκλουσης 0.4 ml/min και ρυθμό ροής του καταγραφικού 1cm/min (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Ενώ στην περίπτωση του δείγματος που περιέχει το μίγμα του C34 με το N68, είναι αδιαμφισβήτητη η δημιουργία πρωτεϊνικού συμπλόκου N68-C34, και δημιουργία ανασυστάμενης διμερούς SecA (πέφτει η κορυφή του C34, και

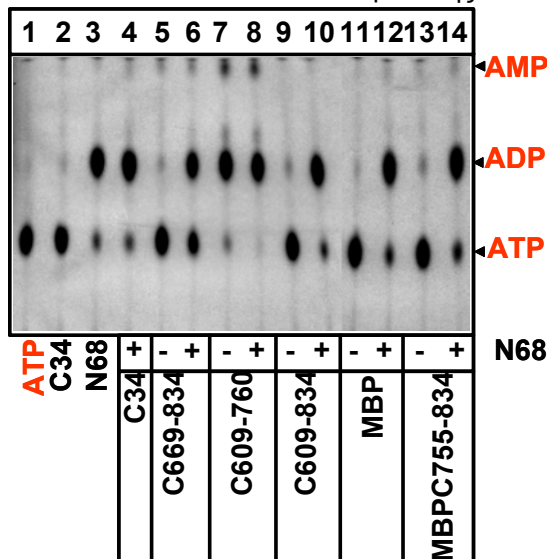
Σχήμα 92: Διερεύνηση της φυσικής αλληλεπίδρασης των διαφόρων παραγώγων του C34 με τον DEAD κινητήρα με χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού. Το N68 (50 μg) αναμιγνύεται σε αναλογία 1:1 με C34 (25 μg), ή με C609-834 (20.6 μg), ή με C669-834 (16.1 μg), ή με C609-757 (14.7 μg), σε διάλυμα 50mM Tris-CL, 300mM NaCL, και 1mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, και στη συνέχεια καθ' ένα από τα παραπάνω μίγματα φορτώνεται ξεχωριστά στη χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού (στην ίδια κολώνα Superdex-200, διαδοχικά; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Τα ίχνη των παραπάνω δειγμάτων (A, B, Γ, και Δ) αντιπαραβάλλονται κάθε φορά με τα ίχνη του N68, και του αντίστοιχου C34 παραγώγου, τα οποία φορτώνονται επίσης ξεχωριστά, και διαδοχικά, στην ίδια κολώνα με τις ίδιες συνθήκες. Στο διάγραμμα A σημειώνεται επίσης το ίχνος της SecA (50 μg), στην ίδια κολώνα, ως μάρτυρας της θέσης του ίχνους του συμπλόκου του N68 με το C34. Η AUFS=0.02, ο ρυθμός έκλουσης 0.4ml/min, ενώ ο ρυθμός με τον οποίο τρέχει το καταγραφικό 1cm/min.



δημιουργείται νέα κορυφή κοντά στο σημείο που εκλούεται η SecA), για τα υπόλοιπα C34 παράγωγα, τα πράγματα δεν είναι ξεκάθαρα. Έτσι ενώ το N68 εκλούεται στα 13.28ml και το C34 στα 14.12ml, όταν φορτωθούν μαζί στην κολώνα σε αναλογία 1:1, η μέγιστη πρωτεϊνική απορρόφηση διαπιστώνεται στα 13.08ml, δηλαδή εκεί που εκλούεται και η διμερής SecA (12.88ml) (σχήμα 92A; Karamanou et al., 1999; Εισαγωγή), και επαληθεύεται η δημιουργία συμπλόκου N68-C34. Όταν στην κολώνα φορτωθεί C609-834, παρατηρούνται δύο κορυφές πρωτεϊνικής απορρόφησης (σχήμα 92B). Μία στα 13.92ml, και μία στα 15.02ml. Η πρώτη αντιστοιχεί στο διμερές και η δεύτερη στο μονομερές C609-834 παράγωγο (βλέπε αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο του ρόλου της IRA1 περιοχής στον διμερισμό της SecA). Όταν προστεθεί στην κολώνα μαζί με το τελευταίο παράγωγο, και N68 σε αναλογία 1:1, διαπιστώνεται η κορυφή του μονομερούς C609-834 πεπτιδίου, (που εκλούεται όμως τώρα στα 14.9ml και είναι λίγο ελαττωμένη), η κορυφή του N68 στα 13.4ml, και μία κορυφή κοντά στα 12.8ml, ουσιαστικά ένας ώμος κορυφής (που δεν μετατρέπεται σε διακριτή κορυφή ακόμα και με ελαττωμένη ποσότητα N68, λόγω της περιορισμένης διακριτικότητας της κολώνας), που θα μπορούσε να αντιστοιχεί στο σύμπλοκο N68-C609-834 (σχήμα 92B). Σημειώνεται ότι αυτή η τελευταία κορυφή εκλούεται νωρίτερα από την SecA, και ότι φυσιολογικά θα έπρεπε να παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής του N68 προς μεγαλύτερα μοριακά βάρη, όχι όμως μεγαλύτερα της SecA, και ελάττωση της κορυφής του διμερούς C609-834 για να μιλούσαμε για δημιουργία σταθερού συμπλόκου μεταξύ N68-C34. Εν συνεχεία στην περίπτωση του παραγώγου C669-834 απαντώνται τρεις κορυφές απορρόφησης. Μία στα 10.88ml, μία στα 13.16ml, και μία πολύ μικρή, κοντά στα 14.8ml (σχήμα 92Γ). Οι κορυφές αυτές, όπως περιγράφεται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο του ρόλου της IRA1 περιοχής στον διμερισμό της

SecA, αντιστοιχούν σε ολιγομερές, τετραμερές, και στο μονομερές του συγκεκριμένου C34 παραγώγου. Όταν ακολούθως στην κολώνα φορτωθεί μίγμα του C669-834 με το N68 σε αναλογία 1:1, η κορυφή απορρόφησης του ολιγομερούς παραγώγου διατηρείται (η δεύτερη κορυφή είναι κρυμμένη, και η τρίτη μετατοπίζεται ελαφρώς προς μεγαλύτερα μοριακά βάρη), αλλά ανιχνεύεται μία καινούργια κορυφή στα 11.72ml, που θα μπορούσε να δικαιολογεί δημιουργία συμπλόκου N68-C669-834. Το περίεργο είναι ότι εμφανίζεται νωρίτερα από την κορυφή που εκλούεται η SecA και άρα αντιστοιχεί σε μεγάλα μοριακά βάρη, που θα δικαιολογούσαν μόνο σύμπλοκο N68-εξαμερούς C669-834 (σχήμα 92Γ). Τέλος όσον αφορά το C609-757 παράγωγο, αυτό τρέχει σαν μονομερές στα 15.52ml (περιγράφεται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο του ρόλου της IRA1 περιοχής στον διμερισμό της SecA), του οποίου η κορυφή παραμένει και μετά το φόρτωμα στην κολώνα μίγματος N68-C34 σε αναλογία 1:1 (σχήμα 92Δ). Αξίζει να σημειωθεί ότι ανιχνεύεται στην περίπτωση του μίγματος και μία μικρή κορυφή απορρόφησης κοντά στα 12ml, πριν την κορυφή της SecA, που λόγω αυξημένου μοριακού βάρους δεν μπορεί να αντιπροσωπεύει σύμπλοκο μονομερούς C609-757-N68.

Αξίζει να σημειωθεί ότι μπορεί να μην παρατηρήθηκε καταστολή της ATPάσης του DEAD κινητήρα μετά από την προσθήκη του C669-834, ή του C609-760 πεπτιδίου, με περίσσεια κρούς ATP (σχήμα 90), πειράματα όμως στα οποία χρησιμοποιήθηκαν στοιχειομετρικές ποσότητες [<sup>32</sup>P-α]ATP και N68 και τα προϊόντα υδρόλυσης παρακολούθηθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, έδειξαν επίδραση των παραπάνω πεπτιδίων στον ένα κύκλο υδρόλυσης του N68 (σχήμα 93). Συγκεκριμένα λόγω των



Σχήμα 93: Διερεύνηση της επίδρασης των διάφορων παραγώγων του C34 στην ATPάση του DEAD κινητήρα. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται υδρόλυση του N68 (14.7pmols) παρουσία ισομοριακών ποσοτήτων [<sup>32</sup>α]-ATP σε διάλυμα B με 1mM DTT και 1mg/ml BSA (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Συγκεκριμένα σε αντιδράσεις των 25μl προστίθενται είτε καθ'ένα από τα παράγωγα του C34, είτε το N68, είτε το N68 και καθ'ένα από τα παράγωγα του C34 σε μοριακή αναλογία 1:12 αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι πραγματοποιείται ένας κύκλος υδρόλυσης ATP, και γι' αυτό δεν παρατηρείται καταστολή της ATPάσης του DEAD κινητήρα από το C34WT. Παρατηρείται όμως μείωση ακόμα και αυτής της υδρόλυσης του N68 παρουσία του C669-834 (περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο)

στοιχειομετρικών ποσοτήτων N68 και ATP, πραγματοποιείται μετατροπή του ATP μόνο σε ADP (σχήμα 93, πηγαδάκι

3), η οποία δεν περιορίζεται παρουσία ολόκληρης της C-περιοχής (αυτή ασκεί επίδραση στους πολλαπλούς κύκλους υδρόλυσης του N68, τους οποίους και καταστέλλει; σχήμα 93, πηγαδάκι 4), αλλά ελαττώνεται εν μέρει από το C669-834 πεπτιδίο. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει σταθεροποίηση της ADP διαμόρφωσης του DAED κινητήρα από την WD και την IRA1-περιοχή της C-περιοχής. Μόνο της η IRA1-περιοχή δεν φαίνεται να έχει την ίδια επίδραση στην υδρόλυση του N68 (σχήμα 93, πηγαδάκι 14), ενώ η SD μαζί με την WD-περιοχή επειδή υδρολύουν ATP προς ADP και AMP, απουσία N68 (σχήμα 93, πηγαδάκι 7), δεν μπορεί να αξιολογηθεί η δράση τους εν συνεχεία στην υδρόλυση του N68.

Έτσι συμπερασματικά από τα παράγωγα του C34, μόνο το μεγαλύτερο παράγωγο C609-834, αλληλεπιδρά με τον DEAD κινητήρα και καταστέλλει την ATPάση του. Για τα μικρότερα παράγωγα τα αποτελέσματα είναι σχεδόν πάντα αρνητικά (για το C609-760 δεν έχει διαφανεί πιθανή αλληλεπίδραση με το N68, αλλά για το C669-834 υφίστανται και θετικά αποτελέσματα), και μπορεί να οφείλονται είτε σε πραγματική ανικανότητα αλληλεπίδρασης τους με τον DEAD κινητήρα, είτε σε απώλεια αυτής της ιδιότητας λόγω δομικών προβλημάτων των παραπάνω παραγώγων (αν και από το σχήμα 88, φαίνεται ότι παρουσιάζουν αναδίπλωση α-έλικας).

Επομένως συμπεραίνουμε ότι η C34-περιοχή δεν αλληλεπιδρά με τον DEAD κινητήρα και δεν καταστέλλει την ATPάση του, παρά μόνο παρουσία και των τριών (από τις τέσσερις) υποπεριοχών της, δηλαδή της SD, WD, και της IRA1-περιοχής.

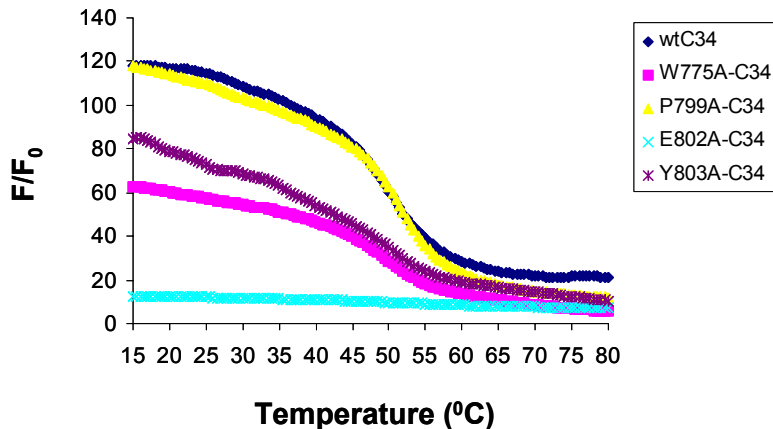
Με την χρησιμοποίηση “ζεστών” C34 παραγώγων όμως, έγινε εν συνεχεία και προσπάθεια διερεύνησης της αλληλεπίδρασης τους με “κρύα” παράγωγα του N68, και συγκεκριμένα με παράγωγα για κάθε μία από τις υποπεριοχές του N68 (σχήμα 91). Είναι γνωστό όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ότι ολόκληρη η περιοχή του C34 αλληλεπιδρά τόσο με την NBD, όσο και με την IRA2-περιοχή, αλλά όχι με την SSD-περιοχή (παρά μόνο ασθενώς). Θελήσαμε λοιπόν να εξετάσουμε αν μπορούμε να διακρίνουμε στην C-περιοχή ειδικές περιοχές για τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις. Έτσι καθ’ ένα από τα παραπάνω παράγωγα του C34 επώασθη με τα ακόλουθα πεπτίδια του N68: το N1-263, που περιλαμβάνει την NBD-περιοχή (αα 1-419; βλέπε Εισαγωγή), το N462-610 που περιλαμβάνει την IRA2-περιοχή (αα 420-619; βλέπε Εισαγωγή), και το παράγωγο N244-478, που περιέχει την SSD-περιοχή (αα 220-360; βλέπε Εισαγωγή). Παρατηρήθηκε πιθανή αλληλεπίδραση των C669-834, C609-757, και του C609-834, με την NBD-περιοχή (σχήμα 91Α, πηγαδάκια 4 και 6, όπου το σύμπλοκο N1-263/C669-834, σημειώνεται με κίτρινο αστεράκι; σχήμα 91Β, πηγαδάκια 1 και 3, όπου το σύμπλοκο N1-263/C609-757, σημειώνεται με κόκκινο αστεράκι; Σχήμα 91Γ, πηγαδάκια 1 και 3, όπου το σύμπλοκο N1-263/C609-834, σημειώνεται με κόκκινο αστεράκι), καθώς παρατηρείται δημιουργία ευδιάκριτης πρωτεϊνικής ζώνης μετά την επώαση τους με το N1-263, σε αντίθεση με την διάχυτη και θαμπή εικόνα που παρουσιάζουν τα παραπάνω C34 παράγωγα, απουσία άλλης πρωτεΐνης (σχήματα 91Α, Β, Γ, πηγαδάκια 4, 1, 1 αντίστοιχα). Αλληλεπίδραση με την IRA2-περιοχή, πραγματοποιείται σε περιορισμένο βαθμό τόσο με το C669-834 (σχήμα 91Α, πηγαδάκια 4 και 7, όπου το υποτιθέμενο σύμπλοκο σημειώνεται με μπλε αστεράκι), όσο και με το C609-757 (σχήμα 91Β, πηγαδάκια 1 και 4, όπου το υποτιθέμενο σύμπλοκο σημειώνεται με μαύρο βέλος), αλλά καθόλου με το C609-834 παράγωγο (σχήμα 91Γ, πηγαδάκια 1 και 4). Τέλος δεν παρατηρείται καμία αλληλεπίδραση, όπως αναμενόταν και από την συμπεριφορά ολόκληρου του C34, με την SSD-περιοχή (σχήμα 91Α, Β, Γ, πηγαδάκια 8, 5, 5). Τα αποτελέσματα αυτά μέχρι να επαναληφθούν, και να επιβεβαιωθούν και μ’ άλλες μεθόδους, δεν θεωρούνται επισφαλή και δεν πρόκειται να αναλυθούν περαιτέρω.

Από όλα τα παραπάνω πειράματα προκύπτει ότι η IRA1 περιοχή πιθανά δεν μπορεί να δράσει ως ανεξάρτητο ρυθμιστικό στοιχείο. Διαφαίνεται ότι η C-περιοχή χρειάζεται τη συμμετοχή και των SD και WD περιοχών της, μαζί με την περιοχή IRA1 για να εξασκήσει την δράση της.

### **3.3.Α. Η IRA1 περιοχή ελέγχει την διαμόρφωση των περιοχών SD και WD της C-περιοχής.**

Η απαίτηση σύγχρονης παρουσίας με την IRA1 περιοχή και των περιοχών SD και WD, προκειμένου η πρώτη να επιτελέσει την δράση της, σημαίνει πιθανότατα ότι οι SD και WD περιοχές, δουλεύουν σαν αρθρώσεις που διευκολύνουν ή μεταδίδουν την κίνηση της δομής έλικας-λούπας-έλικας της IRA1 περιοχής, για παράδειγμα στον DEAD κινητήρα. Επομένως η IRA1 περιοχή πιθανά επιτελεί την δράση της επιδρώντας στην διαμόρφωση των SD και WD υποπεριοχών, των οποίων αποτελεί την φυσική συνέχεια (κατά σειρά η C-περιοχή αποτελείται από τις SD, WD και IRA1 περιοχές), και με τις οποίες αλληλεπιδρά (Κεφάλαιο III). Η αλλαγή της διαμόρφωσης των περιοχών αυτών όμως, τελικά τροποποιεί την δομή και την λειτουργία του DEAD κινητήρα, αφού ο τελευταίος αλληλεπιδρά απευθείας με την πρώτη υποπεριοχή της C-περιοχής, την SD (αλληλεπιδράσεις της SD με την NBD περιοχή στο Κεφάλαιο III), αλλά και δέχεται τις αλλαγές της διαμόρφωσης της WD-περιοχής, αφού αυτές μεταδίδονται διαδοχικά στην SD-περιοχή (σχήμα 86).

Η παραπάνω ερμηνεία ενισχύεται από πειράματα της Λίλης Καραμάνου, που έδειξαν ότι ο ενδογενής φθορισμός των τρυπτοφανών των διαφόρων παραγώγων του C34 που αναφέρθηκαν παραπάνω (σχήμα 87), κατά την θερμική τους αποδιάταξη (βλέπε υλικά και μέθοδοι), είναι παρόμοιος (και επομένως και η διαμόρφωση τους), όταν υφίσταται η IRA1 περιοχή, αλλά τροποποιείται απουσία της. Συγκεκριμένα το πεπτίδιο C669-834 (WD+IRA1 περιοχές; σχήμα 94, γαλάζια γραμμή), παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά αποδιάταξης με το πεπτίδιο C609-834 (SD+WD+IRA1 περιοχές; Σχήμα94, μοβ γραμμή), καθώς και με ολόκληρο το πεπτίδιο C34 (σχήμα 95, μπλε σκούρα γραμμή). Αντίθετα το πεπτίδιο C609-760 (SD+WD περιοχές; σχήμα 94, κίτρινη γραμμή), στο οποίο απουσιάζει η IRA1 περιοχή, παρουσιάζει μία δραστικά διαφορετική αποδιατακτική συμπεριφορά. Εξάλλου όπως φαίνεται



στον πίνακα VI, η μεγαλύτερη επίδραση στο προφίλ των σημείων μεταπτώσεως  $T_m$  της θερμικής αποδιάταξης των παραπάνω παραγώγων του C34, συμβαίνει με την απομάκρυνση της IRA1 περιοχής, στο πεπτιδίο C609-760. Τα προφίλ των  $T_m$  για τα υπόλοιπα πεπτιδία είναι παρόμοιο. Επομένως η

Σχήμα 94: Διάγραμμα της έντασης του ενδογενούς φθορισμού ( $F$ ) των τρυπτοφανών με την θερμοκρασία, των διαφόρων παραγώγων του C34, δηλαδή των πεπτιδίων C609-834 (μωβ γραμμή), C609-760 (κίτρινη γραμμή, C669-834 (γαλάζια γραμμή), αλλά και του ίδιου του C34 (μπλε σκούρα γραμμή) στα 340nm, σε σχέση με την ένταση του φθορισμού τους στην αρχική θερμοκρασία ( $F/F_0$ ). Σημειώνεται ότι έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση των τιμών φθορισμού για κάθε παράγωγο του C34, έτσι ώστε να ξεκινούν όλα από την ίδια τιμή και να γίνονται ευκολότερες συγκρίσεις (Βλέπε και σημείωση στον πίνακα VI).

Πίνακας VI: Θερμική αποδιάταξη των διαφόρων παραγώγων του C34 (σε διάλυμα  $Mg^{2+}$ ; βλέπε υλικά και μέθοδοι), που παρακολουθείται μέσω του φθορισμού των τρυπτοφανών τους.

Πεπτιδίο	$T_m1$	$T_m2$	$T_m3$	$T_m4$	$T_m5$
609-901	47.83	49.38*	50.61		
609-834		50.61*	52	54.05	
669-834		50.61*			
609-760	48.75			54.35	58.41*

\* υποδηλώνει την κυριότερη παρράγωγο (υψηλότερη κορυφή)

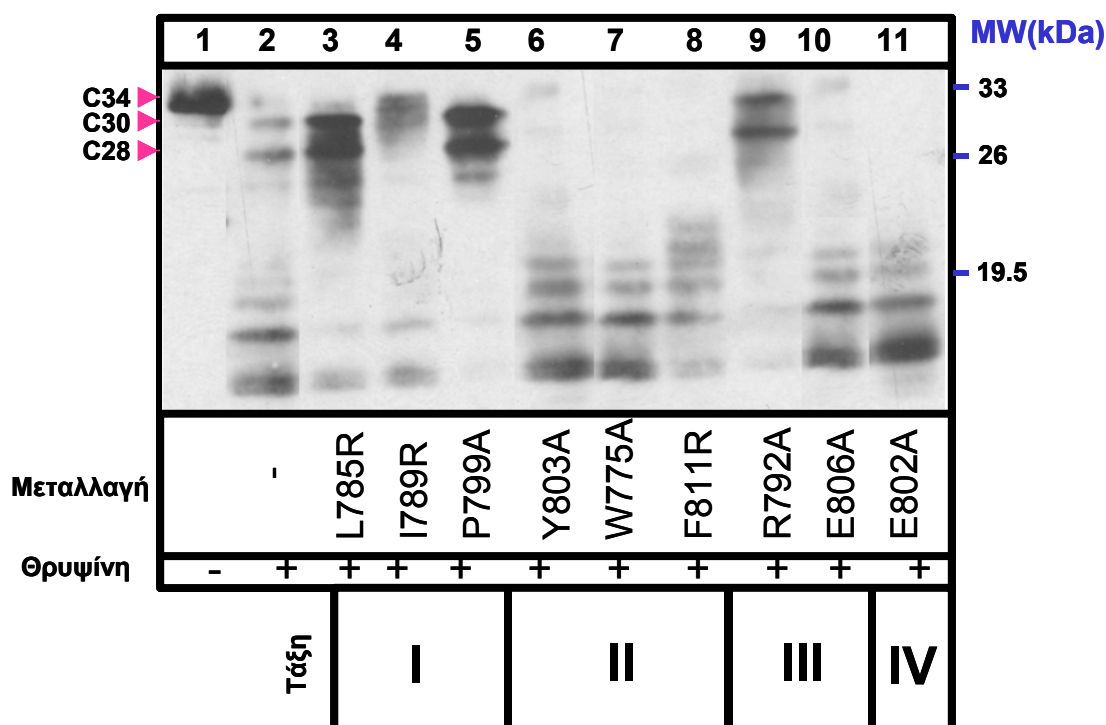
Σημείωση: Ενώ χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ποσό πρωτεΐνης από τα παραπάνω δείγματα, η μοριακή συγκέντρωση είναι 1.3α για το C609-834, 1.8α για το C669-834, και 1.9α για το C609-760, όπου α η συγκέντρωση του C609-901. Έτσι το C609-901 πεπτιδίο φθορίζει λιγότερο (a.u.=100), ενώ περισσότερο δεν φθορίζει το C609-760 (a.u.=150), αλλά το C669-834 (a.u.=200), στο οποίο περιέχεται και η περιοχή WD και η περιοχή IRA1, που περιέχουν τρυπτοφάνες που συνεισφέρουν στον φθορισμό (βλέπε Εισαγωγή). Το πεπτιδίο C609-834 παρουσιάζει τον ίδιο φθορισμό με το πεπτιδίο C609-760 (a.u.=150), αν και χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1.5 φορές μικρότερη από το δεύτερο, καθώς περιέχει και την περιοχή WD και την IRA1 περιοχή που φθορίζουν, ενώ η IRA1 περιοχή λείπει από το C609-760.

περιοχή IRA1, επηρεάζει την διαμόρφωση και κατ' επέκταση και τον ενδογενή φθορισμό των τρυπτοφανών της ευρύτερης C-περιοχής.

Από τις παραπάνω θερμικές αποδιάταξεις επιβεβαιώνεται ακόμα, ότι ο φθορισμός των τρυπτοφανών της C-περιοχής της SecA, οφείλεται κύρια στην περιοχή WD (βλέπε Εισαγωγή και Hunt et al., 2002), αφού αφαιρώντας είτε την καρβοξυτελική περιοχή (CT; πεπτιδίο C609-834), ή την SD (πεπτιδίο C669-834), ή την IRA1 περιοχή (πεπτιδίο C609-760) ο φθορισμός διατηρείται. Έτσι στον φθορισμό της C-περιοχής συμβάλουν κύρια οι τρυπτοφάνες που εντοπίζονται στην WD περιοχή, δηλαδή η W701 και η W723 (βλέπε Εισαγωγή), αλλά σε μικρότερο βαθμό και η τρυπτοφάνη της IRA1 περιοχής, η W775A. Γι' αυτό και το πεπτιδίο C609-760 (SD+WD περιοχές), από το οποίο λείπει η IRA1 περιοχή, παρουσιάζει μικρότερη ένταση φθορισμού από το πεπτιδίο C669-834 (WD+IRA1 περιοχές), από το οποίο λείπει η περιοχή SD (η μοναδική της τρυπτοφάνη δεν φαίνεται να συντελεί στον φθορισμό της C-περιοχής, όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή) αν και χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη κατά μία φορά από το δεύτερο πεπτιδίο (βλέπε σημείωση στον πίνακα VI).

Η επίδραση της IRA1 περιοχής στην ρύθμιση της διαμόρφωσης της ευρύτερης C-περιοχής όμως, διαπιστώθηκε και με πειράματα περιοριστικής πρωτεόλυσης των διαφόρων

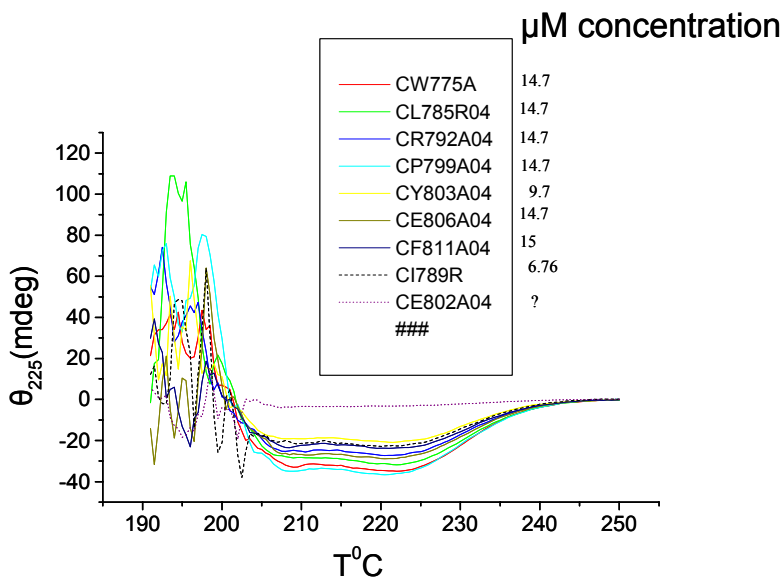
C34IRA1 πεπτιδίων (βλέπε υλικά και μέθοδοι; σχήμα 95). Συγκεκριμένα τα προκύπτοντα πρωτεολυτικά προφίλ των πεπτιδίων C34IRA1 (σχήμα 95, πηγαδάκια 3-10) αποκλίνουν περισσότερο ή λιγότερο από το προφίλ του C34WT (σχήμα 95, πηγαδάκι 2), και είτε



Σχήμα 95: Περιοριστική πρωτεόλυση των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων στον πάγο για 5' με θρυψίνης (σε αντιδράσεις 100μl, σε διάλυμα 1XB με 1mM DTT, όπου περιέχονται 30μg από κάθε πεπτιδίιο, προστίθενται 2.5 μg θρυψίνης; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Η προστιθέμενη θρυψίνη αδρανοποιείται μετά τα 5' θρυψινόλυσης με Pefabloc (9mM), για ακόμα 5' στον πάγο. Διακρίνονται μοριακοί μάρτυρες 33, 26, και 19.5 kDa (αριστερά), ενώ σημειώνονται και οι θέσεις των περιοριστικών πεπτιδίων C30 και C28.

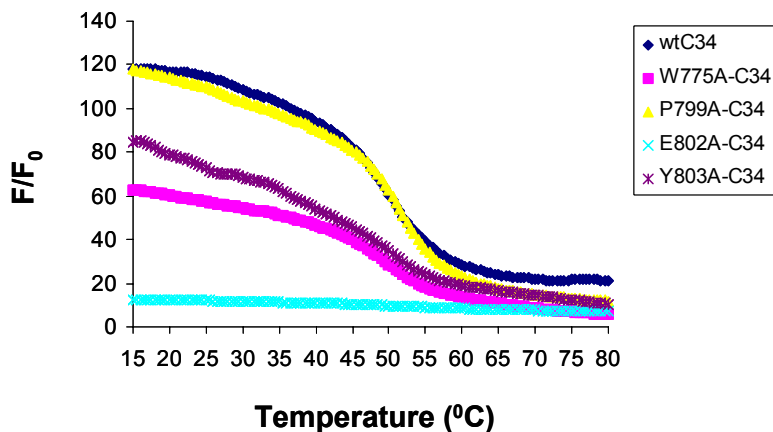
παρουσιάζουν αυξημένη ανθεκτικότητα σε πρωτεόλυση (σχήμα 95, πηγαδάκια 3, 5, και 9), είτε αυξημένη ευαισθησία και αποσταθεροποίηση (σχήμα 95, πηγαδάκια 4, 6, 7, 8, και 10). Και στις δύο περιπτώσεις πάντως μιλάμε για διατάραξη από την IRA1 περιοχή της δομής της C-περιοχής και των υποπεριοχών της SD, WD, IRA1, και CT. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα C34IRA1 πεπτιδία παρουσιάζουν πάντως χαρακτηριστική α-ελικοειδή δομή, όπως φαίνεται στο σχήμα 96.

Η παραπάνω παρατήρηση είναι σύμφωνη και με την εικόνα της θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων, που μελετήθηκε με βάση τον ενδογενή φθορισμό των τρυπτοφανών τους, από την Λίλη Καραμάνου, (σχήμα 97, και Πίνακας VII). Διαπιστώθηκε συγκεκριμένα ότι το C34Y803A πεπτιδίιο που παρουσιάζει ενισχυμένη πρωτεόλυση σε σχέση με το C34WT (σχήμα 95, σύγκριση πηγαδιών 6 και 2 αντίστοιχα), χάνει και πιο γρήγορα τον φθορισμό του, σε σχέση με τον φθορισμό του πεπτιδίου C34WT (σχήμα 97, σύγκριση σκούρας μοβ καμπύλης με την σκούρα μπλε καμπύλη αντίστοιχα). Αντίθετα το πεπτιδίιο C34P799A, που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην πρωτεόλυση σε σχέση με το πεπτιδίιο C34WT (σχήμα 95, σύγκριση πηγαδιών 5 και 2 αντίστοιχα), καθυστερεί στην μείωση του φθορισμού του κατά την θερμική του αποδιάταξη, σε σχέση με την εικόνα που παρουσιάζει το C34WT (σχήμα 97, σύγκριση κίτρινης καμπύλης με την σκούρα μπλε καμπύλη αντίστοιχα). Από τον Πίνακα VII φαίνεται εξάλλου, ότι τα διάφορα C34IRA1 πεπτιδία παρουσιάζουν τροποποιημένες θερμικές ιδιότητες σε σύγκριση με το πεπτιδίιο C34WT, που αντανακλώνται είτε σε διαφορετικό ρυθμό μείωσης της έντασης του φθορισμού κατά την θερμική τους αποδιάταξη, είτε σε διαφορετικό αριθμό σημείων μετάπτωσης και διαφορετικές τιμές τους, είτε και σε διαφορετική ένταση αρχικού φθορισμού (σχήμα 97, παρατηρείται ολοένα μειούμενη ένταση αρχικού φθορισμού  $F_0$  από το C34Y803A, στο C34W775A, και σχεδόν καθόλου στο C34E802A). Κατά συνέπεια οι IRA1 μεταλλαγές επηρεάζουν τα θερμικά



Σχήμα 96: Μελέτη της δευτεροταγούς δομής των διαφόρων C34IRA1 πεπτιδίων με την μελέτη των φασμάτων με κυκλικό διχρωϊσμό υπεριώδους (Far-UV CD). Για καθ' ένα από τα παράγωγα του C34 μετρήθηκαν τα φάσματα της ellipticity ( $\theta$ ) σε διάφορα μήκη κύματος (από 190-250nm). Συγκεκριμένα οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 20mM MOPS pH 8, 5mM NaCl, και 5mM MgCl<sub>2</sub> στους 4°C, και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε, Karamanou et al., 1999; Sianidis et al. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση (αντιδράσεις 120μl) αναγράφονται δίπλα από το όνομα τους στο παραπάνω σχήμα. Σημειώνεται ότι η ελάχιστη ellipticity στα 222 nm είναι χαρακτηριστική της παρουσίας ελικοειδούς δομής.

όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών ελαττώνεται (μεγαλύτερη έκθεση του περιβάλλοντος των τρυπτοφάνων στον υδατικό περιβάλλον ή μεγαλύτερη κινητικότητα στην αντίστοιχη περιοχή) κατά την θερμική τους αποδιάταξη, ήδη από την αρχική θερμοκρασία (ενδεικτικά σχήμα 98). Ο φθορισμός όμως της SecA οφείλεται κατά κύριο λόγο στις τρυπτοφάνες που εντοπίζεται στην WD υποπεριοχή της C-περιοχής και εν συνεχεία, αλλά λιγότερο στην τρυπτοφάνη του



Σχήμα 97: Θερμικό φάσμα C34 και παραγώγων. Διάγραμμα της έντασης του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφάνων (F) με την θερμοκρασία, του C34WT (μπλε σκούρα καμπύλη) και τεσσάρων C34IRA1 πεπτιδίων (για λόγους απλότητας), των C34W775A (μοβ καμπύλη), C34P799A (κίτρινη καμπύλη), C34E802A (γαλάζια καμπύλη), και C34Y803A (σκούρα μοβ καμπύλη), στα 340nm, σε σχέση με την ένταση του φθορισμού τους στην αρχική θερμοκρασία.

IRA1 (den Blaauwen et al., 1996; Ding et al., 2001; Hunt et al., 2002; σχήμα 99), υποδηλώνοντας ότι η IRA1-περιοχή τροποποιεί την διαμόρφωση της WD-περιοχής. Σημειώνεται ότι στον φθορισμό της SecA συντελούν σε πολύ μικρό βαθμό και οι διάφορες τρυπτοφάνες του DEAD κινητήρα (den Blaauwen et al., 1996; 1999; βλέπε και Εισαγωγή) Έτσι το γεγονός ότι ο φθορισμός της SecAY803A, της SecAF811A, και της SecADIRA1 χάνεται τελείως κατά την θερμική τους αποδιάταξη σε διάλυμα με EDTA (βλέπε υλικά και μέθοδοι; Πίνακας VIII), ενισχύει ακόμα περισσότερο την παραπάνω πρόταση. Στις παραπάνω πρωτεΐνες παρατηρείται μόνο το ασθενές προφίλ φθορισμού που χαρακτηρίζει τον DEAD κινητήρα τους. Η τρομακτική όμως αυτή μείωση του φθορισμού των παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγών, δεν μπορεί παρά να

χαρακτηριστικά της C-περιοχής, και κατά συνέπεια και την διαμόρφωση των διάφορων υποπεριοχών της. Από τα παραπάνω πειράματα διαπιστώνεται ότι η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την διαμόρφωση της C-περιοχής. Η IRA1 περιοχή όμως, επιδρά ειδικότερα στην WD υποπεριοχή της ευρύτερης C-περιοχής. Και αυτό γιατί ο φθορισμός

Πίνακας VII: Αναγραφή των σημείων μετάπτωσης (apparent Tm) της θερμικής αποδιάταξης, παρακολουθούμενης μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών, για τα διάφορα C34IRA1 μεταλλαγμένα πεπτιδία (σε διάλυμα Mg<sup>2+</sup>)

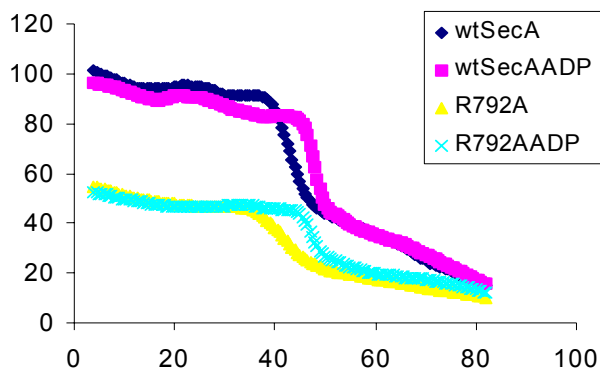
C34 domain	Tm1	Tm2	Tm3
wt	47.83	49.38*	50.61
W775A		49.06	50.94
L785R		49.68	51.56*
I789R	48.43	49.9*	52.17
R792A		50.94*	52.17
P799A		50.94	
E802A	45.32		54.67*
Y803A		50.61	
E806A		49.38	
F811A	48.13	49.38*	50.61

\* Σημειώνεται η κυριότερη κορυφή όσον αφορά την ένταση της παραγωγού.

**Σημείωση :** Το πεπτιδίο C34E802A, που όπως αναφέρθηκε, και θα μελετηθεί αναλυτικότερα παρακάτω, είναι πρωτεολυμένο στο αμινοτελικό του άκρο, έχει χάσει σχεδόν το σύνολο του φθορισμού των τρυπτοφανών του. Συγκεκριμένα η ένταση του φθορισμού του μειώνεται 8.5 φορές σε σχέση με την ένταση του φθορισμού ίσης ποσότητας σε μg C34WT.

οφείλεται στην ειδική επίδραση αυτών των IRA1 μεταλλαγών στην διαμόρφωση της WD περιοχής, στην οποία στηρίζεται και η πλειονότητα του φθορισμού της SecA. Από την άλλη μεριά και η αλλαγή των σημείων μετάπτωσης (η θερμοκρασία στην οποία απαντώνται, και η παρουσία σε μερικές περιπτώσεις περισσότερων του ενός σημείων μετάπτωσης) της θερμικής αποδιάταξης των υπολοίπων SecAIRA1 μεταλλαγών, τόσο σε διάλυμα EDTA (Πίνακας VIII), όσο και σε διάλυμα Mg<sup>2+</sup> (Πίνακας IV), η οποία

Σχήμα 98: Καμπύλες θερμικής αποδιάταξης της SecAWT και της SecAR792A, που προκύπτουν από την μέτρηση του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα σε διάλυμα.... Στο ίδιο διάγραμμα απεικονίζεται η καμπύλη θερμικής αποδιάταξης της SecAWT απουσία και παρουσία ADP (μπλε και ροζ καμπύλη αντίστοιχα), και της SecAR792A απουσία και παρουσία ADP (κίτρινη και τυρκουάζ καμπύλη αντίστοιχα).



παρακολουθείται μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών τους, μπορεί να θεωρηθεί δηλωτική αλλαγής της διαμόρφωσης της WD περιοχής. Επιπλέον ο φθορισμός του πεπτιδίου C34E802A, μειώνεται 8.5 φορές (βλέπε σημείωση στον Πίνακα VII) σε σχέση με τον φθορισμό του C34WT πεπτιδίου, και

επομένως σε μεγάλο βαθμό, που δεν μπορεί παρά να αποδοθεί σε τροποποιημένη WD περιοχή στο συγκεκριμένο πεπτιδίο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η αλλαγή της διαμόρφωσης της WD περιοχής προκαλείται είτε από την IRA1 μεταλλαγή, είτε από την κουτσουρεμένη SD περιοχή, μιας και το πεπτιδίο C34E802A (30kDa) είναι πρωτεολυμένο και ξεκινά όχι από την L610, αλλά από την Q644 (σχήμα 100). Από τα παραπάνω πειράματα λοιπόν ενδέχεται η IRA1 περιοχή να επιδρά στη διαμόρφωση της WD υποπεριοχής της C-περιοχής. Υπάρχουν όμως σοβαρές ενδείξεις ότι η IRA1 περιοχή τροποποιεί και την διαμόρφωση της SD υποπεριοχής της C-περιοχής. Συγκεκριμένα το πεπτιδίο C34E802A πρωτεολύεται μέσα στην περιοχή SD, και όπως αναφέρθηκε, το αμινοτελικό του άκρο εντοπίζεται στην Q644 (πραγματοποιήθηκε ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας του αμινοτελικού άκρου του πρωτεολυμένου πεπτιδίου, βλέπε υλικά και μέθοδο; σχήμα 100,



	ΥΠΟΠΕΡΙΟΧΕΣ	B. subtilis	E. coli
<b>C-περιοχή</b>	<b>SD</b>	571-621	622-669
	<b>WD</b>	622-705	670-755
	<b>IRA1</b>	706-777	756-827
	<b>CT</b>	778-802	828-901

```

610          620          630          640          650          660
|           |           |           |           |           |
L GMKPGEAIEH FVVTKAIANA QRKVESRNF D IRKQLLEYDD VANDQRRAIY
670          680          690          700          ▲10          720
|           |           |           |           |           |
SQRNELLDVS DVSETINSIR EDVFKATIDA YIPPOSLEEM WDIPGLQERL KNDFDLPLPI
730          740          750          760          770          780
|           |           |           |           |           |
AEWLDKEPEL HEETLRERIL AQSIEVYQRK EEVVGAEEMR HFEKGVMLQT LDSLWKEHLA
790          800          810          820          830          840
|           |           |           |           |           |
AMDYLRQGIH LRGYAQKDPK QEYKRESFSM FAAMLES LKY EVISTLSKVQ VRMP EEEV EEL
850          860          870          880          890          900
|           |           |           |           |           |
EQQRRMEABR LAQMQLSHQ DDDSAAAAAL AAQTGERKVG RNDPCPCGSG KKYKQCHGRL

```

Q

Σχήμα 99: Απεικόνιση των υποπεριοχών του C34 πεπτιδίου (C-περιοχή) και της αλληλουχίας του στην *E.coli*. Σύμφωνα με τη δομή της bsSecA η C-περιοχή ξεκινάει από την W622, όμως τα διάφορα C34 πεπτιδία ξεκινούν από την L610 (περιλαμβάνοντας και τμήμα της IRA2 περιοχής, που απεικονίζεται με μπλε χρώμα), καθώς κατασκευάστηκαν πριν την ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής (βλέπε υλικά και μέθοδοι). Στην αλληλουχία σημειώνεται ακόμα το αμινοτελικό άκρο του πρωτεολυμένου C34E802A πεπτιδίου (μαύρο βέλος), καθώς και οι θέσεις των τρυπτοφανών της C-περιοχής.

γεγονός που συσχετίζει την E802A μεταλλαγή του IRA1 με αλλαγή της διαμόρφωσης της περιοχής SD, που επιτρέπει την αποκάλυψη της K643 (σχήμα 101). Καθώς όμως το E802 αμινοξύ της IRA1 περιοχής του ενός πρωτομερούς [SecA(α)] βλέπει την SD του άλλου πρωτομερούς [SecA(β)] (Κεφάλαιο III των αποτελεσμάτων και σχήμα 101), ενδέχεται η αλλαγή της διαμόρφωσης της SD που προκαλεί η E802A μεταλλαγή να αφορά την περιοχή SD του απέναντι πρωτομερούς (σχήμα 101).

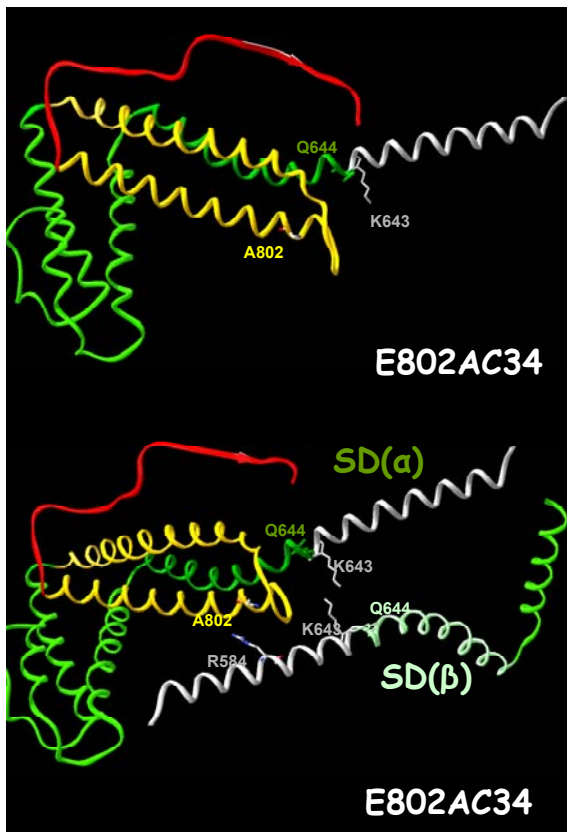
Από την άλλη μεριά η περιοριστική πρωτεόλυση των C34IRA1 μεταλλαγών που αναφέρθηκε παραπάνω (σχήμα 95), παρουσιάζει είτε σταθεροποίηση δύο πρωτεολυτικών κομματιών r30 και r28, σε σχέση με την πρωτεόλυση του πεπτιδίου C34WT (σχήμα 95, σύγκριση πηγαδιών 3, 5, και 9 με 2), που ξεκινούν από το αμινοτελικό άκρο του C34E802A, δηλαδή από την θέση Q644 (αα 644-901 και αα 644-881), είτε αποσταθεροποίηση τους (σχήμα 95, σύγκριση πηγαδιών 4, 6, 7, 8, και 10 με 2). Έτσι στα C34L785R, C34P799A, και C34R792A πεπτιδία

(σχήμα 95 πηγαδάκια 3, 5, και 9 αντίστοιχα), αποκαλύπτονται η θέση πρωτεόλυσης K643 όπως και στο C34WT πεπτίδιο (σχήμα 95 πηγαδάκι 2), αλλά τα **Πίνακας VIII:** Σημεία μετάπτωσης (apparent Tm) της θερμικής αποδιάταξης των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών, η οποία παρακολουθείται μέσω του ενδογενούς φθορισμού των τρυπτοφανών σε διάλυμα με EDTA.

	Μετρήσεις σε διάλυμα με EDTA
SecAWT	44.39
N68WT	Διαφορετική καμπύλη από αυτή των SecA/C34 44.6
C34WT	49.5
SecAW775A	43.76
SecAL785R	Tm1:35.99 Tm2:43.76*
SecAI789R	42.21
SecAR792A	44.69
SecAP799A	44.39
SecAE802A	Δεν μετρήθηκε
SecAY803A	Δραματική πτώση της έντασης του φθορισμού των τρυπτοφανών. Μένει μόνο η εικόνα από τον φθορισμό του N68 : 37.85/43.46*
SecAE806A	44.48
SecAF811A	Δραματική πτώση της έντασης του φθορισμού των τρυπτοφανών. Μένει μόνο η εικόνα από τον φθορισμό του N68: 49.06/54.98*
SecADIRA1	Δραματική πτώση της έντασης του φθορισμού των τρυπτοφανών. Μένει μόνο η εικόνα από τον φθορισμό του N68: 45.022

\* Σημειώνεται το κύριο Tm (υψηλότερη κορυφή της παραγωγού)

προκύπτοντα πεπτίδια p30 και p28 επιπλέον, σταθεροποιούνται (το p28 διατηρείται μέχρι και 20' πρωτεόλυσης σε πειράματα κινητικής) σε σχέση με τα αντίστοιχα πεπτίδια του C34WT, γεγονός που υποδηλώνει αλλαγή της διαμόρφωσης της SD περιοχής τους. Αντίθετα στα C34I789R, C34Y803A, C34W775A, C34F811A και C34E806A πεπτίδια (σχήμα 95 πηγαδάκια 4, 6, 7, 8 και 10 αντίστοιχα) οι θέσεις πρωτεόλυσης K643 ή R642 είναι κρυμμένες



Σχήμα 100: Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του E802AC34 της *ecSecA* κατ' αναλογία με την δομή της *bsSecA*. Το E802AC34 πρωτεολύεται στην K643, και ξεκινά από την Q644 της SD-περιοχής του C34. Οι υπόλοιπες περιοχές του C34 χρωματίζονται όπως στο σχήμα 87.

σε σχέση με το C34WT πεπτιδίο (σχήμα 95 πηγαδάκι 2), αντανακλώντας άμεση επίδραση και των παραπάνω IRA1 μεταλλαγών στη διαμόρφωση της SD περιοχής. Από τα παραπάνω πειράματα προκύπτει ότι η IRA1 περιοχή επιδρά και

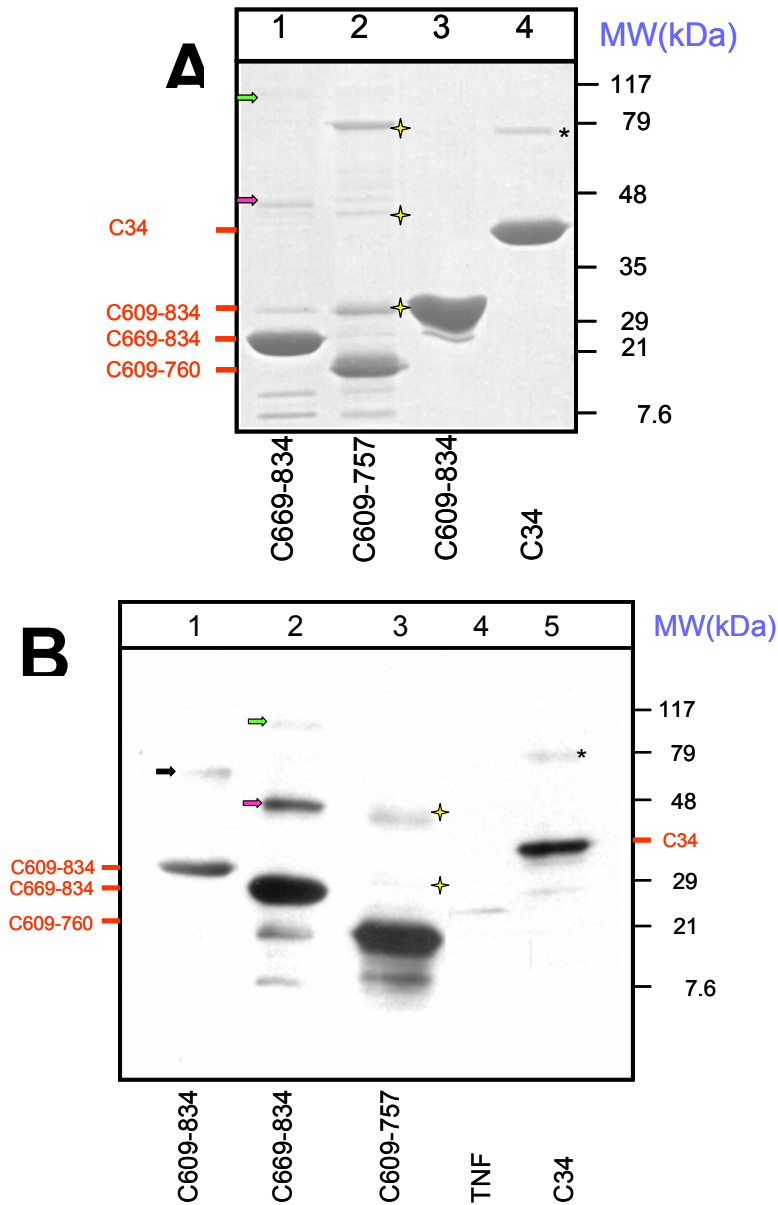
Σχήμα 101: Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του E802AC34 της *ecSecA* κατ' αναλογία με την δομή της *bsSecA*. Το E802AC34 πρωτεολύεται στην K643, και ξεκινά από την Q644 της SD-περιοχής του C34. Οι υπόλοιπες περιοχές του C34 χρωματίζονται όπως στο σχήμα 37. Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζεται και η SD-περιοχή του δεύτερου πρωτομερούς [SD(β)], μιας και το αμινοξύ E802 αλληλεπιδρά με το R584 της παραπάνω περιοχής. Όταν το E802 μεταλλάσσεται σε E802A η παραπάνω αλληλεπίδραση διαταράσσεται, και ενδέχεται έτσι να επηρεάζεται η πρωτεόλυση στην K643 του SD(β).

στην διαμόρφωση ειδικότερα της SD περιοχής της ευρύτερης C-περιοχής.

Κατά συνέπεια η IRA1 περιοχή ρυθμίζει την δομή της C-περιοχής της *SecA*, τροποποιώντας την δομή και λειτουργία του DEAD κινητήρα, αλλάζοντας την διαμόρφωση των WD και SD υποπεριοχών της.

### 3.3.M. Η IRA1 περιοχή ελέγχει τον διμερισμό της SecA.

Σύμφωνα με τους Hirano et al., 1996 η απαραίτητη περιοχή διμερισμού στην SecA εντοπίζεται στην C-περιοχή, στην αλληλουχία 662-831. Σε μία προσπάθεια να διερευνηθεί ο ρόλος της IRA1 περιοχής (αα 756-828) στην συγκρότηση διμερούς SecA, μελετήθηκαν τα προηγούμενα παράγωγα του C34 (σχήμα 86), ως προς την ικανότητα τους να σχηματίζουν διμερή. Ήδη από την χρώση τους με Coomassie (σχήμα 102A), αλλά και τον ανοσοεντοπισμό τους με αντίσωμα έναντι της SecA (σχήμα 102B), μετά τον καθαρισμό τους



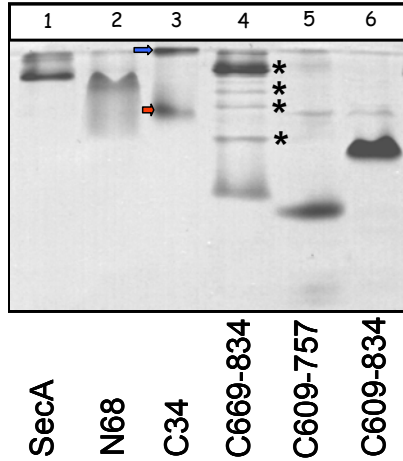
Σχήμα 102:Μελέτη των παραγώγων του C34 με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντοπισμό. Α) Χρώση με Coomassie των παραγώγων του C34 και του ίδιου του C34, μετά το τρέξιμο τους σε 12% αποδιατακτικό SDS πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Έτσι φορτώνονται ~10μg από κάθε πρωτεϊνικό παράγωγο του C34, αλλά και από το ίδιο το C34. Β) Ανοσοεντοπισμός (Western; βλέπε υλικά και μέθοδοι) των παραγώγων του C34 με αντίσωμα έναντι της SecA (α-SecA), μετά το τρέξιμο τους σε 15% αποδιατακτικό SDS πήκτωμα ακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Συγκεκριμένα φορτώνεται ~1μg από κάθε πρωτεϊνικό παράγωγο του C34, από το C34, καθώς και από την πρωτεΐνη αναφοράς (control) τον παράγοντα TNF. Στο σχήμα αναγράφονται επίσης οι θέσεις διαφόρων μοριακών δεικτών. Το μαύρο βέλος υποδεικνύει το διμερές του C609-834, το ροζ και το πράσινο το διμερές και τριμερές του C669-834, τα κίτρινα βέλη τις άσχετες πρωτεΐνες που συναπομονώνονται μαζί με το C609-760, και δίνουν μη ειδικό σήμα

(βλέπε υλικά και μέθοδοι), διαπιστώνεται η ικανότητα ορισμένων απ' αυτά να σχηματίζουν διμερή ή και ολιγομερή. Προβλέπεται λοιπόν ότι το C669-834 (το μοριακό βάρος του είναι ~22kDa, αλλά τρέχει σαν ~26kDa πρωτεΐνη; σχήμα 102A, πηγαδάκι 1, και 102B πηγαδάκι 2. Με το ροζ βέλος, υποδεικνύεται το διμερές των ~50kDa και με πράσινο βέλος το τριμερές των ~100kDa), όπως και ολόκληρο το C34 (C609-901; σχήμα 102A,

πηγαδάκι 4 και 102B πηγαδάκι 5. Το αστεράκι, υποδηλώνει το διμερές, ενώ ολιγομερές C34 διαπιστώνεται στο σχήμα 103, πηγαδάκι 3, μπλε βέλος), σχηματίζει ολιγομερή. Το ίδιο θα περίμενε κανείς και για το C609-757, από την στιγμή που τόσο στο σχήμα 102A, πηγαδάκι 2, όσο και στο σχήμα 102B, πηγαδάκι 3), εντοπίζονται πρωτεϊνικές ζώνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (σημειώνονται με κίτρινα αστεράκια) που ανιχνεύονται με το αντίσωμα έναντι της SecA. Όμως όπως θα δούμε παρακάτω από πειράματα χημικής διασύνδεσης (σχήμα 105), οι ζώνες αυτές του μεγαλύτερου μοριακού βάρους (~29kDa και ~45kDa, που δεν είναι πολλαπλάσια του μοριακού βάρους του C609-757, που είναι 20kDa) αντιστοιχούν σε άσχετες πρωτεΐνες (όπως εξάλλου φάνηκε και για την ~80kDa πρωτεϊνική ζώνη, που ενώ φαίνεται στο σχήμα 102A, πηγαδάκι 2, δεν ανιχνεύεται με αντίσωμα έναντι της SecA, σχήμα

102B, πηγαδάκι 3) που απλά καθαρίζονται μαζί με το C609-757 παράγωγο του C34, και αντιδρούν μη ειδικά με το αντίσωμα έναντι της SecA.

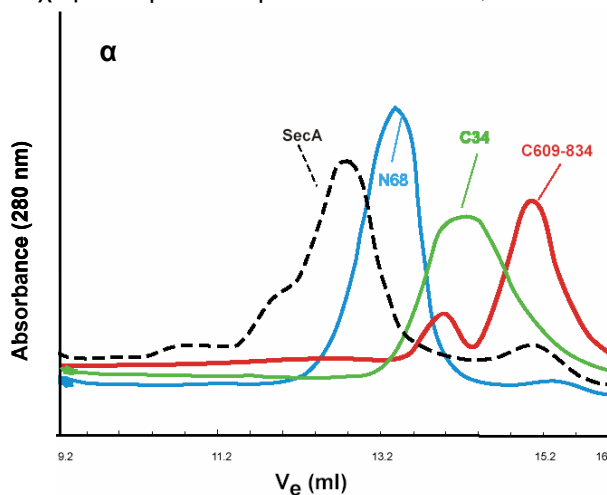
Προκειμένου λοιπόν να εξεταστεί άμεσα η δυνατότητα ολιγομερισμού των παραπάνω παραγώγων του C34, και κατά συνέπεια ο ρόλος της περιοχής IRA1 στον διμερισμό, οι παραπάνω πρωτεΐνες φορτώθηκαν καταρχήν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (NATIVE-PAGE; βλέπε υλικά και μέθοδοι) και διαπιστώθηκε ο σχηματισμός ολιγομερών του C669-834 (σχήμα 102, πηγαδάκι 4. Με αστεράκια σημειώνονται τα διάφορα διμερή, τριμερή



Σχήμα 103: Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διαφόρων παραγώγων του C34 με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. 12% πήκτωμα μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης (NATIVE-PAGE) στο οποίο φορτώνονται 10μg από τα διάφορα παράγωγα του C34, και 5 μg από το C34, το N68, και την SecA. Οι πρωτεΐνες χρωματίζονται με Coomassie.

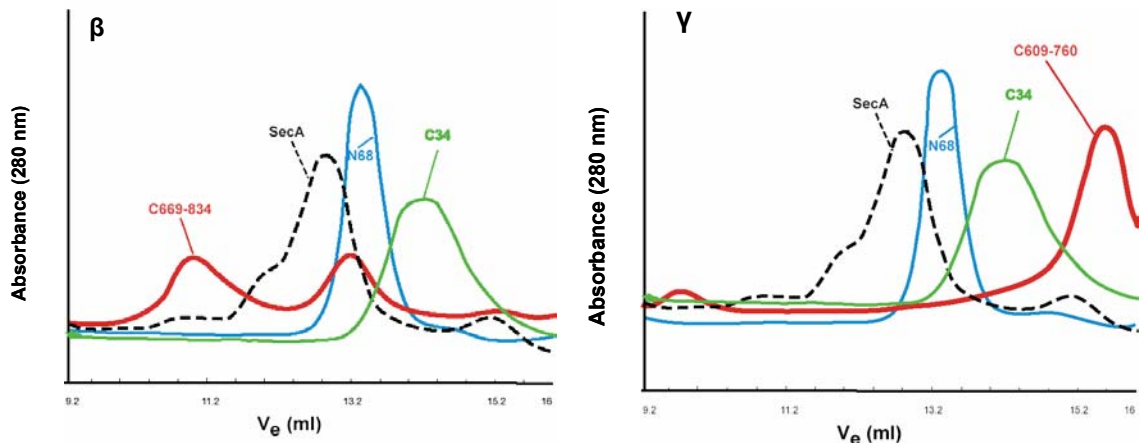
κόκ του C669-834), η δημιουργία μιας διμερούς πρωτεϊνικής ζώνης στην περίπτωση του C609-834 (σχήμα 103, πηγαδάκι 6; τρέχει αρκετά ψηλά για ~29kDa πρωτεΐνη, δηλαδή κοντά στο διμερές C34, που τρέχει σαν 68kDa πρωτεΐνη; σχήμα 103, πηγαδάκι 3, κόκκινο βέλος; Karamanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή), ενώ το C609-760 τρέχει σαν μία ζώνη, λίγο χαμηλότερα από την ζώνη χαμηλότερου μοριακού βάρους του C669-834 (σχήμα 103, πηγαδάκι 5), δηλαδή πρέπει να είναι μονομερές.

Επειδή όμως στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης οι πρωτεΐνες τρέχουν τόσο με βάση τη μάζα σχήμα αλλά και με βάση το φορτίο τους, για καλύτερη προσέγγιση του μοριακού τους βάρους και άρα και της ικανότητας ολιγομερισμού τους, τα παραπάνω παράγωγα του C34 φορτώθηκαν σε μπλε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (BLUE-NATIVE-PAGE; Βλέπε υλικά και μέθοδοι), όπου λόγω κατάλληλης χρωστικής (Coomassie G250 brilliant blue) με την οποία "χρωματίζονται" οι διάφορες πρωτεΐνες, αποκτούν κοινό φορτίο και επομένως τρέχουν με βάση μόνο τη μάζα και το σχήμα τους. Τα πειράματα όμως αυτά δεν οδήγησαν σε ξεκάθαρη εικόνα (πιθανά λόγω χαμηλής ποσότητας των δειγμάτων) και δεν παρουσιάζονται. Έτσι προκειμένου να συγκριθούν ως προς το μοριακό τους βάρος τα διάφορα παράγωγα του C34, φορτώθηκαν σε χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού (Size exclusion chromatography), στην οποία οι πρωτεΐνες εκκλύονται με βάση όχι το φορτίο, αλλά τη μάζα και το σχήμα τους, και μπορούν να γίνουν ακριβείς συγκρίσεις του μοριακού τους βάρους όσον αφορά σφαιρικές πρωτεΐνες, που μοιράζονται το ίδιο σχήμα. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε η Superdex 200 (σχήμα 104; βλέπε υλικά και μέθοδοι), παρότι αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί η Superdex 75, που παρουσιάζει διαχωριστική ικανότητα από 3-70kDa, που είναι κοντά στα μοριακά βάρη των C34



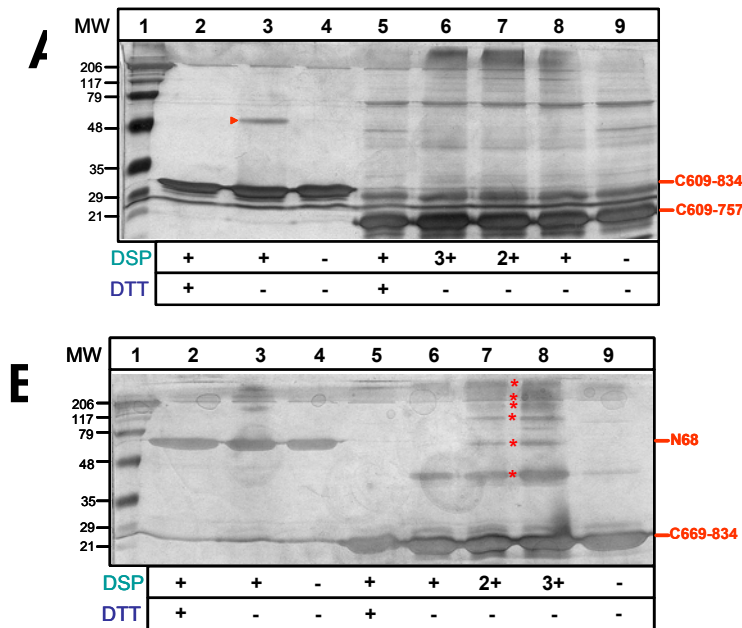
Σχήμα 104: Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διαφόρων παραγώγων του C34. N68 (50 μg), ή C34 (25 μg), ή SecA (50 μg), ή C609-834 (20.6 μg), ή C669-834 (16.1 μg), ή C609-757 (14.7 μg), σε διάλυμα 50mM Tris-CL, 300mM NaCl, και 1mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, φορτώνονται ξεχωριστά σε χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού (στην ίδια κολώνα Superdex-200, διαδοχικά; βλέπε υλικά και μέθοδοι), και τα ίχνη καθενός από τα τρία C34 παράγωγα (α, β, γ) αντιπαραβάλλονται με τα ίχνη του N68, C34, και της SecA. Η AUFS=0.02, ο ρυθμός έκλυσης 0.4ml/min, ενώ ο ρυθμός με τον οποίο τρέχει το καταγραφικό 1cm/min.

παραγώγων ως μονομερή, αλλά εν συνεχεία, λόγω της έκλυσης της μεγαλύτερης ποσότητας των περισσότερων από τις παραπάνω πρωτεΐνες στα αρχικά κλάσματα, που αντιστοιχούν στον void όγκο της κολώνας, χρησιμοποιήθηκε η Superdex 200 που παρουσιάζει διαχωριστική ικανότητα από 10-600kDa, αλλά ο καλύτερος διαχωρισμός πραγματοποιείται για πρωτεΐνες από 30-150kDa δηλαδή σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Καταρχήν φορτώθηκαν σαν μάρτυρες, η SecA, η οποία τρέχει ως γνωστόν σαν διμερές



~200kDa (Karamanou et al., 1999), και η οποία εκλούεται στα 12.88ml (σχήμα 106α, διακεκομμένη μαύρη καμπύλη), το N68, που σε κανονικές συγκεντρώσεις είναι μονομερές (Karamanou et al., 1999), και το οποίο εκλούεται στα 13.36ml (σχήμα 106α, μπλε καμπύλη), και το C34 που είναι κύρια διμερές σε κανονικές συγκεντρώσεις (παρουσιάζει τάση και για ολιγομερισμό; σχήμα 103, πηγαδάκι 3, μπλε βέλος που αυξάνεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις), (Karamanou et al., 1999), και το οποίο εκλούεται στα 14.12ml (σχήμα 104α, πράσινη καμπύλη). Εν συνεχεία υπό τις ίδιες συνθήκες (στο ίδιο διάλυμα 50mM Tris-CL, 300mM NaCL, και 1mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, με τον ίδιο ρυθμό έκλουσης 0.4ml/min, αλλά και τον ίδιο ρυθμό τρεξίματος του καταγραφικού 1cm/min; Βλέπε υλικά και μέθοδοι) φορτώθηκαν τα διάφορα παράγωγα του C34. Διαπιστώθηκε ότι το C609-834 εμφανίζει δύο μέγιστες κορυφές απορρόφησης. Μία στα 13.92ml που αντιστοιχεί στο διμερές (σχήμα 104α, σύγκριση της μικρής κόκκινης κορυφής με την πράσινη κορυφή του διμερούς C34), και άλλη μία μεγαλύτερη στα 15.02ml, που πιθανότατα αντιστοιχεί στο μονομερές (σχήμα 104α, η μεγάλη κόκκινη κορυφή εντοπίζεται στο δεξιό άκρο του διαγράμματος). Όσον αφορά το C669-834, αυτό παρουσιάζει επίσης δύο μέγιστες κορυφές απορρόφησης. Μία στα 13.16ml που αντιστοιχεί σε ολιγομερές (σχήμα 104β, σύγκριση της κόκκινης κορυφής των 13.16ml με την κορυφή της SecA; το μοριακό βάρος του C669-834 είναι 22kDa, και ο void όγκος της κολώνας είναι 7.2ml), και άλλη μία μεγαλύτερη απορρόφηση στα 10.88ml, που αντιστοιχεί σε ολιγομερές υψηλότερης τάξης (σχήμα 104β, πρώτη κόκκινη κορυφή απορρόφησης κατά την έκλυση του C669-834). Μία πολύ μικρότερη κορυφή απορρόφησης παρατηρείται στα 15.2ml και πιθανότατα αντιστοιχεί σε μονομερές (σχήμα 104β, η κορυφή των 15.2 ml εκλούεται κοντά στο τέλος του όγκου έκλουσης της κολώνας). Όσον αφορά τώρα το C609-757, διαπιστώνεται μία κορυφή απορρόφησης στα 15.52ml που αντιστοιχεί σε μονομερή πρωτεΐνη (σχήμα 104γ, η κόκκινη κορυφή του C609-757 εντοπίζεται κοντά στο τέλος του όγκου έκλουσης της κολώνας; το μοριακό βάρος του C609-757 είναι 20kDa). Επομένως τα τελευταία 67 αμινοξέα της C-περιοχής, και κατά συνέπεια η CT-υποπεριοχή της δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον διμερισμό της (το C609-834 είναι διμερές). Από την άλλη απουσία των aa 758-834, δηλαδή της περιοχής IRA1 (aa756-828) δεν σχηματίζονται διμερή (το C609-760 τρέχει σαν μονομερές). Αντίθετα η αλληλουχία 669-834 αρκεί για τον σχηματισμό διμερών, τριμερών, και ποικίλων ολιγομερών μορφών από το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό παράγωγο. Από τα παραπάνω δεν μπορεί να αντιστοιχηθεί η ικανότητα ολιγομερισμού της C-περιοχής αποκλειστικά και μόνο στην IRA1-περιοχή, καθώς δεν καταφέραμε να συλλέξουμε σημαντική ποσότητα για περαιτέρω μελέτη από το παράγωγο C755-834, απουσία σύντηξης με την MBP-πρωτεΐνη (που δυσχεραίνει τα παραπάνω πειράματα). Έτσι λοιπόν παρατηρούμε ότι μόνο η SD και η WD-περιοχές της C-περιοχής δεν αρκούν για το διμερισμό της (C609-760; SD+WD). Η παρουσία όμως στην WD περιοχή και της IRA1, (C669-834; WD+IRA1) αρκεί για τον σχηματισμό ολιγομερών μορφών. Σημειώνεται ότι πιο ακριβείς μετρήσεις του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών επιτυγχάνονται με αναλυτική υπερφυγοκέντρηση (Analytical Ultracentrifugation) των παραπάνω δειγμάτων, μιας και η μετακίνηση των πρωτεϊνών με την μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται μόνο με βάση τη μάζα τους (δεν παίζει ρόλο το σχήμα τους). Τέτοιες μετρήσεις όμως δεν πραγματοποιήθηκαν.

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα χημικής διασύνδεσης (σχήμα 105), με τον χημικό διασυνδετή DSP (dithiobis succinimidyl propionate), που διαθέτει δύο όμοιες ενεργές ομάδες), όπως παρουσιάζεται στα υλικά και μέθοδοι. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χημική διασύνδεση, δεν αντικατοπτρίζει την πραγματική εικόνα



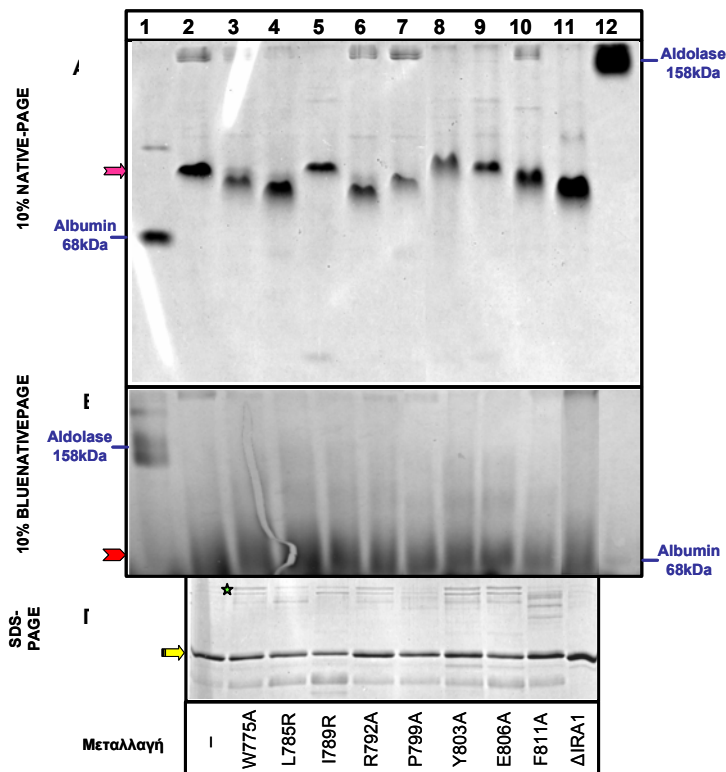
ολιγομερισμού των διάφορων πρωτεϊνικών δειγμάτων, αλλά την εν δυνάμει ικανότητα τους να σχηματίζουν ολιγομερείς μορφές. Παρατηρείται συγκεκριμένα ότι το C609-834 σχηματίζει διμερές (σχήμα 105A, πηγαδάκι 3, το οποίο διασπάται με DTT, πηγαδάκι 2), το C669-834 ολιγομερή (σχήμα 105B, πηγαδάκια 6, 7, και 8, τα οποία διασπώνται με DTT, πηγαδάκι 5), ενώ το C609-760, δεν αλλάζει το πρωτεϊνικό προφίλ του

Σχήμα 105: Μελέτη του ολιγομερισμού των διάφορων παραγώγων του C34 μετά από χημική διασύνδεση με DSP (dithiobis succinimidyl propionate; βλέπε υλικά και μέθοδοι). Συγκεκριμένα σε 8.45μM C609-834 (27A, πηγαδάκια 2 και 3), σε 17.73μM C669-834 (27B, πηγαδάκια 6 και 9), σε 17.5μM C609-757 (27A, πηγαδάκια 5 και 8), και σε 4.41μM N68 (27B, πηγαδάκια 2 και 3), προστίθεται DSP (0.00575μg/ml), σε διάλυμα 50mM Hepes, pH 7.6, 50mM KCL, και 5mM MgCL<sub>2</sub>. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15', και μετά οι αντιδράσεις σταματούν με προσθήκη 125mM Tris-CL, pH 7.6, και επώαση στον πάγο για ακόμη 20'. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση των παραγώγων C669-834 και C609-757, χρησιμοποιείται διπλάσια (0.0115μg/μl; 27B, πηγαδάκι 8 και 27A, πηγαδάκι 6 αντίστοιχα), αλλά και τριπλάσια (0.01725μg/μl; 27B, πηγαδάκι 7 και 27A, πηγαδάκι 7 αντίστοιχα) συγκέντρωση DSP. Τα διάφορα σύμπλοκα χημικής διασύνδεσης που διασπώνται με DTT (80mM; 30', 37°C; πηγαδάκι 2, στο A, και πηγαδάκι 5 στο B), σημειώνονται είτε με κόκκινο βέλος (26A, πηγαδάκι 3), είτε με κόκκινα αστεράκια (26B, πηγαδάκι 8). Στα πηγαδάκια 4 και 9 στο A, αλλά και στα πηγαδάκια 4 και 9 στο B, δεν προστίθεται ούτε DSP, ούτε DTT. Στο πηγαδάκι 1, φορτώνονται μοριακοί δείκτες (μεγέθη σε kDa). Τα δείγματα υπόκεινται σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE; 15% πήκτωμα ακρυλαμίδης), και ακολουθεί χρώση αργύρου (silver staining; βλέπε υλικά και μέθοδοι).

παρουσία και απουσία DSP (σχήμα 105A, πηγαδάκια 5, 6, 7, και 8), όπως και η πρωτεΐνη αναφοράς (control) N68 (σχήμα 105B, πηγαδάκια 2 και 3), που δεν διμερίζεται (Karamanou et al., 1999), παρά μόνο σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (Dempsey et al., 2002).

Απ' όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η IRA1 περιοχή είναι απαραίτητη για την ικανότητα ολιγομερισμού της C-περιοχής της SecA. Το C669-834 που αποτελείται από την WD και IRA1-περιοχές σχηματίζει ολιγομερή, ενώ το C609-757 από το οποίο απουσιάζει η IRA1-περιοχή, αλλά αποτελείται από την SD και WD-περιοχές, είναι μονομερές. Επειδή όπως είπαμε, δεν καθαρίστηκαν επαρκείς ποσότητες για βιοχημικές μελέτες από το C753-834 που αποτελείται μόνο από την IRA1-περιοχή, δεν μπορούμε να συμπεράνουμε πέραν πάσης αμφιβολίας ότι η IRA1-περιοχή είναι αρκετή ή απαιτείται και η WD-περιοχή για την τάση ολιγομερισμού της C-περιοχής. Το σίγουρο είναι πάντως ότι απουσία IRA1 η C-περιοχή δεν μπορεί να δώσει ολιγομερείς μορφές. Διαπιστώθηκε ακόμα ότι αν λείπει η CT-περιοχή της SecA, παρατηρείται μία σταθεροποίηση των διμερών μορφών της C-περιοχής και δεν παρατηρούνται ολιγομερή, όπως διαπιστώνεται από το προφίλ σε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση του C609-834, από το οποίο απουσιάζει η CT-περιοχή του C34, σε σχέση με το προφίλ του C34 στην ίδια ηλεκτροφόρηση (σχήμα 103, στο πηγαδάκι 6 δημιουργείται μόνο διμερές C609-834, ενώ στο πηγαδάκι 3 υφίσταται και διμερές και ολιγομερές C34, κόκκινο και μπλε βελάκι αντίστοιχα). Αν απουσιάζει τέλος και η SD-περιοχή μαζί με την CT-περιοχή (αλλά παραμένει η IRA1-περιοχή), ενισχύεται η τάση της C-περιοχής προς ολιγομερή αντί μόνο για διμερή. Το C609-834 σχηματίζει "σκάλα" από πρωτεϊνικές ζώνες κατά την διάρκεια μη αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης, ενώ το C609-834 μόνο ένα διμερές (σχήμα 103 πηγαδάκια 4, και 6 αντίστοιχα).

Αφού η IRA1 περιοχή εμπλέκεται στην ικανότητα διμερισμού της πρωτεΐνης, εξετάστηκαν οι επιδράσεις των διάφορων IRA1 σημειακών μεταλλαγών στην ικανότητα διμερισμού του C34 πεπτιδίου. Τα ποικίλα C34IRA1 πεπτιδία φορτώνονται πρώτα σε 15% αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (σχήμα 106Γ, το κίτρινο βέλος υποδεικνύει την θέση του C34WT πεπτιδίου), προκειμένου να πιστοποιηθεί η ομοιότητα των ποσοτήτων τους, που στη συνέχεια φορτώνονται σε πολλαπλάσια τιμή στα επόμενα πηκτώματα. Σημειώνεται ότι σ' όλες τις περιπτώσεις είναι εμφανής και η παρουσία διμερούς C34IRA1 πεπτιδίου (σχήμα



Σχήμα 106: Ρόλος της IRA1-περιοχής στον ολιγομερισμό της C34-περιοχής της SecA. Τα καθαρισμένα πολυπεπτίδια C34IRA1 φορτώνονται διαδοχικά σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης (10% NATIVE-PAGE; A; 10μg), σε μπλε μη αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης (10% BLUE-NATIVE-PAGE; B; 10μg), και σε αποδιατακτικό πήκτωμα 15% ακρυλαμίδης (15% SDS-PAGE; Γ; 2.5μg), και χρωματίζονται με Coomassie. Στα παραπάνω πάνελ σημειώνεται η θέση που τρέχει το πεπτικό C34WT στα παραπάνω πηκτώματα με ροζ, κόκκινο και κίτρινο βέλος αντίστοιχα, ενώ σημειώνονται και οι θέσεις των πρωτεϊνικών μαρτύρων της Αλδολάσης (158kDa), και της Αλβουμίνης (68 kDa).

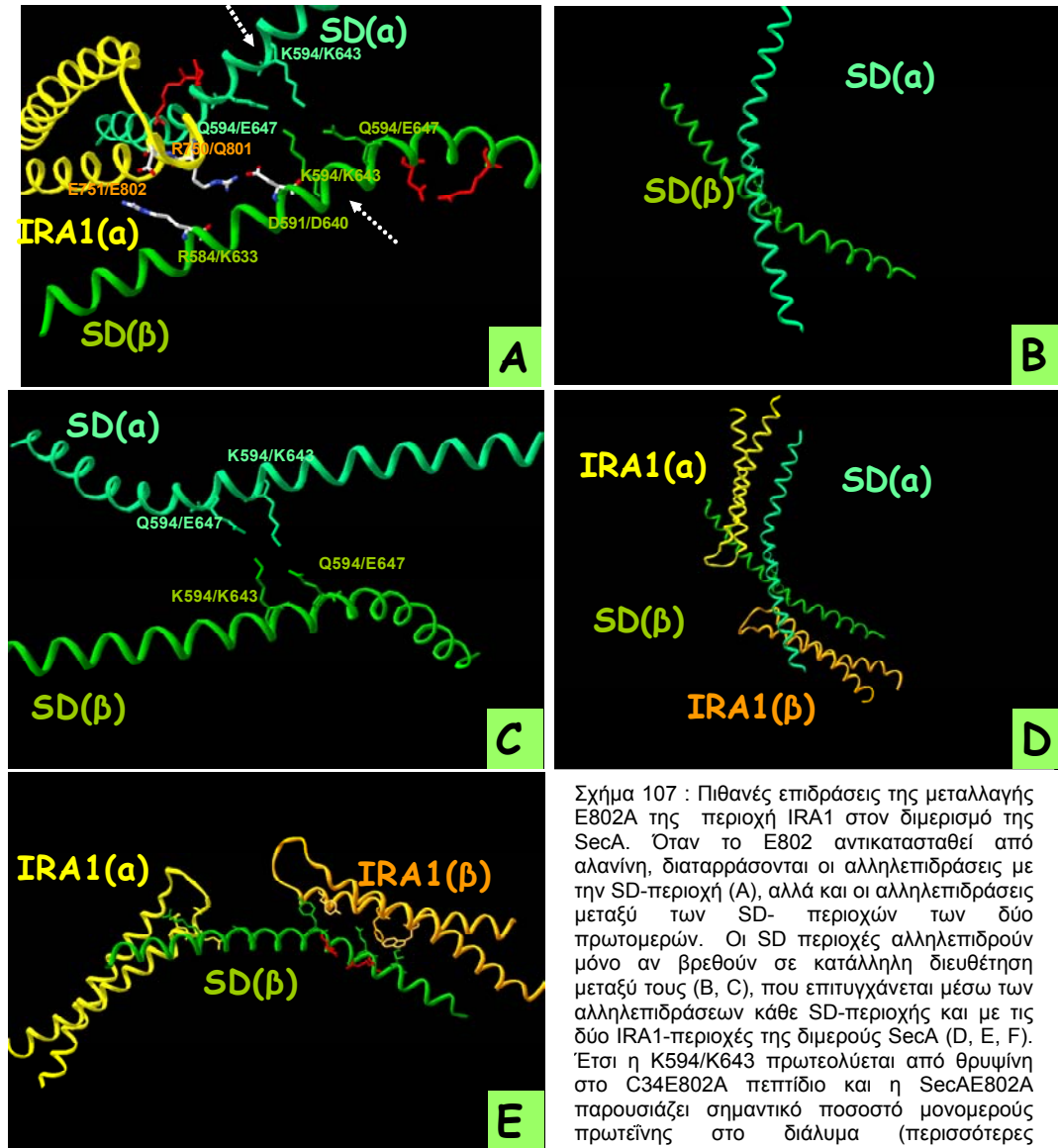
106Γ, πράσινο αστεράκι). Προκειμένου να διερευνηθεί αν οι IRA1 μεταλλαγές επιδρούν στον διμερισμό του C34, τα

διάφορα C34IRA1 πεπτίδια φορτώθηκαν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (σχήμα 106A). Διαπιστώθηκε ότι εκτός από τα C34I789R και C34E806A πεπτίδια (σχήμα 106, πηγαδάκια 5 και 9), όλα τα υπόλοιπα C34IRA1 παράγωγα τρέχουν ή χαμηλότερα (σχήμα 106A, πηγαδάκια 3, 4, 6, 7, 10, και 11) ή υψηλότερα (C34Y803A; σχήμα 106, πηγαδάκι 8), από το C34WT (σχήμα 106A, πηγαδάκι 2, με ροζ βέλος σημειώνεται η θέση που τρέχει το C34WT), υποδηλώνοντας διαφορά στο μέγεθος (που παραπέμπει σε διαφορά στην τάση ολιγομερισμού της C-περιοχής), ή στο φορτίο, ή στο σχήμα, ή και στα τρία, των C34IRA1 μεταλλαγών. Τρέξιμο των παραπάνω δειγμάτων σε χρωματογραφία αποκλεισμού, και πολύ περισσότερο σε αναλυτική υπερφυγοκέντρωση, που θα απαντούσε στο ερώτημα της αλλαγής στον ολιγομερισμό της C-περιοχής από τις διάφορες IRA1 μεταλλαγές, δεν πραγματοποιήθηκε. Πραγματοποιήθηκε μόνο μπλε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των παραπάνω C34IRA1 πεπτιδίων, η οποία δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στο τρέξιμο τους, και άρα στο μέγεθος (που παραπέμπει στον ολιγομερισμό τους), και στο σχήμα τους (σχήμα 106B, το κόκκινο βέλος υποδεικνύει την θέση που τρέχει το C34WT).

Μπορεί οι διάφορες IRA1 μεταλλαγές στα C34 πεπτίδια να μην προκαλούν έντονες τουλάχιστον αλλαγές στον ολιγομερισμό της C-περιοχής, όμως η ανάλυση της δομής της SecA, τόσο από το *Bacillus subtilis*, όσο και από το *Mycobacterium tuberculosis* (Εισαγωγή σχήμα 47, 48 και Κεφάλαιο III), έδειξε ότι η περιοχή IRA1 εμπλέκεται στον διμερισμό της SecA, όπως και η SSD-περιοχή (Κεφάλαιο 3.4). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η περιοχή IRA1 του ενός πρωτομερούς της *bsSecA*, και κατ' αναλογία και της *ecSecA*, SecA(α), αλληλεπιδρά με την περιοχή SD του δεύτερου πρωτομερούς, SecA(β), (σχήμα 107). Μάλιστα βρέθηκε ότι τα αμινοξέα R750/Q801 και E751/E802 (*bsSecA/ ecSecA*) της IRA1περιοχής του ενός πρωτομερούς, πιθανότατα σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις δεσμού άλατος ή van der Waals αντίστοιχα, με τα αμινοξέα R584/K633 και D591/D640 της περιοχής SD του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα 107A). Έτσι η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος, στη θέση 751/802 από αλανίνη, αναμένεται να διαταράσσει την παραπάνω αλληλεπιδράση της IRA1 με την SD-περιοχή (σύμφωνα με το *rdB viewer* πρόγραμμα, Κεφάλαιο 3.4). Ταυτόχρονα, όπως είδαμε στο προηγούμενο Κεφάλαιο, το πεπτικό C34E802A, που φέρει την παραπάνω αμινοξική αντικατάσταση, κατά την διάρκεια του καθαρισμού του πρωτεολύεται (σχήμα 102 και 103), στο αμινοξύ K594/K643 της SD περιοχής (που είναι κοντά στα αμινοξέα με τα οποία η SD-περιοχή αλληλεπιδρά με την περιοχή IRA1), το οποίο ευρισκόμενο στο ένα πρωτομερές της SecA, σχηματίζει εν δυνάμει, δεσμό άλατος με το Q598/E647 της SD περιοχής του άλλου πρωτομερούς (σχήμα 107A). Στην περίπτωση της E751A/E802A μεταλλαγής λοιπόν, που αναμένεται ότι διαταράσσεται η επικοινωνία της IRA1-περιοχής του πρώτου μονομερούς, με την SD-περιοχή του δεύτερου μονομερούς της SecA, πιθανολογείται ότι διαταράσσεται και η



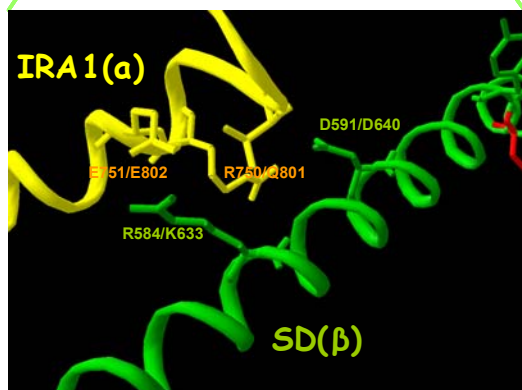
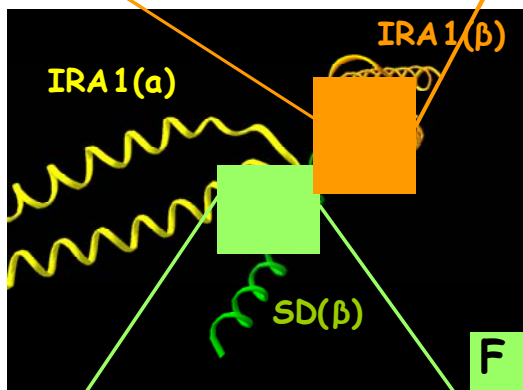
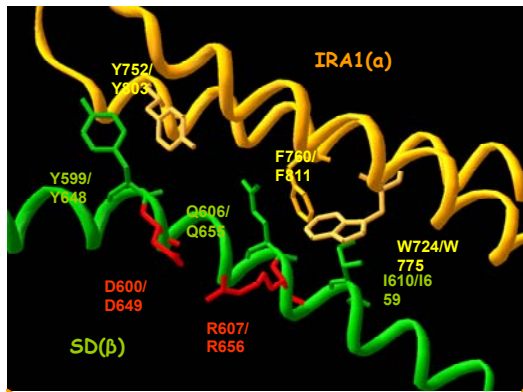
επικοινωνία μεταξύ των SD περιοχών των δύο μονομερών. Αυτή η διαταραχή θα μπορούσε



Σχήμα 107 : Πιθανές επιδράσεις της μεταλλαγής E802A της περιοχή IRA1 στον διμερισμό της SecA. Όταν το E802 αντικατασταθεί από αλανίνη, διαταρράσσονται οι αλληλεπιδράσεις με την SD-περιοχή (A), αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των SD- περιοχών των δύο πρωτομερών. Οι SD περιοχές αλληλεπιδρούν μόνο αν βρεθούν σε κατάλληλη διεύθυνση μεταξύ τους (B, C), που επιτυγχάνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων κάθε SD-περιοχής και με τις δύο IRA1-περιοχές της διμερούς SecA (D, E, F). Έτσι η K594/K643 πρωτεολύεται από θρυψίνη στο C34E802A πεπτιδίο και η SecAE802A παρουσιάζει σημαντικό ποσοστό μονομερούς πρωτεΐνης στο διάλυμα (περισσότερες πληροφορίες στο κείμενο).

να επιτρέπει στην θρυψίνη να πρωτεολύσει την SD-περιοχή στην θέση K594/K643, που τώρα δεν αλληλεπιδρά με το Q598/E647, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του C34E802A πολυπεπτιδίου. Συγκεκριμένα για να επικοινωνήσουν οι δύο έλικες του SD, δηλαδή η SD(a) και η SD(b) (σχήμα 107B, C) πρέπει να υφίστανται οι αλληλεπιδράσεις κάθε μιας SD-υποπεριοχής τόσο με την IRA1-περιοχή του ίδιου, αλλά και με την IRA1-περιοχή του άλλου πρωτομερούς (σχήμα 107D, E, F). Διαφορετικά απομακρύνεται η κάθε μεγάλη έλικα της SD(a) και SD(b) προς την NBD-IRA2-περιοχή με την οποία αλληλεπιδρά με πολλαπλές ισχυρές αλληλεπιδράσεις όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 3.4, και διακόπτονται οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

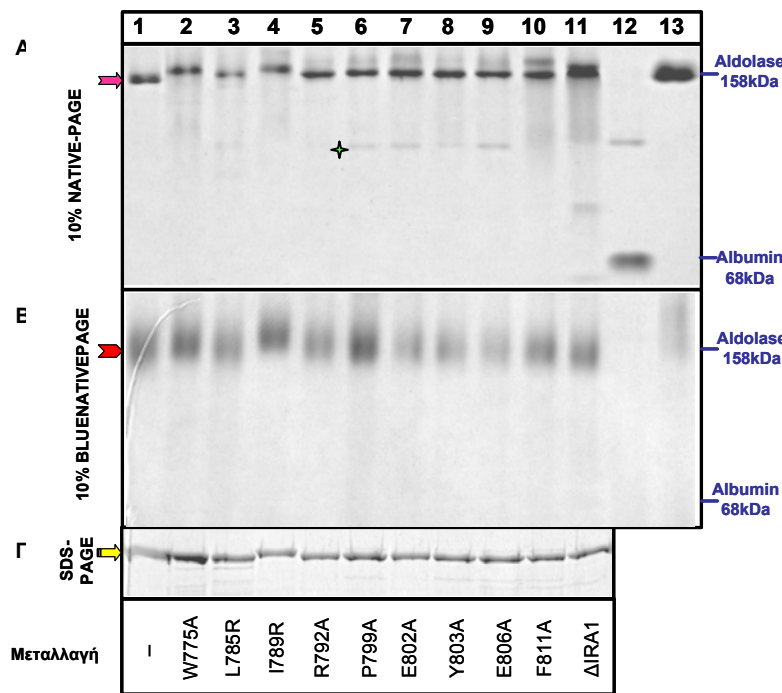
Σημειώνεται επίσης ότι η περιοχή IRA1 του ενός πρωτομερούς, επικοινωνεί με την περιοχή NBD του άλλου πρωτομερούς (μόνο στην δομή της *bsSecA*, Κεφάλαιο 3.4). Μάλιστα διαφαίνεται η δημιουργία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης μεταξύ της F760/F811 της IRA1, με την L5/L6 της NBD-περιοχής. Η αλληλεπίδραση αυτή διαταράσσεται στην περίπτωση της αμινοξικής αντικατάστασης της φαινυλανανίνης στην θέση 760/811 από αλανίνη (Κεφάλαιο 3.4), ενώ οι Or et al., 2002 (βλέπε και Εισαγωγή) έδειξαν ότι πολλαπλές σημειακές μεταλλαγές στην ευρύτερη περιοχή της παραπάνω φαινυλανανίνης, μονομερίζουν την SecA. Από την άλλη μεριά σύμφωνα με την δομή της *mtSecA*, διαφαίνεται ότι η IRA1(α)-περιοχή (η λούπα της συγκεκριμένα) επικοινωνεί μέσω διαφορετικού αμινοξέος με την SD(β)-περιοχή (Κεφάλαιο 3.4), ενώ η έλικα 1 της IRA1(α)-περιοχής επικοινωνεί με την IRA2(β)-περιοχή (Κεφάλαιο 3.4).



Επομένως με βάση τα παραπάνω, φάνηκε ενδιαφέρουσα η εξέταση του ρόλου της IRA1-περιοχής, άμεσα πλέον, στον διμερισμό των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών, και αρχικά στα διμερή σταθερής κατάστασης των παραπάνω πρωτεϊνών. Προς τούτο οι SecAIRA1 πρωτεΐνες φορτώθηκαν καταρχήν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (σχήμα 108Α), και παράλληλα το ¼ της ποσότητας τους φορτώθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (σχήμα 108Γ, με κίτρινο βέλος σημειώνεται η θέση που τρέχουν οι SecAIRA1 πρωτεΐνες), για να επιβεβαιωθεί η ομοιότητα των φορτωμένων ποσοτήτων των παραπάνω δειγμάτων. Διαπιστώθηκε ότι όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες (σχήμα 108Α, πηγαδάκια 2-11) τρέχουν σε κάποιο βαθμό διαφορετικά από την SecAWT (σχήμα 108Α, πηγαδάκι 1, με ροζ βέλος υποδεικνύεται η θέση που τρέχει η SecAWT), και συγκεκριμένα καθυστερούν ασθενώς στην μετατόπιση τους, σε σχέση με την SecAWT, με ενδεικτικότερους αντιπροσώπους τις SecAW775A, και SecAI789R (σχήμα 108Α, πηγαδάκι 2 και 4). Μία τέτοια αλλαγή όμως θα μπορούσε να οφείλεται σε αλλαγή του επιφανειακού φορτίου των SecAIRA1 πρωτεϊνών, ή του σχήματος τους, και όχι απαραίτητα σε αλλαγή του μεγέθους τους, που παραπέμπει σε διαταραχή της κατάστασης ολιγομερισμού τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο μη αποδιατακτικό πήκτωμα είναι προφανής η παρουσία πρωτεϊνικής ζώνης που θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε μονομερή SecAIRA1 (σχήμα 108Α, πηγαδάκια 6-9, πράσινο αστεράκι). Μάλιστα η ζώνη αυτή ανιχνεύεται με αντίσωμα έναντι της

SecA, α-SecA, δεν μπορεί όμως να αποδειχθεί ότι αντιστοιχεί σε μονομερή πρωτεΐνη.

Για να διερευνηθεί αν η ποικιλότητα στο τρέξιμο των SecAIRA1 πρωτεϊνών στο παραπάνω μη αποδιατακτικό πήκτωμα, οφείλεται όχι σε διαφορετικό φορτίο, αλλά σε διαφορετικό μέγεθος ή σχήμα, οι πρωτεΐνες αυτές φορτώθηκαν εν συνεχεία και σε μπλε μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (σχήμα 108B, με κόκκινο βέλος σημειώνεται η θέση που τρέχει η SecAWT. Παρατηρήθηκε ότι όλες οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (σχήμα 108B, πηγαδάκια 2-11) μετατοπίζονται παρόμοια με την SecAWT (σχήμα 108B, πηγαδάκι 1), με εξαίρεση ίσως την SecAI789R (σχήμα 108B, πηγαδάκι 4), που φαίνεται να καθυστερεί στην μετακίνηση της στο παραπάνω πήκτωμα. Όλες λοιπόν οι παραπάνω SecAIRA1 πρωτεΐνες, με βάση τουλάχιστον την παραπάνω ποιοτική μέθοδο είναι κύρια διμερείς. Όσον αφορά την SecAI789R, που εξακολουθεί να μετατοπίζεται πιο αργά και στο μπλε μη αποδιατακτικό πήκτωμα, και άρα δεν φταίει γι' αυτό το διαφορετικό επιφανειακό της φορτίο, δεν είναι ξεκάθαρο αν αλλάζει η κατάσταση ολιγομερισμού της, ή απλά και μόνο το σχήμα της, από την παρουσία της συγκεκριμένης IRA1 μεταλλαγής.



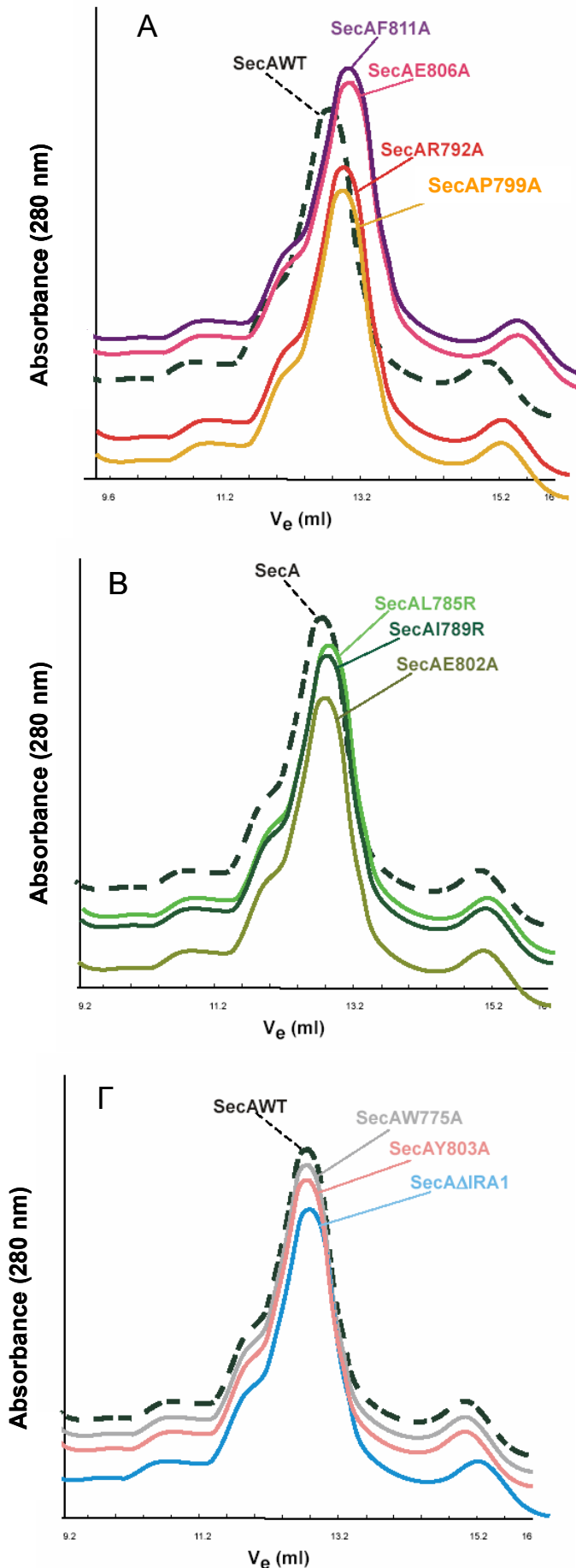
Ακολούθως οι SecAIRA1 μεταλλαγές φορτώθηκαν και σε χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού (Superdex 200; Βλέπε υλικά και μέθοδοι; σχήμα 109), για ακόμα πιο εμπειριστωμένη μελέτη της ολιγομερικής δομής τους, οπότε και διαπιστώθηκε για ορισμένες τουλάχιστον απ' αυτές μία μετατόπιση της κύριας κορυφής της απορρόφησης τους σε μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Έτσι ενώ η SecAWT σε 50mM Tris-CL, 400mM NaCL,

Σχήμα 108 : Ρόλος της IRA1-περιοχής στον ολιγομερισμό της SecA. Οι καθαρισμένες SecAIRA1 πρωτεΐνες φορτώνονται διαδοχικά σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης (10% NATIVE-PAGE; A; 10μg), σε μπλε μη αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης (10% BLUE-NATIVE-PAGE; B; 10μg), και σε αποδιατακτικό πήκτωμα 10% ακρυλαμίδης (10% SDS-PAGE; Γ; 2.5μg), και χρωματίζονται με Coomassie. Στα παραπάνω πάνελ σημειώνεται η θέση που τρέχει η SecAWT στα παραπάνω πηκτώματα με ροζ, κόκκινο και κίτρινο βέλος αντίστοιχα, ενώ σημειώνονται και οι θέσεις των πρωτεϊνικών μαρτύρων της Αλδολάσης (158kDa), και της Αλβουμίνης (68 kDa).

και 5mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, με ρυθμό έκλουσης 0.5ml/min, και ρυθμό τρεξίματος του καταγραφικού 1cm/min, εκλούεται στα 12.68ml (σχήμα109; στο σχήμα 104, η SecA εκλούεται στα12.88ml, αφού παρουσιάζει μεγάλη πλαστικότητα και τρέχει διαφορετικά σε διαφορετικό διάλυμα και με διαφορετικό ρυθμό έκλουσης), οι SecAR792A, SecAP799A, SecAE806A, και SecAF811A, εκλούνται αντίστοιχα στα 12.93ml για τις δύο πρώτες, και στα 12.95ml για την τρίτη αντίστοιχα (σχήμα 109A). Λιγότερο έντονες διαφορές στην έκλουση τους παρατηρούνται για τις SecAL785R, SecAI789R, και την SecAE802A, που εκλούνται στα 12.83, 12.8 και 12.78ml αντίστοιχα (σχήμα 109B). Αξίζει να σημειωθεί ότι η SecAW775A, όπως και η SecAY803A, εκλούνται στα ίδια ml με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη, ενώ η SecAΔIRA1 από την οποία απουσιάζουν 13 αμινοξέα της SecA (αλλά έχουν προστεθεί άλλα 5) εκλούεται στα 12.7ml (σχήμα 109Γ). Και σ' αυτή την περίπτωση όμως δεν μπορεί κανείς να είναι σίγουρος για το αν η έκλουση σε αυξημένο όγκο παραπέμπει σε διαταραχή του ολιγομερισμού των παραπάνω πρωτεϊνών, ή απλά σε αλλαγή του σχήματος τους, λόγω των διαφόρων μεταλλαγών.

Γ' αυτό το λόγο τουλάχιστον ορισμένες από τις παραπάνω πρωτεΐνες φορτώνονται σε αναλυτική υπερφυγοκέντρωση (Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν από...; Βλέπε υλικά και μέθοδοι), για να μελετηθεί απευθείας η αλλαγή ή όχι της μάζας-μεγέθους τους, και άρα η διαταραχή ή όχι της κατάστασης ολιγομερισμού τους, αλλά και για να γίνει και ποσοτικός προσδιορισμός αυτών των υποτιθέμενων αλλαγών (από τον υπολογισμό του

Σχήμα 109: Διερεύνηση της κατάστασης ολιγομερισμού των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών. Οι μεταλλαγές αυτές σε διάλυμα 50mM Tris-CL pH 8, 400mM NaCL, και 5mM β-Μερκαπτοαιθανόλη, φορτώνονται ξεχωριστά σε χρωματογραφία μεγέθους αποκλεισμού (στην ίδια κολώνα Superdex-200, διαδοχικά; βλέπε υλικά και μέθοδοι), και τα ίχνη τους, ανάλογα με την συμπεριφορά έκλουσης τους αντιπαραβάλλονται με τα ίχνη της SecAWT (καμπύλη με μαύρη διακεκομμένη γραμμή). Έτσι στο διάγραμμα A απεικονίζεται το προφίλ απορρόφησης των SecAR792A (140μg), SecAP799A (133 μg), SecAE806A (200 μg), και SecAF811A (150 μg), που εκλούνται σε αυξημένο όγκο, έως και 0.27ml, σε σχέση με την SecAWT. Στο διάγραμμα B απεικονίζεται το προφίλ απορρόφησης των SecAL785R (200μg), SecAI789R (200 μg), και SecAE802A (200 μg), που εκλούνται σε λιγότερο από προηγουμένως, αλλά επίσης αυξημένο όγκο, έως και 0.15ml, σε σχέση με την SecAWT. Τέλος στο διάγραμμα Γ, απεικονίζεται το προφίλ απορρόφησης των SecAW775A (200μg), SecAY803A (200 μg), και SecAΔIRA1 (150 μg), που εκλούνται όπως και η SecAWT, με την κορυφή απορρόφησης της SecAΔIRA1, να είναι ελαφρώς μετατοπισμένη προς τα δεξιά (εκλούεται σε αυξημένο όγκο κατά 0.02ml σε σχέση με την SecAWT). Η AUFS=0.1, ο ρυθμός έκλουσης 0.5ml/min, ενώ ο ρυθμός με τον



συντελεστή καθίζησης τους  $s$ , sedimentation velocity), και να διερευνηθεί η δυναμική της ολιγομερικής δομής τους. Συγκεκριμένα με ολική οριακή ανάλυση των φασμάτων απορρόφησης (Stafford, 1992; Philo, 2000; Shuck, 2000; Βλέπε υλικά και μέθοδοι), διαπιστώθηκε ότι τόσο η SecAWT, όσο και η SecAE802A, συγκροτούνται τόσο σε μονομερή, διμερή, και τετραμερή, αλλά διαφέρουν ως προς την διασπορά των παραπάνω μορφών τους, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ειδικότερα, ενώ το 40% της SecAWT είναι διμερής και το 38% μονομερής, το 60% της SecAE802A ανιχνεύεται σε μονομερή μορφή, και μόνο το 19.4% σε διμερή.

Επομένως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της περιοχής IRA1 του ενός πρωτομερούς της SecA, με την περιοχή SD του άλλου πρωτομερούς, πρέπει να συντελούν στην ρύθμιση της ισορροπίας του μονομερούς-διμερούς στην SecA.

Από την άλλη μεριά η αναλυτική υπερφυγοκέντρωση της SecAW775A έδειξε ότι είναι ενισχυμένο το ποσοστό του τετραμερούς της, και άρα μιλάμε πάλι για διαταραχή της ισορροπίας ολιγομερισμού της SecA, και ειδικότερα της ισορροπίας διμερούς-τετραμερούς, από μεταλλαγή στην IRA1-περιοχή. Στην περίπτωση αυτή βέβαια δεν προβλέπεται αλλαγή στην αλληλεπίδραση της IRA1-περιοχής του ενός πρωτομερούς, με την SD-περιοχή του άλλου πρωτομερούς, παρά μόνο μεταξύ της IRA1-SD του ίδιου πρωτομερούς (Κεφάλαιο 3.4). Αναμένεται πάντως και αυτή η IRA1 μεταλλαγή να οδηγεί τελικά σε διαταραχή της επικοινωνίας των δύο μονομερών, και κατά συνέπεια σε ενίσχυση του τετραμερισμού.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η περιοχή IRA1, ρυθμίζει την κατάσταση ολιγομερισμού της SecA πρωτεΐνης, πιθανότατα μέσω διαταραχής της αλληλεπίδρασης της IRA1-περιοχής της SecA(α), με την SD-περιοχή της SecA(β). Μπορεί όμως η IRA1-περιοχή να τροποποιεί την ολιγομερική δομή της SecA επιδρώντας στην επικοινωνία της IRA1 της SecA(α), με την NBD-

περιοχή της SecA(β), ή στην επικοινωνία της IRA1(α) με την IRA2(β)-περιοχή (7ε) (Κεφάλαιο 3.4).

Μελετώντας όμως την δομή της *bsSecA*, προτείνεται ότι εναλλακτικά η περιοχή IRA1 μπορεί να επηρεάζει τον διμερισμό της SecA, επιδρώντας πρώτα στην διαμόρφωση της περιοχής SSD της SecA(α) και εν συνεχεία στην επικοινωνία της SSD-περιοχής με την IRA2-περιοχή, ή με την SD-περιοχή της SecA(β) (Κεφάλαιο 3.4). Ακόμα η περιοχή IRA1, θα μπορούσε να επεμβαίνει στον ολιγομερισμό της SecA, επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση της SD-περιοχής της SecA(α), με την περιοχή NBD, ή την περιοχή SD της SecA(β), μετά την τροποποίηση της δομής της SD-περιοχής της SecA(α) (Κεφάλαιο 3.4). Τέλος μπορεί οι IRA1 μεταλλαγές να επιδρούν και στην σχέση της IRA2-περιοχής της SecA(α), με την WD-περιοχή της SecA(β) (Κεφάλαιο 3.4).

Εν παραλλήλω μετρήσεις των SecAIRA1 πρωτεϊνών με σκέδαση των ακτίνων X υπό μικρή γωνία, SAXS (Small Angle X ray Scattering), σε διάλυμα, από τον Brian Shilton, έδειξαν ότι οι τάξης II μεταλλαγές (SecAW775A, και SecAF811A), που αφορούν αλληλεπιδράσεις της IRA1-περιοχής με την περιοχή του SD, αλλά και η SecAΔIRA1, που όλες μαζί χαρακτηρίζονται από υψηλή ATPάση σε διάλυμα, και αδυναμία συγκρότησης σταθερού συμπλόκου με το N68 στην C34 μορφή τους, παρουσιάζουν αυξημένη Rg (Radius of gyration) σε σχέση με την SecAWT. Συγκεκριμένα η Rg αυξάνεται από 4.2 σε 4.4 nm για τις SecAW775A και SecAΔIRA1, ενώ είναι λιγότερο αυξημένη για την SecAF811A. Πάντως και οι τρεις παραπάνω μεταλλαγές φαίνεται να οδηγούν σε πιο εκτεταμένη δομή της SecA, σε σχέση μ' αυτή που παρατηρείται στην αγρίου τύπου πρωτεΐνη (η αλλαγή της καμπυλότητας ποιοτικά ομοιάζει με την αλλαγή της πρωτεΐνης MBP καθώς πηγαίνει από την κλειστή (σφαιρική) στην ανοιχτή (εκτεταμένη) της δομή), και αποτελούν την ομάδα I των SecAIRA1 πρωτεϊνών. Πιο εκτεταμένη όμως δομή παραπέμπει σε ενισχυμένη παρουσία τετραμερούς και άρα επίπτωση στην κατάσταση ολιγομερισμού των πρωτεϊνών, όπως διαπιστώθηκε και με την αναλυτική υπερφυγοκέντρωση, τουλάχιστον για την SecAW775A πρωτεΐνη. Η ομάδα II περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μικρότερες αλλαγές στην διαμόρφωση τους, που κυμαίνονται μεταξύ αυτών που παρατηρούνται στην SecAWT και τις πρωτεΐνες της ομάδας I. Εδώ ανήκουν η SecAE802 (για την οποία με αναλυτική υπερφυγοκέντρωση διαπιστώθηκε ενίσχυση της μονομερούς μορφής της πρωτεΐνης), που επίσης επιδρά στην αλληλεπίδραση της περιοχής IRA1 με την περιοχή του SD, του άλλου όμως πρωτομερούς, η SecAP799A, και ίσως και η SecAI789R, μιας σε μεγάλες γωνίες σκέδασης η τελευταία παρουσιάζει περίεργη εικόνα. Τέλος στην ομάδα III, ανήκουν η SecAY803A, και ίσως η SecAR792A (πάλι σε μεγάλες γωνίες σκέδασης παρουσιάζει περίεργη εικόνα), που δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην διαμόρφωση τους σε σχέση με την SecAWT, και αποτελούν αρνητικά control της παραπάνω διαδικασίας. Διαφαίνεται από τις παραπάνω μετρήσεις ότι οι SecAIRA1 πρωτεΐνες που επηρεάζουν την επικοινωνία της περιοχής IRA1 με την περιοχή του SD, του ίδιου ή του άλλου πρωτομερούς, είναι αυτές που υφίστανται τροποποίηση πιθανά στον ολιγομερισμό τους.

Απ' όλα τα παραπάνω αναμένεται επίδραση της IRA1-περιοχής στην ολιγομερική δομή της SecA.

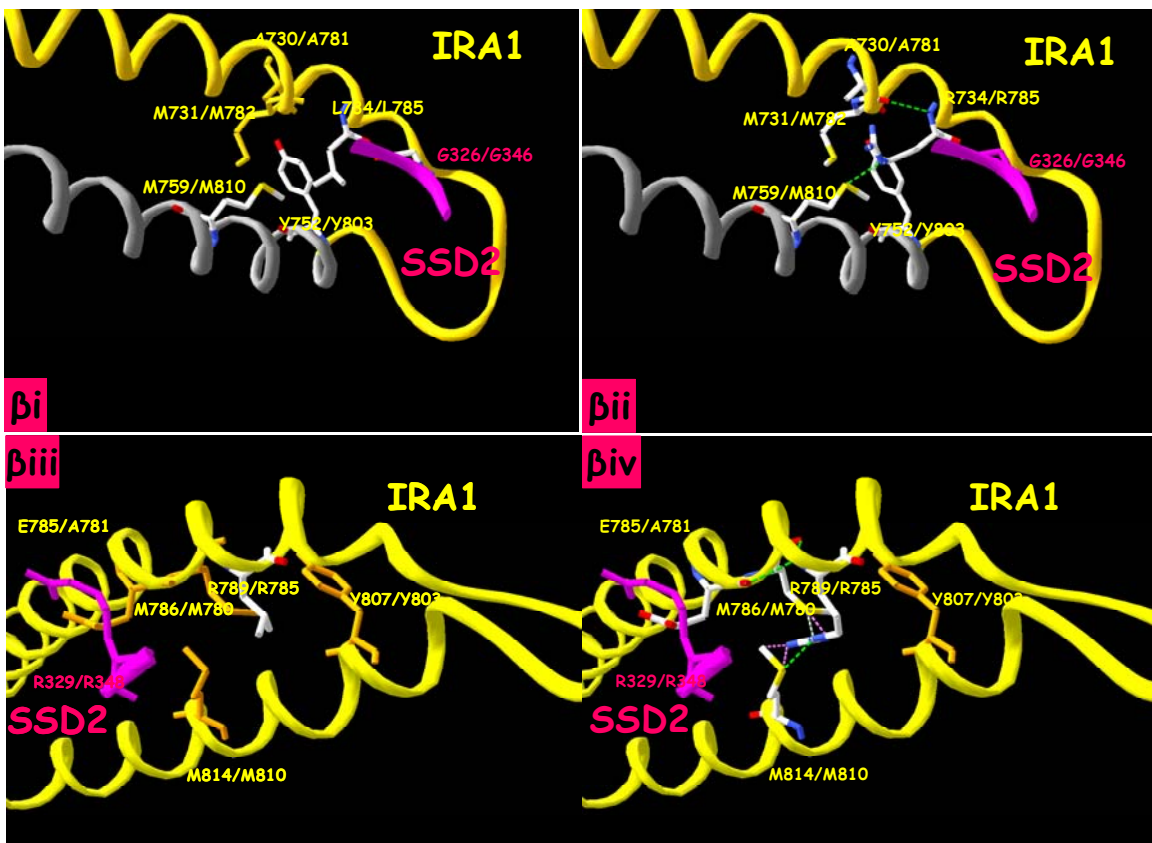
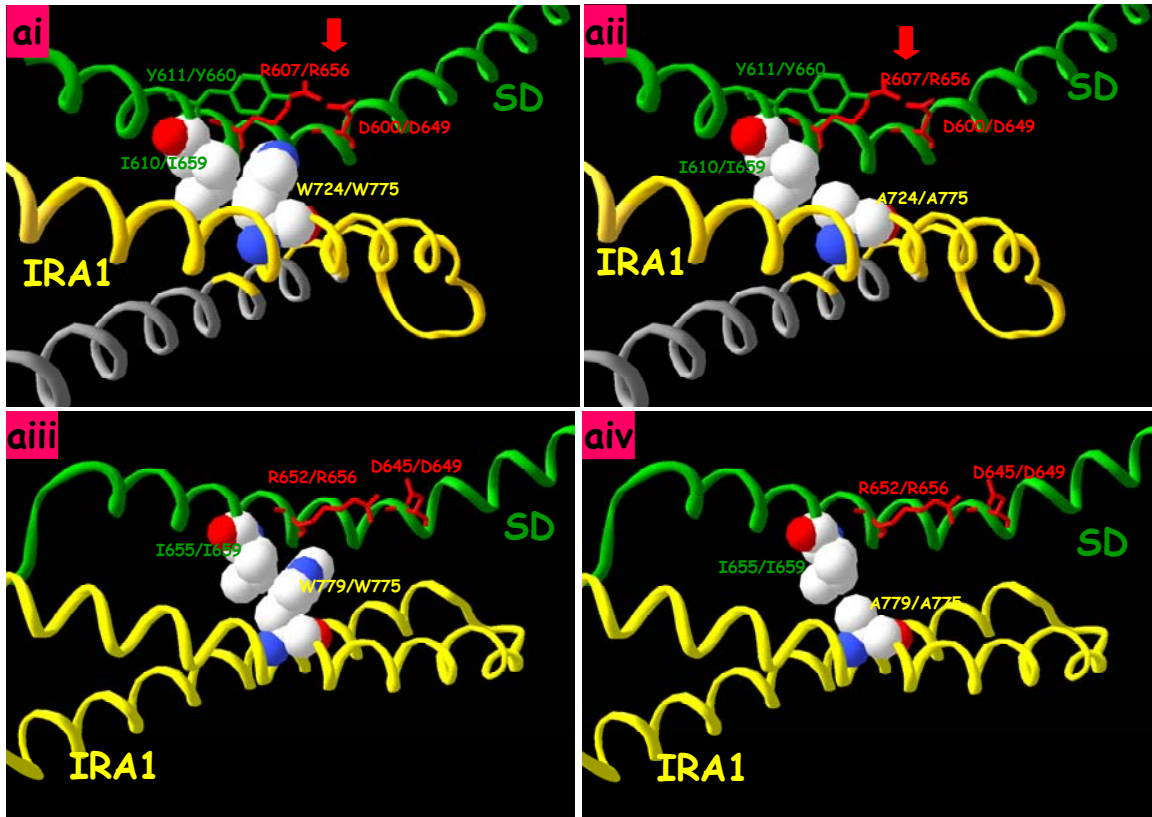
### 3.4. ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

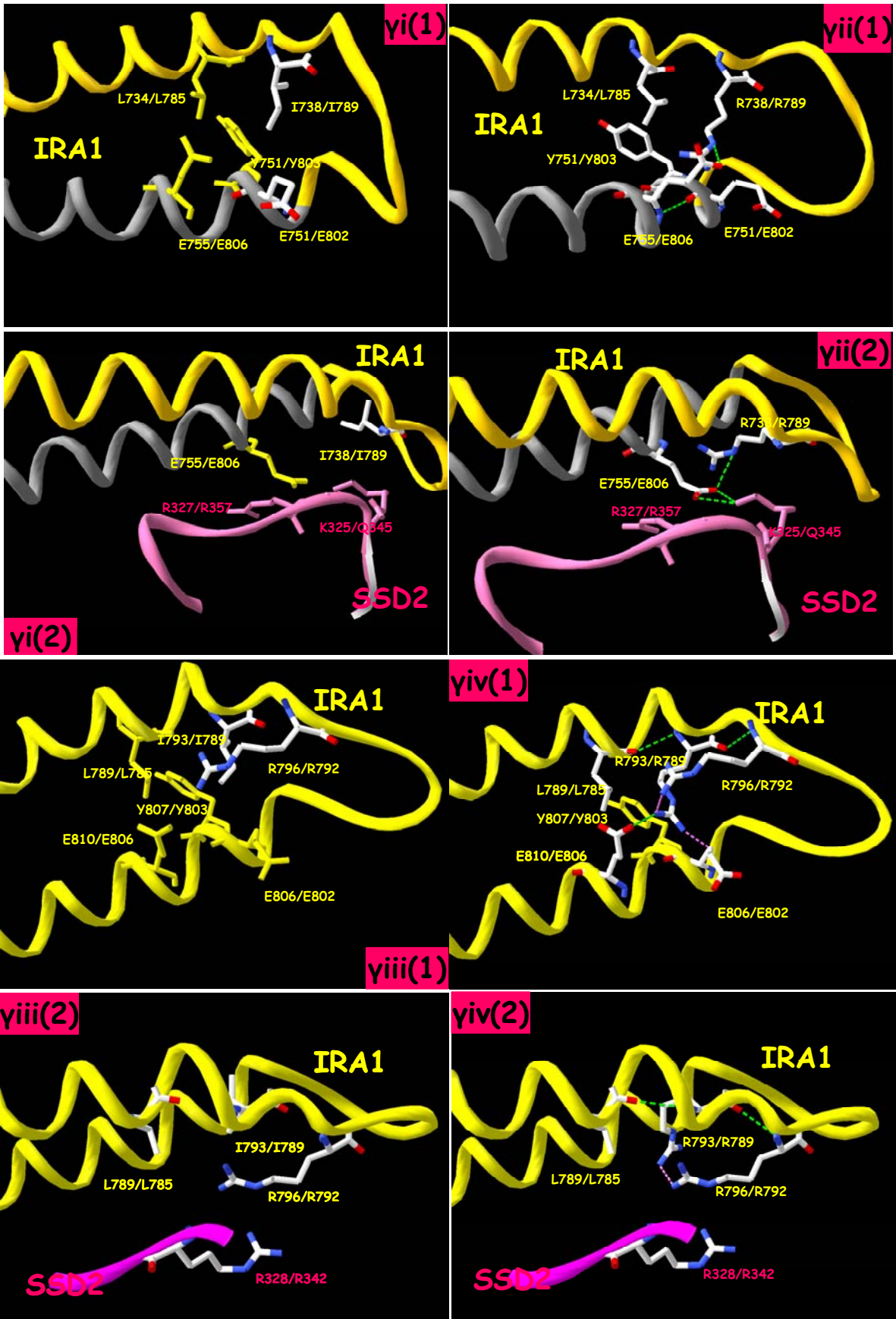
#### 3.4.A. Σημειακές μεταλλαγές στον IRA1 μοριακό διακόπτη

Σημαντικές πληροφορίες για την λειτουργία του IRA1 διακόπτη συλλέγουμε με την μελέτη ένα προς ένα όλων των αμινοξέων της IRA1-περιοχής που υφίστανται σημειακές μεταλλαγές στην *ecSecA*, με βάση τις δομές της *bs* και της *mtSecA* (σχήμα 56). Συγκεκριμένα στα παρακάτω πάνελ (σχήμα 110) μελετώνται οι κύριες αλληλεπιδράσεις κάθε αμινοξέος στις παραπάνω αναλυμένες κρυσταλλογραφικά *SecA* (*swiss-pdbviewer* πρόγραμμα) και η πιθανή επίδραση της σημειακής μεταλλαγής τους σ' αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Έτσι διαπιστώνεται ότι το αμινοξύ W775 (110αι-αιν), παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της περιοχής IRA1 με την SD-περιοχή. Η αλληλεπίδραση αυτή κάνει εφικτό τον δεσμό άλατος της R656 με το D649 που δημιουργεί την κάμψη (κόκκινο βέλος) της έλικας της SD-περιοχής. Έτσι αυτή "αγκαλιάζει" τον DEAD κινητήρα όπως θα αναφερθεί αναλυτικότερα στη συζήτηση. Το αμινοξύ L785 συμβάλλει στην διαμόρφωση της IRA1-περιοχής, αλλά και κατά δεύτερο λόγο, στην ομαλή επικοινωνία της με την SSD-περιοχή (σχήμα 110βι-iv; περισσότερες λεπτομέρειες στη συζήτηση). Αντίστοιχη, αν και πιο έντονη (λεπτομέρειες στη συζήτηση) είναι και η δράση του αμινοξέος I789 [σχήμα 110γι(1), (2)-iv(1), (2)]. Από την άλλη μεριά το αμινοξύ R792 συμμετέχει στην αλληλεπίδραση της IRA1-περιοχής με την SSD-περιοχή (σχήμα 110δι-iv), αν και όχι τόσο έντονα όσο το E806 αμινοξύ (σχήμα 110ει-iv; Λεπτομέρειες στη συζήτηση). Το αμινοξύ P799 συντελεί στην διαμόρφωση της IRA1-περιοχής, ενώ στην περίπτωση της αντικατάστασης του από αλανίνη, αναμένεται μεγαλύτερη έλικα<sub>2</sub> για την περιοχή IRA1 (περισσότερες λεπτομέρειες στη συζήτηση). Το αμινοξύ E802 εν συνεχεία, παίζει ρόλο στην επικοινωνία της IRA1(α)-περιοχής του ενός πρωτομερούς με την SD(β)-περιοχής του δεύτερου πρωτομερούς, και έτσι το πρώτο μισό αυτής της περιοχής στρέφεται προς τα κάτω και προς τ' αριστερά σε σχέση με το δεύτερο μισό της (σχήμα 110ζι-iv; Περισσότερες λεπτομέρειες στη συζήτηση), και διευκολύνεται η κάμψη της έλικας της SD-περιοχής. Το επόμενο αμινοξύ της IRA1-περιοχής που μεταλλάχθηκε, το Y803, εμπλέκεται και στην διαμόρφωση της IRA1-περιοχής, αλλά και στην επικοινωνία της με την SD-περιοχή (σχήμα 110ηι-iv). Τέλος το αμινοξύ F811 επηρεάζει την επικοινωνία της IRA1-περιοχής με την SD-περιοχή, αλλά κατά δεύτερο λόγο και με την NBD(β)-περιοχή του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα 110θι-iv; Περισσότερες λεπτομέρειες στη συζήτηση).

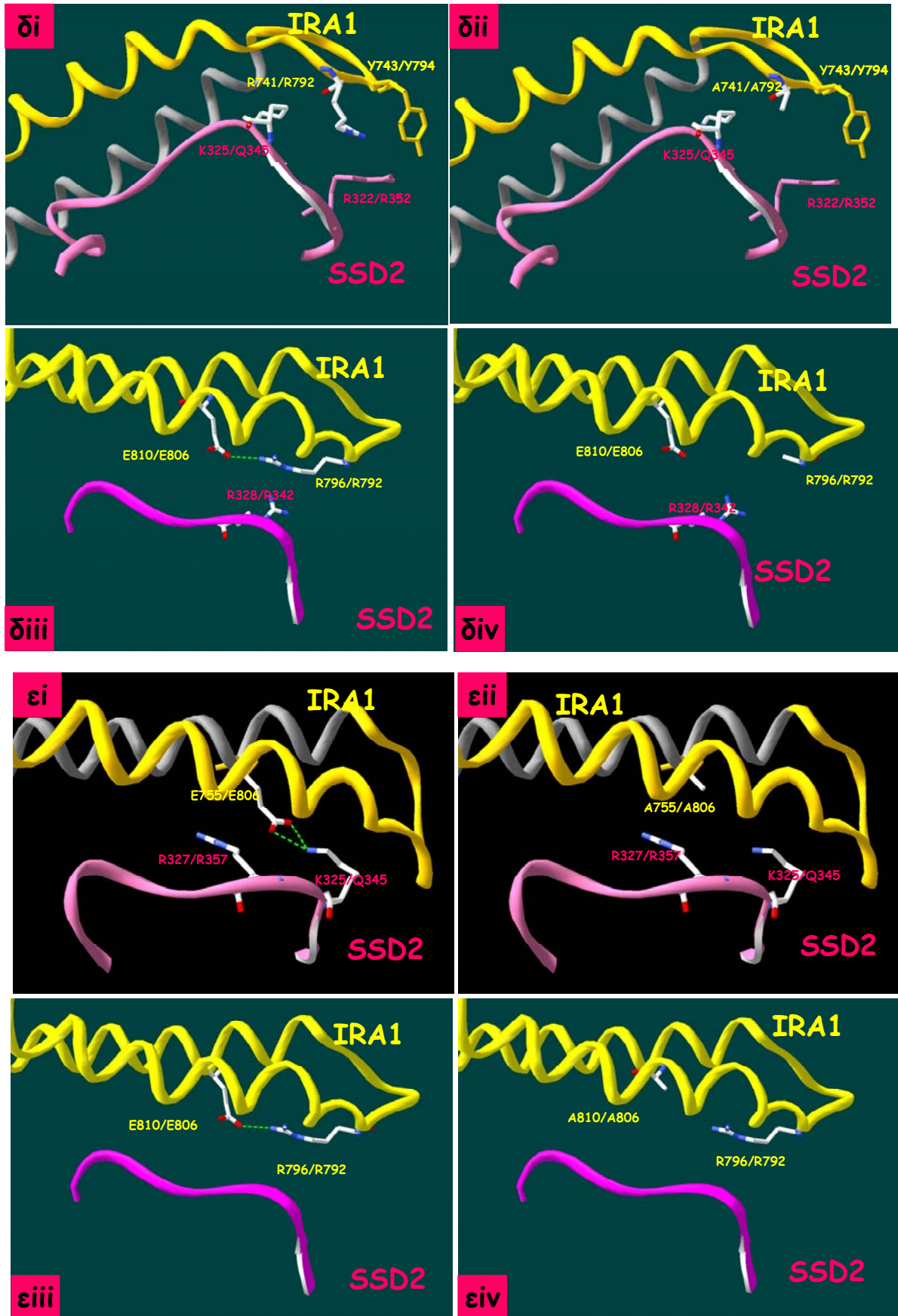
Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι τα αμινοξέα της *ecSecA* που μεταλλάχθηκαν, μπορούν να καταταγούν σε τέσσερις τάξεις (σχήμα 111 και πίνακας IX), με βάση τη συμμετοχή τους σε τέσσερις διακριτές δομικές αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα διακρίνονται οι IRA1 μεταλλαγές τύπου I (W775, Y803, και F811), που επηρεάζουν την εσωτερική δομή του IRA1 στοιχείου (σχήμα 113Ba). Οι IRA1 μεταλλαγές τύπου II (L785, I789, P799, και Y803) που διαταράσσουν την επικοινωνία του IRA1 με την περιοχή SD (σχήμα 111Bβ). Οι IRA1 μεταλλαγές τύπου III (R792, και E806), που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του IRA1 με την SSD-περιοχή (σχήμα 111Bγ), και τέλος, οι IRA1 μεταλλαγές τύπου IV (E802), που επιδρούν στην επικοινωνία της IRA1-περιοχής του ενός πρωτομερούς (που θα αναφέρεται από εδώ και πέρα ως *SecAα*), με την περιοχή SD του άλλου πρωτομερούς (που θα αναφέρεται από εδώ και πέρα ως *SecAβ*; σχήμα 111Bδ).

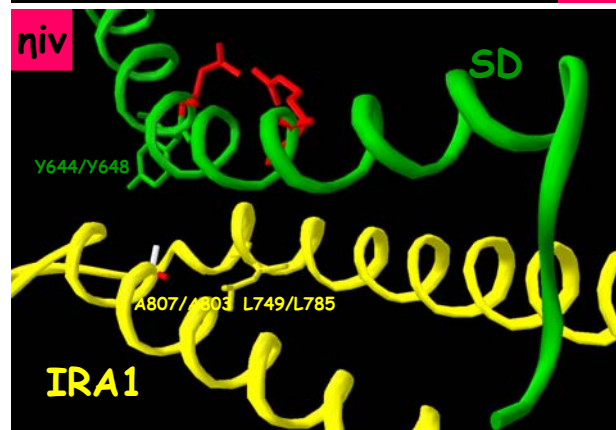
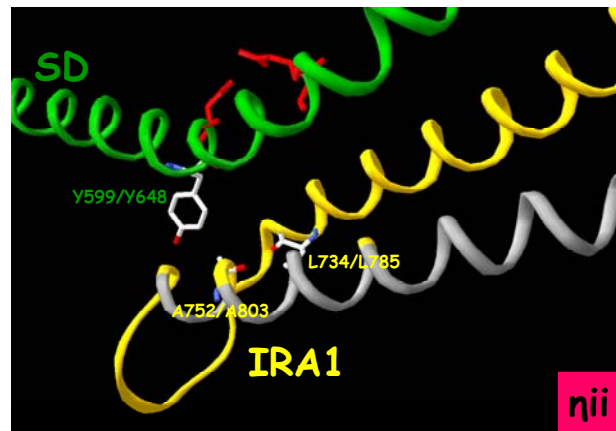
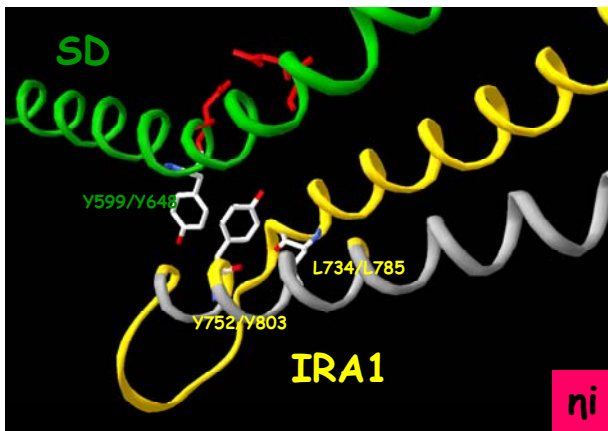
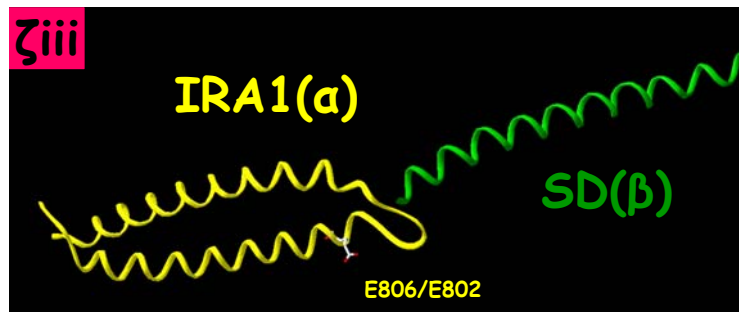
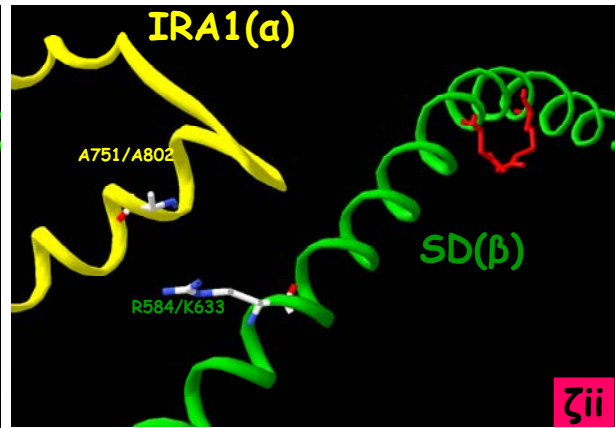
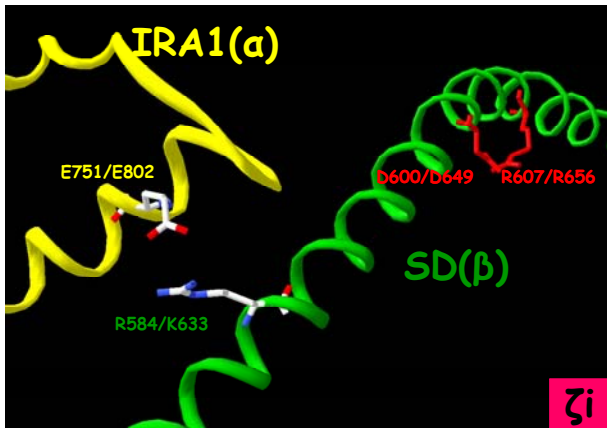
Σχήμα 110: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων του IRA1 που υφίστανται σημειακές μεταλλαγές στην *ecSecA*, τόσο στην δομή της *bs* (i), όσο και στην δομή της *mtSecA* (iii), με τις διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης τόσο του πρώτου [*SecA(α)*], όσο και του δεύτερου μονομερούς [*SecA(β)*]. Σημειώνονται επίσης οι αλληλεπιδράσεις των αντικατάστατων αμινοξέων κατά τις μεταλλαγές στις παραπάνω θέσεις, πάλι τόσο στην δομή της *bs* (ii), όσο και στην δομή της *mtSecA* (iv). Σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις σε κάθε περίπτωση. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Τα αμινοξέα που μετέχουν σε λιγότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις χρωματίζονται ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχονται, δηλαδή μπλε από την περιοχή NBD, λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, και ροζ από την περιοχή SSD. Τα ονόματα όλων των αμινοξέων σημειώνονται επίσης με το χρώμα της περιοχής από την οποία προέρχονται και σε σειρά αντίστοιχα *bs/ecSecA* (i, ii), ή *mt/ecSecA*(iii, iv). Οι πράσινες διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν δεσμούς – H και οι μωβ στερικές παρεμποδίσεις. α)W775, β)L785, γ) I789, δ) R792, ε) E806, ζ)E802, η)Y803, και θ) F811. Στο γ) οι αλληλεπιδράσεις της I789 διακρίνονται σ' αυτές μέσα στην IRA1-περιοχή (1), και σ' αυτές στην SSD-περιοχή (2).

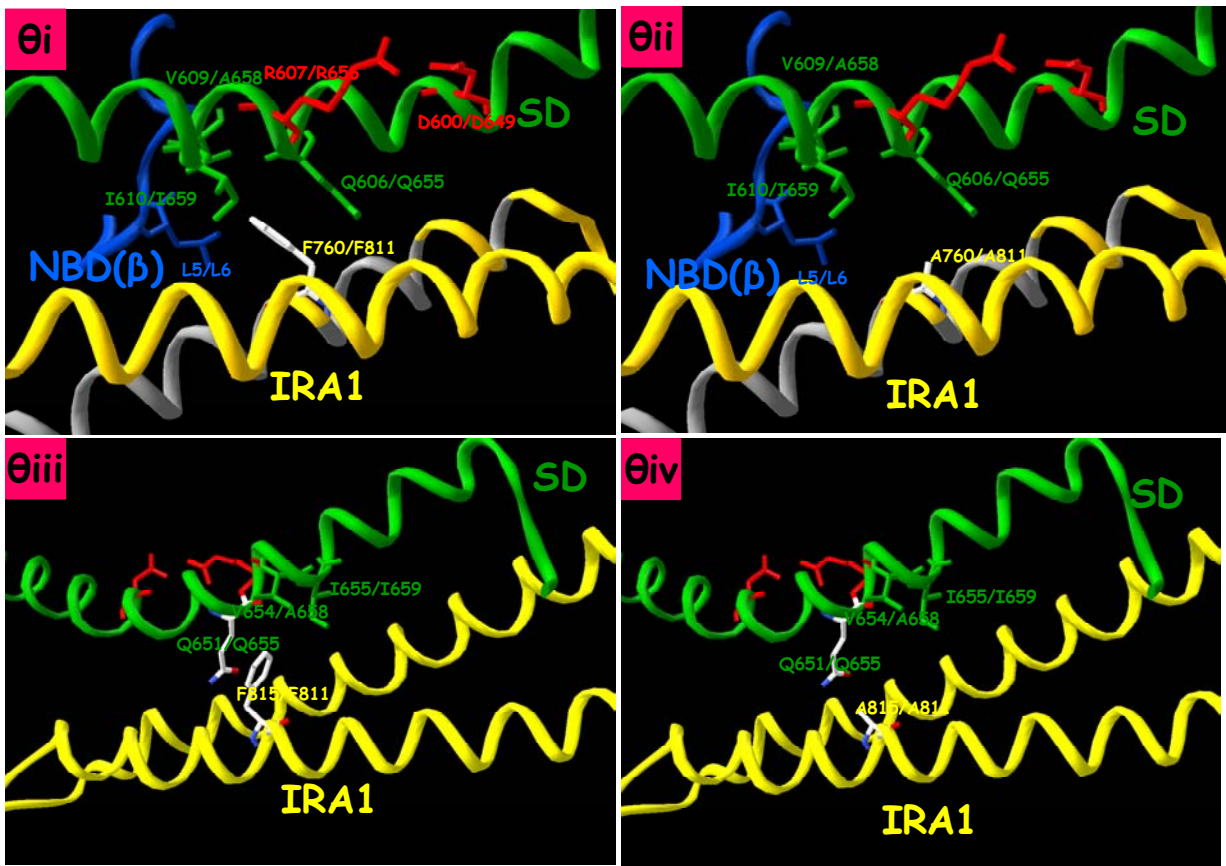


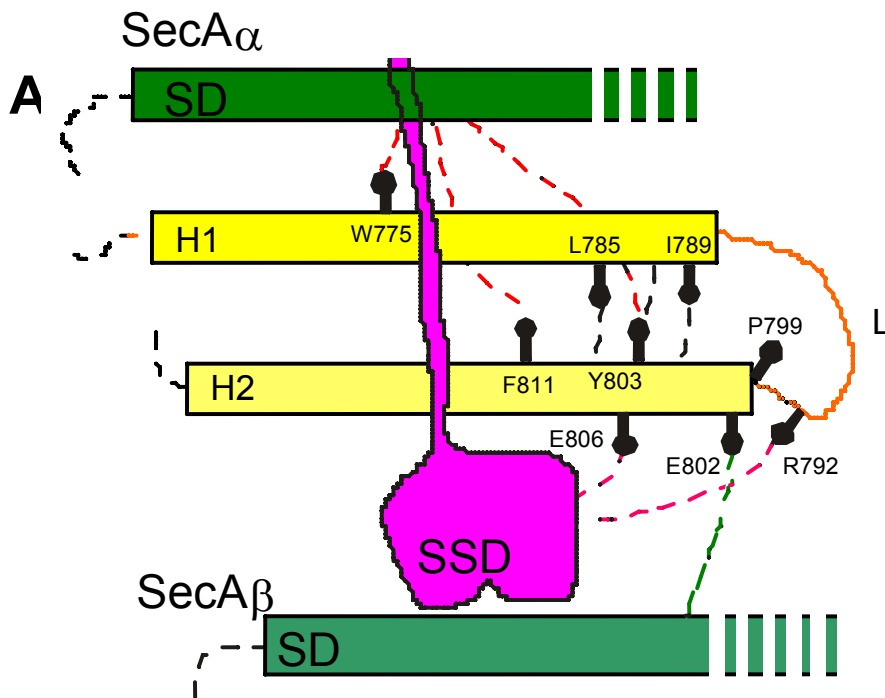






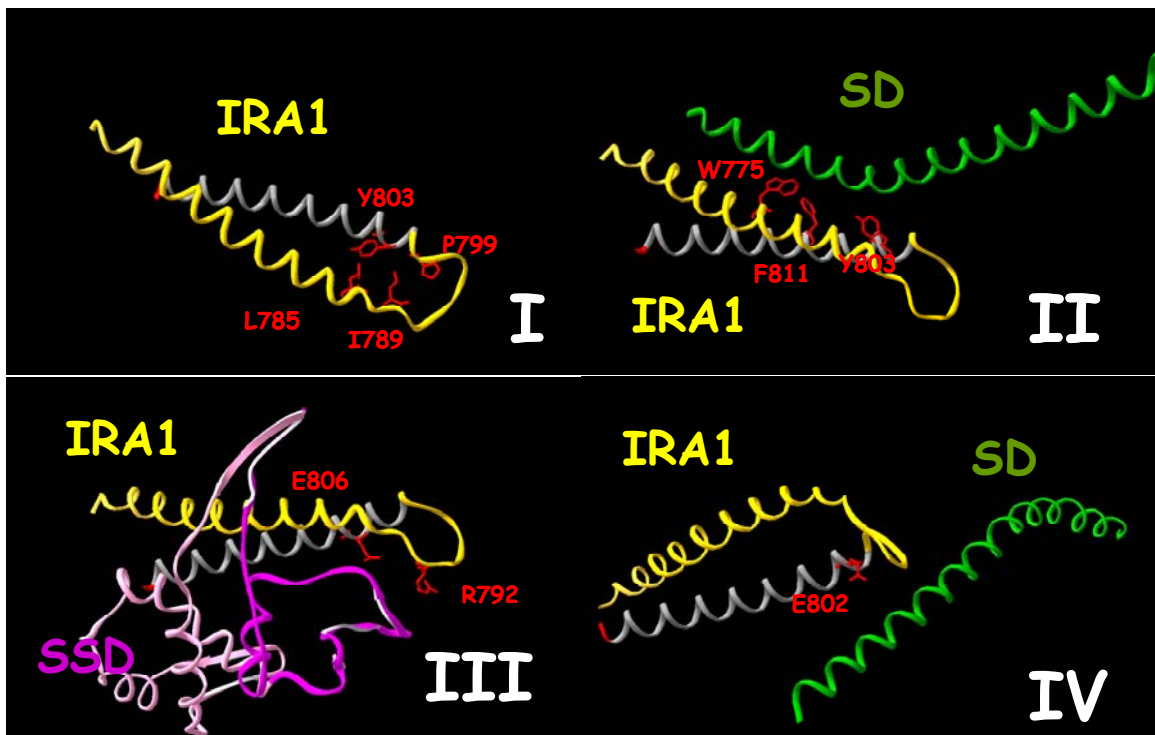






Σχήμα 111: Οι διάφορες IRA1 μεταλλαγές διαιρούνται σε τέσσερις τάξεις με βάση τις κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις τους με τέσσερις περιοχές της SecA. Α) Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των αμινοξέων τάξης I (μαύρες διακεκομμένες γραμμές), των αμινοξέων τάξης II (κόκκινες διακεκομμένες γραμμές), των αμινοξέων τάξης III (ροζ διακεκομμένες γραμμές), και των αμινοξέων τάξης IV (πράσινη διακεκομμένη γραμμή). Β) Διάιρωση των IRA1 μεταλλαγών σε τέσσερις τάξεις. Στην τάξη I ανήκουν τα αμινοξέα που διαμορφώνουν την δομή της IRA1-περιοχής, στην τάξη II τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με την SD-περιοχή, στην τάξη III τα αμινοξέα που επικοινωνούν με την περιοχή SSD, και στην τάξη IV τα αμινοξέα που επικοινωνούν με την SD(β)-περιοχή του δεύτερου πρωτομερούς.

**B**



Πίνακας ΙΧ

Ταξη μεταλλαγών	Μεταλλαγμένο Αμινοξύ του IRA1		Αλληλεπιδράσεις του WT αμινοξικού καταλοίου -ADP									
			IRA1		SD		SSD		SD*		NBD*	
	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs	Ec	Bs
I	L785R	L734	M810	M759								
			(+++,W)									
				Y803	Y752							
				(+++, W)								
								G346	G326			
								(+,H)				
		I789R	I738	Y803	Y752							
				(+/-, W)								
		P799A	P748									
		Y803A	Y752	L785	L734							
			+++W									
			I789R	I738								
			(+, -VDW)									
								Y599				
							(++, W )					
							D649	D600				
							(+-, W )					
							V651	V602				
							(+-, W )					
							A652	L603				
							(+-, W )					
II	W775A	W724			I659	I610						
					(++, W)							
					Y660	Y611						
					(+, W)							
					R656	R607						
					(+, W)							
				M814	M763							
				(+, W)								
						Q655	Q606					
						( +/-W )						
	F811A	F760			A658	V609						
					( +/-W )							
					I659	I610						
					( +/-W )							
					R656	R607						
					( +/-W )							
			H778	H727								

			H778	H727				
								L5
								+W
<b>III</b>	R792A	R741			Q345	K325		
					+W			
					R352 / Y794	R322 / Y743		
	E806A	E755			Q345	K325		
					(+++, S)			
					R357	R327		
					(++, W)			
							K6 33	R5 84
							(+++, S)	

## Ευρετήριο

κίτρινο= κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις

ανοιχτό πράσινο= δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις

S= δεσμός άλατος

W= υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

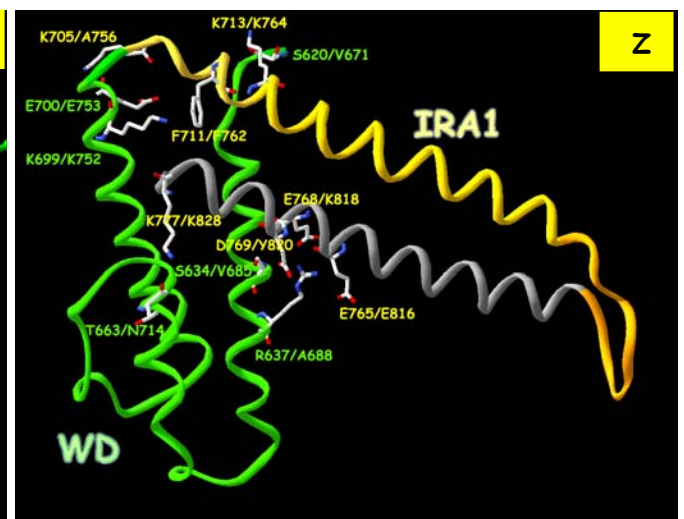
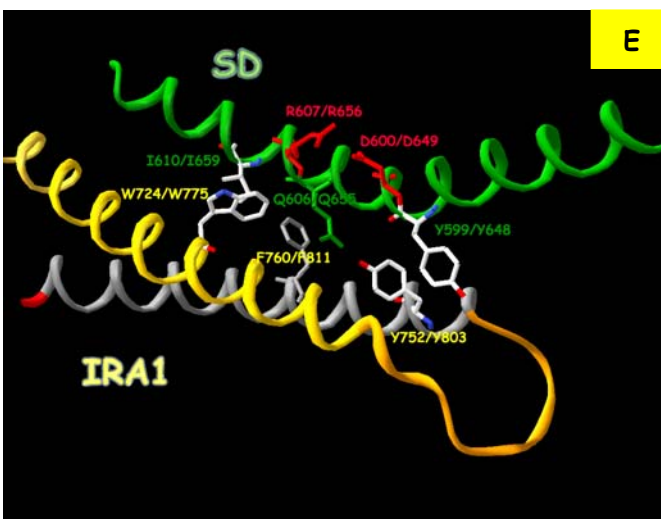
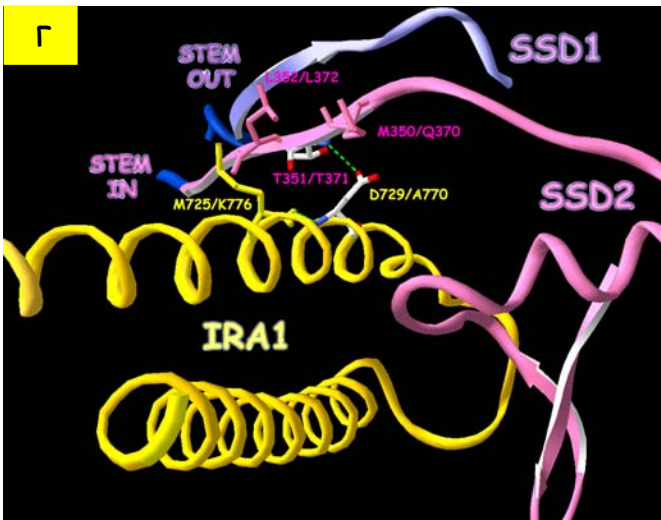
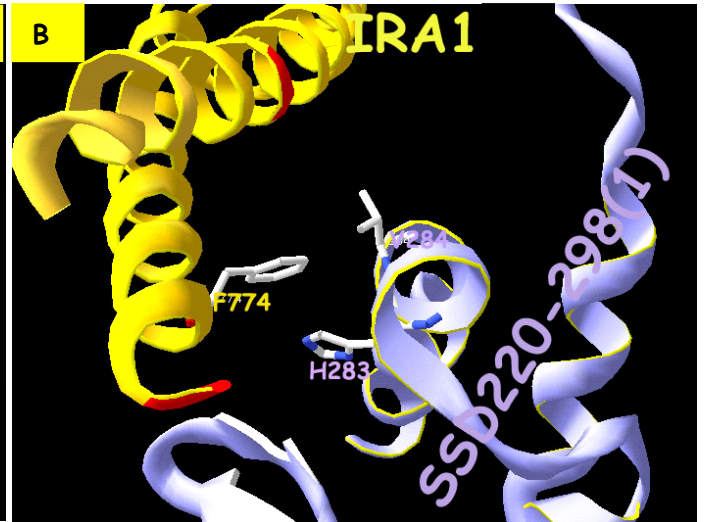
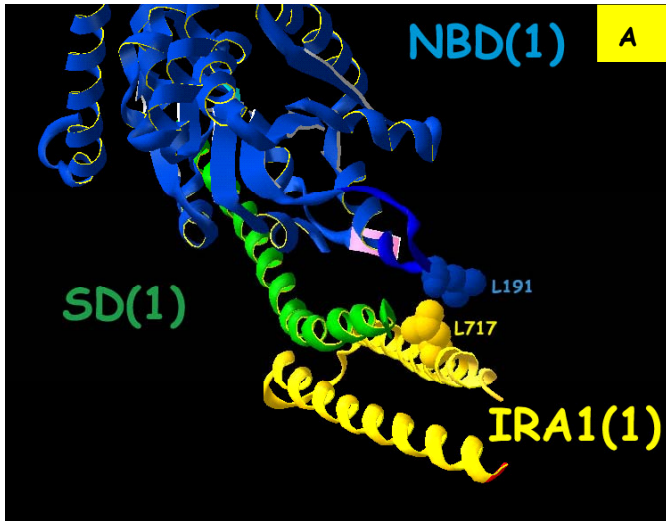
H= δεσμός υδρογόνου

### 3.4.B. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της περιοχής IRA1 και των υπολοίπων περιοχών της SecA

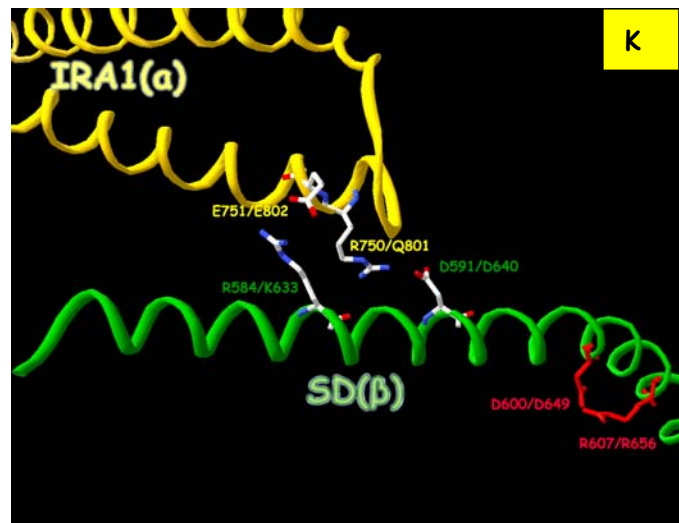
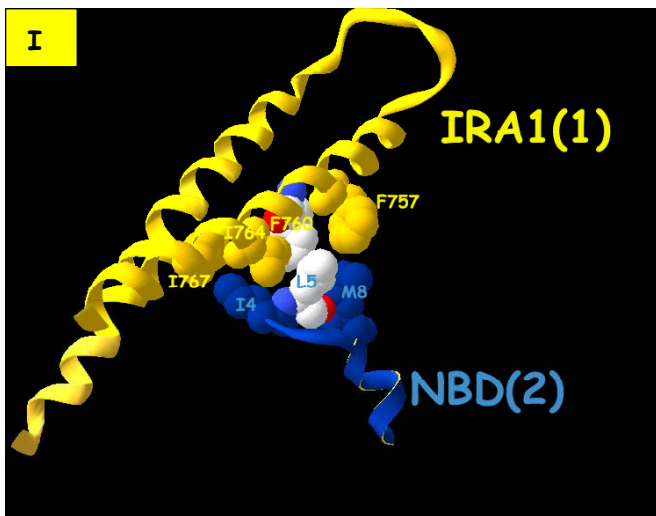
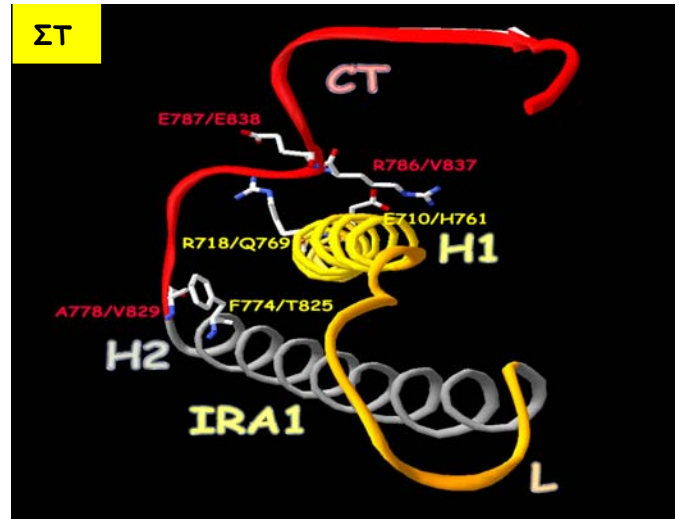
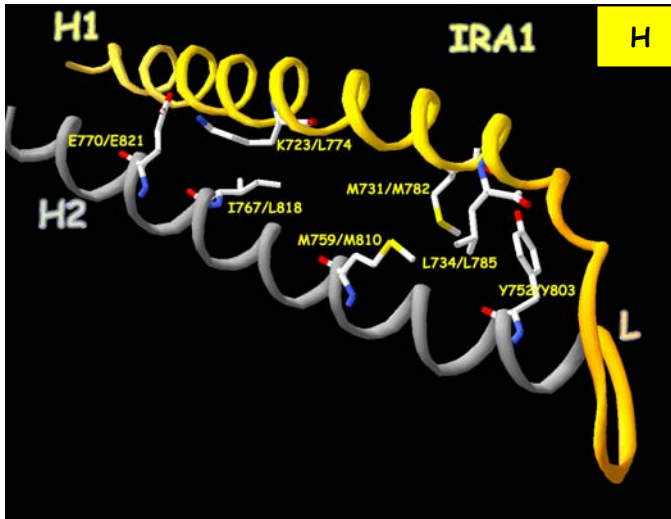
Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο Κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, κατ' αναλογία με την δομή της *bsSecA*, τα αμινοξέα του IRA1 στην *ecSecA* αναμένεται να παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τις SSD, SD, WD, IRA1, και CT-περιοχές του ενός πρωτομερούς, αλλά και με τις NBD, και SD-περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα 112Α-Κ και πίνακας Χ). Αλλά και με βάση την δομή της *mtSecA*, τα αμινοξέα του IRA1 στην *ecSecA* αναμένεται να παρουσιάζουν αλληλεπιδράσεις με τις SSD, SD, WD, και IRA1-περιοχές του ενός πρωτομερούς, αλλά και με τις IRA2, και SD-περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς (σχήμα 113α-ζ).

Σχήμα 112: Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις διάφορες περιοχές στο ίδιο μονομερές SecA(α), αλλά και με περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς, SecA(β). Σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις σε κάθε περίπτωση. Οι αλληλεπιδράσεις προκύπτουν από την κρυσταλλογραφική δομή της *bsSecA*, οπότε αναλογικά πιστεύεται ότι ισχύουν και για την *ecSecA*. Σ' όλες τις παρακάτω εικόνες αναγράφεται πρώτα το αμινοξύ της *bsSecA* και μετά το αμινοξύ της *ecSecA*. Α) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή NBD του ίδιου πρωτομερούς. Β) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την SSD1 περιοχή (220-298) του ίδιου πρωτομερούς. Γ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την β-αλυσίδα του στελέχους (stem) της περιοχής SSD, που εισέρχεται στην περιοχή NBD (stem in) στο ίδιο πρωτομερές. Δ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή SSD2 (299-355) του ίδιου πρωτομερούς. Ε) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την SD περιοχή της ευρύτερης C-περιοχής, του ίδιου πρωτομερούς. Ζ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την WD περιοχή της C-περιοχής, του ίδιου πρωτομερούς. Η) Αλληλεπιδράσεις μέσα στην IRA1 περιοχή. ΣΤ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την CT περιοχή της C-περιοχής, του ίδιου πρωτομερούς. Ι) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή NBD του άλλου πρωτομερούς. Κ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή SD του άλλου πρωτομερούς. Πίνακας Χ: Στον πίνακα σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις διάφορες περιοχές στην διμερή SecA.

Σχήμα 113: (σελίδα 196) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις διάφορες περιοχές στο ίδιο μονομερές SecA(α), αλλά και με περιοχές του δεύτερου πρωτομερούς, SecA(β). Σημειώνονται οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις σε κάθε περίπτωση. Οι αλληλεπιδράσεις προκύπτουν από την κρυσταλλογραφική δομή της *mtSecA*, οπότε αναλογικά πιστεύεται ότι ισχύουν και για την *ecSecA*. Τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Τα αμινοξέα που μετέχουν σε λιγότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις χρωματίζονται ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχονται, δηλαδή λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, και ροζ από την περιοχή SSD. Τα ονόματα όλων των αμινοξέων σημειώνονται επίσης με το χρώμα της περιοχής από την οποία προέρχονται και αντίστοιχα από την *mt/ec/bsSecA*. Οι πράσινες διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν δεσμούς—H. α) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με τις υποπεριοχές SSD1(ai), SSD2(aii), και την υποπεριοχή του στελέχους, STEM(aiii) της SSD-περιοχής του ίδιου πρωτομερούς. ε) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή IRA2 του άλλου πρωτομερούς. Οι αλληλεπιδράσεις με τις υπόλοιπες περιοχές του ίδιου πρωτομερούς SD, WD, και IRA1 δεν σημειώνονται. ζ) Αλληλεπιδράσεις της IRA1 περιοχής με την περιοχή SD του άλλου πρωτομερούς.





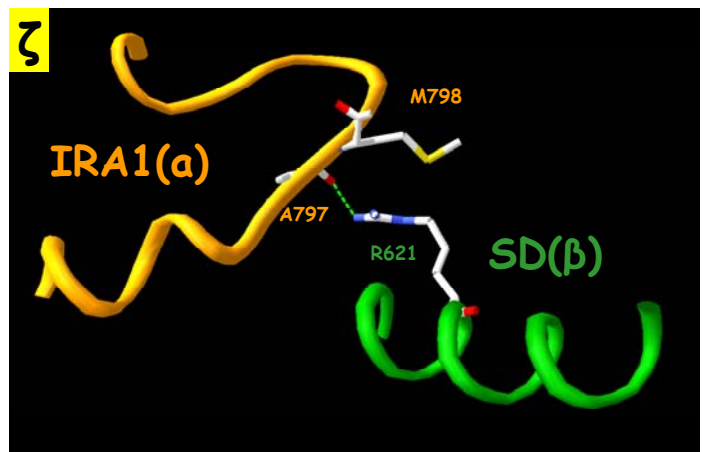
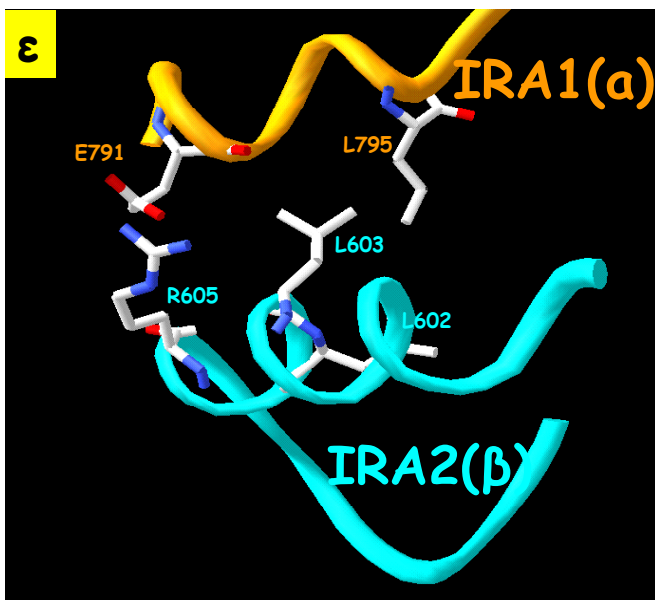
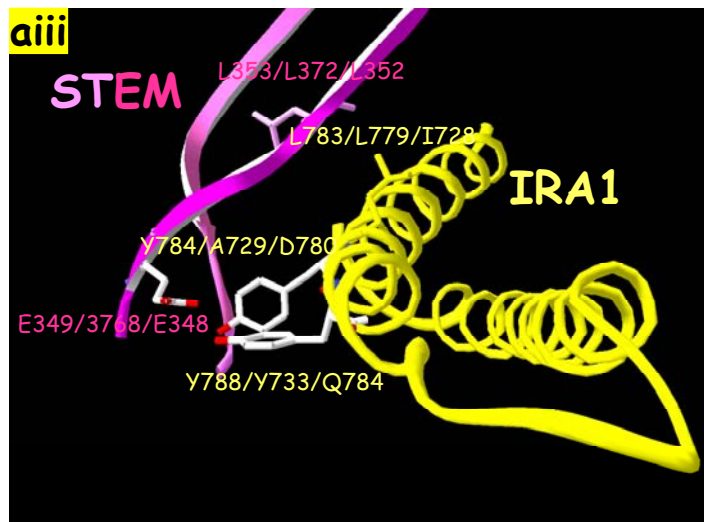
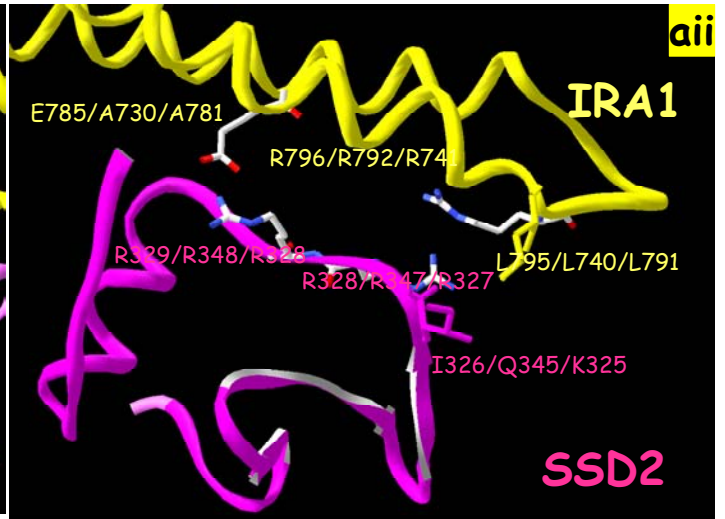
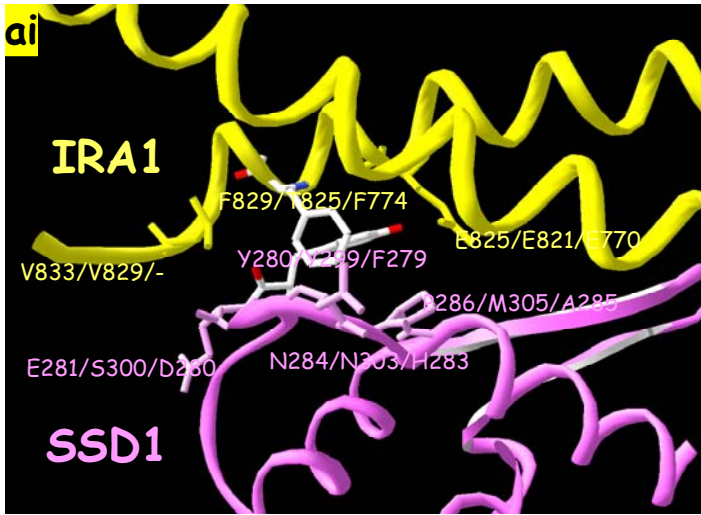


Πίνακας X

IRA1(α) Residues	NBD(α) Residues	IRA2(α) Residues	SSD(α) Residues		SD(α) Residues	WD(α) Residues	IRA1(α) Residues	CT1(α) Residues	NBD(β) Residues	SD(β) Residues
			220-298	299-355						
L717 L768	L191 F193 +/-W									
		-								
			STEM OUT							
			-							
F774 T823			MAIN BODY							
			V284 I304 ++W							
			H283 N303 ++W							
				STEM IN						
M725 K776				L352 L372 +W						
D729 A780				T351 T371 +++H						
				M350 Q370 +W						
E755 E806				K325 Q345 +++S,H						
				R327 R357 ++ W						
R741 R792				K325 Q345 + W						
K723 L774				E331 D351 +++S						
S766 S817				E331 D351 +?(R-R)						
Y743 Y794				R322 R352 +/- W						
W724 W775					I610 I659 ++W					
					R607* R656 +W					
					Y611 Y660 +W					
Y752 Y803					Y599 Y648 ++W(P)					
					V602 V651 +/-W					
					D600* D649 +/-W					
					L603 A652 +/-W					

IRA1(a) Residues	NBD(a) Residues	IRA2(a) Residues	SSD(a) Residues	SD(a) Residues	WD(a) Residues	IRA1(a) Residues	CT1(a) Residues	NBD(β) Residues	SD(β) Residues
F760 F811				I610 I659 +/-W					
				V609 A658 +/-W					
				R607* R656 +/-W					
				Q606 Q655 +/-W					
Q606 Q655				F760 F811 +/-W					
				F757 F808 +/-W					
				H727 H778 +/-W					
				M731 M782 +/-W					
M776 S827					K695 V746 -W				
					I692 I741 -W				
K777 K828					T664 D715 -W				
					T663 N714 +++H				
E765 E816					R637 A688 ++W				
E768 K819					R637 A688 +++S,H				
					S633 D684 -W				
D769 Y820					R637 A688 +++S,H				
					S634 V685 ++W				
V771 V822					M630 I681 -W				
K713 K764					S620 V671 ++H				
E712 E763					Y696 Y749 -W				
K705 A756					E700 E753 ++H				
M708 M759					K699 K752 -W				
F711 F762					K699 K752 ++W				
R709 R760					N622 D671 -W				

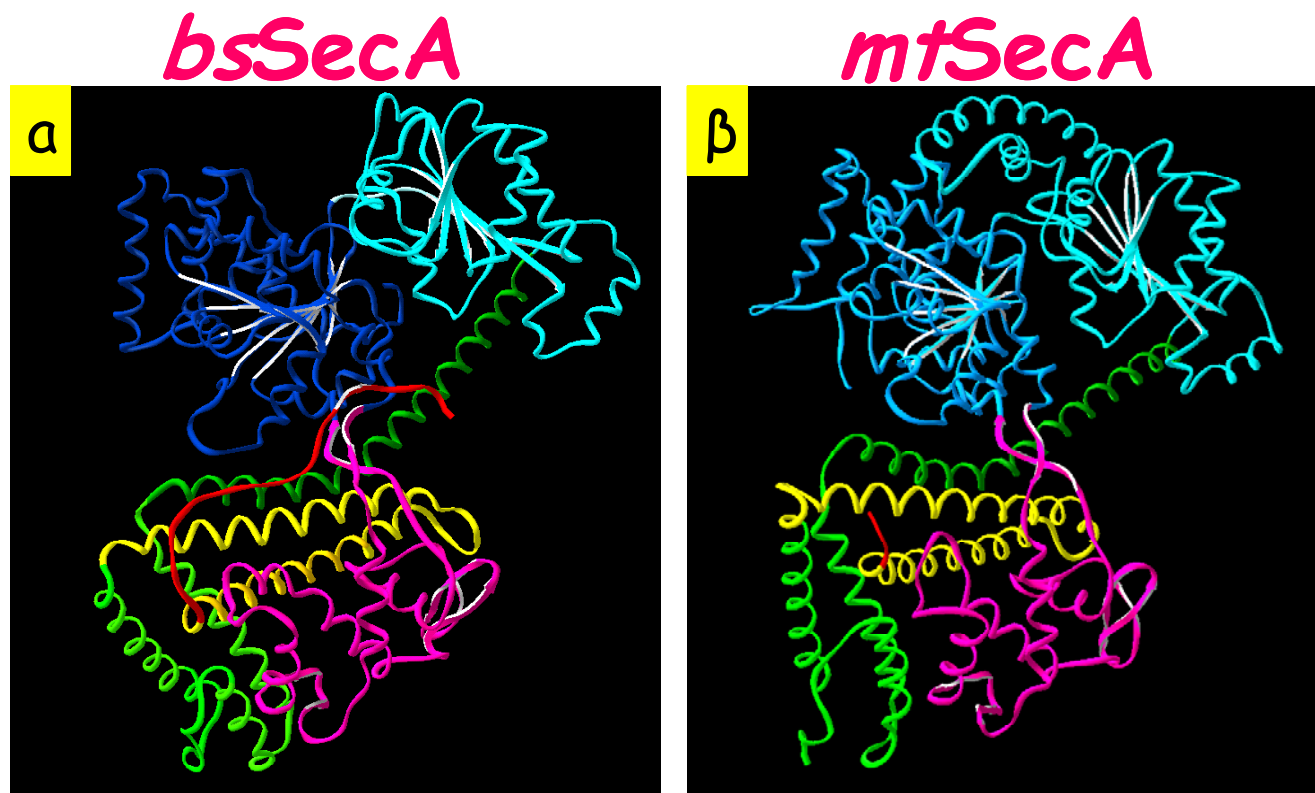
IRA1(a) Residues	NBD(a) Residues	IRA2(a) Residues	SSB(a) Residues		SD(a) Residues	WD(a) Residues	IRA1(a) Residues	CT1(a) Residues	NBD(b) Residues	SD(b) Residues
			220-298	299-355						
W724 W775							M763 M814 +W			
F760 F811							H727 H778 +W			
Y752 Y803							L734 L785 +++W I738 I789 +/-W			
E751 E802							I738 I789 +W			
E770 E821							K723 L774 ++S			
I767 L818							K723 L774 ++W			
M763 M814							K723 L774 +W H727 H778 +W			
M759 M810							L734 L785 +++W M731 M782 ++W?(S)			
R718 Q769							E787 E838 ++W			
E710 H761							R786 V837 +++H			
K713 K764							R786 V837 +H			
F774 T825							A778 V829 +++H,W			
F760 F811								L5 L6 +W		
E751 E802										R584 K633 +++S
R750 Q801										D591 D640 +++W



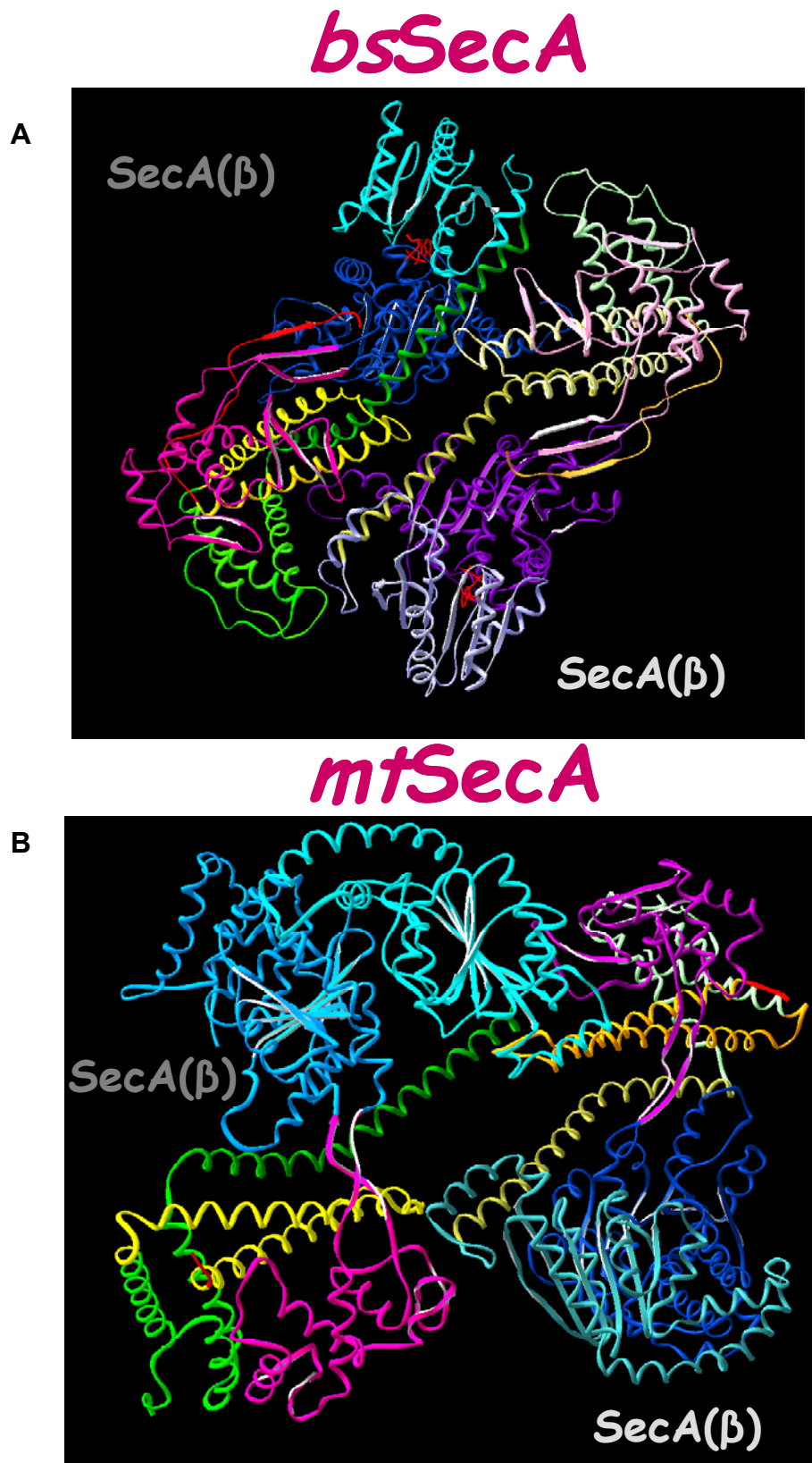
### 3.4.Γ. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων περιοχών της SecA

Από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της *bsSecA*, όσο και της *mtSecA* διαπιστώνονται διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ποικίλλων περιοχών της, τόσο στο μονομερές (σχήμα 114), όσο και στο διμερές της (σχήμα 115), και οι οποίες μπορούν αναλογικά να ισχύουν και στην περίπτωση της *ecSecA*. Έτσι στο μονομερές της *bsSecA* εντοπίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NBD-IRA2 (σχήμα 116α), NBD-SD (σχήμα 116β), NBD-CT (σχήμα 116γ), IRA2-SD (σχήμα 116δ), SSD-SD (σχήμα 116ε), SSD-WD (σχήμα 116ζ), SSD-IRA1 (σχήμα 112β, γ, δ), SSD-CT (σχήμα 116η), SD-IRA1 (σχήμα 112ε), WD-IRA1 (σχήμα 112ζ), και WD-CT (σχήμα 116στ). Συγκρίνοντας εν συνεχεία την δομή της μονομερούς *bsSecA* με την μονομερή *mtSecA* (σχήμα 114α και β), διαπιστώνουμε ότι και στην *mtSecA* διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω περιοχών της SecA [μάλιστα στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης των SSD-SD περιοχών, συμμετέχουν αντίστοιχα αμινοξέα μ' αυτά που συμμετέχουν και στην *bsSecA* (σχήμα 116ι)- για τις άλλες περιοχές δεν έχει ελεγχθεί αν οι αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται μεταξύ αντίστοιχων αμινοξέων της *mtSecA* με την *bsSecA*], εκτός από την SSD-WD αλληλεπίδραση που δεν υφίσταται (η SSD-περιοχή είναι απομακρυσμένη από την περιοχή WD στην *mtSecA*), ενώ λόγω της έλλειψης της CT-περιοχής από την κρυσταλλική δομή της *mtSecA*, δεν μπορούμε να ελέγξουμε αν διατηρούνται οι αλληλεπιδράσεις της, με τις NBD, SSD, και WD-περιοχές, όπως στην *bsSecA*.

Από την άλλη μεριά στο διμερές της *bsSecA* (σχήμα 117Α και σχήμα 118Α και Β) εντοπίζονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NBD(α)-SD(β) (σχήμα 119α), NBD(α)-IRA1(β) (σχήμα 119β), IRA2(α)-SSD(β) (σχήμα 119γ), IRA2(α)-WD(β) (σχήμα 119δ), SD(α)-SSD(β) (σχήμα 119ε), SD(α)-SD(β) (σχήμα 119ζ), και SD(α)-IRA1(β) (σχήμα 119η). Στο διμερές όμως της *mtSecA* (σχήμα 117Β και σχήμα 118Β και Δ), εντοπίζονται λιγότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών των δύο πρωτομερών, καθώς τα δύο μονομερή φαίνεται σαν να έχουν γλιστρήσει το ένα σε σχέση με το άλλο, σε σύγκριση με τα δύο μονομερή στο διμερές της *bsSecA*, (115Α και Β). Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται είναι μεταξύ των IRA2(α)-SSD(β) (σχήμα 120α), IRA2(α)-IRA1(β) (σχήμα 120β), και SD(α)-IRA1(β) (σχήμα 120γ). Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή η SecA είναι μία πολύ εύπλαστη πρωτεΐνη που εύκολα αλλάζει σχήμα και κατά συνέπεια και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων περιοχών της, και άρα και μεταξύ των δύο πρωτομερών της.

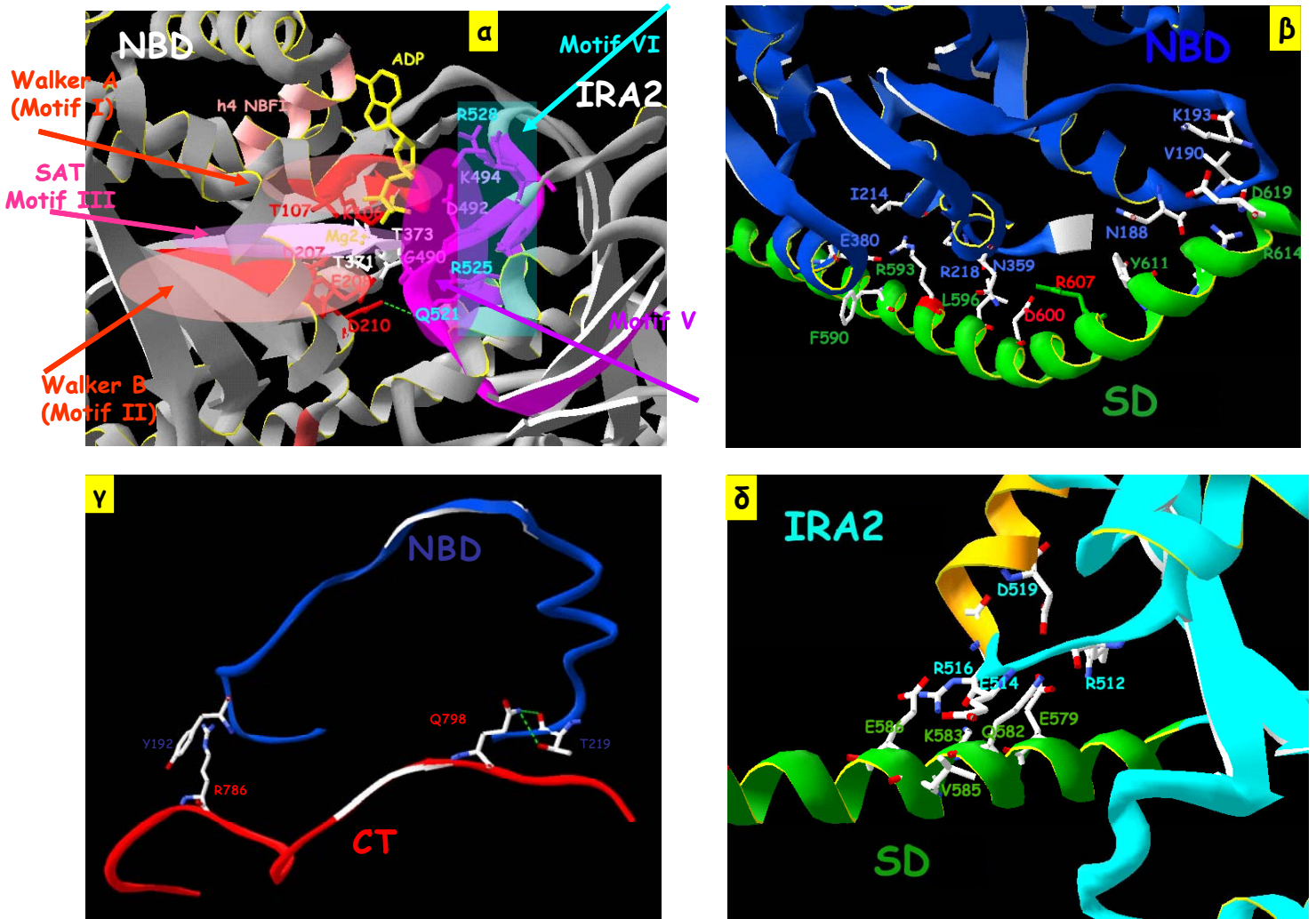


Σχήμα 114: Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής του μονομερούς της *bs* και της *mt*SecA. Οι διάφορες περιοχές και στις δύο δομές χρωματίζονται ανάλογα με το σχήμα 56 (πρώτο Κεφάλαιο αποτελεσμάτων). Η δομή είναι παρόμοια σε γενικές γραμμές, αλλά δεν υφίσταται αλληλεπίδραση SSD-WD (περισσότερες πληροφορίες στο κείμενο).

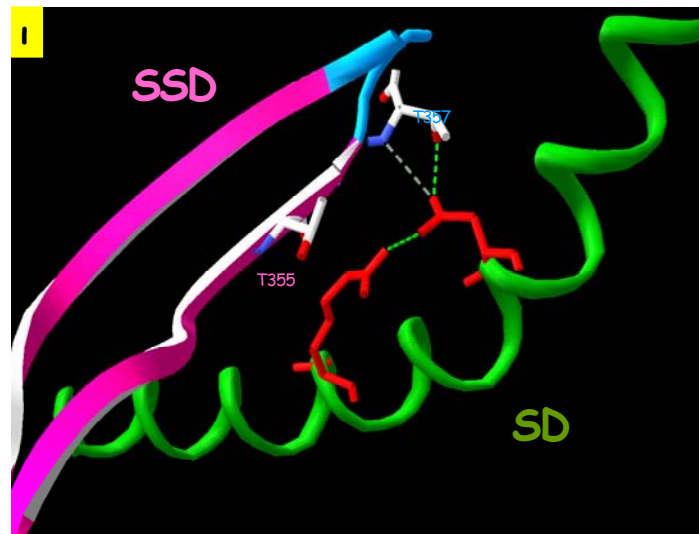
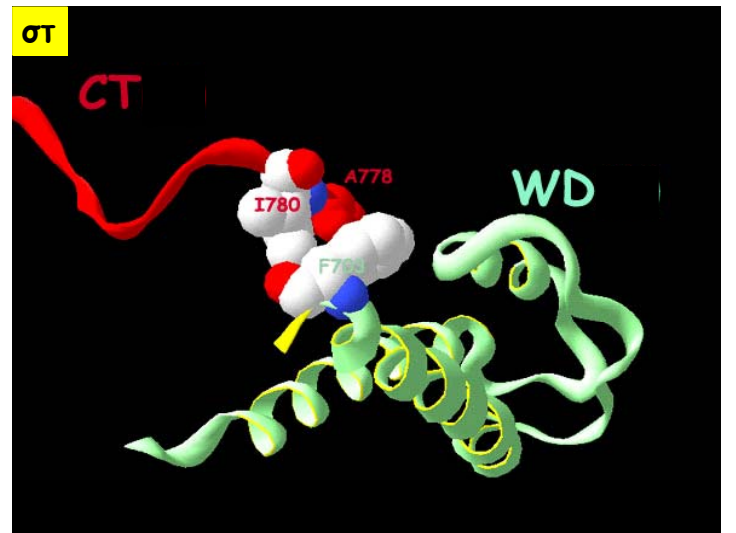
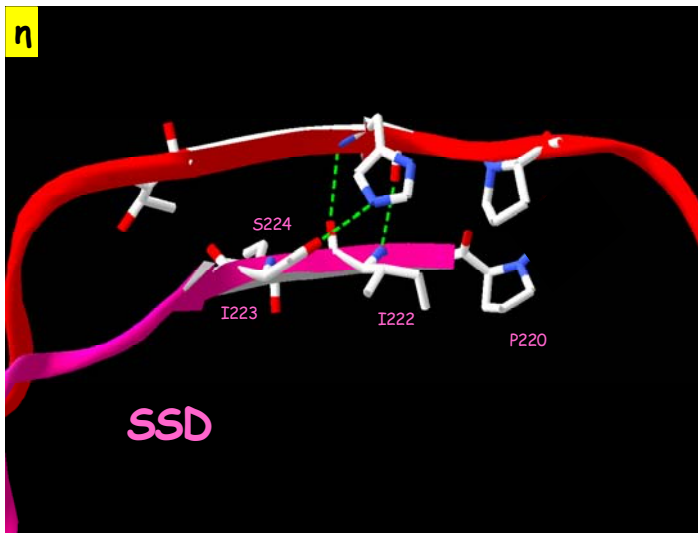
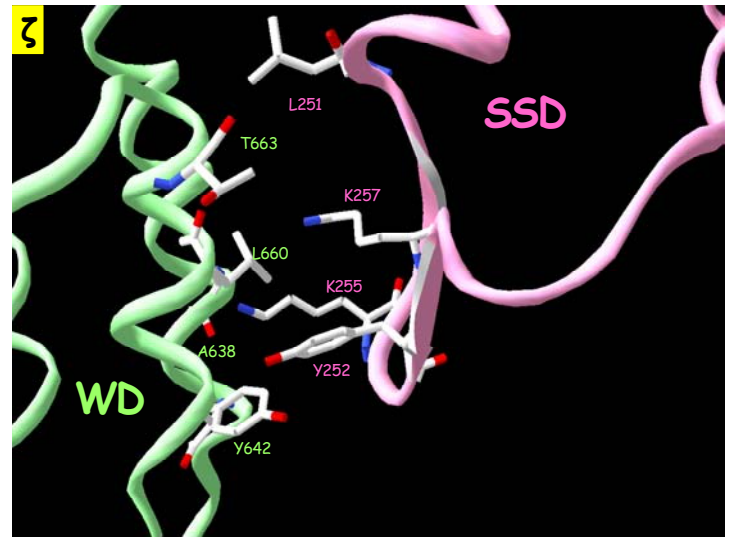
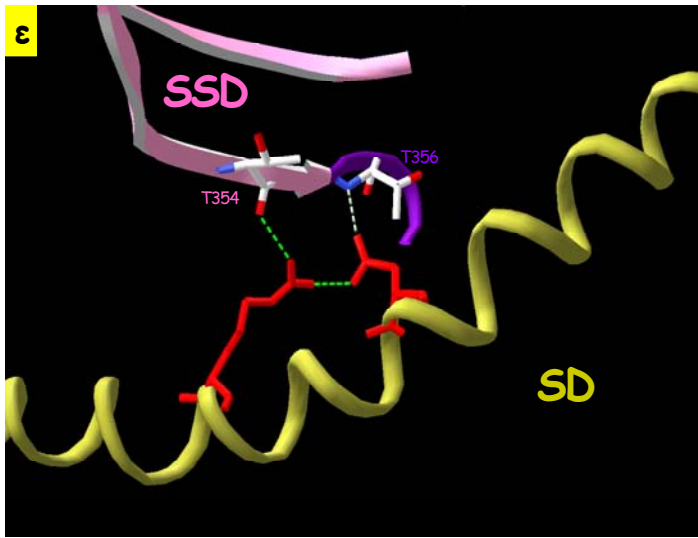


Σχήμα 115: Απεικόνιση του κρυσταλλογραφικού διμερούς της *bs*SecA (A), και του κρυσταλλογραφικού διμερούς της *mt*SecA (B), με χρωματισμό των διάφορων περιοχών όπως έχει γίνει στο σχήμα 34(Εισαγωγή) και στο σχήμα 56. Διακρίνεται η μικρότερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονομερών στην *mt*SecA σε σχέση με την *bs*SecA.

Σχήμα 116: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών της μονομερούς *bsSecA* (α-στ), και της μονομερούς *mtSecA* (ι) όπως προκύπτουν από την μελέτη των κρυσταλλογραφικών δομών τους (Hunt et al., 2002; Sharma et al., 2003). Στα παραπάνω σχήματα α)-ι), τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων περιοχών στη μονομερή *SecA*, παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Τα ονόματα των αμινοξέων χρωματίζονται ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχονται, δηλαδή μπλε από την περιοχή NBD, λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, ροζ από την περιοχή SSD, λαχανί από την WD-περιοχή, και κόκκινο από την περιοχή CT. Στο σχήμα στ) τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις διάφορες αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με την μορφή σφαιρών, για να τονιστούν οι πιθανές υδρόφοβες και van der Waals αλληλεπιδράσεις. Στα σχήματα (α-στ) σημειώνονται τα αμινοξέα της *bsSecA*, ενώ στο ι), σημειώνονται τα αμινοξέα της *mtSecA*. Στο σχήμα α) σημειώνονται τα παρακάτω μοτίβα: το μοτίβο I (Walker A) της έλικας 4 της NBD-περιοχής που δεσμεύει τον φώσφορο α και β του νουκλεοτιδίου, το μοτίβο II (Walker B), επίσης της NBD-περιοχής στο οποίο το D207 αλληλεπιδρά με το  $Mg^{2+}$ , το E208 αποτελεί την καταλυτική βάση της διαδικασίας υδρόλυσης του ATP, και το D210 που σχηματίζει δεσμό H με το Q521 του μοτίβου VI της IRA2-περιοχής, το μοτίβο III (SAT), στο οποίο τα T371 και T373 σχηματίζουν δεσμό H πάλι με το Q521, το μοτίβο V της περιοχής IRA2, του οποίου τα αμινοξέα αλληλεπιδρούν με τον α-φώσφορο και την ριβόζη του νουκλεοτιδίου, και τέλος το μοτίβο VI επίσης της IRA2-περιοχής, στο οποίο το D492 αλληλεπιδρά με την ριβόζη, ενώ το R525 με τον γ-φώσφορο του νουκλεοτιδίου. Σημειώνεται ότι οι πιθανοί δεσμοί H απεικονίζονται στα παραπάνω σχήματα με πράσινες διακεκομμένες γραμμές.

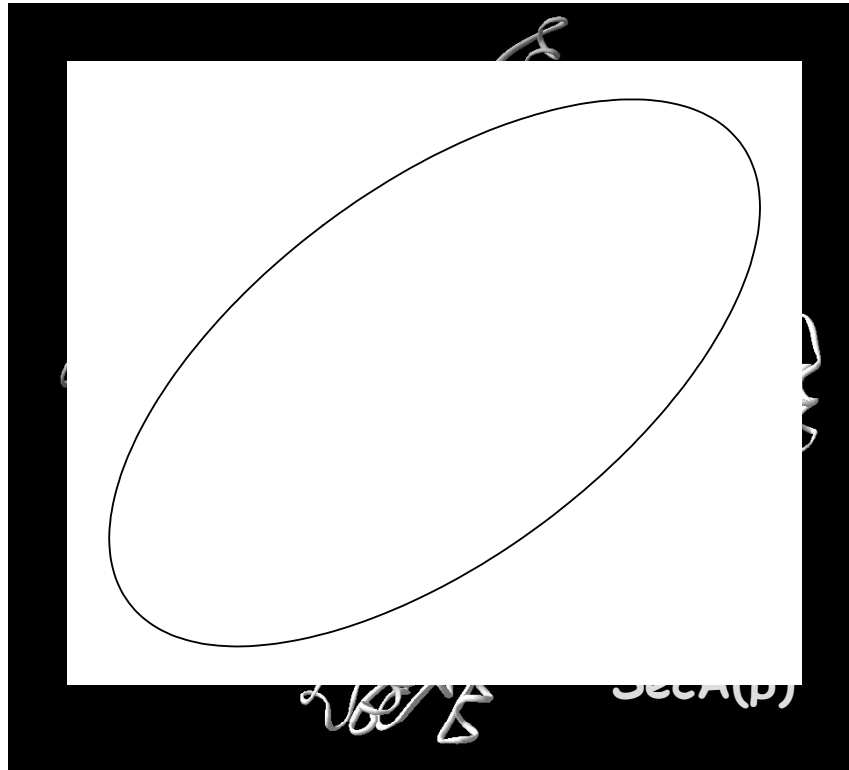






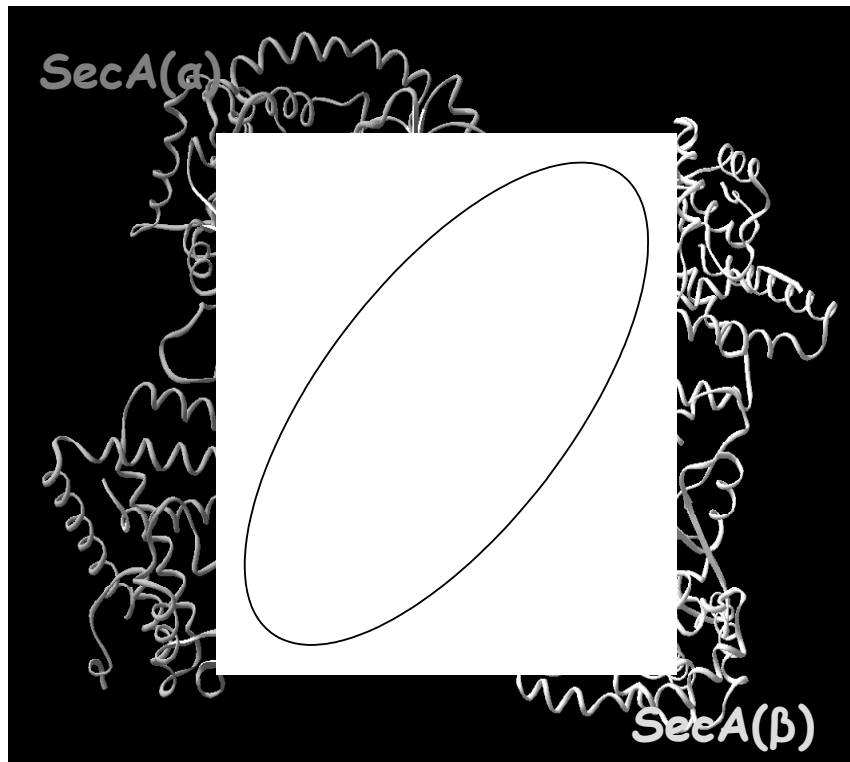
# *bsSecA*

**A**

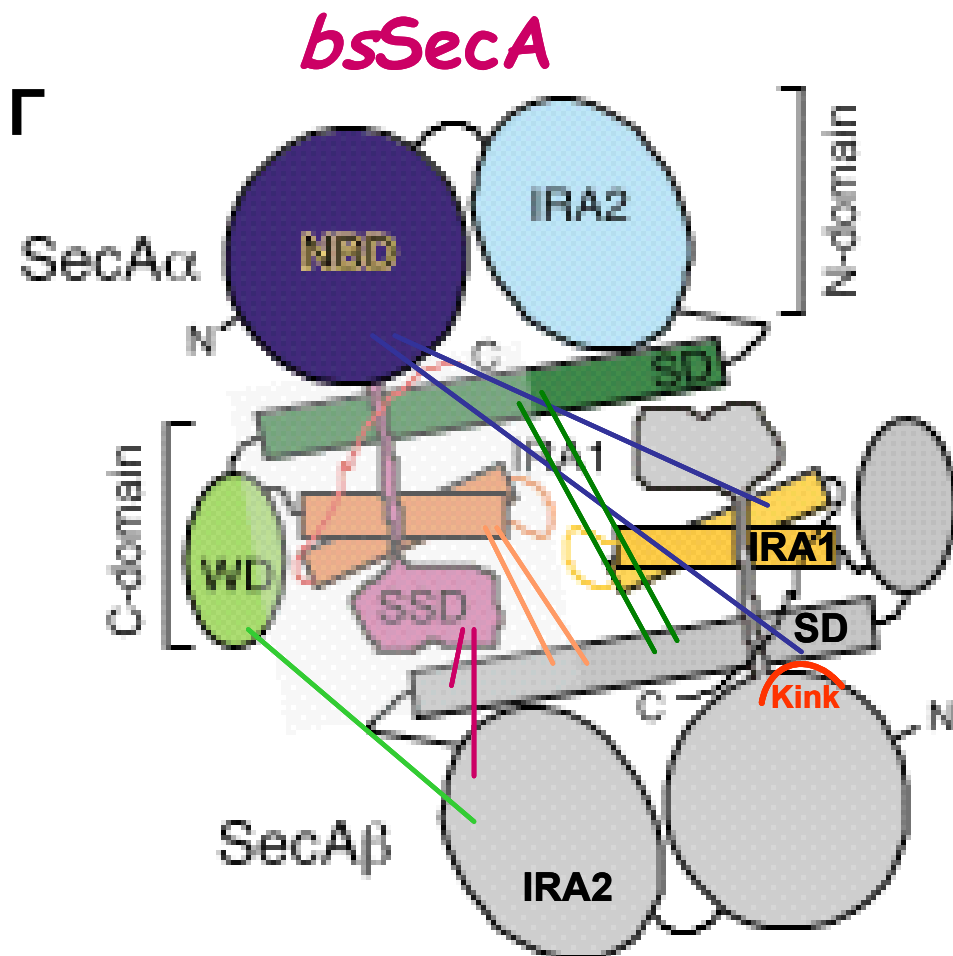
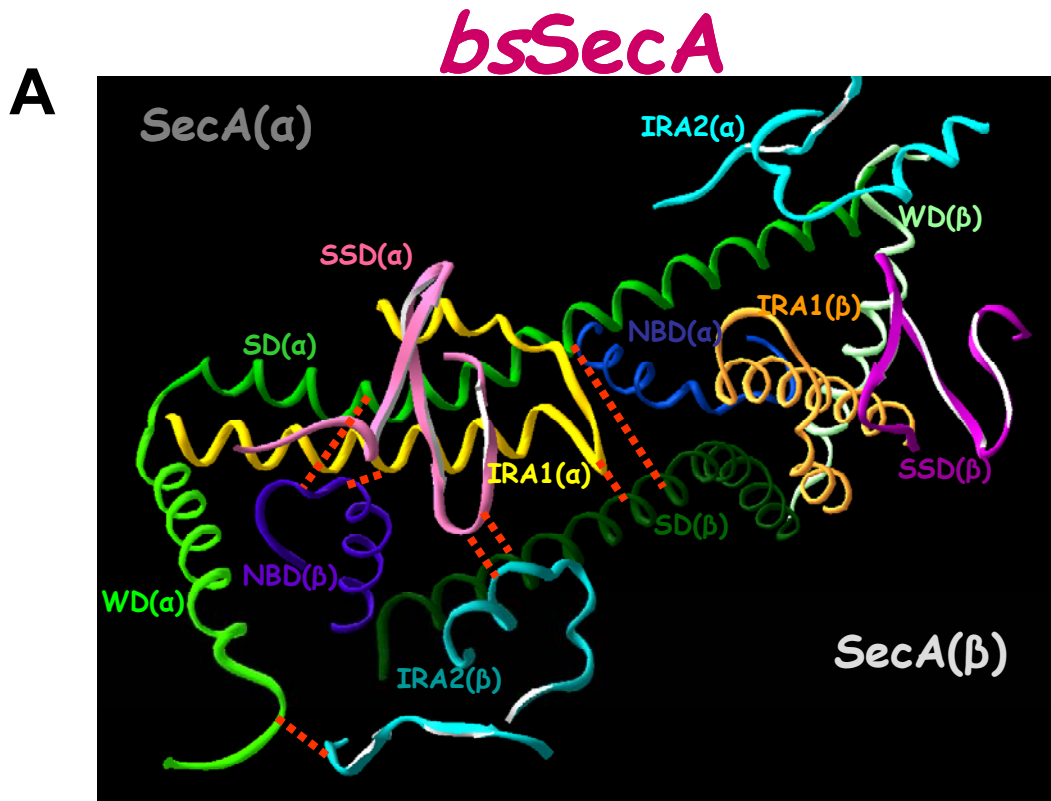


# *mtSecA*

**B**

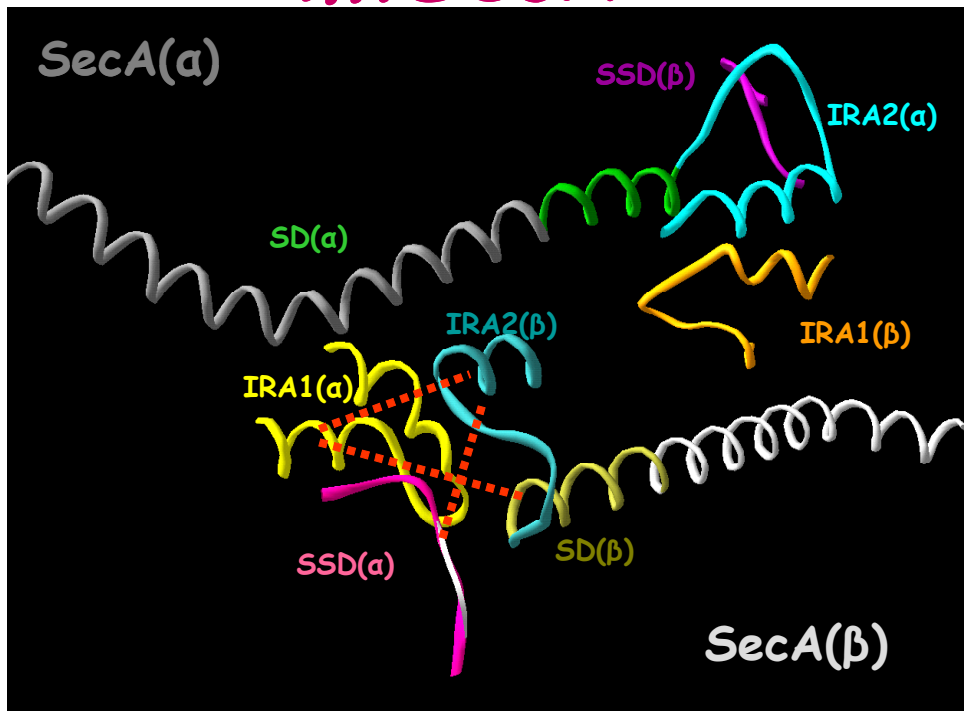


Σχήμα 117: Χρωματική απεικόνιση των περιοχών των δύο μονομερών στην *bsSecA* (A) και στην *mtSecA* (B) που έρχονται σε επαφή κατά τον διμερισμό.

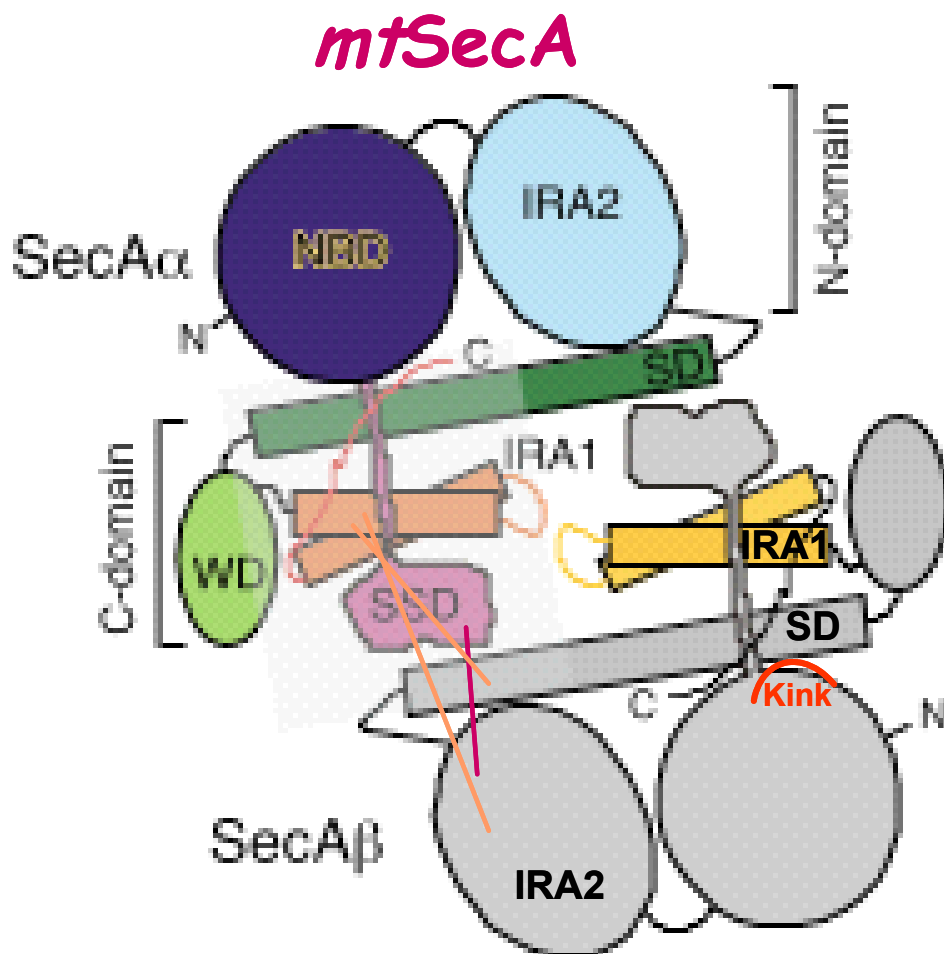


# *mtSecA*

B

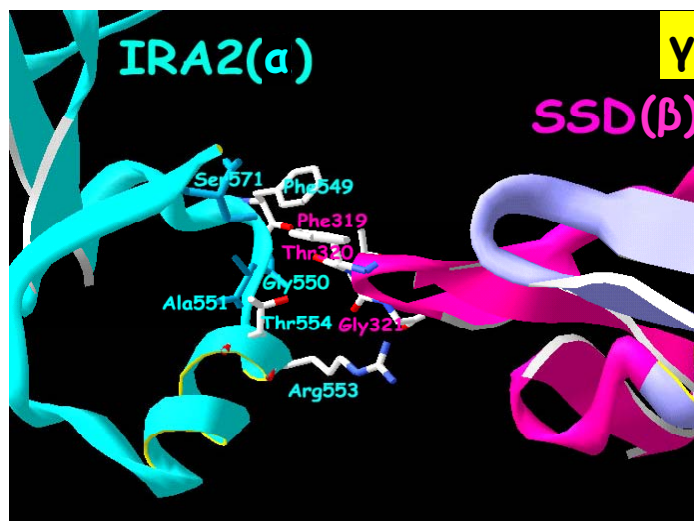
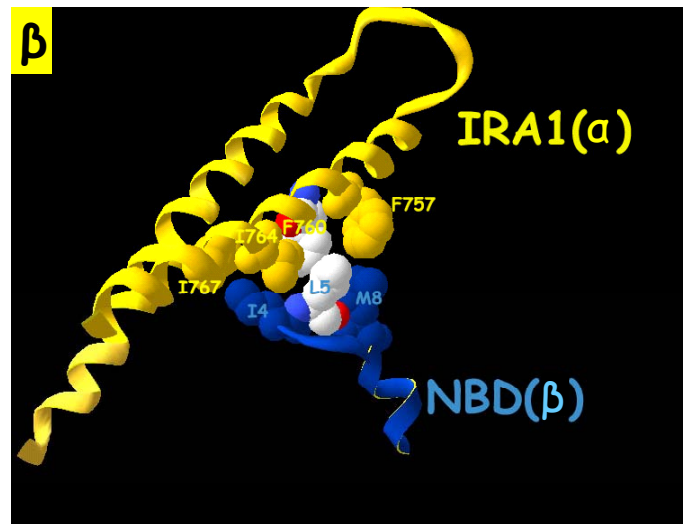
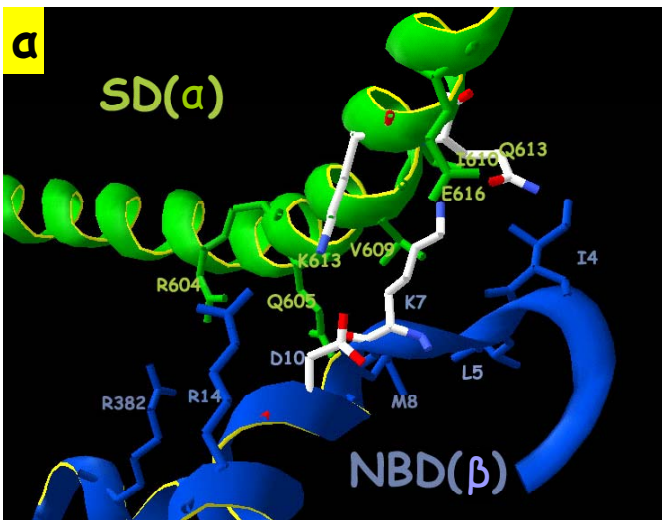


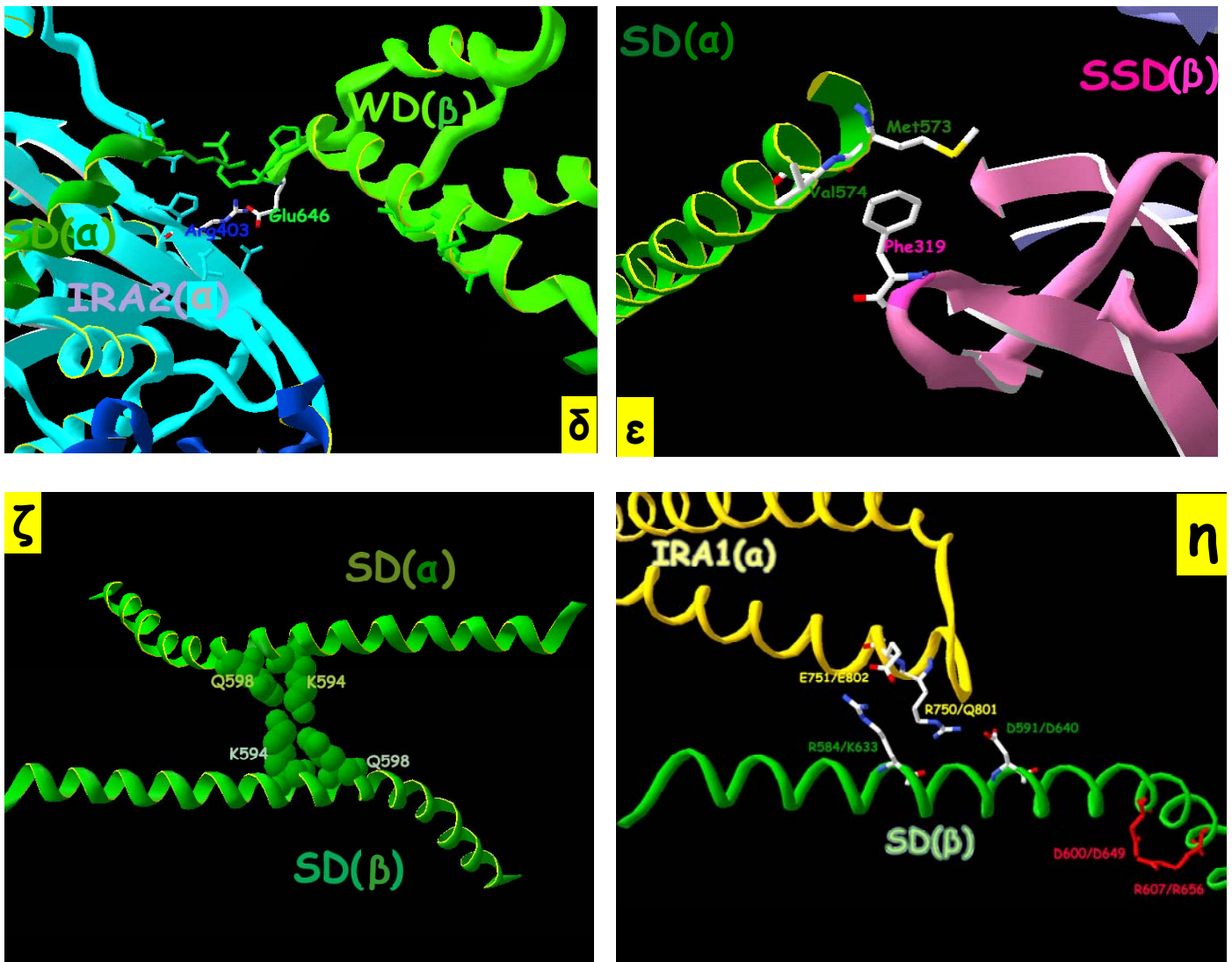
Δ



Σχήμα 118: Μεγένθυση των σκιασμένων περιοχών διμερισμού της *bsSecA* (A), και της *mtSecA* (B) από το προηγούμενο σχήμα 119. Με κόκκινες γραμμές απεικονίζονται τα υπάρχοντα είδη αλληλεπιδράσεων, που περιγράφονται αναλυτικότερα στα επόμενα σχήματα 37 και 38. Στα (Γ) και (Δ), γίνεται σχηματική αναπαράσταση των παραπάνω σχημάτων. Οι αλληλεπιδράσεις που ξεκινούν από το πρώτο μονομερές και καταλήγουν στο δεύτερο υποδηλώνονται με γραμμές στα χρώματα των περιοχών που ξεκινούν από το πρώτο μονομερές. Και από εδώ φαίνεται ότι οι αλληλεπιδράσεις είναι περισσότερες στην περίπτωση της *bsSecA* απ' ό τι στην *mtSecA*.

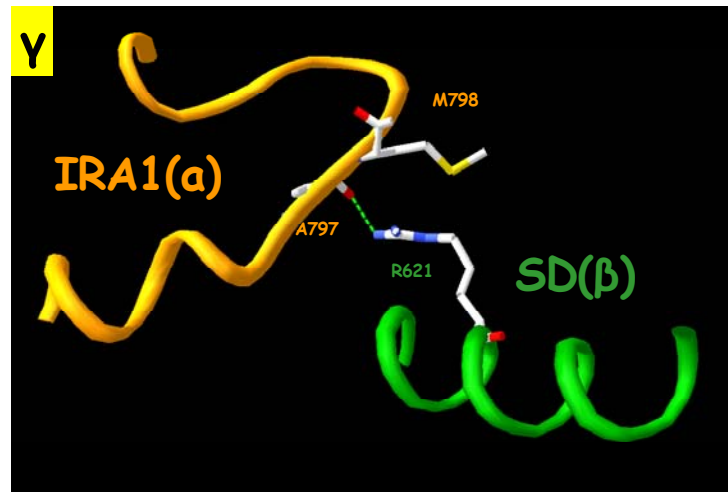
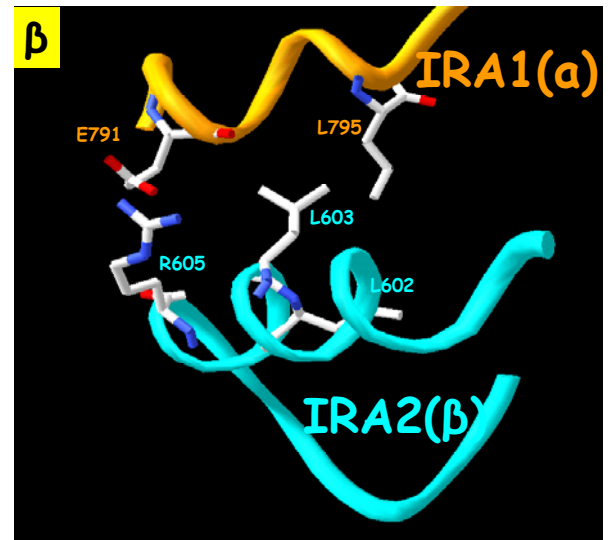
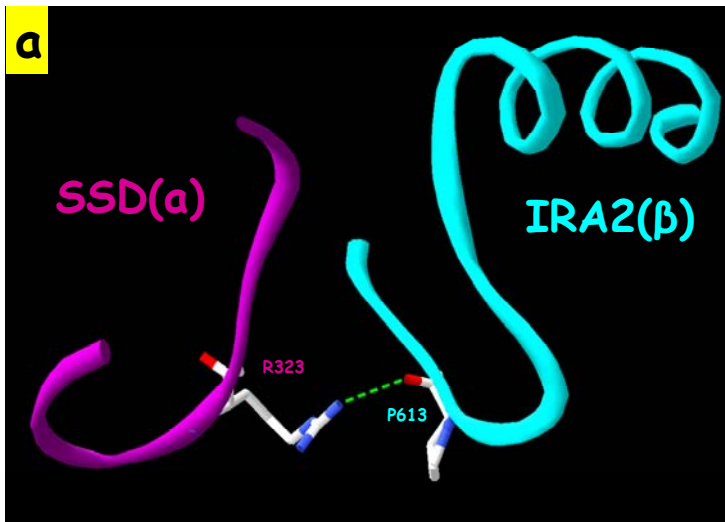
Σχήμα 119: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών της διμερούς *bsSecA*, όπως προκύπτουν από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της (Hunt et al., 2002), οι οποία αποτελείται από α και β πρωτομερή. Κατά συνέπεια οι περιοχές του ενός μονομερούς ονομάζονται περιοχή (α), και του άλλου, περιοχή (β). Στα παραπάνω σχήματα α)-η), τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Αντίθετα οι ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις υποδεικνύονται με αμινοξέα χρωματισμένα ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχονται, δηλαδή μπλε από την περιοχή NBD, λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, ροζ από την περιοχή SSD, και λαχανί από την WD-περιοχή. Στα σχήματα β) και ζ) τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις διάφορες αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με την μορφή σφαιρών, για να τονιστούν οι πιθανές υδρόφοβες και van der Waals αλληλεπιδράσεις. Σ' όλα τα παραπάνω σχήματα σημειώνονται τα αμινοξέα της *bsSecA*, εκτός από το η), όπου σημειώνονται και τα αμινοξέα της *ecSecA*.





Σχήμα 120: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών της διμερούς *bsSecA*, όπως προκύπτουν από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της (Hunt et al., 2002), η οποία αποτελείται από α και β πρωτομερή. Κατά συνέπεια οι περιοχές του ενός μονομερούς ονομάζονται περιοχή (α), και του άλλου, περιοχή (β). Στα παραπάνω σχήματα α-η), τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Αντίθετα οι ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις υποδεικνύονται με αμινοξέα χρωματισμένα ανάλογα με την περιοχή από την οποία προέρχονται, δηλαδή μπλε από την περιοχή NBD, λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, ροζ από την περιοχή SSD, και λαχανί από την WD-περιοχή. Στα σχήματα β) και ζ) τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις διάφορες αλληλεπιδράσεις απεικονίζονται με την μορφή σφαιρών, για να τονιστούν οι πιθανές υδρόφοβες και van der Waals αλληλεπιδράσεις. Σ' όλα τα παραπάνω σχήματα σημειώνονται τα αμινοξέα της *bsSecA*, εκτός από το η), όπου σημειώνονται και τα αμινοξέα της *ecSecA*.

Σχήμα 121: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διάφορων περιοχών της διμερούς *mtSecA*, όπως προκύπτουν από την μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής της (Sharma et al., 2003), η οποία αποτελείται από α και β πρωτομερή. Κατά συνέπεια οι περιοχές του ενός μονομερούς ονομάζονται περιοχή (α), και του άλλου, περιοχή (β). Στα παραπάνω σχήματα α-γ), τα αμινοξέα που συμμετέχουν στις κυριότερες αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται με άσπρο χρώμα όσον αφορά τον ανθρακικό σκελετό τους, με μπλέ όσον αφορά το άζωτο και με κόκκινο όσον αφορά το οξυγόνο. Τα ονόματα των αμινοξέων σημειώνονται με το χρώμα της περιοχής από την οποία προέρχονται, λαδί από την περιοχή SD, κίτρινο από την περιοχή IRA1, γαλάζιο από την IRA2 περιοχή, και ροζ από την περιοχή SSD, και λαχανί. Σ' όλα τα παραπάνω σχήματα σημειώνονται τα αμινοξέα της *mtSecA*.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συζήτηση**

Όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή η IRA1 υποπεριοχή της ευρύτερης C-περιοχής παίζει τον ρόλο ενδομοριακού διακόπτη ο οποίος είναι ανοιχτός όταν η SecA βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και διαθέτει τα βασικά μόνο επίπεδα ATPάσης, ενώ είναι κλειστός όταν η SecA συμμετέχει στην μεταφορά πρωτεϊνών διαμέσου της μεμβράνης και υδρόλυει με υψηλό ρυθμό ATP. Μ' αυτόν τον τρόπο η έκκριση των πρωτεϊνών από την μεταθετάση και η υδρόλυση ATP από την SecA, είναι διαδικασίες απόλυτα συνδεδεμένες. Προκειμένου να κατανοηθεί η μοριακή βάση δραστηριότητας του IRA1 διακόπτη, κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν μία σειρά από σημειακές μεταλλαγές σε θέσεις της περιοχής IRA1 με >95% ταυτότητα και ομοιότητα, τόσο με βιοχημικές όσο και με βιοφυσικές μεθόδους. Διαπιστώθηκε λοιπόν καταρχήν, με την χρησιμοποίηση σημειακών πια μεταλλαγών, ότι η περιοχή IRA1 είναι απαραίτητη για την ζωή του βακτηριακού κυττάρου καθώς οι SecAIRA1 μεταλλαγές είτε είναι ασύμβατες με την ζωή είτε προσδίδουν μειωμένη βιωσιμότητα (σχήμα 58), ενώ όλες εκτός από μία (SecAW775A) είναι ανίκανες να επιτελέσουν μεταφορά πρωτεϊνών (π.χ proOmpA) *in vitro* (σχήμα 60B). Σημειώνεται ότι ο *in vivo* φαινότυπος των διαφόρων SecAIRA1 μεταλλαγών δεν ταυτίζεται απόλυτα με τον φαινότυπο *in vitro*, πιθανότητα διότι εκλείπουν από την *in vitro* δοκιμασία τόσο οι μεμβρανικές πρωτεΐνες SecDFYajC που διευκολύνουν και ρυθμίζουν την εκκριτική διαδικασία, αλλά και η ενέργεια που παρέχεται από την κλίση συγκέντρωσης των πρωτονίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με πρωθύστερες μελέτες ελλείψεων ή προσθηκών στην IRA1 περιοχή (SecAΔIRA1 ή SecA::IRA1; Jarosik and Oliver; Karapanou et al., 1999). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι όλες οι SecAIRA1 μεταλλαγές παρουσιάζουν αλλαγές και στα τρία είδη ATPάσης τους (πίνακας I) με κυριότερο πρόβλημα για αρκετές απ' αυτές την ενεργοποίηση της ATPάσης τους είτε με μεμβράνες είτε και με το πρωτεϊνικό υπόστρωμα. Σημειώνουμε ότι ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται μεμβρανικά κυστίδια και SecAIRA1 πρωτεΐνες 5 φορές σε περίσσεια σε σχέση με την συγγένεια των ~200nM που παρουσιάζουν για το σύμπλοκο SecYEG (πίνακας V), πάλι το πρόβλημα της ενεργοποίησης της ATPάσης τους κατά την διαδικασία της μετατόπισης παραμένει. Πάντως η Μεμβρανική και η ATPάση μετατόπισης των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών προσομοιάζει με τον φαινότυπο τους *in vivo*, γεγονός που σημαίνει ότι η SecAR792A και η SecAF811A εστιάζουν την ανικανότητα τους να επιτελέσουν μεταφορά πρωτεϊνών *in vitro* όχι σε απουσία υψηλών ρυθμών υδρόλυσης αλλά πιθανά στην παρουσία προβλημάτων στην εισαγωγή και εξαγωγή τους από την μεμβράνη, διαδικασίες όμως που υποβοηθούνται από τις SecDFYajC μεμβρανικές πρωτεΐνες και το PMF *in vivo*.

Λεπτομερής βιοχημική ανάλυση όλων των SecAIRA1 μεταλλαγών έδειξε ότι παρόλο που πρόκειται για διμερείς πρωτεΐνες (σχήμα 108) με συνολική δευτεροταγή δομή ανάλογη της SecAWT (πίνακας III και σχήματα 63 και 64), παρουσιάζουν βλάβες σ' όλες τις ιδιότητες και λειτουργίες του DEAD κινητήρα και μολονότι ο τελευταίος αποτελεί τον καταλυτικό πυρήνα της SecA, εντούτοις διαφαίνεται ότι όλες οι δραστηριότητες του βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του IRA1 διακόπτη. Συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι η συγγένεια σχεδόν όλων των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών για το ADP, είναι ελαττωμένη σε σχέση με αυτήν της SecAWT, τόσο στους 4 όσο και στους 37°C (πίνακας II). Η ελαττωμένη συγγένεια των SecAIRA1 πρωτεϊνών για το νουκλεοτίδιο στους 4°C δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει υδρόλυση του ATP στον πάγο, αλλά εξηγεί την ανεβασμένη περισσότερο ή λιγότερο δραστηριότητα της ATPάσης τους στους 37°C. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι για ορισμένες SecAIRA1 μεταλλαγές (SecAI789R, SecAR792A, SecAE802A, και SecAE806A) δεν παρατηρείται μεταβολή στην συγγένεια του νουκλεοτιδίου από τους 4 στους 37°C, όπως στην περίπτωση της SecAWT, που διαπιστώνεται μείωση της συγγένειας για το νουκλεοτίδιο στην μισή τιμή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι έχοντας ήδη αποκτήσει την διαμόρφωση της χαμηλής συγγένειας για το νουκλεοτίδιο στους 4°C, οι παραπάνω SecAIRA1 μεταλλαγές δεν διαθέτουν την κατάλληλη πλαστικότητα για να υποστούν κάποια μεταβολή στη δομή τους με την θερμοκρασία.

Εξετάζοντας λεπτομερέστερα την ικανότητα δέσμωσης των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών για το ADP (πίνακας II), διαπιστώθηκε σε συμφωνία με τα παραπάνω ότι όλες αυτές οι μεταλλαγές διαθέτουν μεγαλύτερους ρυθμούς απελευθέρωσης νουκλεοτιδίου στους 4°C σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Οι ρυθμοί αυτοί μεγαλώνουν κατά την μετάβαση από τους 4 στους 37°C, όπως συμβαίνει και για την SecAWT, αλλά είναι συγκριτικά με την SecAWT, μεγαλύτεροι στην περίπτωση των μισών SecAIRA1 πρωτεϊνών με εξαίρεση τις SecAI789R, SecAR792A, SecAP799A, SecAE802A, και SecAE806A. Από την άλλη μεριά

οι ρυθμοί δέσμευσης του ADP, ενισχύονται όπως και στην περίπτωση του DEAD κινητήρα για κάποιες από τις SecAIRA1 μεταλλαγές (σε μικρότερο βαθμό όμως από την αύξηση του ρυθμού απελευθέρωσης του νουκλεοτιδίου, που δικαιολογεί και την αυξημένη  $K_D$  όλων των SecAIRA1 πρωτεϊνών), ενώ για τις υπόλοιπες ο ρυθμός δέσμευσης είναι ή μικρότερος (SecAF811A), ή της ίδιας τάξης με τον ρυθμό δέσμευσης της SecAWT (SecAR792A, SecAE802A, και SecAY803A). Στους 37°C ενώ ο DEAD κινητήρας δεσμεύει δύσκολα το ADP, η παρουσία της C-περιοχής, έστω και τροποποιημένης, σ' όλες τις SecAIRA1 μεταλλαγές, είναι αρκετή για να εξασφαλίσει την ομαλή αύξηση της δέσμευσης του νουκλεοτιδίου με την θερμοκρασία, και να διατηρήσει σ' όλες τις IRA1 μεταλλαγμένες πρωτεΐνες τον ίδιο ρυθμό δέσμευσης νουκλεοτιδίου με την SecAWT. Συμπερασματικά η IRA1 περιοχή προκαλεί αλλαγές στην συγγένεια του DEAD κινητήρα για το ADP, που εκδηλώνονται είτε με αλλαγή στον ρυθμό απελευθέρωσης ή στον ρυθμό δέσμευσης του νουκλεοτιδίου, ή και στους δύο. Σημειώνεται ότι από πειράματα πρωτεόλυσης στους 37°C, διαπιστώνεται ότι η C-περιοχή της SecA δεν συντελεί στην διαμόρφωση του DEAD κινητήρα στην ίδια θερμοκρασία, καθώς τόσο το προφίλ πρωτεόλυσης του N68 όσο και του DEAD κινητήρα της SecA στους 37°C είναι παρόμοια (σχήμα 74 και 75). Όμως όπως είδαμε παραπάνω η συγγένεια για το ADP στους 37°C, μεταξύ της SecA και του N68 είναι κατά πολύ διαφορετική, πράγμα που σημαίνει ότι η διαμόρφωση του DEAD κινητήρα στους 37°C από την στιγμή που έρχεται στο προσκήνιο το νουκλεοτίδιο και αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη, ή μέχρι τη στιγμή που απελευθερώνεται, ελέγχεται από την C-περιοχή, και ειδικότερα από την IRA1 περιοχή, αφού οι επιδράσεις της τελευταίας στην συγγένεια του DEAD κινητήρα για το νουκλεοτίδιο είναι ηπιότερες αλλά αντίστοιχες με την απώλεια της C-περιοχής.

Επειδή οι περισσότερες SecAIRA1 μεταλλαγές δεν παρουσιάζουν Μεμβρανική ATPάση (πίνακας I), αλλά αντίθετα μειωμένη ATPάση παρουσία SecYEG πρωτεολιποσωμάτων, εξετάστηκε η συγγένεια των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών για το μεμβρανικό σύμπλοκο SecYEG. Διαπιστώθηκε ότι όλες οι παραπάνω μεταλλαγμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μειωμένη συγγένεια για το σύμπλοκο SecYEG, αντίστοιχα με τον DEAD κινητήρα (πίνακας V), γεγονός που σημαίνει ότι η διαταραγμένη C-περιοχή όπως και η απουσία της είτε ελαττώνει την συγγένεια του DEAD κινητήρα (η C-περιοχή δεν αλληλεπιδρά με το SecYEG σύμπλοκο) για το παραπάνω σύμπλοκο, είτε επιδρά στην συνεργατικότητα των δύο πρωτομερών του DEAD κινητήρα στην SecA, (όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες είναι διμερείς), και μειώνει έτσι την συνολική δέσμευση των SecAIRA1 πρωτεϊνών στην μεμβράνη. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως, μειώνεται η ικανότητα συγκρότησης της ενεργής μεταθετάσης (SecYEG με SecA) στη μεμβράνη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η συμπεριφορά των παραπάνω πρωτεϊνών όσον αφορά την συγγένεια τους στην μεμβράνη, προσομοιάζει με την συμπεριφορά της SecAWT παρουσία νουκλεοτιδίου. Βρέθηκε ότι η συγγένεια της SecAWT για το SecYEG, μειώνεται παρουσία ATP, και περιορίζεται ακόμα περισσότερο παρουσία ADP. Στην πρώτη περίπτωση η SecA αποκτά την λεγόμενη εκτεταμένη διαμόρφωση και εισέρχεται στην μεμβράνη, οπότε πιθανά ελαττώνεται η συγγένεια της για το σύμπλοκο SecYEG, προκειμένου να διευκολυνθεί η μετακίνηση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη. Στη δεύτερη περίπτωση, ενδέχεται η συγγένεια της να ενισχύεται παρουσία του πρωτεϊνικού υποστρώματος. Στην περίπτωση αυτή, η SecA αποκτά την συμπαγή της διαμόρφωση και εξέρχεται από την μεμβράνη, οπότε και αναμένεται μειωμένη συγγένεια για το SecYEG. Οι SecAIRA1 πρωτεΐνες φαίνεται να έχουν αποκτήσει την εκτεταμένη διαμόρφωση, αφού η συγγένεια τους είναι της ίδιας τάξης μ' αυτήν της SecAWT με ATP. Η υπόθεση αυτή μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω με πειράματα μέτρησης της ποσότητας της SecAWT ή των διάφορων SecAIRA1 που εισέρχεται στην μεμβράνη, σε σχέση με την ποσότητα της πρωτεΐνης που απλά δεσμεύεται στην μεμβράνη.

Επειδή όμως οι SecAIRA1 μεταλλαγές δεν παρουσιάζουν και ATPάση μετατόπισης, εξετάστηκε η δέσμευση σ' αυτές του πεπτιδίου σηματοδότη των εκκρινόμενων υποστρωμάτων (σχήμα 69). Σε κάθε περίπτωση διαπιστώθηκε τροποποιημένη δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη σε σχέση με την δέσμευση που παρουσιάζει η SecAWT, η οποία μάλιστα παρουσιάζεται ενισχυμένη, ίσως και περισσότερο απ' ότι στην περίπτωση του DEAD κινητήρα, χωρίς όμως, όπως και στην περίπτωση του τελευταίου, να ταυτίζεται με ενισχυμένη μετατόπιση πρωτεϊνών μέσα από μεμβράνες.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της λειτουργικής μας μελέτης καταλήγουμε σε τρεις παρατηρήσεις: α) Η IRA1-περιοχή επηρεάζει πολλαπλές ενζυματικές αντιδράσεις της SecA, β) οι διάφορες μεταλλαγές στην IRA1-περιοχή προκαλούν παρόμοιες ποιοτικά αντιδράσεις στην πρωτεΐνη, οι οποίες διαφέρουν όμως ποσοτικά, προκαλώντας ποικιλότητα στην ένταση των διαφόρων φαινοτύπων, και γ) η ποικιλότητα στην ένταση του ίδιου φαινοτύπου οφείλεται

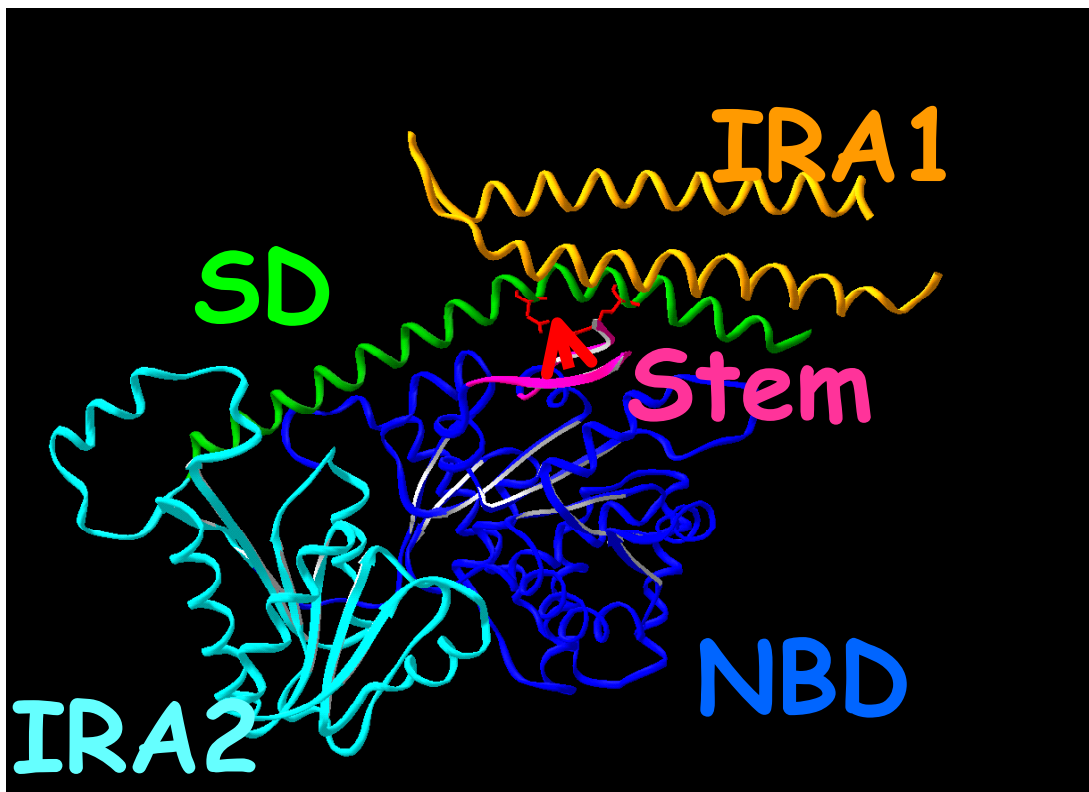
στο ότι κάθε μεταλλαγή ανάλογα με την περιοχή στην οποία βρίσκεται επηρεάζει διαφορετικό και διακριτό στάδιο της πορείας δράσης της πρωτεΐνης. Πράγματι όπως φαίνεται και από την δομή της SecA (σχήμα 55, 56 και Κεφάλαια III.I, III.II), τα εννέα αμινοξέα που μεταλλάξαμε επιτρέπουν στην περιοχή IRA1 να συμμετέχει σε πολλές και διακριτές επιδράσεις και κατά συνέπεια προβλέπουν την επίδραση αλλαγών στην διαμόρφωση της SecA σε πολλές περιοχές, που τα πειραματικά αποτελέσματα επιβεβαίωσαν και έδειξαν ότι μπορεί να είναι και ευρείας κλίμακας (σχήμα 65, 76, και πίνακας III). Η εύρεση της τοποθεσίας των διάφορων αυτών αμινοξέων στην τρισδιάστατη δομή της SecA, αποκαλύπτει τις τοπικές αλληλεπιδράσεις του IRA1 διακόπτη, και βοηθά στην μοριακή κατανόηση του τρόπου δράσης αυτού του ρυθμιστικού στοιχείου. Πρώτα απ' όλα ο IRA1 διακόπτης διαθέτει μία χαρακτηριστική δομή έλικας-λούπας-έλικας (H1-L-H2; σχήμα 54) ή βρόγχου-θληϊάς. Προσεκτικότερη παρατήρηση του στοιχείου υπό συγκεκριμένη γωνία (σχήμα 56E και 57), διαπιστώνεται ότι η δεύτερη έλικα (H2), τρέχει προς την αντίθετη κατεύθυνση σε σχέση με την πρώτη, και εντοπίζεται κάτω από αυτήν υπό γωνία. Στη συνέχεια από την μελέτη της κρυσταλλικής δομής διαπιστώθηκε ότι ο IRA1 διακόπτης συμμετέχει σε έξι διακριτές, ειδικές, και άμεσες αλληλεπιδράσεις, μερικές μάλιστα από τις οποίες περιλαμβάνουν ένα περιορισμένο αριθμό αμινοξέων. Συγκεκριμένα εντοπίζονται ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μέσα στην IRA1-περιοχή (σχήμα 111A, BI, 112A και πίνακες IX και X), όπου οι δύο έλικες συνδέονται μεταξύ τους κύρια με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σ' αυτές εμπλέκονται τρία από τα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν στην παρούσα διατριβή, όπως η L785 (σχήμα 110βι-iv). Σημειώνεται ότι μόνο στην περίπτωση της *bsSecA* φαίνεται η δημιουργία υδροφοβικού συγκροτήματος της L785 με την Tyr803 και την Met810, η οποία όμως με την αντικατάσταση της λευκίνης από αλανίνη διαταράσσεται έντονα και στην περίπτωση της *bsSecA*, αλλά και της *mtSecA*. Το δεύτερο αμινοξύ που εμπλέκεται στην παραπάνω περιοχή είναι η Ile789 [σχήμα 110γι, ii(1), και 110γiii, iv(1)], της οποίας η αλληλεπίδραση στην *bsSecA* εντοπίζεται κύρια με το E802, ενώ στην περίπτωση της *mtSecA*, με την R792. Όταν η ισολευκίνη αντικατασταθεί από αργινίνη όμως, και στην *bsSecA* και στην *mtSecA* ενισχύεται η αλληλεπίδραση του 789 αμινοξέος με το E806, και την L785 καθώς και με την Y803A, ή το E802 αντίστοιχα. Τέλος η Y803 (σχήμα 110ηι-iv) συνιστά αλληλεπίδραση με την L785 που είναι πιο έντονη στην *bsSecA*. Αξίζει να σημειωθεί ότι το και το αμινοξύ P799A, αναμένεται να είναι σημαντικό για το σημείο έναρξης της δεύτερης έλικας, αφού αντικατάσταση του από αλανίνη αναμένεται να προκαλεί επέκταση της H2. Επομένως πρέπει να παίζει ρόλο όπως και τα παραπάνω αμινοξέα στην διατήρηση της ακεραιότητας της δομής του IRA1.

Έπειτα εντοπίζονται αμινοξέα του IRA1 που μετέχουν στην επικοινωνία του με την περιοχή SD (σχήμα 111A, BII, 114E και πίνακες IX και X). Συγκεκριμένα ογκώδη αρωματικά αμινοξέα τόσο από την έλικα H1 (W775), αλλά και από την έλικα H2 (F811 και, Y803, που μετέχει και σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μέσα στο IRA1) εισέρχονται σε υδρόφοβες τσέπες στο δεύτερο μισό της περιοχής του SD. Έτσι στην περίπτωση της W775 (σχήμα 112αι-iv), η αντικατάσταση της από αλανίνη αναστέλλει την αλληλεπίδραση του IRA1 με την I659 της SD, τόσο στην *bs* όσο και στην *mtSecA*. Αντίστοιχα στην περίπτωση της αντικατάστασης της F811 από αλανίνη (σχήμα 110θι-iv) διαταράσσεται η αλληλεπίδραση του IRA1 με την Q656, που είναι πιο έντονη στην περίπτωση της *mtSecA*. Τέλος όταν η Y803 αντικατασταθεί από αλανίνη (σχήμα 110ηι-iv) διακόπτεται η επικοινωνία της H2 με την Y648 της περιοχής SD, κύρια στην περίπτωση της *bsSecA*. Η επικοινωνία όμως του δεύτερου μισού της έλικας της SD-περιοχής με την περιοχή IRA1, είναι απαραίτητη για να αποκτήσει η πρώτη την κατάλληλη διεύθυνση (σχηματίζεται δεσμίδα τριών α-ελίκων από το IRA1 και το δεύτερο μισό της περιοχής του SD; σχήμα 120) που την φέρνει σε επικοινωνία με την περιοχή NBD (σχήμα 116β), και την περιοχή του stem της ευρύτερης SSD-περιοχής (σχήμα 116ε, και 116ι). Όταν έρθει η SD-περιοχή στην κατάλληλη θέση δημιουργείται και δεσμός άλατος μεταξύ των Arg656 και Asp649, ο οποίος ενισχύει μία κάμψη στην έλικα της SD (σχήμα 123), και επιτρέπεται έτσι η επικοινωνία της και με την IRA2-περιοχή (σχήμα 116δ).

Υπάρχουν όμως αμινοξέα του IRA1 που εμπλέκονται στην επικοινωνία του και με την SSD-περιοχή (σχήμα 111A, BI, 112B-Δ, 113αι-iii και πίνακες IX και X). Διαπιστώνεται ότι ενώ αυτά είναι σχεδόν τα ίδια στην *bs* και *mtSecA*, όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις με τις SSD1, και Stem in υποπεριοχές, διαφέρουν αισθητά στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης της IRA1 με την SSD2 υποπεριοχή. Έτσι στην *bsSecA* συμμετέχουν στην τελευταία αλληλεπίδραση αμινοξέα και της έλικας H1 και της έλικας H2, και σε μικρότερο βαθμό και της λούπας, στην *mtSecA* όμως μετέχουν αμινοξέα μόνο από την λούπα και την έλικα H1. Συγκεκριμένα από τα αμινοξέα του IRA1 που μεταλλάξαμε στην επικοινωνία με την SSD-περιοχή παίρνουν μέρος στην *bsSecA* το E806 (σχήμα 110εί, ii), που όταν αντικατασταθεί από αλανίνη διακόπτονται οι



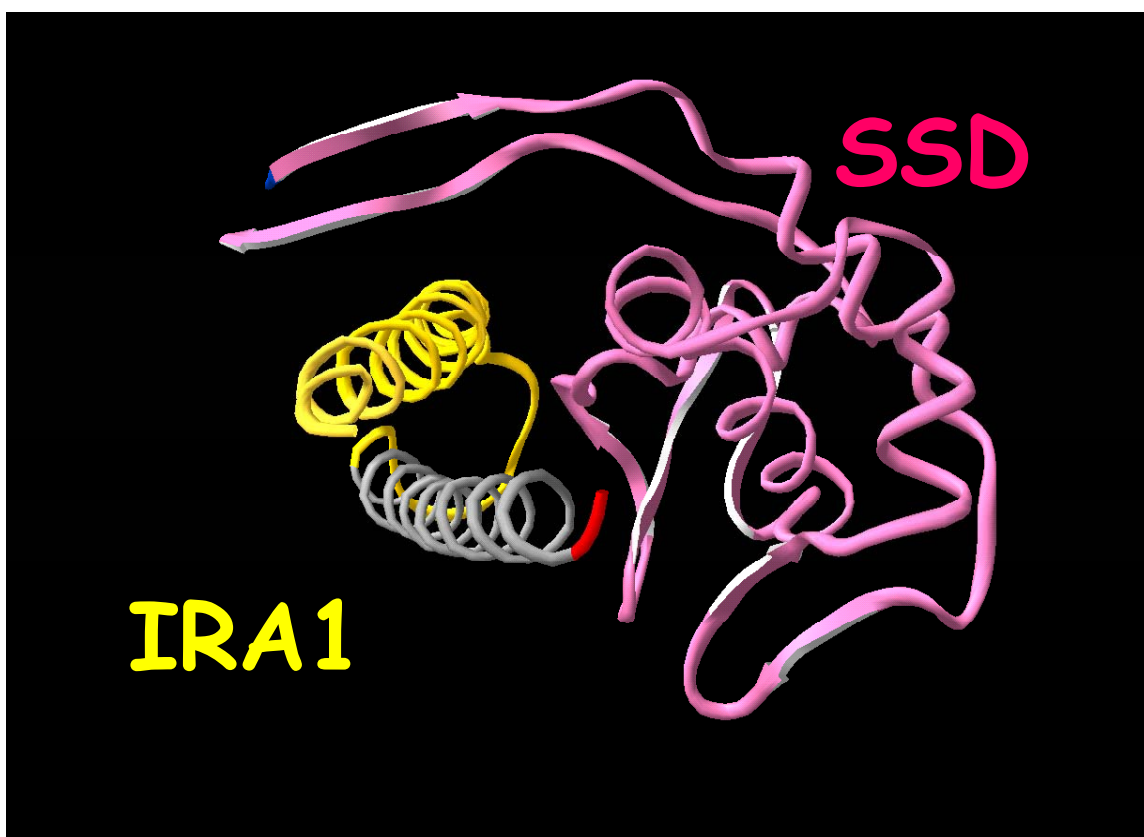
Σχήμα 122: Ο IRA1 διακόπτης μαζί με το δεύτερο μισό της έλικας της SD-περιοχής με την οποία αλληλεπιδρά (διακρίνονται τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα) σχηματίζει δεσμίδα τριών ελίκων.



Σχήμα 123: Επικοινωνία της SD(α) με την IRA1(α)-περιοχή. Η αλληλεπίδραση του δεύτερου μισού της έλικας της SD-περιοχής με το στοιχείο IRA1 συντελεί στην απόκτηση της κατάλληλης διαμόρφωσης από την SD-περιοχή έτσι ώστε να επικοινωνεί με την SSD-, την NBD-, και την IRA2-περιοχή του ίδιου πρωτομερούς. Συγκεκριμένα η έλικα της SD-περιοχής κάμπτεται στην ευρύτερη περιοχή του δεσμού άλατος μεταξύ των R656 και D649 αμινοξέων (αμινοξέα με τον κόκκινο σκελετό) και αγκαλιάζει την NBD-IRA2 επιφάνεια ενώ προσεγγίζει και το στέλεχος (Stem) της SSD-περιοχής.

δεσμοί υδρογόνου με την Q345. Συμμετέχει επίσης και η R792 (σχήμα 110δι, ii)

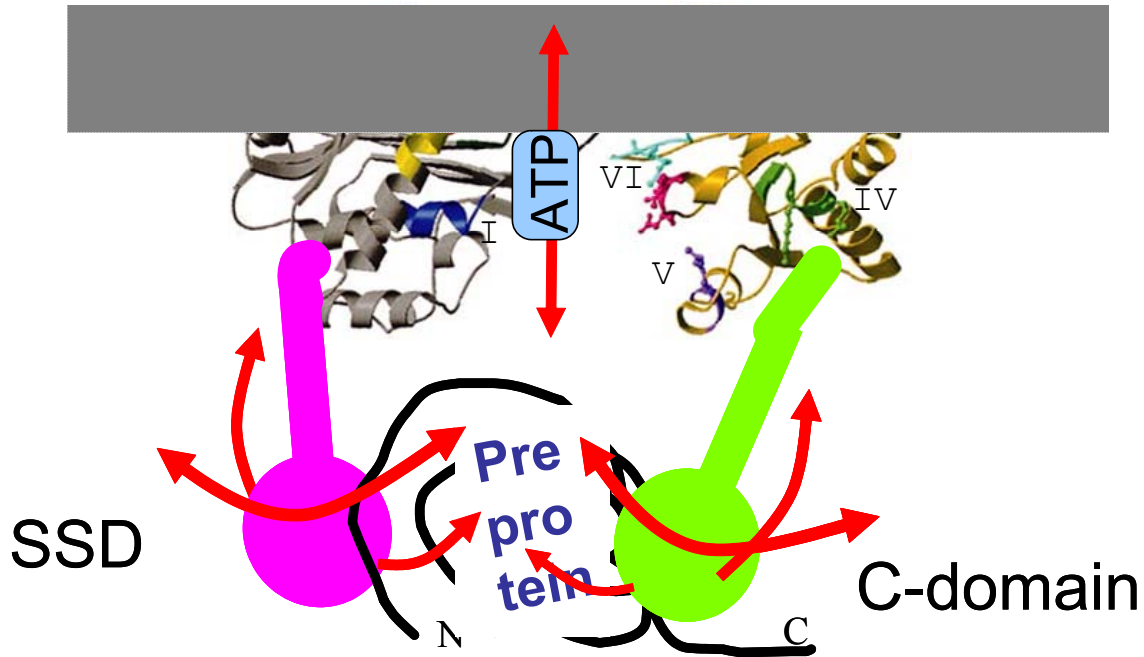
που αλληλεπιδρά με την Q345, ενώ διευκολύνει και την αλληλεπίδραση της Y794 του IRA1 με την R342 της SSD2, αλλά όταν αντικατασταθεί από αλανίνη ενώ διατηρείται η αλληλεπίδραση με την Q345, δεν υπάρχει άπωση μεταξύ αυτής και της R342, και έτσι η επικοινωνία της τελευταίας με την Y794 δεν θα είναι η ίδια. Στην *mtSecA* η R792 (σχήμα 110δiii, iv) παρουσιάζει πιο έντονη αλληλεπίδραση με την R342, καθώς σχηματίζει δεσμό-H με το E806. Το E806 (σχήμα 110ειiii, iv) από την άλλη δεν επιδρά στην SSD-περιοχή παρά μόνο έμμεσα, επικοινωνεί όμως με την R792 και αυτή με την σειρά της όπως είδαμε με την SSD1-υποπεριοχή. Αξίζει να τονιστεί ότι τόσο η I789 όσο και η L785 συμβάλλουν στην επικοινωνία της IRA1 με την SSD-περιοχή μόνο μετά την αντικατάσταση τους από αργινίνη (σχήματα 110γι-iv(2) και 110βι-iv). Έτσι στην περίπτωση της I789R της *bsSecA* και της *mtSecA*, η αργινίνη σχηματίζει δεσμό-H με το E806 τροποποιώντας την αλληλεπίδραση του με την Q345. Στην περίπτωση της L785 στην *bsSecA* (σχήμα 110βι, ii) η αντικατάσταση της λευκίνης από αργινίνη διακόπτει την επικοινωνία της περιοχής IRA1 με την G346. Στην *mtSecA* (σχήμα 110βiii, iv) όμως η επίδραση στην επικοινωνία των IRA1-SSD περιοχών διαφαίνεται μόνο όταν η λευκίνη γίνει αργινίνη, καθώς τότε η τελευταία σχηματίζει δεσμό-H με την A781 και διαταράσσει την επικοινωνία της με την R348 της SSD-περιοχής. Σημειώνεται πάντως ότι οι αλληλεπιδράσεις της IRA1 και με τις τρεις υποπεριοχές της SSD-περιοχής είναι πολύ περιορισμένες αν και η τελευταία περιβάλλει την πρώτη (σχήμα 57 και 122). Ενδέχεται οι



Σχήμα 124: Η SSD-περιοχή περιβάλλει την δομή του IRA1 στοιχείου.

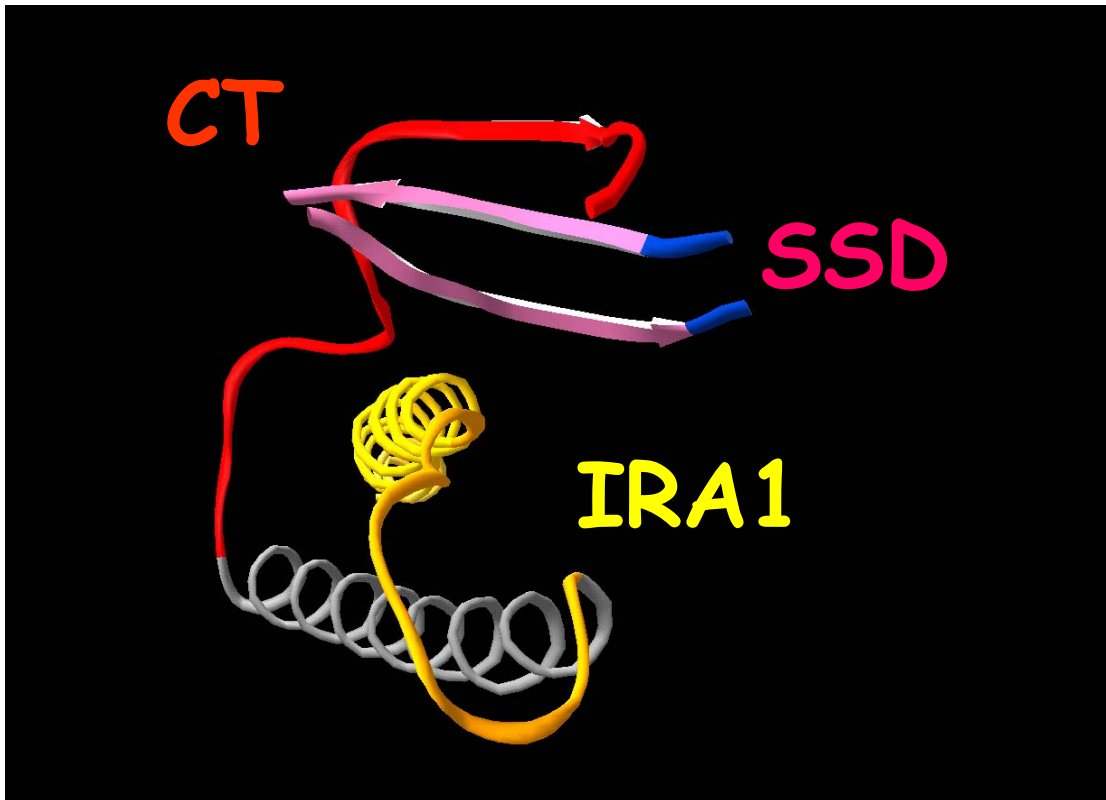
αλληλεπιδράσεις αυτές να ενισχύονται παρουσία των διάφορων υποκαταστατών της διαδικασίας της μετατόπισης, ή είναι δυνατόν οι κενές μεταξύ τους περιοχές να γεμίζουν από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, που προτείνεται ότι αλληλεπιδρά τουλάχιστον με την SSD-περιοχή (σχήμα 125 :Two lever model). Η SSD-περιοχή πέρα από την ασθενή αλληλεπίδραση με την IRA1-περιοχή, αλληλεπιδρά με την περιοχή του SD (σχήμα 118ε), όπως είδαμε καθώς και με την WD (σχήμα 116ζ; Κάτι που δεν συμβαίνει στην *mtSecA*) και την CT-περιοχή (σχήμα 116η). Από την άλλη μεριά έχουν εντοπιστεί και αμινοξέα στην αρχή

της H1 αλλά και στο τέλος της H2 του IRA1, που αλληλεπιδρούν με την WD-περιοχή (σχήμα 112Z, και πίνακας X). Εξάλλου η περιοχή WD επικοινωνεί και με ομοιοπολική σύνδεση με την H1 του IRA1 (σχήμα 56). Σημειώνεται ότι η WD-περιοχή αλληλεπιδρά και με την CT-περιοχή (σχήμα 116στ), πέρα από την SSD-περιοχή που είπαμε προηγουμένως. Τέλος στο μονομερές της SecA συναντάμε και επικοινωνία της IRA1-περιοχής με την CT-περιοχή (σχήμα 112ΣΤ, και πίνακας X), με την οποία επικοινωνεί με ομοιοπολική σύνδεση μέσω της έλικας H2. Η CT-περιοχή επικοινωνεί όμως και με την NBD (σχήμα 116γ), την WD (σχήμα 116στ), αλλά και με το Stem (Stem out) της SSD-περιοχής (σχήμα 116η) με το οποίο σχηματίζεται έτσι περιοχή τριών β-κλώνων αλυσίδων (σχήμα 126). Όσον αφορά τώρα την επικοινωνία της περιοχής IRA1 στην SecA(α) με το δεύτερο πρωτομερές SecA(β), αυτή εστιάζεται στην αλληλεπίδραση με την περιοχή SD(β) (σχήμα 112K, πίνακας IX, X, και σχήμα 113ζ), που όμως διαφέρει ως προς τα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα μεταξύ των δομών της *bs* και *mt*SecA. Συγκεκριμένα στην *bs*SecA το E802 διαταράσσει την επικοινωνία του IRA1(α) με



Σχήμα 125: Υποθετικό μοντέλο της δέσμευσης του προπρωτεϊνικού υποστρώματος μεταξύ των δύο "μοχλών" του DEAD κινητήρα, της SSD και της C-περιοχής.

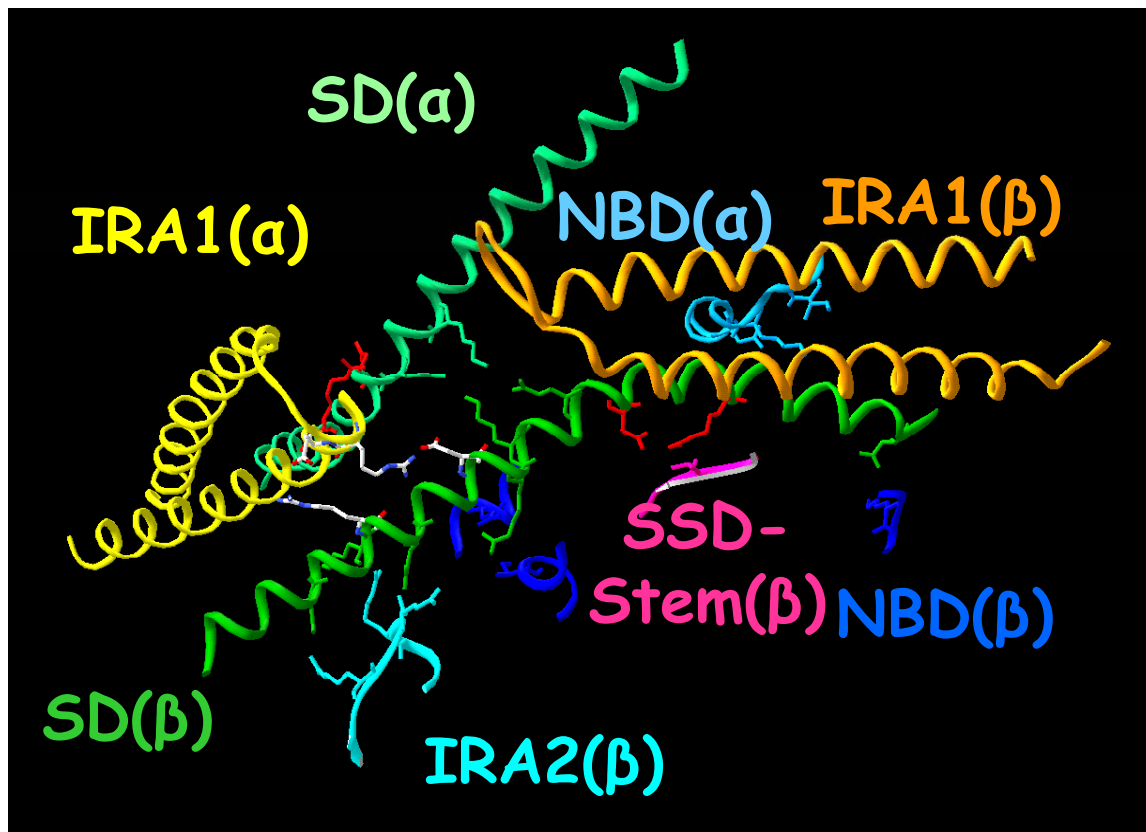
την SD(β) όταν αντικατασταθεί από αλανίνη (σχήμα 110ζi, ii), όπως το ίδιο αναμένεται να επιτελεί και η αντικατάσταση της P799 από αλανίνη, ενώ στην *mt*SecA το E802 είναι στην επιφάνεια, και άλλα αμινοξέα της λούπας διεκπεραιώνουν την επικοινωνία μεταξύ των δύο πρωτομερών. Η αλληλεπίδραση της SD-περιοχής με την περιοχή IRA1 του δεύτερου πρωτομερούς, είναι απαραίτητη για να αποκτήσει η έλικα της SD-περιοχής την κατάλληλη διεύθυνση που θα της εξασφαλίσει την αλληλεπίδραση με διάφορες περιοχές της SecA (σχήμα 127). Συγκεκριμένα η επικοινωνία του πρώτου μισού της α-έλικας της SD-περιοχής, με τον IRA1 διακόπτη του απέναντι πρωτομερούς αναγκάζει την έλικα να γύρει προς τα αριστερά και κάτω (πάντα υπό την οπτική γωνία του σχήματος-σχήμα 128), ενώ η επικοινωνία της με τον IRA1 διακόπτη μέσα στο ίδιο πρωτομερές, όπως είδαμε αναγκάζει το δεύτερο μισό της SD-έλικας να διευθετείται σε δεσμίδα ελίκων μαζί με το γειτονικό IRA1 (σχήμα 120). Μόνο αν η έλικα της SD-περιοχής αλληλεπιδρά και με τα δύο IRA1 στοιχεία της διμερούς SecA αποκτά την κατάλληλη διαμόρφωση, που διευκολύνει τον δεσμό άλατος μεταξύ των D649-R656, και επιτρέπει στην περιοχή του SD να αγκαλιάζει την NBD-IRA2 υποπεριοχή, και να πραγματοποιεί τις ποικίλλες αλληλεπιδράσεις της με την απέναντι έλικα της SD-περιοχής της SecA(β) (σχήμα 120ζ), με την SSD-περιοχή του ίδιου και του απέναντι πρωτομερούς (σχήμα 116ε,ι και 120ε), αλλά και με την NBD-περιοχή της SecA(β) (σχήμα 120α). Από την άλλη μεριά η IRA1(α), μόνο όμως στην *bs*SecA, αλληλεπιδρά και με την NBD(β)-περιοχή κυρίως με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (σχήμα 112I, πίνακας IX, X). Συγκεκριμένα όταν η F811 αντικατασταθεί από αλανίνη (σχήμα 110, ii) περιορίζεται η επικοινωνία της IRA1(α) με την NBD(β)-περιοχή. Σημειώνεται επίσης ότι μόνο από την δομή της *mt*SecA προκύπτει ότι πάλι η περιοχή της



Σχήμα 126: SSD,CT και IRA1-περιοχές. Οι δύο αντιπαράλληλες β-αλυσίδες του στελέχους (stem) της SSD-περιοχής σχηματίζουν μία τριπλή β-πτυχωτή επιφάνεια με την β-αλυσίδα της CT-περιοχής.

λούπας της IRA1(α) επικοινωνεί και με την IRA2(β)-περιοχή (σχήμα 121β). Αξίζει να σημειώσουμε ότι στην περίπτωση της *bsSecA* (σχήμα 117A) οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτομερών, προκύπτουν από το κρυσταλλογραφικό διμερές και έτσι δεν μπορούν να θεωρηθούν απόλυτα επιβεβαιωμένες. Παρόλα αυτά πιθανά υποδηλώνουν εν δυνάμει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο πρωτομερών (σχήμα 118A, Γ), και περιλαμβάνουν εκτός από τις παραπάνω IRA1(α)-SD(β), και IRA1(α)-NBD(β) επικοινωνίες, αλληλεπιδράσεις και μεταξύ των SD(α)-NBD(β) (σχήμα 120α), των SD(α)-SSD(β) (σχήμα 120ε), των SD(α)-SD(β) (σχήμα 120ζ), των IRA2(α)-SSD(β) (σχήμα 120γ), και των IRA2(α)-WD(β) (σχήμα 120δ). Στην περίπτωση της *mtSecA* όμως, στην ασύμμετρη μονάδα εντοπίζονται δύο μονομερή της SecA, και επομένως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών αντιστοιχούν σε ξεκάθαρες μορφές επικοινωνίας, αν και πολύ λιγότερες απ' ό,τι προηγουμένως (σχήμα 117B και 118B, Δ). Συγκεκριμένα πέραν όσων αναφέρθηκαν προηγουμένως δηλαδή των IRA1(α)-SD(β), και IRA1(α)-IRA2(β), εντοπίζονται και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των SSD(α)-IRA2(β) (σχήμα 121α).

Από την παραπάνω δομική ανάλυση της *bsSecA* και της *mtSecA*, αναμένεται ότι το σύνολο των SecAIRA1 μεταλλαγών, επηρεάζει την δομή του IRA1 στοιχείου είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω της διατάραξης της επικοινωνίας του με τις διάφορες περιοχές στο μονομερές ή στο διμερές της SecA. Από την άλλη μεριά η διαπίστωση ότι για όλες τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις του IRA1 διακόπτη παίρνουν μέρος περισσότερα του ενός αμινοξέα (π.χ η W775, η Y803, και η F811 για την επικοινωνία του IRA1 με την έλικα της SD-περιοχής), τα οποία εντοπίζονται σε περισσότερες της μιας υποπεριοχές του IRA1 (π.χ η R792 που μετέχει στην επικοινωνία του IRA1 με την SSD-περιοχή, εντοπίζεται στην λούπα του IRA1, ενώ το E806 στην H2), ενώ αρκετά απ' αυτά μετέχουν στην επικοινωνία με περισσότερες της μιας υποπεριοχές της SecA (π.χ η Y803 μετέχει και στην επικοινωνία του IRA1 με την SD-περιοχή, αλλά και σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μέσα στο IRA1), δικαιολογεί όχι μόνο την ποικιλία των επιρροών των SecAIRA1 μεταλλαγών (επίδραση στην ATPάση των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών, αλλά και στην συγγένεια τους για το σύμπλοκο SecYEG, το πεπτιδίο σηματοδότη, και το νουκλεοτίδιο) αλλά, και τις διαβαθμίσεις στην ένταση αυτών των επιδράσεων από την μία μεταλλαγή στην άλλη (π.χ η Βασική ATPάση των διάφορων SecAIRA1 μεταλλαγών αυξάνεται σε σχέση μ' αυτήν της SecAWT, αλλά σε διαφορετικό



Σχήμα 127: Επικοινωνία της SD(β)-περιοχής και με τα δύο IRA1στοιχεία της διμερούς SecA. Μόνο όταν η SD-περιοχή [SD(β)] επικοινωνεί και με τα δύο IRA1 στοιχεία της διμερούς SecA αποκτά την κατάλληλη διαμόρφωση έτσι ώστε να συνδέεται με την SD(α), NBD(α), NBD(β), IRA2(β), και SSD-Stem(β).

βαθμό για κάθε μεταλλαγή; πίνακας I) . Επιπρόσθετα και η εσωτερική πλαστικότητα και η κινητικότητα που παρουσιάζει η δομή του IRA1 αναμένεται να τροποποιεί ποικίλα στάδια της πορείας δράσης της SecA. Το γεγονός ότι οι H1 και H2 έλικες διασταυρώνονται, το ότι συντηρημένα αμινοξέα εντοπίζονται κύρια μόνο μεταξύ των αλληλεπιδρώντων επιφανειών των παραπάνω ελίκων, το ότι υπάρχει στερεοχημική ανοχή για σημαντικότερες αλλαγές στην πλευρική αλυσίδα πολλών αμινοξέων του IRA1 μεταξύ διαφόρων ειδών SecA, ενώ υπάρχει αναγκαιότητα διακριτού ορίου μόνο μεταξύ H2 και λούπας, καθώς και το ότι διακρίνονται τοπικές διαφορές στην δομή του IRA1 μεταξύ της *bsSecA* και της *mtSecA*, όλα προτείνουν σχετικές μετακινήσεις μεταξύ των δύο ελίκων H1, και H2 του IRA1. Καθίσταται έτσι το IRA1 βασικό μηχανικό στοιχείο, το άνοιγμα και το κλείσιμο του οποίου μπορεί να οδηγεί από ήπιες σε πιο δραστικές αλλαγές της δομής της SecA και κυρίως της διεπιφάνειας των N- και C-περιοχών του ενός μονομερούς, αλλά και της μεσόφασης των μονομερών της SecA μεταξύ τους, θυμίζοντας την δράση του βραχίονα-μοχλού της μυοσίνης. Επιπλέον και η κατάλυση του ATP από την β υπομονάδα της F<sub>1</sub>ATPάσης ρυθμίζεται από την δέσμευση και απελευθέρωση της επιμηκυσμένης γ υπομονάδας (Yoshida et al., 2001), επιβεβαιώνοντας την γενίκευση του παραπάνω μηχανισμού δράσης.

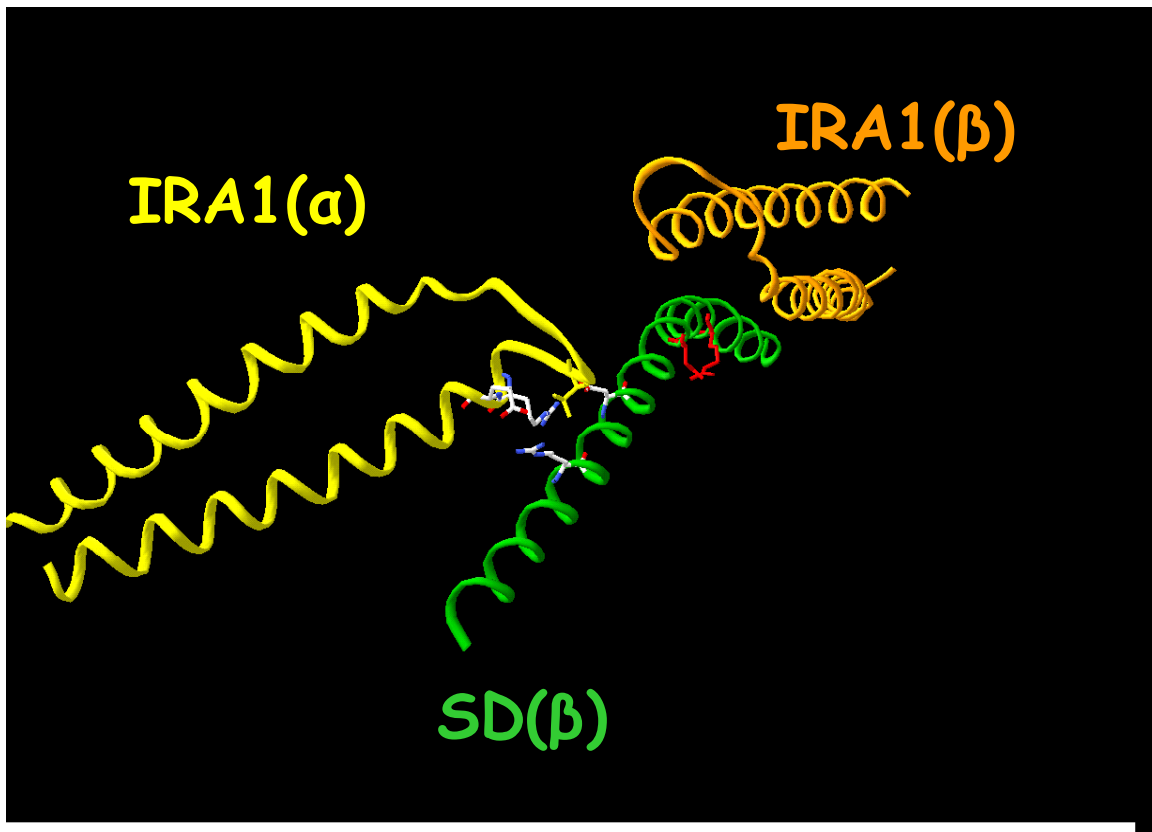
Η ποικιλία των αλληλεπιδράσεων του IRA1 στην διμερή *secA* δεν εξηγεί μόνο την ποικιλία των επιδράσεων των SecAIRA1 μεταλλαγών στην SecA, αλλά προσδίδει στο IRA1 και την ικανότητα να αλλάζει την δυναμική κατάσταση-διαμόρφωση του ενζύμου. Πράγματι, διαπιστώθηκε ότι ο IRA1 διακόπτης, τροποποιεί την συνολική διαμόρφωση της C-περιοχής, (σχήμα 94, 95, 97, 98 και πίνακες VI, VII). Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι προκαλεί αλλαγές στην SD- και στην CTD-περιοχή της C-περιοχής (σχήμα 96), αλλά και στην WD-περιοχή (σχήματα 66, 67, 68, πίνακας IV και σχήματα 94, 97, 98, 99 πίνακες VI, VII, VIII). Η διαπίστωση αυτή δεν είναι απρόσμενη, καθώς η IRA1-περιοχή αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά ή και ομοιοπολικά με τις τρεις παραπάνω περιοχές, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Κατά συνέπεια η IRA1-περιοχή μπορεί να συντονίζει τις σχετικές κινήσεις όλων των υπολοίπων περιοχών της C-περιοχής και έτσι να εξασκεί την δράση της στις λειτουργίες που αυτές



επιτελούν. Έτσι η SD-περιοχή τροποποιεί την αλληλεπίδραση της με την NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδική επιφάνεια με την οποία βρίσκεται σε άμεση επικοινωνία (116β και δ), αποκρινόμενη σε μεταλλαγές στην IRA1-περιοχή (σχήμα 80 και 81). Όταν οι πλευρικές αλυσίδες των αρωματικών αμινοξέων W775, ή Y803, ή F811, που εξασφαλίζουν την επικοινωνία του IRA1 διακόπτη με την SD-περιοχή μικρύνουν (μετά από αντικατάσταση από αλανίνη; Σχήματα 110α, 110η, και 110θ), η αλληλεπίδραση αυτή περιορίζεται και απομονώνονται ασταθή σύμπλοκα μεταξύ των N- και C-περιοχών της SecA. Μάλιστα παρουσία ορισμένων SecAIRA1 μεταλλαγών, διαπιστώθηκε ότι διαταράσσεται και η επικοινωνία μεταξύ της C-περιοχής και κάθε μιας εκ των NBD και IRA2 περιοχών (σχήμα 85). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τελευταίες αλληλεπιδράσεις δεν αναστέλλονται στην περίπτωση των W775A, Y803A, και F811A μεταλλαγών, αλλά κυρίως στις I789R και E806A μεταλλαγές, στις οποίες διακρίνεται σύμπλοκο μεταξύ των N-και C-περιοχών, αλλά όχι μεταξύ των NBD-C και των IRA2-C περιοχών. Προφανώς η διπλή αλληλεπίδραση της C-περιοχής με τις NBD και IRA2 περιοχές της N-περιοχής στην περίπτωση του συμπλόκου που δημιουργείται μεταξύ των N-και C- περιοχών, αντισταθμίζει την περιορισμένη αλληλεπίδραση της C-περιοχής με τις NBD και IRA2 περιοχές ξεχωριστά. Από την άλλη μεριά η WD-περιοχή που μετακινείται κατά την ενδόθερμη μετάπτωση της SecA (Hunt et al., 2002; βλέπε και Εισαγωγή), και κατά συνέπεια παρουσιάζει καίρια σημασία για την διαμόρφωση της πρωτεΐνης στις διάφορες φάσεις της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών, διαπιστώθηκε ότι αλλάζει την διαμόρφωση της παρουσία των διαφόρων IRA1 μεταλλαγών (από πειράματα μέτρησης του φθορισμού των τρυπτοφανών των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών). Η WD-περιοχή συνδέει την H1 του IRA1 με την SD-περιοχή, και κατά συνέπεια μπορεί να αισθάνεται τις μετακινήσεις τόσο της SD όσο και της IRA1 περιοχής. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι οι SecAIRA1 πρωτεΐνες δεν υφίστανται ενδόθερμη μετάπτωση όπως ακριβώς η SecAWT (σχήμα 76) παρουσιάζοντας κατά συνέπεια τροποποίηση της WD-περιοχής τους. Τέλος όσον αφορά την CT περιοχή δεν έχει διερευνηθεί αν οι αλλαγές στην διαμόρφωση της που προκαλούν όπως είπαμε οι IRA1 μεταλλαγές, επηρεάζουν την αλληλεπίδραση της με τα λιπίδια ή με την SecB (Breukink et al., 1996; Fekkes et al., 1997; βλέπε και Εισαγωγή). Το μόνο που μπορεί να ειπωθεί είναι ότι οι αλλαγές στην CT περιοχή, πιθανά να εμπλέκονται στην διαταραγμένη δέσμευση των διάφορων SecAIRA1 πρωτεϊνών με το πεπτιδίο σηματοδότη, καθώς η τρικλωνη β-πτυχωτή επιφάνεια (σχήμα 126) πιθανά να αποτελεί θέση δέσμευσης αυτού του πεπτιδίου σηματοδότη (βλέπε και Εισαγωγή).

Αξίζει να σημειωθεί ότι προηγούμενες μελέτες με πειράματα θρυψινόλυσης και ξεδίπλωμα της SecA με την χρήση χαστροπικών αντιδραστηρίων πρότειναν ότι η C-περιοχή είναι δομικά εύπλαστη (Song and kim, 1997; βλέπε και Εισαγωγή) και η διαμόρφωση της ρυθμίζεται από την δέσμευση νουκλεοτιδίου, πεπτιδίου σηματοδότη και λιπιδίων (Hunt et al., 2002; Fekkes et al., 1998; Ding et al., 2001; βλέπε και Εισαγωγή). Η πλαστικότητα της C-περιοχής αναμένεται να αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα και για την εισχώρηση της SecA στη μεμβράνη στις SecYEG θέσεις (Ulbrandt et al., 1992; Economidou and Wickner, 1994; Song and Kim, 1997; βλέπε Εισαγωγή), και καθώς ο IRA1 διακόπτης ρυθμίζει την συνολική διαμόρφωση της C-περιοχής αναμένεται και να συντονίζει την εισαγωγή και εξαγωγή της SecA από την μεμβράνη. Εξάλλου διαπιστώθηκε ότι οι IRA1 μεταλλαγές ελαττώνουν την συγγένεια της SecA για το SecYEG διαμεμβρανικό σύμπλοκο, ενώ και η συνολική διαμόρφωση τους παραπέμπει σε SecA που έχει προχωρήσει από το κυτταρόπλασμα σε μετέπειτα στάδια της λειτουργίας της στη μεμβράνη [ομοιότητα του προφίλ θρυψινόλυσης των SecAIRA1 μεταλλαγών τόσο με το πρωτεολυτικό προφίλ του DEAD κινητήρα όσο και με το προφίλ της SecWT στους 37°C, περιπτώσεις που προσεγγίζουν την κατάσταση του ενεργοποιούμενου ενζύμου κατά την διαδικασία της μετατόπισης (σχήματα 72-80)]. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι το πρόβλημα των SecAIRA1 μεταλλαγών εντοπίζεται στο ότι δεν φαίνεται να παρουσιάζουν εναλλαγή της διαμόρφωσης της δομής τους υπό διαφορετικές συνθήκες για π.χ όπως η SecAWT από τους 4 στους 37°C (σχήματα 76 και 77) ή όπως η SecAWT μετά την δέσμευση νουκλεοτιδίου (σχήματα 71, 76 και πίνακας III). Εξάλλου για ορισμένες SecAIRA1 μεταλλαγές δεν διαπιστώθηκε και καμία μεταβολή της συγγένειας για το ADP πάλι από τους 4 στους 37°C (πίνακας II).

Εφόσον ο IRA1 διακόπτης επιδρά στην διαμόρφωση της C-περιοχής, και των υποπεριοχών της, αναμένεται να επιδρά και στην φυσική και λειτουργική επικοινωνία της C-περιοχής, με την N-περιοχή. Πράγματι η επικοινωνία αυτή είναι διαταραγμένη (σχήματα 80 και 81), καθώς η IRA1-περιοχή αλληλεπιδρά με την WD και την SD-περιοχές και η τελευταία αλληλεπιδρά άμεσα με την NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδική επιφάνεια. Αν όμως η C-περιοχή αντιπαράκειται με διαφορετικό τρόπο στην N-περιοχή, αναμένεται να τροποποιεί και την



Σχήμα 128: Διευθέτηση της έλικας της SD(β)-περιοχής. Η αλληλεπίδραση του IRA1 του απέναντι πρωτομερούς [IRA1(α)] με το πρώτο μισό της SD-περιοχής SD(β), αναγκάζει το τμήμα αυτό της έλικας της SD-περιοχής να στραφεί αριστερά και προς τα κάτω σε σχέση με το υπόλοιπο τμήμα της που επικοινωνεί με την IRA1-περιοχή του ίδιου πρωτομερούς [IRA1(β)].

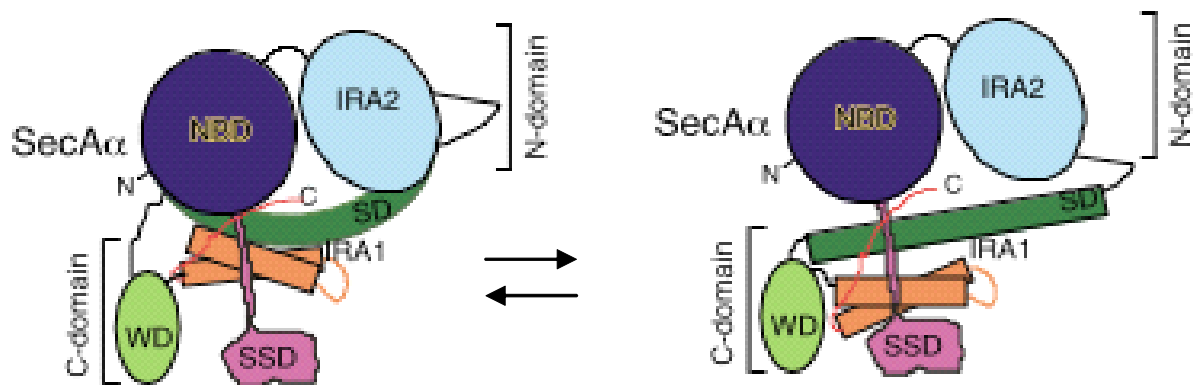
διαμορφωση της τελευταίας. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι οι SecAIRA1 πρωτεΐνες αποκτούν μία πιο ευπρόσβλητη σε πρωτεάση διαμόρφωση του DEAD κινητήρα (σχήμα 76, 77, και 78) όπως παρατηρείται και απουσία ολόκληρης της C-περιοχής (σχήμα 71, 72, και 73), και παράλληλα δεν υφίστανται την απόλυτη μετατροπή της διαμόρφωσης τους με ADP, όπως η SecAWT (σχήμα 76, 77, και 78). Η IRA1-περιοχή ειδικότερα, επιδρά στην διαμόρφωση όλων των υποπεριοχών του DEAD κινητήρα, επιτελώντας την ίδια λειτουργία με ολόκληρη την C-περιοχή. Όμως ο DEAD κινητήρας και συγκεκριμένα οι διαμορφώσεις των διάφορων υποπεριοχών του ρυθμίζονται και από την δέσμευση του νουκλεοτιδίου (σχήμα 71, 72, και 73), γεγονός που ενδυναμώνει την επίδραση του IRA1 διακόπτη στην λειτουργία του DEAD κινητήρα in trans όμως τώρα, εν αντιθέσει με την δράση του δεσμευμένου νουκλεοτιδίου.

Επιπλέον και η σταθεροποίηση τόσο της N- όσο και της C-περιοχής των SecAIRA1 πρωτεϊνών, παρουσία του νουκλεοτιδίου είναι περιορισμένη (πίνακας III, και IV), υποδηλώνοντας την σημασία και του αντίστροφου φαινομένου. Συγκεκριμένα διαπιστώνεται ότι όχι μόνο η C-περιοχή, μέσω του IRA1 διακόπτη της τροποποιεί την διαμόρφωση του DEAD κινητήρα, αλλά και ο DEAD κινητήρας ρυθμίζει την διαμόρφωση της C-περιοχής. Η δέσμευση του ADP στην N-περιοχή, επιδρά στην διαμόρφωση της C-περιοχής στην SecAWT (στον πίνακα IV SecAWT; den Blaauwen et al., 1996; Hunt et al., 2002; βλέπε και Εισαγωγή). Μεταλλαγές που επιδρούν στην κατάλυση του ATP από τον DEAD κινητήρα, ή στην αλληλεπίδραση των NBD-IRA2 περιοχών (R577K και G510A αντίστοιχα; Sianidis et al., 2001; βλέπε και Εισαγωγή) επιδρούν στην διαμόρφωση της C-περιοχής, (στον πίνακα IV SecAG510A, και SecAR577K). Μάλιστα η ρύθμιση της διαμόρφωσης της C-περιοχής από τον DEAD κινητήρα, απαιτεί την παρουσία ενός άθικτου IRA1 διακόπτη. Έτσι στην περίπτωση της SecAW775A και της SecAF811A όπου το  $T_{m_{app}}$  απουσία ADP είναι σαν της SecAWT, παρουσία ADP, σταθεροποιείται μόνο κατά  $2.54^{\circ}\text{C}$  και  $1.8^{\circ}\text{C}$ , αντί για  $5^{\circ}\text{C}$  (πίνακας IV). Προφανώς η IRA1-περιοχή αποκτά την προκαλούμενη από το ADP σταθεροποίηση της διαμόρφωσης της μόνο όταν αισθάνεται φυσιολογικά τις αλλαγές του DEAD κινητήρα, και άρα μόνο απουσία μεταλλαγών. Ο DEAD κινητήρας πιθανότατα μέσω της SD-περιοχής της C-περιοχής με την οποία αλληλεπιδρά, μεταφέρει στην περιοχή IRA1 με την οποία αλληλεπιδρά η SD-περιοχή, την πληροφορία της σταθεροποίησης του DEAD κινητήρα, οπότε τροποποιείται η δομή της, και γι' αυτό παρουσία νουκλεοτιδίου έχει διαπιστωθεί ότι η W775

(ένα από τα αμινοξέα του IRA1 που αλληλεπιδρά με την SD-περιοχή) αλλάζει το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται (den Blaauwen et al., 1996). Απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η αλληλεξάρτηση της διαμόρφωσης των δύο πρωταρχικών περιοχών της SecA, βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του IRA1 διακόπτη, και αναμένεται να διατηρείται σ' όλη την διάρκεια του καταλυτικού κύκλου, αποτελώντας την ουσία της κατάλυσης της SecA και της μεταθετάσης. Ο DEAD κινητήρας δεχόμενος της επιδράσεις από τους διάφορους υποκαταστάτες της διαδικασίας μετατόπισης (και το σύμπλοκο SecYEG και το υπόστρωμα προτείνεται ότι δεσμεύονται στον DEAD κινητήρα; βλέπε Εισαγωγή) μεταβιβάζει την πληροφορία στον IRA1 διακόπτη που τροποποιεί την διαμόρφωση του, όπως και την διαμόρφωση της ευρύτερης C-περιοχής, και εν συνεχεία ρυθμίζει (βελτιώνει ή αποδικωποιεί) αυτές τις αλληλεπιδράσεις στον DEAD κινητήρα για να επιτελέσει αυτός τις καταλυτικές του λειτουργίες.

Η φυσική πορεία αυτής της ενδοεπικοινωνίας μπορεί να προβλεφθεί από τις στατικές κρυσταλλογραφικές δομές της SecA (Εισαγωγή), αλλά μοιάζει ιδιαίτερα πολύπλοκη και πολυτοκίκλη. Παρόλα αυτά η πληθώρα των βιοχημικών και βιοφυσικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή μας ανοίγει το δρόμο της κατανόησης της δυναμικής κατάστασης του ενζύμου κατά την καταλυτική διαδικασία, και πιο συγκεκριμένα τους πιθανούς ρόλους του IRA1 διακόπτη σ' αυτήν. Καταρχήν ο IRA1 διακόπτης δεν αναμένεται να δουλεύει από μόνος του. Τουλάχιστον τα μέχρι στιγμής βιοχημικά δεδομένα αλλά και η δομή της SecA αυτό υποστηρίζουν. Εκτιμάται ότι για να εξασκήσει την δράση του, χρειάζεται την παρουσία των SD-και WD-περιοχών της SecA, υποδηλώνοντας ότι αυτές αποτελούν τις αρθρώσεις ενός συστήματος που συντονίζεται από τον IRA1 μοχλό. Συγκεκριμένα ο IRA1 διακόπτης φαίνεται πιθανό ότι μπορεί να δουλεύει μέσω τεσσάρων οδών : α. Μέσω επέμβασης στην δομή και στην κινητικότητα της SD-περιοχής. Η SD-περιοχή είναι μία μακριά έλικα 46 αμινοξέων, που παρουσιάζει μία χαρακτηριστική κάμψη μεταξύ των αμινοξέων L645 μέχρι Y648 (σχήμα 126, άσπρο βέλος), και η οποία οδηγεί τελικά σε δεσμό άλατος μεταξύ των αμινοξέων D649 και R656. Η μία μεριά της παραπάνω έλικας επικοινωνεί με τις H1 και H2 έλικες της IRA1-περιοχής μέσω των αμινοξέων W775 (H1), F811 (H2), και Y803 (H2), ενώ η άλλη χάρη στην κυρτότητα που παρουσιάζει η SD-περιοχή αγκαλιάζει και αλληλεπιδρά με τις NBD και IRA2-περιοχές, όπως αναφέραμε πρωτίτερα. Όταν η επαφή των αρωματικών αμινοξέων της IRA1-περιοχής με την SD-περιοχή διαταραχθεί, όπως στην περίπτωση της W775A (σχήμα 110ai-iv), οδηγούμαστε σε αυξημένη ATPάση του DEAD κινητήρα (πίνακας I), καθώς και σε μειωμένη συγγένεια για το ADP (πίνακας II). Πιθανότατα η διαταραγμένη φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των N- και C-περιοχών στην περίπτωση της W775A μεταλλαγής (σχήμα 80 και 81), που οδηγεί σε τροποποιημένο πρωτεολυτικό προφίλ του DEAD κινητήρα, πιο ευπρόσβλητο σε πρωτεάση (σχήμα 76 και 78), όπως και σε λιγότερο σταθεροποιημένη διαμόρφωση του με ADP (σχήμα 76, 77, και πίνακας III), να οδηγεί σε χαλαρότερη επικοινωνία των NBD-IRA2 περιοχών και σε διαταραχή της δευτεροταγούς δομής της IRA2-περιοχής που μπορούν να εξηγήσουν την ελαττωμένη συγγένεια για το ADP (Sianidis et al., 2001). Εξάλλου έχουν διαπιστωθεί τουλάχιστον δύο DEAD RNA ελικάσες (που δεν διαθέτουν ανάλογο συστατικό με την C-περιοχή) οι οποίες αποκτούν διαμορφώσεις με τις περιοχές τους 1α και 2α (που αντιστοιχούν στις NBD και IRA2 περιοχές; Caruthers and Mackay, 2002) να εντοπίζονται μακριά η μία από την άλλη (Caruthers et al., 2000; Story et al., 2001), ενώ όλες οι SecAIRA1 πρωτεΐνες βρέθηκε ότι παρουσιάζουν διαταραχή στην α-ελικοειδή δομή τους με την θερμοκρασία σε σχέση με την SecAWT (σχήμα 65), που είναι δηλωτική διαταραχής της διαμόρφωσης της IRA2-περιοχής. Επιπλέον SecAIRA2 μεταλλαγές που παρουσιάζουν περιορισμένη επικοινωνία μεταξύ των N- και C-περιοχών τους (SecAG510A, SecAR566A; βλέπε και Εισαγωγή), παρουσιάζουν και διαταραγμένη επικοινωνία των NBD-IRA2 περιοχών. Εν συνεχεία το γεγονός ότι η αυξημένη ATPάση του DEAD κινητήρα καταστέλλεται μετά από σχηματισμό στοιχειομετρικού συμπλόκου με την C-περιοχή (Karapanou et al., 1999; βλέπε και Εισαγωγή; Στα αποτελέσματα σχήμα 81 στήλη 2) και η ATPάση αυξάνεται κατά την μετάβαση από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη, ενώ μεταβάλλεται και κατά την διάρκεια της διαδικασίας της μετατόπισης των πρωτεϊνών από μεμβράνες (εισαγωγή και εξαγωγή της SecA από την μεμβράνη μέσω ADP και AMP-PNP διαμόρφωσης της), προτείνουν ότι κύκλοι δέσμευσης και απελευθέρωσης των N- και C-περιοχών πρέπει να λαμβάνουν χώρα διαρκώς κατά την καταλυτική διαδικασία. Πράγματι επειδή η C-περιοχή αλληλεπιδρά με την N-περιοχή μέσω της SD-υποπεριοχής, ενώ τα πεπτιδία C34W775A, C34Y803A C34F811A δεν σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τον DEAD κινητήρα (σχήμα 80 πηγαδάκια 14, 12, και 16 αντίστοιχα) και δεν καταστέλλουν την ATPάση του (σχήμα 81) από την μία μεριά, ενώ από την άλλη έχουν διαπιστωθεί μετακινήσεις της W775 μέσα και έξω από ένα υδρόφοβο περιβάλλον (den

Blaauwen et al., 1996; βλέπε και Εισαγωγή), ενισχύεται το μοντέλο αδιάκοπης δέσμωσης και απελευθέρωσης του DEAD κινητήρα από την SD-περιοχή. Φαίνεται δε ότι μικρές πλευρικές μετακινήσεις της IRA1-περιοχής από την SD-περιοχή πρέπει να συνιστούν τον πυρήνα αυτής της ρύθμισης από τον IRA1 διακόπτη, αφού απλή μείωση του μήκους της πλευρικής



Σχήμα 129: Μοντέλο ταλάντωσης του IRA1 διακόπτη προς και από την έλικα της SD-υποπεριοχής. Όταν ο IRA1 διακόπτης προσεγγίζει την έλικα της SD-υποπεριοχής, αυτή κάμπτεται, δημιουργείται ο δεσμός άλατος μεταξύ των R656 και D649 και η έλικα αγκαλιάζει την NBD-IRA2 επιφάνεια. Όταν τροποποιηθεί η δομή του IRA1 (μετακίνηση των δύο ελίκων του) και απομακρυνθεί από την έλικα της SD-υποπεριοχής, η τελευταία τεντώνεται και απομακρύνεται από την NBD-IRA2 επιφάνεια.

αλυσίδας του αμινοξέος της τρυπτοφάνης 775, μετά από την αντικατάστασή της από αλανίνη, οδηγεί σε εντυπωσιακή αύξηση της SecA, και μάλιστα χωρίς να επηρεάζεται η βιωσιμότητα του κυττάρου (σχήμα 58), και η μεταφορά των πρωτεϊνών *in vitro* (σχήμα 60B). Αναμένεται ότι ο IRA1 διακόπτης ρυθμίζει την κάμψη-τέντωση της έλικας της SD-περιοχής και έτσι συντονίζει την σχετική διεύθετηση της (μοριακός συνδετήρας), ως προς την NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδική επιφάνεια (σχήμα 129). Πράγματι χωρίς την επικοινωνία με τον IRA1 διακόπτη η SD-περιοχή, μολονότι εμπεριέχει όλες τις θέσεις δέσμωσης στον DEAD κινητήρα, δεν αλληλεπιδρά μ' αυτόν, και έτσι το πολυπεπτιδίο C609-757 από το οποίο απουσιάζει η IRA1 περιοχή, δεν σχετίζεται ούτε φυσικά ούτε λειτουργικά με τον DEAD κινητήρα (σχήματα 87, 89, και 90). Με άλλα λόγια ο IRA1 διακόπτης, αισθανόμενος την έλευση της SecA στη μεμβράνη [προτείνεται ότι πραγματοποιείται μέσω του DEAD κινητήρα (βλέπε Εισαγωγή)], μέσω της επικοινωνίας των N- και C-περιοχών της διά της SD-υποπεριοχής, τροποποιεί την διαμόρφωση του, μετακινείται σε σχέση με την SD-περιοχή (περίπτωση W7775 μεταλλαγής) και επάγει αυξημένη υδρόλυση ATP από τον DEAD κινητήρα, χάρη στην απομάκρυνση τώρα της SD-περιοχής ως προς αυτόν. Τα παραπάνω ενισχύονται και από το γεγονός ότι μεταλλαγές των αμινοξέων της έλικας της SD-υποπεριοχής που όταν αυτή κάμπτεται δημιουργούν δεσμό άλατος, δηλαδή των R656 και D649 (οπότε χαλά ο δεσμός άλατος και η κάμψη της έλικας), οδηγούν σε αυξημένη υδρόλυση από τον DEAD κινητήρα που ενεργοποιείται αφού απομακρύνεται από αυτόν η έλικα της SD-υποπεριοχής. Εννοείται ότι ο IRA1 διακόπτης μπορεί να δρα στην έλικα της SD-περιοχής και μέσω των αλλαγών που προκαλεί στη διαμόρφωση της WD-περιοχής, (αναφέρθηκαν προηγουμένως), και η οποία συνδέεται ομοιοπολικά με την SD-περιοχή. Επίσης ανάλογη μπορεί να είναι η συμπεριφορά του IRA1 διακόπτη και στην περίπτωση που ο DEAD κινητήρας αλληλεπιδράσει με το πεπτιδίο σηματοδότη (στην 1-263 περιοχή; βλέπε Εισαγωγή), ή και με ολόκληρο το πρωτεϊνικό υπόστρωμα (προτείνεται ότι προσδένεται στην SSD-υποπεριοχή της N-περιοχής; βλέπε και παρακάτω), ενώ σχετικές μετακινήσεις του IRA1 διακόπτη ενδέχεται να προκαλούν και οι αλλαγές στην διαμόρφωση των NBD-IRA2 περιοχών από την δέσμωση των διαφόρων ειδών νουκλεοτιδίων (ATP, ADP, και Pi). Αξίζει να σημειωθεί ότι μολονότι τα αμινοξέα F811 και Y803 ενδέχεται να δουλεύουν αντίστοιχα με την W775, εντούτοις η αντικατάστασή τους από αλανίνη οδηγεί σε σοβαρότερα προβλήματα *in vivo* (σχήμα 59), αλλά και *in vitro* (σχήμα 60B), πιθανά διότι εντοπίζονται στην H2 και όχι στην H1 του IRA1 διακόπτη και άρα ίσως εμπλέκονται και σε άλλου είδους αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα η Y803 εμπλέκεται στην επικοινωνία των H1 και H2 ελίκων του IRA1, ενώ η F811 πιθανά εμπλέκεται στην επικοινωνία με την NBD-υποπεριοχή του δεύτερου πρωτομερούς, ενώ και τα δύο αμινοξέα επιδρούν

δραματικά στον φθορισμό της WD-περιοχής σε διάλυμα με EDTA (πίνακας VIII). β. Ο IRA1 διακόπτης ενδέχεται να δρα μέσω της SSD-περιοχής. Συγκεκριμένα η IRA1 περιοχή επικοινωνεί όπως είδαμε και με το Stem (Stem in) της SSD-περιοχής, αλλά και με την κύρια υπόλοιπη δομή της, και τις υποπεριοχές SSD1 και SSD2. Εφόσον όμως η SSD-περιοχή προεκβάλλει από την NBD-περιοχή, είναι φανερό ότι ο IRA1 διακόπτης έχει έναν ακόμη τρόπο για να μεταβιβάζει τις αλλαγές της διαμόρφωσης στην NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδική επιφάνεια. Επιπλέον επειδή τα πεπτιδία σηματοδότες δεσμεύονται κοντά ή στην β-αλυσίδα του Stem out, (Baud et al., 2002; βλέπε και Εισαγωγή), ενώ ολόκληρο το πρωτεϊνικό υπόστρωμα έχει υποστεί χημική διασύνδεση με την ευρύτερη SSD-περιοχή (Kimura et al., 1991; βλέπε και Εισαγωγή), η αλληλεπίδραση της IRA1-περιοχής με την SSD, πρέπει να συνιστά ένα σημαντικό μονοπάτι για την αίσθηση του υποστρώματος από την SecA. Πράγματι η δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση της ευρύτερης SSD-περιοχής (Baud et al., 2002), που αλληλεπιδρά με την IRA1, ενώ μεταλλαγές στην τελευταία τροποποιούν την δέσμευση του πεπτιδίου σηματοδότη (σχήμα 70). Επιπρόσθετα η δέσμευση του νουκλεοτιδίου στον DEAD κινητήρα, προκαλεί αλλαγές στην διαμόρφωση της SSD-περιοχής, που ανιχνεύονται με πειράματα θρυψινόλυσης (σχήματα 71 και 72 ;π.χ παρατηρείται πρωτεολυτικό κόψιμο στην θέση 360 αντί στην 420), ενώ και οι SecAIRA1 πρωτεΐνες, τόσο απουσία όσο και παρουσία νουκλεοτιδίου επιφέρουν αλλαγές στην διαμόρφωση της SSD-περιοχής, ανάλογες με την περίπτωση της απουσίας της C-περιοχής από την SecA (σχήματα 71, 72, 73, 76, 77, και 78). Εν παραλλήλω τα αμινοξέα του IRA1 που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με την SSD-περιοχή όταν αντικατασταθούν από αλανίνη (R792A, και E806A σχήματα 110δι-iv και 110ει-iv), διαταράσσουν την IRA1-SSD επικοινωνία και παράλληλα δεν επάγεται (στα επίπεδα της SecAWT) η ATPάση τους παρουσία υποστρώματος (πίνακας I), πιθανότατα διότι τώρα η πληροφορία από την SSD-περιοχή δεν φτάνει στην NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδική επιφάνεια (μέσω της IRA1 περιοχής). Βέβαια από την δομή της SecA διαπιστώνεται ότι το μήνυμα από την SSD-περιοχή μπορεί να φτάσει στην NBD-IRA2 επιφάνεια και απ' ευθείας, μέσω του Stem out που συνδέεται ομοιοπολικά με την NBD-περιοχή, φαίνεται όμως ότι δεν αρκεί αυτή η αλλαγή στην διαμόρφωση της θέσης δέσμευσης του νουκλεοτιδίου για να επαχθεί η δραστηριότητα της ATPάσης με την δέσμευση του υποστρώματος της SecA στη μεμβράνη. Αν δεν χαλαρώσει η δέσμευση στην NBD-IRA2 επιφάνεια της έλικας της SD-περιοχής που προκαλείται όμως όπως είδαμε προηγουμένως μέσω του IRA1 διακόπτη δεν επιτυγχάνεται αύξηση της ATPάσης στα επίπεδα της SecAWT. γ. Η IRA1 περιοχή είναι δυνατόν να εξασκεί την δράση της και μέσω της CT- περιοχής. Η περιοχή αυτή όμως αλληλεπιδρά και με τις NBD, SSD και WD-περιοχές όπως είπαμε προηγουμένως, ενώ αλληλεπιδρά με λιπίδια και με την πρωτεΐνη συνοδό SecB (Fekkes et al., 1998; Breukink et al., 1995; βλέπε και Εισαγωγή). Αλλά η SecB και το πεπτιδίο σηματοδότης δρουν συνεργατικά για να μεταφερθούν τα πρωτεϊνικά υποστρώματα στην SecA (Fekkes et al., 1998). Έτσι η CT-περιοχή με το που δεσμεύει λιπίδια και SecB, μεταφέρει πιθανότατα την πληροφορία στην περιοχή IRA1 αφού η δέσμευση των λιπιδίων και της SecB στην SecA γίνονται αισθητές από την W775 (Ding et al., 2001). Τώρα το μήνυμα για την δέσμευση του συνοδευόμενου από την SecB υποστρώματος από την SSD-περιοχή, μεταφέρεται σ' αυτήν από την CT-αλλά και από την IRA1-περιοχή, που βρίσκονται όπως είδαμε σε επικοινωνία με την SSD-περιοχή. Ταυτόχρονα η CT-και η IRA1-περιοχή (μέσω της SD-περιοχής-πορεία α), επάγουν την ATPάση από την NBD-περιοχή με την δέσμευση των λιπιδίων στην SecA (Λιπιδική ATPάση; Lill et al., 1990; βλέπε και Εισαγωγή). Αναμένεται η δέσμευση λιπιδίων και SecB όμως στην CT-περιοχή να επιδρά και στην WD-περιοχή με την οποία αλληλεπιδρούν και η CT- και η IRA1-περιοχή, αφού από πειράματα των Benach et al., 2002; βλέπε και Εισαγωγή, διαπιστώνονται αλλαγές στον φθορισμό της SecA, και άρα και στον φθορισμό και την διαμόρφωση της WD-περιοχής. δ. Ο IRA1 διακόπτης μπορεί να εμπλέκεται στην επικοινωνία των δύο πρωτομερών της SecA μεταξύ τους, καθώς όπως διαπιστώθηκε από την δομή της SecA (και αναλύθηκε προηγουμένως), ο IRA1 διακόπτης αλληλεπιδρά με την SD-περιοχή, την NBD, ή με την IRA2-περιοχή του άλλου πρωτομερούς. Έτσι το IRA1 στοιχείο μπορεί να αποτελεί τον σύνδεσμο της NBD-IRA2 μονονουκλεοτιδικής επιφάνειας του ενός πρωτομερούς με το άλλο. Επειδή όμως τα δύο πρωτομερή επικοινωνούν, όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, και μέσω άλλων περιοχών των πρωτομερών [IRA2(α)-SSD(β), IRA2(α)-WD(β), SSD(α)-SD(β), SD(α)-NBD(β), SD(α)-SD(β)], ενδέχεται ο ρόλος του IRA1 διακόπτη στην επικοινωνία των δύο πρωτομερών να είναι έμμεσος μέσω αλλαγής στην διαμόρφωση των περιοχών SSD, και SD, με τις οποίες αλληλεπιδρά και οι οποίες συμβάλλουν στην επικοινωνία των δύο πρωτομερών μεταξύ τους. Η δράση του IRA1 στοιχείου στην διασύνδεση των δύο πρωτομερών της SecA,

δεν προβλέπει αναγκαστικά ρύθμιση της ισορροπίας μονομερούς-διμερούς, καθώς δεν είναι ακόμα εξακριβωμένο αν η SecA, δουλεύει κατά την διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών σαν διμερές ή σαν μονομερές. Αν η SecA μένει πάντα διμερής το IRA1 στοιχείο μπορεί να συμβάλει στην ασυμμετρία των δύο πρωτομερών, μεταφέροντας π.χ την πληροφορία της δέσμευσης ATP από το ένα πρωτομερές στο άλλο. Αν πάλι η SecA μονομερίζεται κατά την μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα από την μεμβράνη, ο IRA1 διακόπτης ενδεχομένως συντελεί σ' αυτή την διαδικασία, και τα αμινοξέα του που προηγουμένως έπαιζαν ρόλο στην επικοινωνία των δύο μονομερών, τώρα εμπλέκονται σ' άλλες διαδικασίες ή απλά βλέπουν στο διάλυμα. Οι μέχρι στιγμής μελέτες δεν έχουν οδηγήσει στην εύρεση μονομερών SecA για καμία από τις μελετούμενες σημειακές IRA1 μεταλλαγές (βλέπε Κεφάλαιο του ρόλου του IRA1 στοιχείου στην ολιγομερική κατάσταση της SecA), ενώ μόνο πολλαπλές σημειακές μεταλλαγές στο IRA1, στην ευρύτερη περιοχή του που αλληλεπιδρά με την NBD-περιοχή (γύρω από την F811), οδήγησαν σε σχηματισμό και μονομερούς μαζί με την διμερή SecA (Or et al., 2002;βλέπε και Εισαγωγή). Το μόνο που διαπιστώθηκε για τις SecAIRA1 πρωτεΐνες, είναι η τάση τους να σχηματίζουν μορφές μεγαλύτερες από τετραμερή (πειράματα αναλυτικής υπερφυοκέντρωσης) σε ποσοστά μεγαλύτερα από την SecAWT, όπως και η διαπίστωση για ορισμένες απ' αυτές που μελετήθηκαν με ανάλυση με SAXS, ότι αποκτούν πιο εκτεταμένη διαμόρφωση σε σχέση με την SecAWT, και γι' αυτό παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακτίνα Rg. Οι παραπάνω παρατηρήσεις όμως, αντίστοιχα υποδηλώνουν ότι οι IRA1 μεταλλαγές διαταράσσουν την ολιγομερική δομή της SecA, ή την φυσική επικοινωνία των δύο πρωτομερών ρυθμίζοντας το γλίστρημα του ενός σε σχέση με το άλλο (οπότε η SecA μπορεί να οδηγηθεί σε πιο εκτεταμένη διαμόρφωση με απλό "γλίστρημα" των δύο μονομερών της μεταξύ τους). Το αποτέλεσμα είναι ότι σε κάθε περίπτωση κατά μπορεί να επιτευχθεί ρύθμιση της λειτουργία της SecA.

Απ' όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι οι τέσσερις παραπάνω πορείες δράσης του IRA1 στοιχείου, το εγκαθιδρύουν στο κέντρο της καταλυτικής διαδικασίας της SecA. Με άλλα λόγια η IRA1-περιοχή, προτείνεται ότι παίζει τον ρόλο του γενικού διακόπτη της SecA πρωτεΐνης, αφού "αισθάνεται" μέσω αλλαγών στην διαμόρφωση ή με απ'ευθείας επικοινωνία με τις διάφορες υποπεριοχές της SecA, την δέσμευση όλων των ουσιαστικών (ATP, προπρωτεΐνη, SecYEG, λιπίδια) και μη (SecB) υποκαταστατών της αντίδρασης μετατόπισης, αφού ελέγχει την ολιγομερική κατάσταση της SecA, και αφού συντονίζει και την επικοινωνία των διαφόρων περιοχών της SecA μεταξύ τους και με τους διάφορους υποκαταστάτες μέσω των αλλαγών στην διαμόρφωση τους. Όλες αυτές οι διαδικασίες προσδίδουν στον IRA1 διακόπτη την ιδιότητα του γενικού ρυθμιστή της καταλυτικής δραστηριότητας της SecA, και κατ' επέκταση και της μεταθετάσης της οποίας συνιστά την ATPάση. Η δράση του IRA1 διακόπτη ως ρυθμιστικού στοιχείου εξάλλου δικαιολογεί και την ποικιλία των λειτουργικών ιδιοτήτων που προκαλούν στον DEAD κινητήρα οι διάφορες SecAIRA1 μεταλλαγές και την αδυναμία απομόνωσης ξεκάθαρων φαινοτύπων, αφού τα προβλήματα των SecAIRA1 μεταλλαγών αναμένεται να είναι κινητικά και όχι καταλυτικά για τις διάφορες λειτουργίες. Δηλαδή πιθανότατα δεν υφίσταται ανικανότητα τέλεσης μιας συγκεκριμένης λειτουργίας απλά βραδύτητα στην πραγμάτωση της.

Επιδιώκοντας να τονίσουμε την σημασία της δράσης του IRA1 διακόπτη, αναφέρουμε ότι μπορεί η C-περιοχή της SecA όντας εξειδικευμένη περιοχή της πρωτεΐνης να μην παρουσιάζει ομολογία μ' άλλες πρωτεϊνικές περιοχές των ελικασών, ο τρόπος δράσης της όμως ενδέχεται να αποκαλύπτει στοιχεία για τον τρόπο δράσης γενικότερα των διάφορων ελικασών. Οι ελικάσες διαθέτουν εξειδικευμένες περιοχές που πέρα από την ειδικότητα την οποία προσδίδουν σ' αυτές για το υπόστρωμα στο οποίο επιδρούν, αναμένεται να συντελούν και στην μετατροπή της ενέργειας που καταναλίσκεται από την ομόλογη σ' όλες τις ελικάσες καταλυτική μηχανή, στο μηχανικό έργο που λαμβάνει χώρα κάθε φορά από την ελικάση πάνω στο συγκεκριμένο υπόστρωμα. Διαλεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται η παραπάνω σύνδεση υδρόλυσης ATP-μηχανικού έργου, αναμένεται από την κατανόηση του τρόπου δράσης της C-περιοχής της SecA. Στην περιοχή αυτή εντοπίστηκε η συντηρημένη IRA1-υποπεριοχή με δομή έλικας-λούπας-έλικας, που όπως συμπεράναμε από την παραπάνω μελέτη αποτελεί τον μοναδικό φυσικό σύνδεσμο των δύο εξειδικευμένων περιοχών στην SecA, της SSD και της C-περιοχής. Η IRA1-περιοχή προτείνουμε ότι ταλαντούμενη από και προς τις παραπάνω εξειδικευμένες περιοχές ρυθμίζει τις καταλυτικές ιδιότητες τόσο του DEAD κινητήρα, αλλά εντέλει και την μετακίνηση της πρωτεΐνης κατά μήκος του πρωτεϊνικού υποστρώματος κατά την εκκριτική διαδικασία. Η ρύθμιση από την IRA1-περιοχή πραγματοποιείται σύμφωνα με τις ενεργειακές απαιτήσεις της SecA κατά την διαδικασία της έκκρισης που υπεισέρχονται στην "αντίληψη" της από την πρόσδεση των

διάφορων τύπων υποστρωμάτων. Ανάλογος μηχανισμός συσχέτισης του ενεργειακού με το μηχανικό έργο μπορεί να ισχύει και στις άλλες ελικάσες στις οποίες εντοπίζονται δύο εξειδικευμένες περιοχές. Έτσι στην PcrA και στην Rep DNA ελικάση συναντάμε μία H-L-H περιοχή στην αντίστοιχη με την C-περιοχή της SecA εξειδικευμένη περιοχή (που φύεται από την διαμόρφωση τύπου RecA με τα μοτίβα IV, V και VI). Αυτή η περιοχή αλλάζει διευθέτηση με την δέσμευση του νουκλεϊνικού υποστρώματος, συνδέει τις δύο εξειδικευμένες περιοχές μεταξύ τους, ενώ συμμετέχει και στην πρόσδεση του υποστρώματος η οποία συντελείται κυρίως από την αντίστοιχη με την SSD-εξειδικευμένη περιοχή, η οποία και τελικά υφίσταται δραστική αλλαγή στην τριτοταγή της διαμόρφωση. Στην SecA πρωτεΐνη έχει προταθεί από την βιβλιογραφία ότι το πρωτεϊνικό εκκρινόμενο υπόστρωμα πιθανότατα δεσμεύεται στην SSD-περιοχή. Στην παρούσα διατριβή επιπλέον προτείνουμε ότι η εκτεταμένη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού υποστρώματος θα μπορούσε να γεμίζει και μία περισσότερη διευρυμένη κοιλότητα απ' αυτή που εντοπίζεται μεταξύ SSD και IRA1. Αντίστοιχη εικόνα όμως διαπιστώνεται και στις PcrA και Rep ελικάσες από την μελέτη των κρυσταλλογραφικών διαμορφώσεων τους παρουσία των νουκλεϊνικών τους υποστρωμάτων, καθώς το υπόστρωμα εντοπίζεται στην αντίστοιχη της SSD εξειδικευμένη περιοχή, βλέπει όμως και την H-L-H υποπεριοχή από την δεύτερη εξειδικευμένη περιοχή την αντίστοιχη της C-περιοχής της SecA. Ενδέχεται λοιπόν στις παραπάνω ελικάσες το μήνυμα δέσμευσης του νουκλεϊνικού υποστρώματος από την αντίστοιχη της SSD-περιοχή να καταλήγει στην αντίστοιχη της C-περιοχή μέσω της ανάλογης IRA1-υποπεριοχής. Στην συνέχεια όπως αναμένεται από τον μηχανισμό ελέγχου στη SecA, η αντίστοιχη της C-εξειδικευμένη περιοχή ρυθμίζει τις καταλυτικές δραστηριότητες του DEAD κινητήρα. Ο ακριβής όμως τρόπος ρύθμισης από την ανάλογη της C-περιοχή στις ελικάσες των νουκλεϊκών οξέων, αναμένεται να είναι διαφορετικός. Και αυτό γιατί λείπει η μακριά έλικα της SD-περιοχής που συνδέει τις NBD και IRA2-υποπεριοχές του DEAD κινητήρα, ενώ στην ίδια περιοχή συναντάται τμήμα της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του υποστρώματος. Φαίνεται ότι το πρωτεϊνικό πολυμερές υπόστρωμα της SecA την διαφοροποιεί από τις άλλες ελικάσες των νουκλεϊκών οξέων.

Περισσότερες πληροφορίες για τον τρόπο δράσης του IRA1 διακόπτη και επιβεβαίωση των παραπάνω υποθέσεων θα πραγματοποιηθεί με ανάλυση της δομής καθεμιάς από τις παραπάνω μεταλλαγές, παρουσία και απουσία των διαφόρων υποκαταστατών. Παράλληλα και με άλλες βιοφυσικές μεθόδους π.χ NMR του IRA1 στοιχείου με κάθε μία από τις παραπάνω IRA1 μεταλλαγές, θα μπορούσαν να εξαχθούν πληροφορίες για την μηχανιστική δράση του IRA1 διακόπτη οι οποίες θα μπορούσαν πάλι να μελετηθούν παρουσία και των υπολοίπων περιοχών της SecA, αλλά και των διαφόρων αντιδραστηρίων της διαδικασίας μετατόπισης, και έτσι θα μπορούσε να παρακολουθηθεί η συντονισμένη αλλαγή στην δομή του IRA1 διακόπτη που θα εξασφάλιζε την λειτουργία του. Επιπλέον μελέτες για την διαπίστωση της μετακίνησης των διαφόρων περιοχών στην SecA μέσω του IRA1 διακόπτη, μπορούν να πραγματοποιηθούν με πειράματα με FRET όπου ο δότης και ο δέκτης του φθορισμού εντοπίζονται σε περιοχές των οποίων η επικοινωνία και αλληλεπίδραση τίθενται υπό έλεγχο.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.**

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature*, **370**, :621-8.

Adams GA, Rose JK. (1985). Structural requirements of a membrane-spanning domain for protein anchoring and cell surface transport. *Cell*, **41**,1007-15.

Andrews DW. (2000). Transport across membranes: a question of navigation. *Cell*, **102**, 139-44. Review.

Ahn T, Kim H. (1998). Effects of nonlamellar-prone lipids on the ATPase activity of SecA bound to model membranes. *J Biol Chem.*, **273**, 21692-8.

Akita M, Sasaki S, Matsuyama S, Mizushima S. (1990). SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **265**, 8164-9.

Arkowitz RA, Joly JC, Wickner W. (1993). Translocation can drive the unfolding of a preprotein domain. *EMBO J.*, **12**, 243-53.

Arkowitz, R, Bassilana, M. (1994). Protein translocation in *Escherichia coli*. *BBA*, **1197**, 311-343.

Arkowitz RA, Wickner W. (1994). SecD and SecF are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *EMBO J.*, **13**, 954-63.

Bacher G, Lutcke H, Jungnickel B, Rapoport TA, Dobberstein B. (1996). Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. *Nature*, **381**, 248-51.

Bacher G, Pool M, Dobberstein B. (1999). The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol.*, **146**, 723-30

Basilana M, Arkowitz RA, Wickner W. (1992). The role of the mature domain of proOmpA in the translocation ATPase reaction. *J Biol Chem.*, **267**, 25246-50.

Basilana M, Wickner W. (1993). Purified *Escherichia coli* preprotein translocase catalyzes multiple cycles of precursor protein translocation. *Biochemistry*, **32**, 2626-30.

Baud, C., Karamanou, S., Sianidis, G., Vrontou, E., Politou, A., S. and Economou, A. (2002). Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13724-13731.

Bauer M, Behrens M, Esser K, Michaelis G, Pratje E. (1994). PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol Gen Genet.*, **245**, :272-8.

Benach J, Chou YT, Fak JJ, Itkin A, Nicolae DD, Smith PC, Wittrock G, Floyd DL, Golsaz CM, Gierasch LM, Hunt JF. (2003) Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J Biol Chem.*, **278**, 3628-3638

Berks BC, Sargent F, De Leeuw E, Hinsley AP, Stanley NR, Jack RL, Buchanan G, Palmer T. (2000). A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta.*, **459**, 325-30. Review

Bessonneau P, Besson V, Collinson I, Duong F. (2002). The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.*, **21**, 995-1003.

Bieker-Brady K, Silhavy TJ. (1992). Suppressor analysis suggests a multistep, cyclic mechanism for protein secretion in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **11**, 3165-74.

Bieker KL, Silhavy TJ. (1990). PrIA (SecY) and PrIG (SecE) interact directly and function sequentially during protein translocation in *E. coli*. *Cell*, **61**, 833-42.

Binet R, Letoffe S, Ghigo JM, Delepelaire P, Wandersman C. (1997). Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene*, 192, 7-11. Review.

Bost S, Belin D. (1997). prl mutations in the *Escherichia coli* secG gene. *J Biol Chem.*, **272**, 4087-93.

Bonnefoy N, Kermorgant M, Groudinsky O, Minet M, Slonimski PP, Dujardin G. (1994). Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxa1- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91**, 11978-82.

Bonnefoy N, Chalvet F, Hamel P, Slonimski PP, Dujardin G. (1994). OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J Mol Biol.*, **239**, 201-12.

Braunstein M, Brown AM, Kurtz S, Jacobs WR Jr. (2001). Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol.*, **183**, 6979-90.

Breukink E, Kusters R, De Kruijff B. (1992). In-vitro studies on the folding characteristics of the *Escherichia coli* precursor protein prePhoE. Evidence that SecB prevents the precursor from aggregating by forming a functional complex. *Eur J Biochem.*, **208**, 419-25.

Breukink, E., Nouwen, N., van Raalte, A., Mizushima, S., Tommassen, J. and de Kruijff, B. (1995) The C terminus of SecA is involved in both lipid binding and SecB binding. *J. Biol. Chem.*, 270, 7902-7907.

Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W, Collinson I. (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418: 662-625.

Brodsky JL, Schekman R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol.*, **123**, 1355-63.

Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R. (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9643-6

Brodsky JL, McCracken AA. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol.*, **10**, 507-13. Review.

Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJ, and 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.

Bruch MD, McKnight CJ, Gierasch LM. (1989). Helix formation and stability in a signal sequence. *Biochemistry*, **28**, 8554-61

Cabelli RJ, Dolan KM, Qian LP, Oliver DB. (1991). Characterization of membrane-associated and soluble states of SecA protein from wild-type and SecA51(TS) mutant strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **266**, 24420-7

Cao G, Kuhn A, Dalbey RE. (1995). The translocation of negatively charged residues across the membrane is driven by the electrochemical potential: evidence for an electrophoresis-like membrane transfer mechanism. *EMBO J.*, **14**, 866-75.

Caruthers, J.M., Johnson, E.R., and McKay, D.B. (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97**, 13080-13085.

Caruthers JM, McKay DB. (2002). Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol.*, **12**, 123-33. Review.

Chen L, Tai PC. (1985). ATP is essential for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4384-8

Chen H, Kendall DA. (1995). Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J Biol Chem.*, **270**, 14115-22.

Chen X, Xu H, Tai PC. (1996). A significant fraction of functional SecA is permanently embedded in the membrane. SecA cycling on and off the membrane is not essential during protein translocation. *J Biol Chem.*, **271**, 29698-706

Chen X, Brown T, Tai PC. (1998). Identification and characterization of protease-resistant SecA fragments: SecA has two membrane-integral forms. *J Bacteriol* 180:527-37.

Chirico WJ, Waters MG, Blobel G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**, 805-10.

Chou YT, Swain JF, Gierasch LM. (2002). Functionally significant mobile regions of *Escherichia coli* SecA ATPase identified by NMR. *J Biol Chem.*, **277**, 50985-90.

Danese PN, Silhavy TJ. (1998). Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet.*, **32**, 59-94. Review.

Dapic V and Oliver D. (2000) Distinct membrane binding properties of N- and C-terminal domains of *Escherichia coli* SecA ATPase. *J Biol Chem.*, **275**, 25000-25007.

Davis NG, Model P. (1985). An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer. *Cell*, **41**, 607-14.

de Gier JW, Mansournia P, Valent QA, Phillips GJ, Luirink J, von Heijne G. (1996). Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle. *FEBS Lett.*, **399**, 307-9

de Gier JW, Scotti PA, Saaf A, Valent QA, Kuhn A, Luirink J, von Heijne G. (1998). Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 14646-51.

de Gier JW, Luirink J. (2001). Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001 Apr;40(2):314-22. Review.

de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 192-198.

Dempsey BR, Economou A, Dunn SD, Shilton BH. (2002). The ATPase domain of SecA can form a tetramer in solution. *J Mol Biol.*, **315**, 831-43.

den Blaauwen, T., Fekkes, P., de Wit, J.G., Kuiper, W. and Driessen, A.J.M. (1996) Domain interactions of the peripheral preprotein translocase subunit SecA. *Biochemistry*, **35**, 11194-12004.

den Blaauwen T, de Wit JG, Gosker H, van der Does C, Breukink EJ, de Leij L, Driessen AJ. (1997). Inhibition of preprotein translocation and reversion of the membrane inserted state of SecA by a carboxyl terminus binding mAb. *Biochemistry*, **36**, 9159-68.

den Blaauwen, T., Terpetschnig, E., Lakowicz, J.R. and Driessen, A.J. (1997) Interaction of SecB with soluble SecA. *FEBS Lett.*, **416**, 35-38.

den Blaauwen T, van der Wolk JP, van der Does C, van Wely KH, Driessen AJ. (1999.) Thermodynamics of nucleotide binding to NBS-I of the Bacillus subtilis preprotein translocase subunit SecA. FEBS Lett., **458** 145-150.

Derman AI, Prinz WA, Belin D, Beckwith J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of Escherichia coli. Science, **262**, 1744-7.

Derman AI, Puziss JW, Bassford PJ Jr, Beckwith J. (1993). A signal sequence is not required for protein export in prfA mutants of Escherichia coli. EMBO J., **3**, 879-88.

Deshaies RJ, Schekman R. (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. J Cell Biol., **105**, 633-45.

DeRosier DJ. (1998). The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. Cell, 93, 17-20. Review.

Ding, H., Mukerji, I. and Oliver, D. (2001). Lipid and signal peptide-induced conformational changes within the C-domain of E.coli SecA protein. Biochemistry, **40**, 1835-1843.

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.

Doyle SM, Braswell EH, Teschke CM. (2000). SecA folds via a dimeric intermediate. Biochemistry., 39, 11667-76.

Duong,F. and Wickner, W. (1997a). Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. EMBO J., **16**, 2756 - 2768

Duong, F. and Wickner, W. (1997b). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J.*, **16**, 4871-4879.

Duong F, Eichler J, Price A, Leonard MR, Wickner W. (1997). Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell*, 91, 567-73. Review.

Duong F, Wickner W. (1998). Sec-dependent membrane protein biogenesis: SecYEG, preprotein hydrophobicity and translocation kinetics control the stop-transfer function. *EMBO J.*, **17**, 696-705.

Driessen AJ, Wickner W. (1991). Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the Escherichia coli translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2471-5.

Driessen AJ. (1992). Precursor protein translocation by the Escherichia coli translocase is directed by the protonmotive force. *EMBO J.*, **11**, 847-53.

Driessen AJ. (1992). Bacterial protein translocation: kinetic and thermodynamic role of ATP and the protonmotive force. *Trends Biochem Sci.*, **17**, 219-23. Review.

Driessen AJ. (1993). SecA, the peripheral subunit of the Escherichia coli precursor protein translocase, is functional as a dimer. *Biochemistry*, **32**, 13190-7.

Driessen AJ, Manting EH, van der Does C. (2001) The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. *Nat Struct Biol.* 8, 492-498.

Economou, A. and Wickner, W. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78, 835-843.



Economou, A., Pogliano, J.P., Beckwith, J., Oliver, D.B. and Wickner, W. (1995) SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83, 1171-1181.

Economou, A. (1998). Bacterial preprotein translocase, mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol. Microbiol.*, 27, 511-518.

Economou, A. (2000). Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. *FEBS Lett.*, 476, 18-21.

Economou, A. (2002) Bacterial secretome: the assembly manual and operating instructions. *Mol Membr Biol.* 19, 159-169.

Engelman DM, Steitz TA, Goldman A. (1986). Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.*, 15, 321-53. Review.

Eichler, J. and Wickner, W. (1997) Both an N-terminal 67-kDa domain and a C-terminal 30kDa domain of SecA cycle into the membrane at SecYEG during translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 5574-5581

Eichler J, Brunner J, Wickner W (1997) The protease-protected 30 kDa domain of SecA is largely inaccessible to the membrane lipid phase. *EMBO J.*, 16, 2188-2196

Eichler J, Rinard K, Wickner W. (1998). Endogenous SecA catalyzes preprotein translocation at SecYEG. *J Biol Chem.*, 273, 21675-81.

Eilers M, Schatz G. (1988). Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes. *Cell*, 52, 481-3. Review.

Emr SD, Hanley-Way S, Silhavy TJ. (1981). Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell*, **23**, 79-88.

Erdmann N, Effmert U, Fulda S, Oheim S. (1997). Effect of gravity changes on the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol.*, **35**, 348-55

Ernst F, Hoffschulte HK, Thome-Kromer B, Swidersky UE, Werner PK, Muller M. (1994). Precursor-specific requirements for SecA, SecB, and delta muH<sup>+</sup> during protein export of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **269**, 12840-5

Fekkes P, den Blaauwen T, Driessen AJ. (1995). Diffusion-limited interaction between unfolded polypeptides and the *Escherichia coli* chaperone SecB. *Biochemistry*, **34**, 10078-85.

Fekkes, P., van der Does, C., and Driessen, A.J.M. (1997) The molecular chaperone SecB is released from the carboxy-terminus of SecA during initiation of precursor protein translocation. *EMBO J.* **16**, 6095-6113.

Fekkes, P., de Wit, J.G., van der Wolk, J.P., Kimsey, H.H., Kumamoto, C.A. and Driessen, A.J. (1998) Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.* **29**, 1179-1190.

Fekkes P, de Wit JG, Boorsma A, Friesen RH, Driessen AJ. (1999). Zinc stabilizes the SecB binding site of SecA. *Biochemistry*, **38**, 5111-6.

Fekkes P, Driessen AJ. (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **63**, 161-73. Review.

Flower AM, Doebele RC, Silhavy TJ. (1994). PrlA and PrlG suppressors reduce the requirement for signal sequence recognition. *J Bacteriol.*, **176**, 5607-14.

Geller BL, Movva NR, Wickner W. (1986). Both ATP and the electrochemical potential are required for optimal assembly of pro-OmpA into Escherichia coli inner membrane vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A, **83**, 4219-22.

Gierasch LM. (1989). Signal sequences. Biochemistry, **28**, 923-30. Review.

Gorlich D, Rapoport TA. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. Cell, **75**, 615-30.

Gorlich D, Mattaj IW. (1996). Nucleocytoplasmic transport. Science, **271**, 1513-8. Review.

Hall, M.C., and Matson, S.W. (1999). Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. Mol. Microbiol., **34**, 867-877.

Hanein D, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, Miller KR, Rapoport TA, Akey CW. (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. Cell, **87**, 721-32

Hanada M, Nishiyama KI, Mizushima S, Tokuda H. (1994). Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). J Biol Chem., **269**, 23625-31.

Hanada M, Nishiyama K, Tokuda H (1996) SecG plays a critical role in protein translocation in the absence of the proton motive force as well as at low temperature. FEBS Lett., **381**, 25-28

Hardy SJ, Randall LL. (1993). Recognition of ligands by SecB, a molecular chaperone involved in bacterial protein export. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., **339**, 343-52; discussion 352-4. Review.

Hartl, F.-U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J.P., and Wickner, W. (1990). The binding of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the E. coli membrane. *Cell*, **63**, 269-279.

Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Gorlich D, Jentsch S, Rapoport TA. (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, **367**, 654-7.

Heins L, Soll J. (1998). Chloroplast biogenesis: mixing the prokaryotic and the eukaryotic? *Curr Biol.* , 8, R215-7. Review.

Herskovits AA, Bochkareva ES, Bibi E. (2000). New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol Microbiol.*, **38**, 927-39. Review.

Hirano, M., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1996) The carboxyl-terminal region is essential for SecA dimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 90-95.

Homma T, Yoshihisa T, Ito K. (1997). Subunit interactions in the Escherichia coli protein translocase: SecE and SecG associate independently with SecY. *FEBS Lett*, **408**, 11-15

Huang S, Ratliff KS, Matouschek A. (2002). Protein unfolding by the mitochondrial membrane potential. *Nat Struct Biol.*, **9**, 301-7.

Hueck CJ. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62, 379-433. Review.

Huie JL, Silhavy TJ. (1995). Suppression of signal sequence defects and azide resistance in Escherichia coli commonly result from the same mutations in secA. *J Bacteriol.*, **177**, 3518-26.

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.

Izard JW, Doughty MB, Kendall DA. (1995). Physical and conformational properties of synthetic idealized signal sequences parallel their biological function. *Biochemistry*, **34**, 9904-12.

Jarosik, GP. and Oliver, D.B. (1991) Isolation and analysis of dominant secA mutations in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 860-868.

Johnson AE, van Waes MA. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **15**, 799-842. Review.

Johnson ER, McKay DB. (1999). Crystallographic structure of the amino terminal domain of yeast initiation factor 4A, a representative DEAD-box RNA helicase. *RNA*, **5**, 1526-34

Joly, J.C., and Wickner, W. (1993). The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of the translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *EMBO J.*, **12**, 255-263.

Joly JC, Leonard MR, Wickner WT. (1994). Subunit dynamics in *Escherichia coli* preprotein translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 4703-7.

Karamanou, S., Vrontou, E., Sianidis, G., Baud, C., Roos, T., Kuhn, A., Politou, A., S. and Economou, A., (1999). A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol. Microbiology*, **34**, 1133-1145.

Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem.*, **70**, 755-75. Review.

Keller RC, ten Berge D, Nouwen N, Snel MM, Tommassen J, Marsh D, de Kruijff B. (1996). Mode of insertion of the signal sequence of a bacterial precursor protein into phospholipid bilayers as revealed by cysteine-based site-directed spectroscopy. *Biochemistry*, **35**, 3063-71.

Kim YJ, Oliver DB. (1994). Escherichia coli SecY and SecE proteins appear insufficient to constitute the SecA receptor. *FEBS Lett.*, **339**, 175-80.

Kimura, E., Akita, M., Matsuyama, S.-i. and Mizushima, S (1991) Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.*, **266**, 6600-6606.

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. Review.

Koonin,E.V. and Rudd,K.E. (1996) Two domains of superfamily I helicases may exist as separate proteins. *Protein Sci.*, **5**, 178-180.

Kourtz L, Oliver D. (2000). Tyr-326 plays a critical role in controlling SecA-preprotein interaction. *Mol Microbiol.*, **37**, 1342-56.

Kopito RR. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-30. Review.

Koronakis V, Andersen C, Hughes C. (2001). Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol.*, **11**, 403-7. Review.

Korolev,S., Hsieh,J., Gauss,G.H., Lohman,T.M., and Waksman,G. (1997). Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell*, **90**, 635-647.

Korolev,S., Yao,N., Lohman,T.M., Weber,P.C., and Waksman,G. (1998). Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases. *Protein Sci.*, **7**, 605-610.

Kull FJ, Sablin EP, Lau R, Fletterick RJ, Vale RD. (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, **380**, 550-5

Kuhn A, Wickner W. (1985). Conserved residues of the leader peptide are essential for cleavage by leader peptidase. *J Biol Chem.*, **260**, 15914-8.

Kumamoto CA, Francetic O. (1993). Highly selective binding of nascent polypeptides by an Escherichia coli chaperone protein in vivo. *J Bacteriol.*, **175**, 2184-8.

Kuroiwa T, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. (1991). Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J Biol Chem.*, **266**, 9251-5.

Laforet GA, Kendall DA. (1991). Functional limits of conformation, hydrophobicity, and steric constraints in prokaryotic signal peptide cleavage regions. Wild type transport by a simple polymeric signal sequence. *J Biol Chem.*, **266**, 1326-34.

Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, **387**, 493-7.

Lecker SH, Driessen AJ, Wickner W. (1990). ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.*, **9**, 2309-14.

Lee JI, Kuhn A, Dalbey RE. (1992). Distinct domains of an oligotopic membrane protein are Sec-dependent and Sec-independent for membrane insertion. *J Biol Chem.*, **267**, 938-43.

Lill, R., Dowhan, W., and 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.

Lu Y, Qi HY, Hyndman JB, Ulbrandt ND, Teplyakov A, Tomasevic N, Bernstein HD. (2001). Evidence for a novel GTPase priming step in the SRP protein targeting pathway. *EMBO J.*, **20**, 6724-34.

Luirink J, ten Hagen-Jongman CM, van der Weijden CC, Oudega B, High S, Dobberstein B, Kusters R. (1994). An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY. *EMBO J.*, **13**, :2289-96.

Machius M, Henry L, Palnitkar M, Deisenhofer J. (1999). Crystal structure of the DNA nucleotide excision repair enzyme UvrB from *Thermus thermophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11717-22.

Macfarlane J, Muller M. (1995). The functional integration of a polytopic membrane protein of *Escherichia coli* is dependent on the bacterial signal-recognition particle. *Eur J Biochem.*, **233**, 766-71.

Maluf NK, Ali JA, Lohman TM. (2003). Kinetic Mechanism for Formation of the Active, Dimeric UvrD Helicase-DNA Complex. *J Biol Chem.*, **278**, 31930-40.



Manting EH, Kaufmann A, van der Does C, Driessen AJ. (1999). A single amino acid substitution in SecY stabilizes the interaction with SecA. *J Biol Chem.*, **274**, 23868-74.

Manting EH, van Der Does C, Remigy H, Engel A, Driessen AJ. (2000) SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.*, **19**, 852-861.

Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J, Dobberstein B. (1995). The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell*, **81**, 207-14

Matouschek A, Pfanner N, Voos W. (2000). Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.*, **1**, 404-10. Review.

Matsumoto G, Yoshihisa T, Ito K. (1997). SecY and SecA interact to allow SecA insertion and protein translocation across the Escherichia coli plasma membrane. *EMBO J.*, **16**, 6384-93.

Matsuo E, Mori H, Shimoike T, Ito K. (1998). Syd, a SecY-interacting protein, excludes SecA from the SecYE complex with an altered SecY24 subunit. *J Biol Chem.*, **273**, 18835-40.

Matsuo E, Ito K. (1998). Genetic analysis of an essential cytoplasmic domain of Escherichia coli SecY based on resistance to Syd, a SecY-interacting protein. *Mol Gen Genet.*, **258**, 240-9.

Matsuyama, S, Kimura, E., and Mizushima, S. (1990). Complementation of two overlapping fragments of SecA, a protein translocation ATPase of Escherichia coli, allows ATP binding to its amino-terminal region. *J Biol Chem.*, **265**, 8760-8765.

Matsuyama S, Fujita Y, Mizushima S. (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *EMBO J.*, **12**, 265-70.

McKnight CJ, Briggs MS, Gierasch LM. (1989). Functional and nonfunctional LamB signal sequences can be distinguished by their biophysical properties. *J Biol Chem.*, **264**, 17293-7.

Menz RI, Walker JE, Leslie AG. (2001). Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, **106**, 331-41.

Menz RI, Leslie AG, Walker JE. (2001). The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide. *FEBS Lett.*, **494**, 11-4.

Miller A, Wang L, Kendall DA. (1998). Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *J Biol Chem.*, **273**, 11409-12

Mitchell, C. and Oliver, D. (1993). Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol. Microbiol.*, **10**, 483-497.

Moolenaar GF, Hoglund L, Goosen N. (2001). Clue to damage recognition by UvrB: residues in the beta-hairpin structure prevent binding to non-damaged DNA. *EMBO J.*, **20**, 6140-9.

Mori H, Ito K. (2001). The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* **9**, 494-500.

Muren EM, Suci 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**, 19397-402.

Neupert W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.*, **66**, 863-917. Review.

Nishiyama, K., Suzuki, T. and Tokuda, H. (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell*, **85**, 71-81.

Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K. and Tokuda, H. (1999) Membrane deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. *EMBO J.* **18**, 1049-1058.

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

Nouwen N, de Kruijff B, Tommassen J. (1996). Delta mu H<sup>+</sup> dependency of in vitro protein translocation into Escherichia coli inner-membrane vesicles varies with the signal-sequence core-region composition. *Mol Microbiol.*, **6**, 1205-14.

Oliver, D.B., Cabelli, R.J., and Jarosik, G.P. (1990). SecA protein: autoregulated initiator of secretory precursor protein translocation across the E. coli plasma membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 311-336.

Oliver, D.B. (1993). SecA protein: Autoregulated ATPase catalyzing preprotein insertion and translocation across the Escherichia coli inner membrane. *Mol. Microbiol.*, **7**, 159-165.

Osborne RS, Silhavy TJ. (1993). PrlA suppressor mutations cluster in regions corresponding to three distinct topological domains. *EMBO J.*, **12**, 3391-8.

Or E, Navon A, Rapoport T. (2002). Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane. *EMBO J.*, **21**, 4470-4479.

Paetzel M, Dalbey RE, Strynadka NC. (1998). Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature*, **396**, 186-90

Paetzel M, Danel F, de Castro L, Mosimann SC, Page MG, Strynadka NC. (2000). Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol.*, **7**, 918-25.

Palade G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-58. Review.

Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, :561-70

Park S, Liu G, Topping TB, Cover WH, Randall LL. (1988). Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science*, **239**, 1033-5.

Park, S.K., Kim, D.W., Choe, J. and Kim, H. (1997) RNA helicase activity of Escherichia coli SecA protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 593-597.

Persson B, Argos P. (1994). Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J Mol Biol.*, **237**, 182-92.

Phillips GJ, Silhavy TJ. (1992). The E. coli ffh gene is necessary for viability and efficient protein export. *Nature*, **359**, 744-6.

Pierce MM, Raman CS, Nall BT. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 213-21.

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.

Pohlschroder M, Murphy C, Beckwith J. (1996). In vivo analyses of interactions between SecE and SecY, core components of the Escherichia coli protein translocation machinery. J Biol Chem., **271**, 19908-14.

Poritz MA, Bernstein HD, Strub K, Zopf D, Wilhelm H, Walter P. (1990). An E. coli ribonucleoprotein containing 4.5S RNA resembles mammalian signal recognition particle. Science, 250, 1111-7.

Powers T, Walter P. (1997). Co-translational protein targeting catalyzed by the Escherichia coli signal recognition particle and its receptor. EMBO J., 16, 4880-6

Price, A., Economou, A., Duong, F. and Wickner, W.(1996) Separable ATPase and membrane insertion domains of the SecA subunit of preprotein translocase. J. Biol. Chem., **271**, 31580-31584.

Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J. (1997). Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. Cell, 91, 563-6. Review.

Prinz WA, Boyd DH, Ehrmann M, Beckwith J. (1998). The protein translocation apparatus contributes to determining the topology of an integral membrane protein in Escherichia coli. J Biol Chem., 273, 8419-24.

Pugsley AP. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol Rev., 57, 50-108. Review.

Randall LL, Hardy SJ. (1986). Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in E. coli. Cell, **46**, 921-8.

Ramamurthy, V. and Oliver, D.B. (1997) Topology of the integral membrane form of Escherichia coli SecA protein reveals multiple periplasmically exposed regions and modulation by ATP binding. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23239-23246.

Ramamurthy V, Dapic V, Oliver D. (1998). secG and temperature modulate expression of azide-resistant and signal sequence suppressor phenotypes of Escherichia coli secA mutants. *J Bacteriol.*, **180**, 6419-23.

Rapoport TA, Rolls MM, Jungnickel B. (1996). Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol.*, 4, 499-504. Review.

Rapoport TA, Matlack KE, Plath K, Misselwitz B, Staack O. (1999). Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem.*, **380**, 1143-50. Review.

Riggs PD, Derman AI, Beckwith J. (1988). A mutation affecting the regulation of a secA-lacZ fusion defines a new sec gene. *Genetics*, **118**, 571-9.

Rizzitello AE, Harper JR, Silhavy TJ. (2001). Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of Escherichia coli. *J Bacteriol.*, **183**, 6794-800.

Roos T, Kiefer D, Hugenschmidt S, Economou A, Kuhn A. 2001). Indecisive M13 procoat protein mutants bind to SecA but do not activate the translocation ATPase. *J Biol Chem.*, **276**, 37909-15. Epub 2001 Aug 03.

Rothman JE, Wieland FT. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science*, 272 , 227-34. Review.

Sankaran K, Wu HC. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem.*, **269**, 19701-6.

Sato K, Mori H, Yoshida M, Tagaya M, Mizushima S. (1997). In vitro analysis of the stop-transfer process during translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. J Biol Chem., **272**, 20082-7.

Sato K, Mori H, Yoshida M, Tagaya M, Mizushima S. (1997). Short hydrophobic segments in the mature domain of ProOmpA determine its stepwise movement during translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. J Biol Chem., **272**, 5880-6

Schatz G. (1996). The protein import system of mitochondria. J Biol Chem., 271, 31763-6. Review.

Schatz G, Dobberstein B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. Science, 271, 1519-26. Review.

Schatz PJ, Bieker KL, Ottemann KM, Silhavy TJ, Beckwith J. (1991). One of three transmembrane stretches is sufficient for the functioning of the SecE protein, a membrane component of the E. coli secretion machinery. EMBO J., **10**, 1749-57.

Schekman R, Orci L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. Science, 271 ,1526-33. Review.

Schiebel, E., Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., and Wickner, W. (1991).  $\text{H}^+$  and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. Cell, **64**, 927-939.

Shinkai, A., Mei, L.H., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1991). The conformation of SecA, as revealed by its protease sensitivity, is altered upon interaction with ATP, presertory proteins, everted membrane vesicles, and phospholipids. J. Biol. Chem., **266**, 5827-5833.

Schmidt,M, Ding,H, Ramamurthy,V, Mukerji,I, and Oliver,D. (2000). Nucleotide binding activity of SecA homodimer is conformationally regulated by temperature and altered by prfD and azi mutations. *J Biol Chem.*, **275**, 15440-15448.

Schnell DJ, Hebert DN. (2003). Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell*, **112**, 491-505. Review.

Seluanov A, Bibi E. (1997). FtsY, the prokaryotic signal recognition particle receptor homologue, is essential for biogenesis of membrane proteins. *J Biol Chem.*, **272**, 2053-5

Settles AM, Martienssen R. (1998). Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol.*, **8**, 494-501. Review.

Sharma, V., Arockiasamy, A., Ronning, D.R., Savva, C.G., Holzenburg, A., Braunstein, M., Jacobs, W.R. Jr, Sacchettini, J.C. (2003) Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc .Natl Acad. Sci U S A*, **100**, 2243-2248.

Shilton, B., Svergun, D.I., Volkov, V.V., Koch, M.H.J, Cusack, S. and Economou, A. (1998)*Escherichia coli* SecA shape and dimensions. *FEBS Lett.*, **436**, 277-282.

Shinkai, A., Mei, L.H., Tokuda, H. and Mizushima,S. (1991). The conformation of SecA, as revealed by its protease sensitivity, is altered upon interaction with ATP, resecretory proteins, everted membrane vesicles, and phospholipids. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5827-5833.

Shiozuka,K., Tani,K., Mizushima,S., and Tokuda,H. (1990). The proton motive force lowers the level of ATP required for the in vitro translocation of a secretory protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **265**,18843-18847.



Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Rapanas, K., Kyripides, N., Politou, A., S. and Economou, A., (2001). Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J.*, **20**, 5, 961-970.

Singleton, M.R., Sawaya, M.R., Ellenberger, T., and Wigley, D.B. (2000). Crystal structure of T7 gene 4 ring helicase indicates a mechanism for sequential hydrolysis of nucleotides. *Cell*, **101**, 589-600.

Snyders, S., Ramamurthy, V. and Oliver, D. (1997) Identification of a region of interaction between *Escherichia coli* SecA and SecY proteins. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11302-11306.

Sommer T, Jentsch S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*, **365**, 176-9.

Sommer T, Wolf DH. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.*, **11**, 1227-33. Review.

Song M, Kim H. (1997). Stability and solvent accessibility of SecA protein of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 1010-8.

Song W, Raden D, Mandon EC, Gilmore R. (2000). Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell*, **100**, 333-43.

Soultanas, P., and Wigley, D.B. (2000). DNA helicases: 'inching forward'. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 124-128.

Subramani S. (1996). Protein translocation into peroxisomes. *J Biol Chem.*, **271**, 32483-6. Review.

Suzuki H, Nishiyama K, Tokuda H. (1998). Coupled structure changes of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the secAcsR11 and delta secG::kan double mutant. *Mol Microbiol.*, **29**, 331-41.

Tani K, Shiozuka K, Tokuda H, Mizushima S. (1989). In vitro analysis of the process of translocation of OmpA across the Escherichia coli cytoplasmic membrane. A translocation intermediate accumulates transiently in the absence of the proton motive force. *J Biol Chem.*, **264**, 18582-8.

Tani K, Tokuda H, Mizushima S. (1990). Translocation of ProOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of Escherichia coli. Effect of membrane energization. *J Biol Chem.*, **265**, 17341-7

Taura T, Yoshihisa T, Ito K. (1997). Protein translocation functions of Escherichia coli SecY: in vitro characterization of cold-sensitive secY mutants. *Biochimie.*, **79**, 517-21.

Theis K, Chen PJ, Skorvaga M, Van Houten B, Kisker C. (1999). Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO J.*, **18**, 6899-907.

Topping TB, Randall LL. (1997). Chaperone SecB from Escherichia coli mediates kinetic partitioning via a dynamic equilibrium with its ligands. *J Biol Chem.*, **272**, 19314-8

Triplett, T.L., Sgrignoli, A.R., Gao, F.B., Yang, Y.B., Tai, P.C. and Gierasch, L.M. (2001) Functional signal peptides bind a soluble N-terminal fragment of SecA and inhibit its ATPase activity. *J Biol Chem.*, **276**, 19648-19655.

Uchida K, Mori H, Mizushima S. (1995). Stepwise movement of preproteins in the process of translocation across the cytoplasmic membrane of Escherichia coli. *J Biol Chem.*, **270**, 30862-8.

Ulbrandt, N.D., London, E., and Oliver, D.B. (1992). Deep penetration of a portion of Escherichia coli SecA protein into model membranes is promoted by anionic phospholipids and by partial unfolding. *J. Biol. Chem.* **267**, 15184-15192.

Ulbrandt ND, Newitt JA, Bernstein HD. (1997). The E. coli signal recognition particle is required for the insertion of a subset of inner membrane proteins. *Cell*, **88**, 187-96.

Valent QA, Kendall DA, High S, Kusters R, Oudega B, Luirink J. (1995). Early events in preprotein recognition in E. coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.*, **14**, 5494-505.

Valent QA, Scotti PA, High S, de Gier JW, von Heijne G, Lentzen G, Wintermeyer W, Oudega B, Luirink J. (1998). The Escherichia coli SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon. *EMBO J.*, **17**, 2504-12.

van der Does C, den Blaauwen T, de Wit JG, Manting EH, Groot NA, Fekkes P, Driessen AJ. (1996). SecA is an intrinsic subunit of the Escherichia coli preprotein translocase and exposes its carboxyl terminus to the periplasm. *Mol Microbiol.*, **22**, 619-629

van der Does C, Manting EH, Kaufmann A, Lutz M, Driessen AJ. (1998) Interaction between SecA and SecYEG in micellar solution and formation of the membrane-inserted state. *Biochemistry*, **37**, 201-210.

van der Does C, Swaving J, van Klompenburg W, Driessen AJ. (2000). Non-bilayer lipids stimulate the activity of the reconstituted bacterial protein translocase. *J Biol Chem.*, **275**, 2472-8.

van der Wolk, J.P., de Wit, J.G. and Driessen, A.J. (1997) The catalytic cycle of the Escherichia coli SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.*, **16**, 7297-7304

van der Wolk JP, Fekkes P, Boorsma A, Huie JL, Silhavy TJ, Driessen AJ. (1998). PrIA4 prevents the rejection of signal sequence defective preproteins by stabilizing the SecA-SecY interaction during the initiation of translocation. *EMBO J.*, **17**, 3631-9

van Voorst F, van der Does C, Brunner J, Driessen AJ, de Kruijff B. (1998). Translocase-bound SecA is largely shielded from the phospholipid acyl chains. *Biochemistry*, **37**, 12261-8

van Voorst F, Vereyken IJ, de Kruijff B. (2000). The high affinity ATP binding site modulates the SecA-precursor interaction. *FEBS Lett.*, **486**, 57-62.

Van Voorst F, De Kruijff B. (2000). Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem J.*, **347**, 601-12. Review.

Velankar,S.S., Soutanas,P., Dillingham,M.S., Subramanya,H.S., and Wigley,D.B. (1999). Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell*, **97**, 75-84.

von Heijne G. (1994). Sec-independent protein insertion into the inner E. coli membrane. A phenomenon in search of an explanation. *FEBS Lett.*, **346**, 69-72. Review.

von Heijne G. (1997). Getting greasy: how transmembrane polypeptide segments integrate into the lipid bilayer. *Mol Microbiol.*, **24**, 249-53. Review.

Walker,J.E., Saraste,M., Runswick,M.J., and Gay,N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, **1**, 945-951.

Walter P, Lingappa VR. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.*, **2**, 499-516. Review.

Walter P, Johnson AE. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol.*, 10, 87-119. Review.

Wang L, Miller A, Kendall DA. (2000). Signal peptide determinants of SecA binding and stimulation of ATPase activity. *J Biol Chem.*, **275**, 10154-9.

Wang HW, Chen Y, Yang H, Chen X, Duan MX, Tai PC, Sui SF. (2003). Ring-like pore structures of SecA: implication for bacterial protein-conducting channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4221-6.

Watanabe M, Blobel G. (1993). SecA protein is required for translocation of a model precursor protein into inverted vesicles of Escherichia coli plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9011-5.

Weaver AJ, McDowall AW, Oliver DB, Deisenhofer J. (1992). Electron microscopy of thin-sectioned three-dimensional crystals of SecA protein from Escherichia coli: structure in projection at 40 Å resolution. *J Struct Biol.*, **109**, 87-96

Wickner W, Driessen AJ, Hartl FU. (1991). The enzymology of protein translocation across the Escherichia coli plasma membrane. *Annu Rev Biochem.*, 60, 101-24. Review.

Wickner WT. (1994). How ATP drives proteins across membranes. *Science*, **266**, 1197-8.

Wickner W, Leonard MR. (1996). Escherichia coli preprotein translocase. *J Biol Chem.*, **271**, 29514-6. Review.

Woodbury RL, Hardy SJ, Randall LL. (2002). Complex behavior in solution of homodimeric SecA. *Protein Sci.* 2002 Apr;11(4):875-82.

Xu Z, Knafels JD, Yoshino K. (2000). Crystal structure of the bacterial protein export chaperone secB. *Nat Struct Biol.*, **7**, 1172-7.

Yamada, H., Matsuyama, S.-I., Tokuda, H., and Mizushima, S. (1989). A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **264**, 18577-18581.

Yamada H, Tokuda H, Mizushima S. (1989). Proton motive force-dependent and - independent protein translocation revealed by an efficient in vitro assay system of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.*, **264**, 1723-8.

Yamane K, Ichihara S, Mizushima S. (1986). In vitro translocation of protein across *Escherichia coli* membrane vesicles requires both the proton motive force and ATP. *J Biol Chem.*, **262**, 2358-62.

Yang, Y.B., Yu, N. and Tai, P.C. (1997). SecE-depleted membranes of *Escherichia coli* are active. SecE is not obligatorily required for the in vitro translocation of certain protein precursors. *J Biol Chem.*, **272**, 13660-13665

Zheng N, Gierasch LM. (1996). Signal sequences: the same yet different. *Cell*, **86**, 849-52.  
Review.