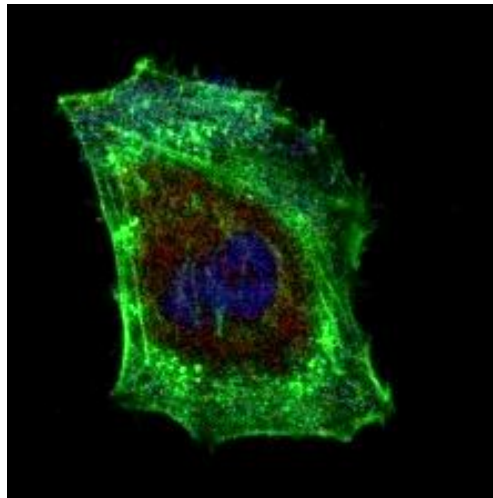


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μοριακή ανάλυση του μηχανισμού  
έκκρισης Τύπου III στο εντεροπαθογόνο  
*E.coli**



Επιμέλεια: Πορτάλιου Αθηνά

Υπεύθυνος καθηγητής: Οικονόμου Αναστάσιος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

## Πίνακας περιεχομένων

---

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
Summary .....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Το εντεροπαθογόνο <i>Escherichia coli</i> (EPEC) .....	9
1.1.1 Κλινικά συμπτώματα και παθολογία .....	9
1.2 Το σύστημα έκκρισης τύπου III .....	10
1.2.1 Ο γενετικός τόπος της εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE, Locus of Enterocyte Effecement).....	11
1.3 Δομή του συστήματος τύπου III .....	12
1.3.1 Δομή του συριγγίου .....	13
1.3.2 Ο πόρος μετατόπισης .....	15
1.3.3 Οι T3S σαπερόνες .....	16
1.4 Εντοπισμένη προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα.....	19
1.4.1 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες του EPEC (Esp) .....	20
1.4.2 Στενή προσκόλληση και ο ρόλος της Tir πρωτεΐνης .....	21
1.4.3 Δομή της A/E κάκωσης .....	22
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Πρωτεϊωματική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3S	26
2.1 Ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το εντεροπαθογόνο <i>E.coli</i> .....	26
2.2 Συγκριτική πρωτεϊωματική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3S .....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μελέτη της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S <i>in vitro</i> και <i>ex vivo</i> ..	32
3.1 Προσδιορισμός των καταλλήλων συνθηκών έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S <i>in vitro</i> .....	32
3.1.1 Το θρεπτικό μέσω ανάπτυξης βακτηρίων .....	32
3.1.2 Προσδιορισμός συνθηκών στις οποίες βελτιστοποιείται η έκκριση .....	34
3.1.3 Σύγκριση με κύτταρα που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα CVD450 .....	34
3.2 Μελέτη της έκκρισης του μεταθέτη EspA <i>in vitro</i> και <i>ex vivo</i> .....	37
3.2.1 Έκκριση του μεταθέτη EspA <i>in vitro</i> .....	37
3.2.2 Έκκριση του μεταθέτη EspA, <i>ex vivo</i> .....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των EspA, EspB και CesAB κατά την διάρκεια της έκκρισης .....	42
4.1 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων των μεταθετών EspA και EspB.....	42
4.2 Απομόνωση και ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
6.1 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας .....	58
6.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA. ....	58
6.1.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA. ....	58
6.1.3 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων. ....	58
6.1.4 Κατασκευή σημειακών μεταλλαγών στην CesAB πρωτεΐνη.....	59
6.2 Καθαρισμός αντισωμάτων έναντι σε διαλυτές πρωτεΐνες του T3S .....	59
6.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλοκών .....	59
6.3.1 Μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση.....	59
6.3.2 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση.....	60
6.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα πολυακρυλαμίδης .....	61
6.4.1 Χρώση Coomassie Blue .....	61
6.4.2 Χρώση Blue Silver.....	61

6.4.3 Χρώση με Νιτρικό Άργυρο .....	61
6.4.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με αντισώματα (Western Blot) .....	62
6.5 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών .....	62
6.5.1 Χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό φορέα pET .....	62
6.5.2 Χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό φορέα pASK-IBA .....	63
6.5.3 Καθαρισμός των His-πρωτεϊνών με Ni <sup>2+</sup> -NTA χρωματογραφία συγγένειας ...	64
6.5.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και τρυψινόλυση αυτών. ....	66
6.6 Βιοχημικές Διαδικασίες .....	67
6.6.1 Έκκριση πρωτεϊνών <i>in vitro</i> από στελέχη EPEC σε σχέση με τον χρόνο. ....	67
6.6.2 Υπο-κυτταρική κλασμάτωση .....	68
6.7 Χρήση κυτταρικών μοντέλων .....	68
6.7.1 Επιμόλυση κυττάρων HeLa .....	68
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	70

## Περιεχόμενα εικόνων

Σχήμα 1. Συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών στα βακτήρια .....	11
Σχήμα 2 : Διάγραμμα ενός βακτηριακού T3S. ....	13
Σχήμα 3: Δομή του συριγγίου.....	15
Σχήμα 4 Τρισδιάστατη εικόνα ενός πόρου μετατόπισης .....	16
Σχήμα 5: Δομή του συμπλόκου CesAB-EspA.....	19
Σχήμα 6: Μετατόπιση των Esps.....	21
Σχήμα 7: Πρωταρχική προσκόλληση EPEC στελεχών.....	21
Σχήμα 8 :Σχηματισμός ψευδοποδίου. ....	23
Σχήμα 9: Η δομή μιας προεκβολής κατά την μόλυνση με EPEC .....	24
Σχήμα 10: Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το EPEC. ....	27
Σχήμα 11: Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας.....	28
Σχήμα 12: Σύγκριση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από διαφορετικά EPEC στελέχη.....	30
Σχήμα 13:Καμπύλη ανάπτυξης των EPEC.....	33
Σχήμα 14: Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης EspA.....	33
Σχήμα 15: Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων EPEC και κυττάρων EPEC μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο CVD450.....	35
Σχήμα 16: Σύγκριση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται ποσοτικά. ....	36
Σχήμα 17 :Ανάλυση προφίλ των πρωτεϊνών που εκκρίνονται. ....	36
Σχήμα 18: Ανίχνευση της πρωτεΐνης EspA, η οποία έχει εκκριθεί από διαφορετικά στελέχη EPEC. ....	38
Σχήμα 19: Μελέτη της έκκρισης της EspA ex vivo.....	41
Σχήμα 20:Ανάλυση των μεγαλομοριακών συμπλόκων που δημιουργούνται μετά από διάρρηξη των EPEC σε συσχέτιση με τον χρόνο ανάπτυξης. ....	44
Σχήμα 21: Στοιχειομετρική ανάλυση της ποσότητας της έκφρασης της πρωτεΐνης EspA45	
Σχήμα 22: Ανίχνευση των συμπλόκων που περιέχουν His-EspA. ....	47
Σχήμα 23 : Σύμπλοκα τα οποία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας σαν «δόλωμα» την πρωτεΐνη His-EspA. ....	47
Σχήμα 24: Στοιχειομετρική ανάλυση της ποσότητας της έκφρασης της CesAB. ....	49
Σχήμα 25 : Σύμπλοκα τα οποία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας σαν «δόλωμα» την πρωτεΐνη His-CesAB.....	49

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Σε ένα κόσμο που καθημερινά οι ζωντανοί οργανισμοί που υπάρχουν σε αυτόν πασχίζουν με κάθε τρόπο για την επιβίωση, αναπαραγωγή και εξέλιξη τους, ο άνθρωπος με γνώμονα την λογική και την σύνεση καταβάλει μέγιστες προσπάθειες για την βελτιστοποίησή του. Στον βωμό της επιστήμης και της έρευνας θυσιάζει την προσωπική του ευημερία με σκοπό την μελέτη και επίλυση σοβαρών επιστημονικών ζητημάτων. Καθημερινά, προσπαθεί να δώσει εξηγήσεις σε αναπάντητα μέχρι στιγμής ερωτήματα με πρωταρχικό στόχο την καλύτερευση της ανθρώπινης ζωής.

Στα πλαίσια αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του επίκουρου καθηγητή Οικονόμου Αναστάσιου, στο ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, απέκτησα την πρώτη ουσιαστική εμπειρία μου με τον τομέα αυτό της Βιολογίας και πραγματοποίησα μια σύντομη αλλά καθοριστικής σημασίας γνωριμία με τον κόσμο της εργαστηριακής έρευνας. Κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο μου δόθηκε η ευκαιρία να ασχοληθώ με την μοριακή ανάλυση του μηχανισμού έκκρισης του συστήματος τύπου III στο εντεροπαθογόνο *Escherichia coli*.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους οι οποίοι συνέβαλαν με τον τρόπο τους για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή, κύριο Αναστάσιο Οικονόμου διότι δέχτηκε να με συμπεριλάβει στις ερευνητικές δραστηριότητες του εργαστηρίου του και να με καταστήσει ενεργό μέλος του. Ταυτόχρονα, να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή υποστήριξή του τόσο σε θέματα ερευνητικά όσο και γενικότερης φύσης. Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω και προς: **α)** την υπομονετική και με κατανόηση διδάκτορα Μπαλαμπανίδου Βασιλεία, η οποία κυρίως ανέλαβε το δύσκολο ρόλο του συμβούλου και καθοδηγητή για θέματα πειραματισμού και έρευνας, **β)** τον τεχνικό Κουντουράκη Νίκο και τον μετά-διδασκτορικό ερευνητή Αϊβαλιώτη Μιχάλη, στους οποίους οφείλω την εκμάθηση των μεθόδων πρωτεωματικής ανάλυσης. Επίσης, θέλω να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ γενικά σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, το καθένα με τον τρόπο του συνέβαλε στην πραγμάτωση της διατριβής αυτής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον Γιακουμάκη Κωνσταντίνο για την ψυχολογική και όχι μόνο υποστήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Το εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC) είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο το οποίο προσβάλλει το εντερικό επιθήλιο και αποτελεί απειλή για την υγεία των ανθρώπων κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Υπεύθυνο κατά κύριο λόγο, για την παθογονικότητα του βακτηρίου είναι ένα μοναδικό σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών, το σύστημα έκκρισης Τύπου III (T3S). Το T3S είναι μια περίπλοκη νανομηχανή μέσω της οποίας εκκρίνονται απευθείας στο κύτταρόπλασμα του ξενιστή όλες οι μολυσματικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Η νανομηχανή αυτή αποτελείται από το βασικό σωματίο, που διαπερνά τις βακτηριακές μεμβράνες, από την βελόνη και το ινίδιο, εξωκυτταρικά. Παρόλες τις μελέτες που έχουν γίνει γύρω από το σύστημα έκκρισης αυτό, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα.

Στην παρούσα διατριβή, προσπαθούμε αρχικά να ανιχνεύσουμε το σύνολο των πρωτεϊνών οι οποίες εκκρίνονται διαμέσου του T3S από τα EPEC. Στην συνέχεια, σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε το μονοπάτι έκκρισης των μολυσματικών πρωτεϊνών, μελετάμε τον τρόπο έκκρισης των μεταθέτων EspA και EspB και τις αλληλεπιδράσεις αυτών με την σαπερόνη τους, CesAB.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, αρχικά προσδιορίσαμε τις συνθήκες στις οποίες η έκκριση των πρωτεϊνών είναι βέλτιστη. Στη συνέχεια, ανιχνεύσαμε το σύνολο των πρωτεϊνών το οποίο εκκρίνεται διαμέσου του T3S, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας. Τέλος, αξιοποιώντας γενετικά τροποποιημένα στελέχη EPEC, προσδιορίσαμε την ιεραρχία με την οποία εκκρίνονται οι μολυσματικοί παράγοντες από τα αγρίου τύπου κύτταρα, και το πώς η ιεραρχία αυτή επηρεάζεται απουσία πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν την έκκριση.

Παράλληλα, προσπαθήσαμε να διερευνήσουμε τον τρόπο που αλληλεπιδρούν οι μολυσματικές πρωτεΐνες με τις εξειδικευμένες σαπερόνες του συστήματος έκκρισης τύπου III, χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο τους μετάθετες EspA και EspB και την σαπερόνη αυτών CesAB. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήσαμε βιοχημικά πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo*. Στα πειράματα αυτά, μελετήσαμε τις αλληλεπιδράσεις της σαπερόνης και των υποστρωμάτων της, καθώς και πώς αυτές οι αλληλεπιδράσεις επηρεάζονται από διάφορα γενετικά τροποποιημένα παράγωγα της σαπερόνης.

Επιπλέον, σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε το μονοπάτι της στόχευσης που ακολουθούν οι πρωτεΐνες EspA και EspB πριν την έκκρισή τους από το T3S, ανιχνεύσαμε τα τεταρτοταγή σύμπλοκα που δημιουργούνται στα διαφορετικά υπό-κυτταρικά κλάσματα που δημιουργούνται έπειτα από ήπια και έντονη διάρρηξη των κυττάρων EPEC. Τέλος, αναλύσαμε τους παράγοντες από τους οποίους τα μεγαλομοριακά αυτά σύμπλοκα αποτελούνται, χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποτελούν μια βάση για την κατανόηση του μοριακού μηχανισμού έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S των EPEC και στοιχειοθετούν ένα πλαίσιο για την περαιτέρω ανάλυση του μονοπατιού έκκρισης των πρωτεϊνών από το σύστημα αυτό.

## Summary

---

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important diarrheal pathogen and an endemic health threat in the developing world[1]. The virulence proteins responsible for causing diarrheal disease are translocated directly into the host intestinal epithelium through a type iii secretion system (T3S). The T3S is a nano-machine which consists of the basal body that penetrates the bacterial membrane, and expanded by a needle and a filament. Although a lot of research has been done, there are many questions that need to be answered about the function and regulation of this specific secretion system.

In this study, firstly, we tried to analyze the whole secretome of EPEC. In addition, in order to elucidate how proteins are being secreted from T3S, we analyzed the secretion profile of two translocator proteins, EspA and EspB and their chaperone, CesAB.

To achieve this goal, firstly, we determine the conditions where the secretion from T3S is being induced (pH, temperature). Afterwards, we analyzed all the proteins that are being secreted through T3S using mass spectrometry. Moreover, using deletion strains of EPEC we determine the hierarchy of secretion and how it is regulated by the absence of different factors.

Additionally, we tried to elucidate the interactions between effector proteins and their specific chaperones, using as a model CesAB chaperone and its substrates EspA and EspB. To clarify these interactions, we perform biochemical assays *in vitro* and *ex vivo*. In these experiments, we analyze the interactions between the chaperone and its substrates, and how these interactions are affected after generating mutations at chaperone's gene.

Moreover, to illustrate the secretion pathway that EspA and EspB follow through secretion via T3S, we analyzed the complexes that are being extracted after hard and mild lysis of the EPEC. Furthermore, using mass spectrometry analysis, we tried to identify all the proteins that form the above complexes.

The results of this study reveal important elements to understand the molecular basis of T3S and compose a framework for future studies and analysis of this secretion system.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

### 1.1 Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC)

---

Η μελέτη της βακτηριακής παθογένεσης είναι τεράστιου ενδιαφέροντος, κυρίως γιατί στις μέρες μας επανεμφανίζονται παλιές ασθένειες, όπως η φυματίωση, εμφανίζονται νέες βακτηριακές λοιμώξεις και κυρίως λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από πολλά βακτηριακά στελέχη. Μεγάλο μέρος της μελέτης αυτής έχει εστιαστεί στην κατανόηση του μοριακού και κυτταρικού μηχανισμού της εκδήλωσης της παθογένειας από τα μικρόβια και οι μελέτες αυτές έχουν οδηγήσει σε νέες εκτιμήσεις για τον τρόπο με τον οποίο τα μικρόβια προκαλούν μια ασθένεια. Ένα μεγάλο θέμα τείνει να είναι η διερεύνηση της ικανότητας πολλών μικροβίων να εκμεταλλεύονται τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος των ευκαρυωτικών οργανισμών που προσβάλλουν προς όφελος τους, όπως και άλλα κυτταροσκελετικά και μεμβρανικά συστατικά του κυττάρου-ξενιστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα βακτήρια που ακολουθούν αυτή την οδό είναι ενδοκυτταρικά, όπως η *Listeria*, η *Shigella* και η *Salmonella*. Αντίθετα, το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* είναι εξωκυττάριο παθογόνο, το οποίο προκαλεί ασθένεια μέσω της πρόσδεσης του στη μεμβράνη του ξενιστή και την άμεση προώθηση των μολυσματικών πρωτεϊνών- τοξινών που παράγει στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η διαδικασία αυτή της έκκρισης τοξινών και της μετατόπισης τους απ' ευθείας στο κύτταρο του ξενιστή γίνεται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3S) [2].

#### 1.1.1 Κλινικά συμπτώματα και παθολογία

---

Ως παθογόνο που προσβάλλει τον άνθρωπο, η περιγραφή των συμπτωμάτων και της παθολογίας που σχετίζεται με την μόλυνση από EPEC παρέχει το πλαίσιο στην πρόσφατη πρόοδο σχετικά με τον προσδιορισμό της μοριακής βάσης της ασθένειας. Μία από τις πολλές κατηγορίες των *E. coli* που προκαλούν διάρροια, το EPEC είναι μια πολύ συνηθισμένη αιτία της ανθρώπινης διάρροιας, κυρίως σε νεαρά παιδιά. Παρόλο που οι εξάρσεις στις αναπτυγμένες χώρες ήταν συχνές μέχρι την δεκαετία του 1940 και 1950 [3], η συχνότητα της μόλυνσης από το EPEC έχει από τότε

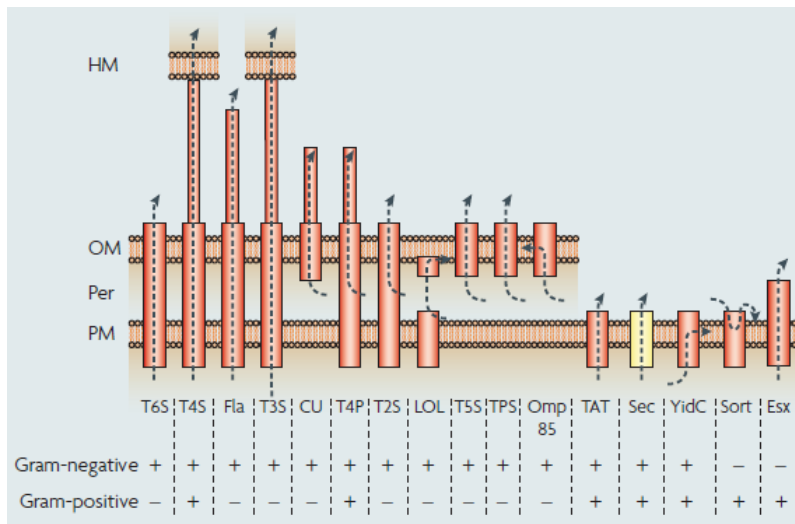
μειωθεί σημαντικά στις χώρες αυτές. Παρόλο' αυτά το EPEC είναι ακόμη υπεύθυνο για ξεσπάσματα σε κέντρα πρόνοιας και στους παιδιατρικούς θαλάμους νοσοκομείων [4]. Επιπλέον, το EPEC παραμένει μια σημαντική αιτία της παιδικής θνησιμότητας στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου τα πολύ πρόσφατα ξεσπάσματα αναφέρουν ρυθμό θνησιμότητας περίπου 30% [5]. Συνεπώς, η μόλυνση από το EPEC υπολογίζεται πως προκαλεί θάνατο σε πολλές εκατοντάδες χιλιάδες παιδιά το χρόνο [6], κατατάσσοντας το στην πέμπτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της προσβολής από το EPEC είναι η A/E ιστοπαθολογία (Attaching/Effacing, Προσκόλληση/Εξάλειψη ή Καταστροφή), η οποία συχνά εμφανίζεται σε δείγματα βιοψίας του λεπτού εντέρου από μολυσμένους ασθενείς και επίσης παρατηρείται μετά από επιμόλυνση επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες [6-7]. Η μόλυνση συνήθως προκαλεί οξεία διάρροια, αλλά σε βαριές περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί παρατεταμένη ασθένεια [8]. Εκτός από τη διάρροια, ο εμετός και η ανάπτυξη πυρετού είναι κοινά συμπτώματα [8]. Στηριζόμενοι στην θνησιμότητα που προκαλεί το μικρόβιο αυτό, το EPEC παραμένει μία από τις πιο σημαντικές απειλές της υγείας των παιδιών παγκοσμίως.

## 1.2 Το σύστημα έκκρισης τύπου III

---

Η εξέλιξη έχει αποδώσει έναν αξιοσημείωτο αριθμό μηχανισμών που εκκρίνουν πρωτεΐνες. Δεκαέξι τέτοια συστήματα, τα οποία ελέγχουν την πρωτεϊνική έκκριση, τη διάκριση και την ένθεση πρωτεϊνών στην μεμβράνη, βρίσκονται στα βακτήρια και μόνο (Σχήμα 1). Από αυτά, μόνο το μονοπάτι Sec είναι ευρέως διαδεδομένο και είναι απαραίτητο για τη ζωή σε όλους τους οργανισμούς.

Όμως, η πανώλη, ο τυφοειδής πυρετός, η βακτηριακή δυσεντερία και πολλές βακτηριακές ακόμη δυσεντερίες προκαλούνται από βακτηριακά παθογόνα, τα οποία χρησιμοποιούν ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύστημα έκκρισης, το λεγόμενο σύστημα έκκρισης τύπου III (T3S) [9]. Αυτό το σύστημα έχει την μοναδική ικανότητα να εισάγει βακτηριακές μολυσματικές πρωτεΐνες κατευθείαν στο κύτταρο του ξενιστή, γεγονός που επιτρέπει σε αυτές τις πρωτεΐνες να ελέγχουν βιοχημικές λειτουργίες του ξενιστή, οι οποίες κυμαίνονται από τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων έως την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού.



Σχήμα 1. Συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών στα βακτήρια

### 1.2.1 Ο γενετικός τόπος της εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE, Locus of Enterocyte Effacement).

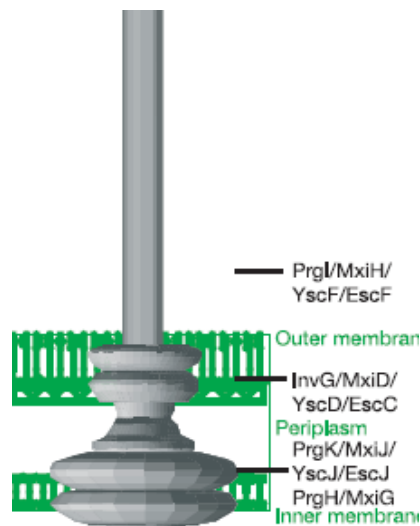
Σε αντίθεση με τα μη παθογόνα στελέχη *E. coli*, τα οποία βρίσκονται μέσα στο ανθρώπινο έντερο, το EPEC, όπως και άλλα παθογόνα στελέχη *E. coli* περιέχουν στο γένωμά τους γενετικούς τόπους που περιέχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την παθογένεση. Έτσι, όλα τα αναγκαία γονίδια (ή σχεδόν όλα) για τον σχηματισμό της A/E κάκωσης (A/E lesion) και της χαρακτηριστικής προεκβολής (pedestal), η οποία μοιάζει με ένα άκρο που ξεπροβάλλει από την επιφάνεια του προσβαλλόμενου κυττάρου, περιέχονται σε μια τέτοια περιοχή 35 Kbp, η οποία ονομάζεται «γενετικός τόπος της εξάλειψης των εντεροκυττάρων» (LEE) [6, 10]. Το περιεχόμενο σε G+C νουκλεϊκών οξέων του LEE είναι 38.4%, σημαντικά μικρότερο κατά 50% από το χρωμόσωμα του μη παθογόνου *E. coli* K-12. Αυτή η διαφορά μπορεί να σημαίνει πως το LEE αποκτήθηκε αρχικά από κάποια άλλη ξένη πηγή και έπειτα από εξελικτικές πιέσεις ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα του *E. coli*. Η θέση ένθεσης του LEE στο γένωμα του *E. coli* K-12, είναι στη θέση που κωδικοποιεί το t-RNA για τη σεληνο-κυστεΐνη. Ολόκληρη η περιοχή του LEE έχει αλληλουχηθεί και περιέχει ένα σύστημα έκκρισης III, καθώς και άλλα γονίδια απαραίτητα για το σχηματισμό της προεκβολής [6]. Αυτά περιλαμβάνουν πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενες πρωτεΐνες του συστήματος III, οι οποίες ονομάζονται Esps (EPEC –secreted proteins) και είναι η EspA, EspB, EspD και EspF, όπως και η προσκολλητίνη (adhesin), η ιντιμίνη (intimin) και ο εκκρινόμενος

υποδοχέας της, Tir. Μεταλλαγές σε οποιονδήποτε από τους παραπάνω βακτηριακούς παράγοντες, με την εξαίρεση του EspF [11], παρεμποδίζουν το σχηματισμό της A/E κάκωσης σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές [7]. Όπως και με τα υπόλοιπα συστήματα τύπου III, έτσι και με αυτό, κυτταροπλασματικές σαπερόνες είναι αναγκαίες για την έκκριση πολλών μολυσματικών παραγόντων, καθώς και συστατικών του ίδιου του συστήματος. Μέχρι τώρα, ως σαπερόνες έχουν χαρακτηριστεί τα μόρια, CesT για την Tir [12], CesD για EspB και EspD [13], CesF για EspF [14], CesD<sub>2</sub>, δεύτερη σαπερόνη για EspD [15] και η CesAB για EspA και EspB [16]. Αλληλουχίες DNA με μεγάλο βαθμό ομολογίας με το EPEC LEE έχουν βρεθεί και σε άλλα βακτήρια που προκαλούν την A/E κάκωση, συμπεριλαμβανομένου του EHEC, όπως και του παθογόνου των ποντικών *C. rodentium*, υποδεικνύοντας πως υπάρχει ένα κοινό εξελικτικό μονοπάτι που οδήγησε στο σχηματισμό της A/E κάκωσης [6].

### 1.3 Δομή του συστήματος τύπου III

---

Το κεντρικό συστατικό του T3S είναι ένα υπερ-μοριακό οργανίδιο, το σύμπλοκο της βελόνης (needle complex), το οποίο διαπερνά τον βακτηριακό φάκελο και μοιάζει με μια μοριακή σύριγγα με βελόνα [17]. Πιστεύεται ότι αυτή η δομή λειτουργεί ως ένας κενός αγωγός, ο οποίος επιτρέπει στις μολυσματικές πρωτεΐνες να διασχίσουν το βακτηριακό φάκελο. Η τελική παράδοση των πρωτεϊνών αυτών απαιτεί μια οικογένεια βακτηριακών πρωτεϊνών, τους μεταθέτες (translocators), οι οποίοι κατά την έκκριση τους από το σύμπλοκο της βελόνης, συνδέονται με τη μεμβράνη του ξενιστή σχηματίζοντας πόρους, ώστε να μεσολαβήσουν για την τελική παράδοση των μολυσματικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή [18]. Το σύμπλοκο της βελόνης μαζί με τους μεταθέτες αποτελούν το συρίγγιο (injectisome).



Σχήμα 2 : Διάγραμμα ενός βακτηριακού T3S.

Τα τρία συστατικά του βασικού σωματίου και της βελόνης από 4 αντιπροσωπευτικά είδη σημειώνονται με βάση τον πιθανό εντοπισμό τους στο βακτηριακό φάκελο με την ακόλουθη σειρά : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* και EPEC.

### 1.3.1 Δομή του συριγγίου

Η ανασύσταση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) του συμπλόκου της βελόνης από τη *Salmonella typhimurium* ήταν μια επιτυχία ορόσημο για το πεδίο<sup>7</sup>. Από τότε, το σύμπλοκο βελόνης από το EPEC [19] και την *S.flexini* [20-21] έχουν επίσης ανασυσταθεί με τη χρήση TEM (Σχήμα 2 και Σχήμα 3). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα σύμπλοκα βελόνης από την *S. typhimurium* και την *S. flexeni* ήταν πολύ όμοια μεταξύ τους. Αλλά και το σύμπλοκο βελόνης από το EPEC ήταν επίσης πολύ όμοιο, αν και μικρότερο, παρά το γεγονός πως αυτό το βακτήριο ανήκει σε διαφορετική οικογένεια [19]. Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν στο ότι η συνολική αρχιτεκτονική των συμπλοκών της βελόνης διατηρείται μεταξύ των διαφορετικών συριγγίων. Το σύμπλοκο της βελόνης αποτελείται από : α) μια κυλινδρική κατασκευή, όμοια με το βασικό σωματίο (basal body) του μαστιγίου (Σχήμα 2 και Σχήμα 3), η οποία απαρτίζεται από δύο ζεύγη δακτυλίων που διαπερνούν την εσωτερική και την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, ενωμένα μεταξύ τους με το ραβδί (rod), και β) από τη βελόνη, η οποία προεξέχει από την εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και λειτουργεί ως ακροφύσιο για την έκκριση των τοξινών στο κύτταρο-ξενιστή [22]. Η ανακάλυψη αυτής της μορφολογίας ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις, σύμφωνα με τις οποίες η έξοδος των μολυσματικών πρωτεϊνών από τις βακτηριακές μεμβράνες και η μετατόπιση τους διαμέσου της ευκαρυωτικής μεμβράνης γίνεται σε ένα βήμα. Παρά το γεγονός πως η υπερμοριακή

δομή του EPEC συμπλόκου της βελόνης είναι ίδια με αυτήν των *Shigella* και *Salmonella*, μία μοναδική εξωκυτταρική προεξοχή (μεγέθους μέχρι και 600 nm) στην οποία καταλήγει η βελόνη των EPEC έχει παρατηρηθεί [19]. Η προεξοχή αυτή ή διαφορετικά ινίδιο αποτελείται από την πολυμερισμένη πρωτεΐνη EspA [23], η οποία φαίνεται να σχηματίζει μια φυσική γέφυρα μεταξύ του βακτηρίου και του ξενιστή. Ανάλυση μοναδιαίου σωματιδίου (single particle), χρησιμοποιώντας μικροσκοπία κρύο-ηλεκτρονίου (cryo-electron microscopy, cryo-EM) επέτρεψε τον καθορισμό της δομής συμπλοκών της βελόνης από την *S. flexini* σε υψηλή ανάλυση (Σχήμα 3) [24-25]. Αυτή η δομή αποκάλυψε για πρώτη φορά, ένα κεντρικό κανάλι περίπου 2-3nm, το οποίο εκτείνεται από τη βάση των ζευγών των δακτυλίων έως την κορυφή της εξωκυττάριας βελόνης. Πρέπει να σημειωθεί πως αυτό το μέγεθος του καναλιού είναι πολύ μικρό για να επιτρέπει σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να διαπεράσουν τον κυλινδρικό αυτό σωλήνα, παρατήρηση που συμφωνεί με πειραματικά δεδομένα που στηρίζουν την υπόθεση πως οι πρωτεΐνες πρέπει να αποδιπλώνονται για να εκκριθούν [26].

Τέλος, όπως φαίνεται από τις cryo-EM φωτογραφίες, τα σύμπλοκα της βελόνης δεν περιέχουν τον C-δακτύλιο, ο οποίος πιθανότατα προσδένεται ασθενώς με το υπόλοιπο βασικό σωματίο και έτσι μπορεί να αποσυνδέεται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού των συμπλοκών από τη μεμβράνη. Επίσης τα απομονωμένα αυτά σύμπλοκα δεν περιέχουν και την συντηρημένη ATPάση (Ysc οικογένεια), η οποία όμως είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συριγγίου [27]. Φαίνεται λοιπόν πως επιπρόσθετα συστατικά του συριγγίου μπορεί να χάνονται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού τους.



Σχήμα 3: Δομή του συριγγίου.

Τριδιάστατη δομή συριγγίων απομονωμένων από *Shigella* (πάνω) και *Salmonella* (κάτω) ανακατασκευασμένες από τον μέσο όρο εικόνων μικρογραφίας κρυο-ηλεκτρονίων (cryo-electron micrograph).

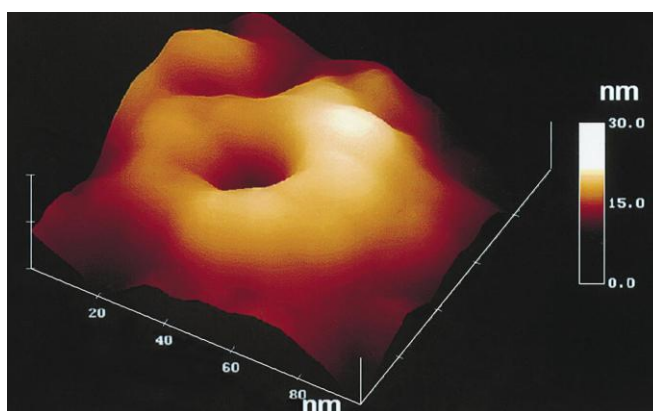
### 1.3.2 Ο πόρος μετατόπισης

---

Ένα ενεργό συρίγγιο, κατά την επαφή του με το κύτταρο του ξενιστή, καταλήγει στον πόρο μετατόπισης, ο οποίος ενσωματώνεται στη μεμβράνη του ξενιστή. Ο σχηματισμός αυτού του πόρου απαιτεί την παρουσία ενός εξειδικευμένου συνόλου πρωτεϊνών, τους μεταθέτες (translocators) [18, 28-30]. Γενικά, υπάρχουν τρεις μεταθέτες σε κάθε T3S (YopB, YopD και LcrV στα *Yersinia spp.*, IpaB, IpaC και IpaD στα *Shigella spp.*, EspA, EspB και EspD στο *EPEC*), ενώ και οι τρεις πρωτεΐνες έχει δείξει να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους [31].

Ο καθορισμός της δομής και της σύστασης ενός πόρου μετατόπισης, ενσωματωμένου σε μεμβράνες ξενιστών από ζωντανά βακτήρια παραμένει ένα από τα κύρια ερωτήματα στο πεδίο του T3S. Πειράματα προστασίας από την όσμωση που έχουν γίνει σε ερυθροκύτταρα τα οποία είχαν προσβληθεί από διαφορετικά βακτήρια οδήγησαν στην εκτίμηση ενός πόρου με διάμετρο γύρω στα 2.3 nm [28, 32-33]. Πρόσφατα, με την βοήθεια του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM), για πρώτη φορά λύθηκε η δομή ενός πόρου από μεμβράνες ερυθροκυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με *EPEC*. Ο πόρος αυτός είχε μια εξωτερική διάμετρο της τάξης των 55-65 nm και έφτανε σε ύψος μέχρι 20 nm από το επίπεδο της μεμβράνης. Η εσωτερική

διάμετρος μετρήθηκε κοντά στα 8 nm, σε αντίθεση με 3-5 nm που είχε υπολογιστεί με βάση τα πειράματα οσμωπροστασίας. Αυτή η διαφορά μπορεί απλά να εξηγηθεί με το άνοιγμα το οποίο φαίνεται να κάνει ο πόρος καθώς προβάλλει από την εσωτερική μεμβράνη (Σχήμα 4). Στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί οι EspB και EspD μεταθέτες, ενώ ο σχηματισμός του πόρου φαίνεται να εξαρτάται και από τις τρεις πρωτεΐνες, EspA, EspB και EspD [34]. Μέχρι τώρα δεν ήταν δυνατή η χρήση της μικροσκοπίας ηλεκτρονίου, προκειμένου να έχουμε την εικόνα ενός φυσιολογικά εντεθειμένου πόρου από το συρίγγιο (τα ερυθροκύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν αποτελούν το φυσικό στόχο για T3S). Επιπρόσθετα, η δομή και η στοιχειομετρία ενός φυσικά σχηματισμένου πόρου μετατόπισης είναι άγνωστη.



Σχήμα 4 Τρισδιάστατη εικόνα ενός πόρου μετατόπισης

### 1.3.3 Οι T3S σαπερόνες

Η συναρμολόγηση και η λειτουργία του συρίγγιου απαιτεί τη βοήθεια μιας σειράς μικρών βακτηριακών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι γνωστές ως T3S σαπερόνες. Αυτές ανήκουν σε τρεις διαφορετικές τάξεις, όπου είτε βοηθούν τις μολυσματικές πρωτεΐνες (τάξη I), ή τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν τον πόρο (τάξη II), είτε, τέλος, τις πρωτεΐνες που πολυμερίζονται έξω από το κύτταρο (τάξη III). Αυτές οι σαπερόνες δεν θα εκκριθούν ποτέ από το βακτηριακό κύτταρο, ενώ είναι πολύ πιθανό να ανακυκλώνονται. Παρακάτω αναλύεται η καθεμιά από τις τάξεις αυτές των σαπερονών.

*Τάξη I.* Πολλές μολυσματικές πρωτεΐνες έχουν εξειδικευμένες σαπερόνες, ενώ υπάρχει ένα σημαντικό κομμάτι της βιβλιογραφίας το οποίο περιγράφει την δομή τους και τον τρόπο με τον οποίο αυτές αναγνωρίζουν το υπόστρωμα τους [35-39]. Τα



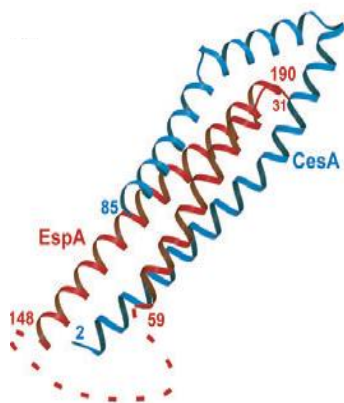
γονίδια που κωδικοποιούν για τις σαπερόνες αυτής της τάξης βρίσκονται σχεδόν πάντα δίπλα στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το υπόστρωμα τους. Όλες τους είναι όξινες (pI 4-5), μικρές και διμερείς πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδέονται στα 100 πρώτα αμινοξέα των υποστρωμάτων τους, στην περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης, αμέσως μετά από το μικρό πεπτίδιο σινιάλο-εξόδου, το οποίο βρίσκεται στο αμινοτελικό τους άκρο. Σημαντική επίσης είναι η παρατήρηση ότι, παρά το γεγονός πως οι σαπερόνες αυτές δεν έχουν μεταξύ τους σημαντική ομοιότητα στο επίπεδο της πρωτοταγούς τους αλληλουχίας, φαίνεται να έχουν μια συντηρημένη τρισδιάστατη δομή. Συγκεκριμένα, όλες έχουν την ίδια περίπου αναδίπλωση, που αποτελείται από 5 β-πτυχωτές επιφάνειες και τρεις α-έλικες [40-41]. Η παρουσία υδρόφοβων επιφανειών στα ομοδιμερή των σαπερονών είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποστρώματος [39-40, 42].

Παρά το γεγονός πως πολλές σαπερόνες αυτής της τάξης με τα υποστρώματά τους έχουν ενδελεχώς μελετηθεί και χαρακτηριστεί, εντούτοις ο πραγματικός τους ρόλος στη διαδικασία της έκκρισης παραμένει υπό αμφισβήτηση. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι σαπερόνες θα μπορούσαν να είναι τρισδιάστατοι παράγοντες στόχευσης ή ότι έχουν κάποιο ρόλο στην επιβολή μιας προσωρινής ιεραρχίας στην έξοδο των υποστρωμάτων από το κύτταρο [40, 43]. Άλλες παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι σαπερόνες χρειάζονται για να διατηρούν τα υποστρώματά τους σε μια κατάσταση συμβατή με την έκκριση, πριν ακριβώς από την έκκριση τους [44], αλλά την ίδια στιγμή η πρόσδεση με τη σαπερόνη δεν αποτρέπει την αναδίπλωση του υπόλοιπου σώματος της μολυσματικής πρωτεΐνης [45-46]. Πρόσφατα έχει δείχτει πως η περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης στις YopE, YopO και YopT τοξίνες συμπίπτει με την περιοχή ένθεσης στη μεμβράνη του ξενιστή. Η περιοχή αυτή έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει την αδιαλυτοτητα των πρωτεϊνών Yop, αλλά ενδοκυτταρικά η πρόσδεση της περιοχής αυτής στην σαπερόνη αποτρέπει το φαινόμενο αυτό. Έτσι λοιπόν οι SycE, SycO και SycT σαπερόνες καλύπτουν την υδρόφοβη αυτή περιοχή που οδηγεί στη σωστή στόχευση των υποστρωμάτων τους στη μεμβράνη του ξενιστή. Η κάλυψη λοιπόν μιας περιοχής στόχευσης μπορεί να είναι μια σημαντική λειτουργία των σαπερονών [46-47], και αν αυτή η περιοχή στόχευσης ήταν απλώς μια υδρόφοβη περιοχή, τότε οι σαπερόνες της τάξης I θα μπορούσαν να αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα υποστρώματα. Συνεπώς, τα ευρήματα αυτά προτείνουν πως η περιοχή στόχευσης της μολυσματικής πρωτεΐνης δεν είναι μια υδρόφοβη περιοχή μόνο. Η πρόταση πως οι σαπερόνες κρύβουν τις

περιοχές για την κυτταρική στόχευση δεν αποκλείει την πιθανότητα αυτές να διευκολύνουν και την έξοδο των υποστρωμάτων τους από το κύτταρο. Πράγματι, σαπερόνες σε σύμπλοκο με τα υποστρώματα τους θα μπορούσαν να δρουν σαν τρισδιάστατα σινιάλα για την έκκριση, όπως ακριβώς προτάθηκε για τη SycE ή ακόμη θα μπορούσαν να διευκολύνουν την έκθεση σινιάλων εξόδου, τα οποία βρίσκονται αμέσως μετά την περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης [48].

*Τάξη II.* Οι υδρόφοβοι μεταθέτες είναι τοξικοί για το βακτηριακό κύτταρο [49], και η τοξικότητα αυτή εξουδετερώνεται από τις σαπερόνες τάξης II [38]. Λίγα είναι γνωστά για τον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζουν το υπόστρωμα, αλλά γενικά φαίνεται μια σαπερονη (SycD στην *Yersinia* spp., IpgC στην *Shigella* spp.) να εξυπηρετεί και τους δύο μεταθέτες μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, η SicA, έχει δείχτει να παίζει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση των τοξινών. Αυτή η παρατήρηση έχει νόημα με την έννοια ότι η ελεύθερη σαπερόνη μπορεί να δρα ως προειδοποιητικό σήμα μέσα στο κύτταρο, το οποίο θα ενημερώνει πως ο πόρος είναι έτοιμος και το συρίγγιο λειτουργικό [44].

*Τάξη III.* Τα εξωκυτάρια, σπειροειδή συστατικά δομών όπως η βελόνη ή το ινίδιο του συριγγίου πρέπει να αποτρέπονται από τον πρόωρο πολυμερισμό τους μέσα στο βακτήριο. Αυτό επιτυγχάνεται από τις σαπερόνες τάξης III, οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδέονται στα υποστρώματα τους, καλύπτοντας τις περιοχές εκείνες που ελέγχουν τον πολυμερισμό τους. Στο μαστίγιο, η FlgN δρα ως σαπερόνη για την FlgK και την FlgL, τις δύο πρωτεΐνες που συνδέονται με το άγγιστρο (hook). Η FliT είναι η σαπερόνη της πρωτεΐνης της καλύπτρας (cap) FliD και η FliS λειτουργεί ως σαπερόνη για τη φλατζελίνη (FliC). Τα σπειροειδή συστατικά του συριγγίου επίσης χρησιμοποιούν εξειδικευμένες κυτταροπλασματικές σαπερόνες, οι οποίες διατηρούν τα συστατικά αυτά σε μονομερή κατάσταση, αποτρέποντας έτσι την πρόωρη αλληλεπίδραση με τον ίδιο τους τον εαυτό, ίσως βοηθώντας παράλληλα την παράδοση τους στην υπόλοιπη εκκριτική μηχανή. Για παράδειγμα στο εντεροπαθογόνο *E. coli* η πρωτεΐνη CesAB δρα ως σαπερόνη και ως αντι-πολυμεριστικός παράγοντας της πρωτεΐνης EspA του ινιδίου, καθώς η προσφάτως κρυσταλλογραφικά λυμένη δομή τους ετεροδιμερούς συμπλόκου δείχνει τη σαπερόνη να σταθεροποιεί ενδοκυτταρικά το υπόστρωμα κρατώντας το στη μονομερή του μορφή (Σχήμα 5). Στην πραγματικότητα όμως, η CesAB είναι μια ξεχωριστή σαπερόνη, γιατί πέρα από τις διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες του μορίου, είναι απαραίτητη για την έκκριση και του μεταθέτη EspB [50].



Σχήμα 5: Δομή του συμπλόκου CesAB-EspA.  
Κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ της CesAB σαπερόνης (μπλε) και του υποστρώματός της EspA (κόκκινο)

#### 1.4 Εντοπισμένη προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του EPEC και του ξενιστή παρόλο που περιλαμβάνει πολλά βήματα, θεωρείται πλέον σαν μια διαδικασία τριών βημάτων. Το πρώτο στάδιο στη μολυσματικότητα από το EPEC είναι η πρωταρχική προσκόλληση του βακτηρίου στη μεμβράνη του εντερικού επιθηλίου. Σε αυτό το στάδιο, το EPEC σχηματίζει πυκνές μικρό-αποικίες στην επιφάνεια των ευκαρυωτικών κυττάρων με ένα συγκεκριμένο πρότυπο γνωστό ως εντοπισμένη προσκόλληση [7]. Το βακτήριο πιστεύεται πως αρχικά προσκολλάται στο κύτταρο-ξενιστή μέσω του τριχιδίου σχηματισμού του δεματίου (BFP, Bundle Forming Pilus), το οποίο κωδικοποιείται από ένα πλασμίδιο (plasmid). Παρόλο' αυτά, μεταλλάγματα τα οποία δεν έχουν το πλασμίδιο αυτό, μπορούν ακόμη να προσκολληθούν στο κύτταρο του ξενιστή, αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν μικρό-αποικίες και παράγουν λιγότερες A/E κακώσεις σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος [10, 51]. Η μελέτη αυτή όμως δεν αναιρεί το γεγονός ότι το BFP παραμένει ένας σημαντικός μολυσματικός παράγοντας καθώς στελέχη που δεν φέρουν το επίσωμα αυτό δείχνουν σαφώς μειωμένη ικανότητα να προκαλούν διάρροια σε εθελοντές ανθρώπους [52]. Αυτή η μείωση της μολυσματικής ικανότητας πιθανόν να σημαίνει πως και τα δύο, η πρωταρχική προσκόλληση όσο και ο σχηματισμός των μικρό-αποικιών είναι ιδιαίτερα σημαντικά και καθορίζουν την επιτυχία με την οποία ένα στέλεχος θα προσβάλει τον ξενιστή του. Αξιοπεριέργα, οι μεσολαβητές της πρωταρχικής προσκόλλησης φαίνεται να ποικίλουν μέσα στην οικογένεια των A/E παθογόνων. Το συγγενικό στέλεχος του EHEC, δεν έχει BFP, και σε αντίθεση με το EPEC, προσβάλει το ανθρώπινο κόλον και όχι τον ειλέο [7]. Έτσι

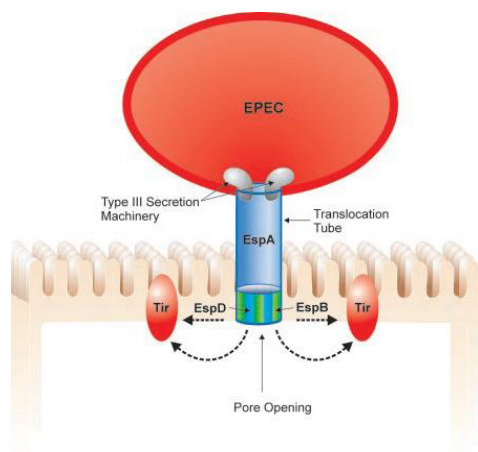
λοιπόν, εάν η βακτηριακή αποίκιση γίνει στο λεπτό ή το παχύ έντερο, αυτό μπορεί να καθοριστεί από την έκφραση ή όχι του BFP και άλλων προσκολλητινών, όπως επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση και άλλων μολυσματικών παραγόντων [53].

#### 1.4.1 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες του EPEC (Esps)

Το δεύτερο στάδιο της παθογένεσης του EPEC περιλαμβάνει την παραγωγή των βακτηριακών πρωτεϊνών, της EspA, EspB και EspD. Αυτές οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο εξοκυτταρικό περιβάλλον μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (Σχήμα 6), το οποίο επίσης κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο LEE. Το σύστημα έκκρισης τύπου III πιστεύεται πως δημιουργεί ένα συνεχή δίαυλο, ο οποίος επιτρέπει σε αυτή την μετατόπιση να συμβεί [6, 10]. Το σύστημα αυτό παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και από άλλα Gram(-) παθογόνα βακτήρια, όπως είναι η *Yersinia* και η *Salmonella*, επιτρέποντας στις βακτηριακές πρωτεΐνες να μετατοπιστούν σε ένα βήμα από το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, όπου συντίθενται, απ' ευθείας στο κυτταρόπλασμα ή τη μεμβράνη του ξενιστή. Παρόλο που οι περισσότερες Esp πρωτεΐνες είναι αναγκαίες για την πρόκληση της A/E κάκωσης, ο ακριβής ρόλος τους στην παθογένεση δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος. Έτσι, η EspA πρωτεΐνη σχηματίζει ινώδεις κατασκευές που προεκτείνονται εξωτερικά του βακτηρίου και εκφράζονται περιοδικά στην επιφάνεια του βακτηρίου [10]. Αυτά τα ινίδια αλληλεπιδρούν με τον ξενιστή, πιθανότατα σχηματίζοντας ένα κανάλι μετατόπισης, το οποίο φτάνει μέχρι την επιφάνεια του ξενιστή (Σχήμα 7).

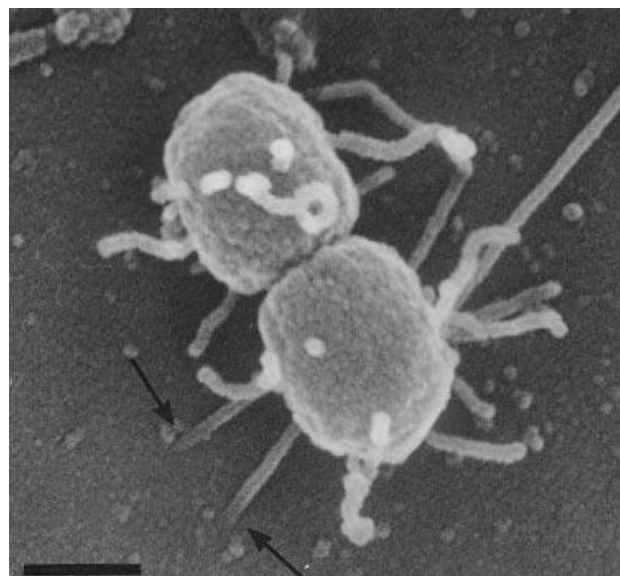
Επιβεβαιώνοντας την παραπάνω θεωρία, η EspB μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τη μεμβράνη του ξενιστή με μια διαδικασία, η οποία εξαρτάται από την EspA [10]. Η EspD επίσης έχει δειχτεί να ενσωματώνεται στις μεμβράνες του ξενιστή [54]. Αν και ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα γνωστός, η ομολογία τους με τις πρωτεΐνες YopD και YopB από τη *Yersinia*, αλλά και η ικανότητα τους να λύουν ερυθροκύτταρα [55], αποτελούν σοβαρές ενδείξεις ότι λειτουργούν ως συστατικά της ίδιας της μηχανής μετατόπισης, πιθανότατα σχηματίζοντας έναν πόρο στη μεμβράνη του ξενιστή. Κατά συνέπεια, πρωταρχική λειτουργία των EspB και EspD είναι να παραδώσουν τις άλλες τοξίνες στο ευκαρυωτικό κύτταρο, παρά να μετατοπιστούν οι ίδιες. Παρόλο' αυτά ένθεση του EspB σε κύτταρα HeLa οδηγεί σε

αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και αποδιοργάνωση των ινιδίων έντασης (stress fibers) [56], υποδεικνύοντας ότι η ίδια η EspB μπορεί να δρα ως κυτταροσκελετική τοξίνη.



Σχήμα 6: Μετατόπιση των Esps.

Η μετατόπιση των Esps γίνεται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου ΙΙΙ, το οποίο σχηματίζει έναν πόρο που διαπερνά τις βακτηριακές μεμβράνες. Μόλις βρεθούν έξω από το βακτήριο, η EspA πρωτεΐνη θα πολυμεριστεί σχηματίζοντας το χαρακτηριστικό ινώδες αγωγό μετατόπισης, ενώ οι EspB και EspD, ενσωματώνονται στη μεμβράνη του ξενιστή, πιθανότατα σχηματίζοντας έναν πόρο, και επιτρέπουν έτσι το τελικό πέρασμα των τοξινών, όπως είναι η Tir πρωτεΐνη.



Σχήμα 7: Πρωταρχική προσκόλληση EPEC στελεχών.

Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης οι οποίες δείχνουν την πρωταρχική προσκόλληση EPEC στελεχών σε HEL επιθηλιακά κύτταρα. Πριν από το σχηματισμό της A/E κάκωσης, ινώδεις επιφανειακές δομές, οι οποίες αντιστοιχούν στην EspA, σχηματίζονται στην επιφάνεια του βακτηρίου και φαίνεται να σχηματίζουν μια φυσική γέφυρα μεταξύ του βακτηρίου και της επιφάνειας του κυττάρου HEL. Τα βέλη στην εικόνα υποδεικνύουν τα EspA ινίδια, τα οποία εμφανίζονται ιδιαίτερα άκαμπτα, ενώ φαίνεται να ενσωματώνονται μέσα στη μεμβράνη του ξενιστή

#### 1.4.2 Στενή προσκόλληση και ο ρόλος της Tir πρωτεΐνης

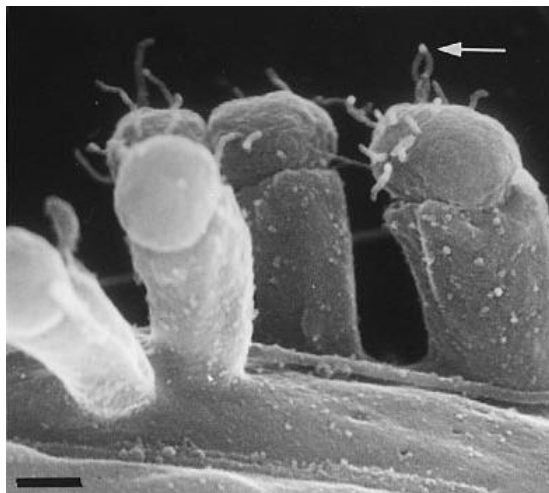
Το τρίτο στάδιο της μόλυνσης από EPEC περιλαμβάνει την εξάλειψη των εντεροκυττάρων, το σχηματισμό των προεκβολών και τη στενή βακτηριακή προσκόλληση πάνω στον ξενιστή. Η στενή προσκόλληση απαιτεί την πρωτεΐνη της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης ιντιμίνη (intimin). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 94 KDa της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *eae*, και ελέγχει τη στενή προσκόλληση μέσω της αναγνώρισης μιας 90 KDa πρωτεΐνης στην

μεμβράνη του ξενιστή [57]. Αυτός ο υποδοχέας, ο οποίος τώρα πια ονομάζεται Tir, στην αρχή πιστευόταν ότι είναι μια ευκαρυωτική πρωτεΐνη, τώρα όμως έχει αποδειχτεί ότι πρόκειται για μια βακτηριακή πρωτεΐνη, η οποία μετατοπίζεται στη μεμβράνη του ξενιστή μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III [53]. Αμέσως μετά την μετατόπιση του παράγοντα Tir στο κύτταρο-ξενιστή, ο υποδοχέας Tir φωσφορυλλιώνεται σε δύο κατάλοιπα σερίνης, μια διαδικασία που εξαρτάται από την κινάση A [58]. Ο Tir φωσφορυλλιώνεται και στην τυροσίνη 474, από μια άγνωστη κινάση [57]. Μόλις ενσωματωθεί στη μεμβράνη, διμερίζεται και τότε μόνο λειτουργεί ως υποδοχέας της ιντιμίνης. Τα δύο μόρια Tir ενώνονται μεταξύ τους με τέτοιο τρόπο ώστε να έρχονται σε ένα επίπεδο σχεδόν παράλληλο με το επίπεδο της μεμβράνης του βακτηρίου και του ξενιστή, αλλά και η σύνδεση αυτή επιτρέπει την πολύ κοντινή (περίπου 10nm) απόσταση ανάμεσα στο βακτήριο και τον ξενιστή [53]. Εάν η φωσφορυλλίωση του υποδοχέα προηγείται ή έπεται της ένθεσης του στη μεμβράνη δεν είναι πλήρως εξακριβωμένο, αλλά τελευταία έχει βρεθεί Tir στις μεμβράνες ερυθροκυττάρων, η οποία φυσικά δεν ήταν τροποποιημένη. Με αυτά τα δεδομένα, ενισχύεται το μοντέλο ότι πρώτα η πρωτεΐνη Tir θα ενσωματωθεί στη μεμβράνη και μετά θα φωσφορυλλιωθεί [59].

### 1.4.3 Δομή της A/E κάκωσης

Το κύτταρο του ξενιστή υπόκειται σε μια σειρά από αλλαγές κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του από EPEC, αλλά η πιο εντυπωσιακή αλλαγή είναι αυτή του σχηματισμού των προεκβολών της ακτίνης. Στην πραγματικότητα, η εντοπισμένη συσσώρευση της ακτίνης που προκαλείται, είναι τόσο χαρακτηριστική, που έχει αποτελέσει τη βάση για τη δημιουργία μιας *in vitro* διαγνωστικής δοκιμής για EPEC [60]. Η διαδικασία του σχηματισμού της προεκβολής ξεκινάει μετά την προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* και *in vivo*, παράλληλα με την εξάλειψη των μικρολαχνών του ξενιστή. Μέσα σε τρεις ώρες από την επιμόλυνση κυτταρικών σειρών από EPEC, οι προεκβολές αρχίζουν να σχηματίζονται ακριβώς κάτω από το προσκολλημένο βακτήριο [6, 10]. Πιο συγκεκριμένα, η μεμβράνη του προσβαλλόμενου κυττάρου σηκώνεται κάτω από το βακτήριο για να σχηματίσει τις χαρακτηριστικές προεκβολές, οι οποίες εκτείνονται μέχρι και 10μm μακριά από το ευκαρυωτικό κύτταρο και μοιάζουν με ψευδοπόδια (Σχήμα 8) [10]. Πέρα από το να παρέχουν δυνατή προσκόλληση του EPEC στην κυτταρική επιφάνεια, πιθανότατα για

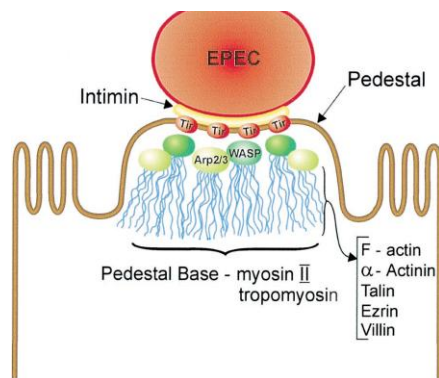
να μην αποκολληθούν λόγω της διάρροιας που θα προκληθεί, ο ρόλος του σχηματισμού του ψευδοποδίου παραμένει ασαφής. Μπορεί παρόλο' αυτά να αποτελεί μια στρατηγική του βακτηρίου να παραμένει εξωκυττάριο, μαζί με την ικανότητα του EPEC να εμποδίζει τη φαγοκυττάρωση του από τα φαγοκύτταρα [61].



Σχήμα 8 :Σχηματισμός ψευδοποδίου.  
Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, όπου ένα βακτήριο προσβάλλει σειρές επιθηλιακών κυττάρων και το ψευδοπόδιο έχει σχηματιστεί

Μελέτες ανοσοφθορισμού έχουν δείξει, ότι εκτός από την πρωτεΐνη Tir, οι προεκβολές περιέχουν κυρίως την F-ακτίνη [62]. Επίσης, η  $\alpha$ -ακτινίνη, η ταλίνη, η εζρίνη (ezrin) και η βιλλίνη (villin) συσσωρεύονται κατά μήκος της προεκβολής, καθώς όλα αυτά τα κυτταροσκελετικά συστατικά δρουν ως διασυνδέτες των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Επίσης, μυσίνη II και τροπομυσίνη εντοπίζονται στη βάση της προεκβολής [62]. Με βάση τη θέση του στην κορυφή της προεκβολής αυτής, όπως επίσης και της δομής του, ο υποδοχέας Tir είναι ο πιο ισχυρός υποψήφιος για την σύνδεση του EPEC με τον κυτταροσκελετό, κατευθύνοντας τη συσσώρευση της ακτίνης και το σχηματισμό του ψευδοποδίου. Έτσι είναι πολύ πιθανό ο Tir να στρατολογεί γνωστούς ρυθμιστές της δυναμικής της ακτίνης για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό της. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως πρωτεΐνες της οικογένειας του συνδρόμου Wiskott-Aldrich (WASP), όπως και ένας παράγοντας πολυμερισμού της ακτίνης, το επταμερές σύμπλοκο Arg2/3, έχουν βρεθεί στις προεκβολές. Αυτοί οι παράγοντες έχει δείχτει να στρατολογούνται στην κορυφή της προεκβολής (Σχήμα 9) και μεταλλαγές στην περιοχή της GTPάσης του WASP εμπόδισαν τη στρατολόγηση του συμπλόκου Arg2/3 και το σχηματισμό της προεκβολής [63]. Παρόλο που οι αναδιατάξεις των στοιχείων του κυτταροσκελετού είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της προεκβολής, μπορεί επίσης να ευθύνονται και

για την καταστροφή των μικρολαχνών του εντέρου. Αν και αυτό πρέπει να αποδειχτεί, δεν αποκλείεται η εξαφάνιση των μικρολαχνών να οφείλεται στον επαγόμενο από το βακτήριο από-πολυμερισμό της ακτίνης των μικρολαχνών, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των προεκβολών. Όμως πολλές από τις πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην προεκβολή, δεν έχουν προέλθει από τις μικρολάχνες, γεγονός που υποδεικνύει ότι συμβαίνει μια πιο περίπλοκη διαδικασία, από το απλό ξανακτίσιμο μικρολαχνών κάτω από το προσκολλημένο βακτήριο [2].



Σχήμα 9: Η δομή μιας προεκβολής κατά την μόλυνση με EPEC



## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Πρωτεϊωματική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3S**

---

Το εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC) είναι ένα σημαντικό παθογόνο του εντερικού επιθηλίου και αποτελεί απειλή για την υγεία κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες [48]. Οι μολυσματικές πρωτεΐνες που προκαλούν την ασθένεια της διάρροιας, μεταφέρονται απευθείας μέσα στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου διαμέσου του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3S). Το T3S, το οποίο κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο της εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE, Locus of Enterocyte Effecement), χρησιμοποιείται για την έγχυση των μολυσματικών πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο ξενιστή τόσο για αυτές που εκφράζονται από τον γενετικό τόπο το LEE όσο και για αυτές που εκφράζονται από άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Οι μολυσματικές αυτές πρωτεΐνες επηρεάζουν και ρυθμίζουν τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και τις ανοσοαποκρίσεις του ευκαρυωτικού κυττάρου που προσβάλλουν [64]. Επιπλέον, αλληλεπιδρούν με τα κυτταροσκελετικά στοιχεία του ξενιστή (όπως η ακτίνη) προκαλώντας την αναδιαμόρφωση των κυτταροσκελετικών στοιχείων και την λύση των κυττάρων-ξενιστών. Αναγνωρίζοντας τους μολυσματικούς αυτούς παράγοντες και προσδιορίζοντας την δομή και την λειτουργία αυτών θα οδηγηθούμε αφενός στην κατανόηση της ιεραρχίας και της ρύθμισης του συστήματος έκκρισης τύπου III, και αφετέρου στην αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού της παθογένειας των βακτηρίων αυτών [65]. Για τον σκοπό αυτό, στην παρούσα εργασία έγινε μια πρώτη προσπάθεια να αναγνωριστούν όλες οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου III των EPEC, χρησιμοποιώντας μεθόδους συγκριτικής πρωτεωμικής και φασματομετρία μάζας.

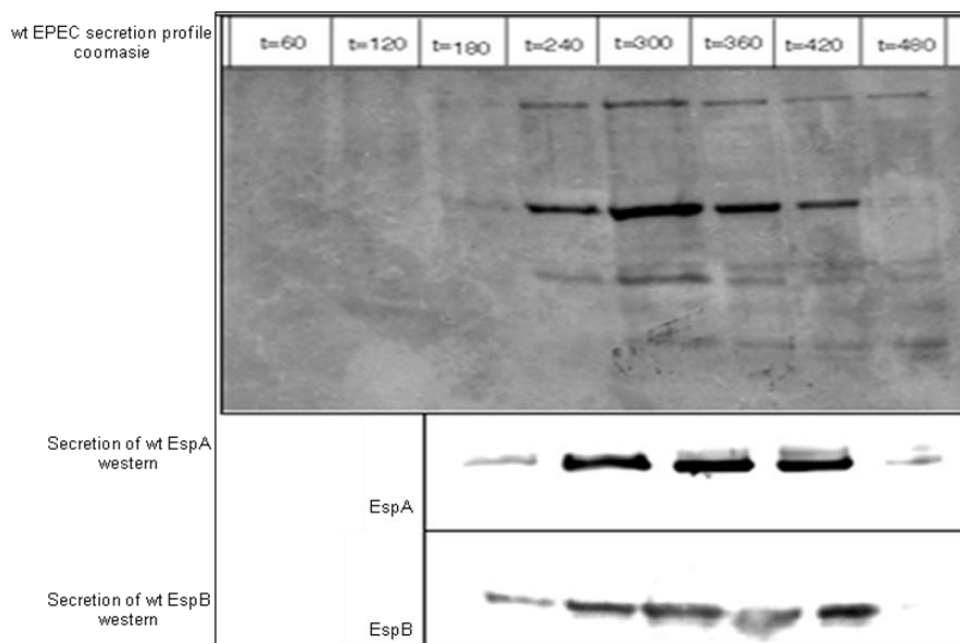
### **2.1 Ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το εντεροπαθογόνο *E.coli***

---

Για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το σύστημα τύπου III των EPEC χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος EPEC E2348/69 (EPEC O126:H6) το οποίο απομονώθηκε από ένα ξέσπασμα παιδικής διάρροιας στο Τάουντον της Μεγάλης Βρετανίας [66], καθώς και διάφορα γενετικά τροποποιημένα παράγωγα αυτού. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM, το οποίο είναι το ιδανικό για την ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων και χρησιμοποιήθηκε την παρούσα διατριβή ώστε να προσομοιωθούν όσο γίνεται

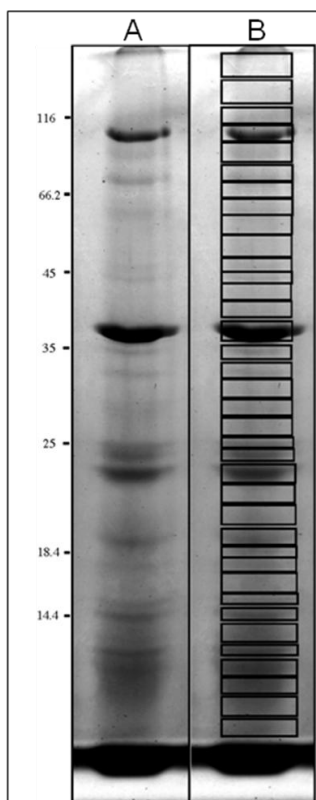
καλύτερα οι συνθήκες στις οποίες το παθογόνο αναπτύσσεται φυσιολογικά κατά την διάρκεια της μόλυνσης.

Αρχικά, τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C και προσδιορίστηκε η έκκριση των πρωτεϊνών τους σε σχέση με τον χρόνο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, δείγμα καλλιέργειας συλλεγόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα ξεκινώντας μετά από 60 λεπτά από την στιγμή που γινόταν ο εμβολιασμός της καλλιέργειας. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και χρώση είτε με Coomassie R250, είτε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των γνωστών μεταθετών του συστήματος, EspA και EspB. (Σχήμα 10). Στην συνέχεια, αφού προσδιορίστηκε το χρονικό σημείο όπου η έκκριση των πρωτεϊνών είναι η μέγιστη (300 λεπτά μετά τον εμβολιασμό), καλλιεργήθηκαν βακτήρια σε μεγαλύτερο όγκο θρεπτικού μέσου και στο συγκεκριμένο χρονικό σημείο συλλέχθηκαν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Το πρωτεϊνικό αυτό δείγμα αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και έγινε χρώση με Coomassie G250. Έπειτα, οι πρωτεϊνικές ζώνες που είχαν εμφανιστεί στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Σχήμα 11) απομονώθηκαν και αναγνωρίστηκαν με την μέθοδο φασματομετρίας μάζας, χρησιμοποιώντας LTQ-Orbitrap XL .



Σχήμα 10: Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το EPEC.

Πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το T3S σε σχέση με τον χρόνο ανάπτυξης της καλλιέργειας των βακτηρίων. Οι χρόνοι που αναγράφονται αναφέρονται σε λεπτά επώασης μετά από την στιγμή του εμβολιασμού. A) Ανάλυση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3S με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και χρώση με coomassie R-250. B&C) Ανίχνευση της έκκρισης των μεταθετών EspA και EspB με ανοσοαποτύπωση, αντίστοιχα



Σχήμα 11: Ανάλυση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας.  
 Α και Β) Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T3S αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύθηκαν με coomassie G-250 Β) Τα πλαίσια υποδεικνύουν τις πρωτεϊνικές ζώνες οι οποίες αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας

## 2.2 Συγκριτική πρωτεϊωματική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το T3S

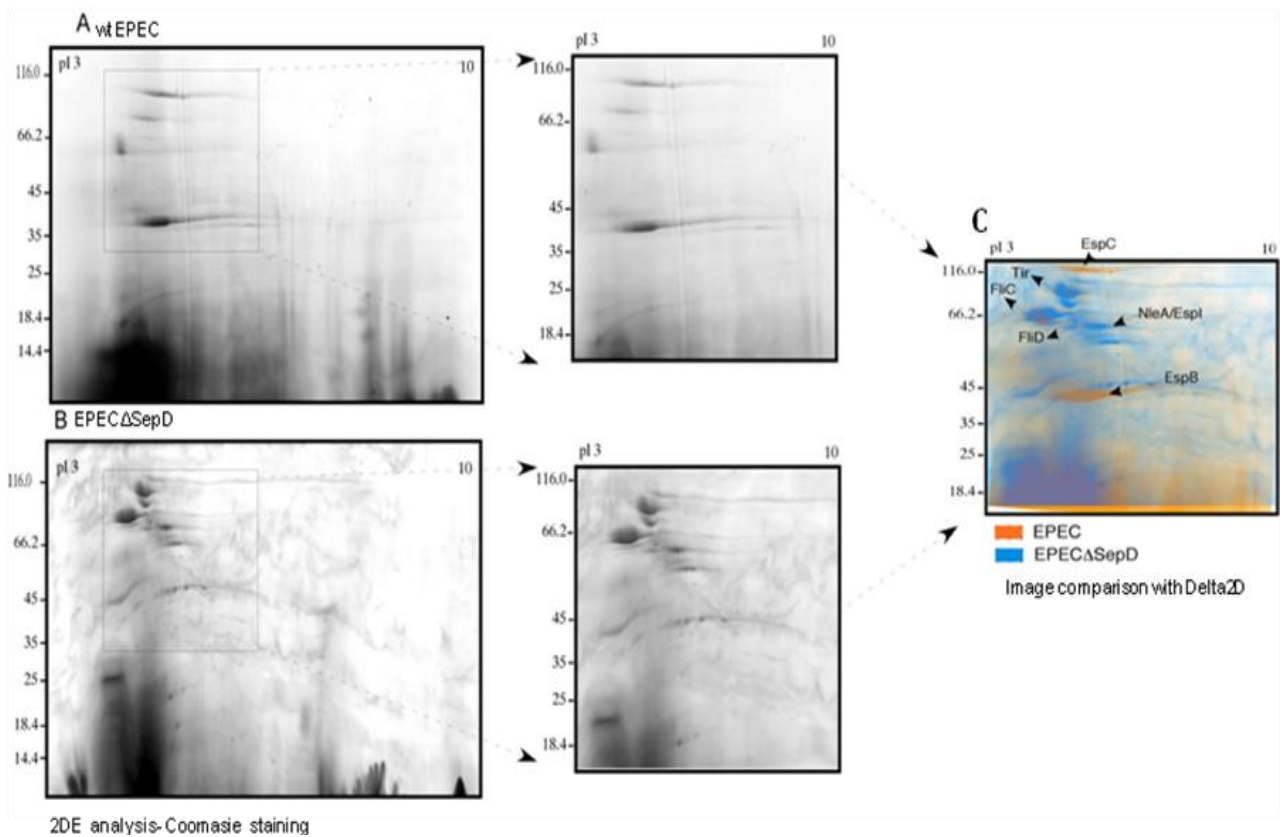
Εκτός από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται χρησιμοποιώντας το σύστημα έκκρισης τύπου III στα EPEC σημαντικό είναι να προσδιοριστεί και η ιεραρχία της έκκρισης αυτών, δηλαδή ποιες πρωτεΐνες εκκρίνονται πρώτα και ποιες έπειτα κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Επιπλέον, ο προσδιορισμός πρωτεϊνών οι οποίες ρυθμίζουν την έκκριση των μολυσματικών πρωτεϊνών κρίνεται αναγκαίος.

Μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από το γενετικό τόπο LEE έχει δειχθεί ή υπονοηθεί στην βιβλιογραφία ότι αποτελούν μέρος του T3S και ονομάζονται πρωτεΐνες Sep (Secretion switching protein) [1]. Η πρωτεΐνη SepD που ανήκει σε αυτή την οικογένεια, έχει αναφερθεί ότι είναι βασικό στοιχείο του συστήματος και συγκεκριμένα είναι αναγκαία για την έκκριση τόσο των μεταθετών όσο και των μολυσματικών στοιχείων των EPEC [1]. Η πρωτεΐνη SepD βρίσκεται στην κυταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και θεωρείται υπεύθυνη για την ρύθμιση της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S. Πιστεύεται ότι ελέγχει την έξοδο των μεταθετών από την μεμβράνη του κυττάρου,

δεδομένου ότι απουσία της πρωτεΐνης SepD , οι μεταθέτες του συστήματος τύπου III, EspA, EspB και EspD δεν εκκρίνονται [1].

Συνεπώς, η σύγκριση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το αγρίου τύπου EPEC με αυτές που εκκρίνονται από μια κυτταρική σειρά στην οποία το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SepD έχει απαλειφτεί θα αποτελέσει πολύ σημαντική πληροφορία για την ιεραρχία της έκκρισης και για τον ρυθμιστικό ρόλο της SepD σε αυτήν.

Για να επιτύχουμε την σύγκριση των δυο βακτηριακών αυτών στελεχών, αρχικά αυτές καλλιεργήθηκαν ταυτόχρονα σε θρεπτικό υλικό στους 37°C, τα δείγματα συλλέχθηκαν και οι πρωτεΐνες που περιέχονταν σε αυτά αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας δισδιάστατη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Κατά την πρώτη διάσταση οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και κατά την δεύτερη με βάση την μοριακή τους μάζα. Οι πρωτεϊνικές ζώνες απομονώθηκαν και οι πρωτεΐνες που εμπεριέχονταν σε αυτές προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας. Επιπλέον, οι εικόνες των πηκτωμάτων που προέκυψαν αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Delta2D (Decodon) (Σχήμα 12). Από την σύγκριση των δυο διαφορετικών στελεχών EPEC προκύπτουν δυο διαφορετικές κατανομές πρωτεϊνών. Παρατηρήσαμε ότι οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται και από τα δυο στελέχη συγκεντρώνονται στην όξινη περιοχή το οποίο σημαίνει ότι έχουν όξινο ισοηλεκτρικό σημείο (pI 4-6). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από τα αγρίου τύπου EPEC στην δεδομένη χρονική στιγμή είναι ελάχιστες (περίπου 10 με 15), ενώ από το στέλεχος EPECΔSepD είναι περισσότερες (περίπου 20-30). Επιπρόσθετα, ανιχνεύονται πρωτεΐνες οι οποίες έχουν εκκριθεί σε πολύ μεγάλη ποσότητα στα αγρίου τύπου βακτήρια, ενώ στα γενετικά τροποποιημένα είτε δεν έχουν εκκριθεί καθόλου είτε έχουν εκκριθεί σε ελάχιστη ποσότητα. Παρατηρούμε βέβαια, και την αντίθετη περίπτωση. Δηλαδή, πρωτεΐνες οι οποίες έχουν εκκριθεί σε πολύ μεγάλη ποσότητα από τα EPECΔSepD, δεν έχουν εκκριθεί από τα αγρίου τύπου ή έχουν εκκριθεί ελάχιστα, στην συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την σημασία της πρωτεΐνης SepD στην ιεραρχία της έκκρισης και στην ρύθμιση αυτής. Επιπλέον, αποδεικνύουν μερικώς την σειρά με την οποία οι μολυσματικές πρωτεΐνες εκκρίνονται. Συγκεκριμένα, πρώτα πρέπει να εκκριθούν οι μεταθέτες του συστήματος (EspA, EspB) και οι μολυσματικές πρωτεΐνες που συμβάλουν στην πρωταρχική προσκόλληση των EPEC με το κύτταρο-ξενιστή (όπως την Tir), και έπειτα οι τοξίνες που προσβάλλουν τον ξενιστή.



Σχήμα 12: Σύγκριση πρωτεϊνών που εκκρίνονται από διαφορετικά EPEC στελέχη  
 Α) Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από αγρίου τύπου EPEC και αναλύθηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση.  
 Β) Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα βακτηριακά στελέχη EPECΔSepD και αναλύθηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Τα βελάκια υποδεικνύουν τις περιοχές όπου συγκεντρώνονται οι πρωτεΐνες και εστίασαμε το ενδιαφέρον μας. C) Εικόνα η οποία προκύπτει, έπειτα από σύγκριση με κατάλληλο λογισμικό, των πρωτεϊνών οι οποίες εκκρίνονται από τα δυο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη. Με πορτοκαλί χρώμα σημαίνονται οι πρωτεΐνες που αντιπροσωπεύουν το αγρίου τύπου στέλεχος και με μπλέ αυτές του EPECΔSepD.

Η συνολική και συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από το σύστημα τύπου III στα EPEC οδήγησε στην αναγνώριση και τον προσδιορισμό συνολικά 28 από τις 34 πρωτεΐνες που πιστεύεται ότι εκκρίνονται από αυτό (πίνακας 1). Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύθηκαν όλες οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα κύτταρα EPEC μπορεί να οφείλεται στην ποσότητα των πρωτεϊνών στο κυτταρικό δείγμα, η οποία μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμη, καθώς και στην χρονική στιγμή συλλογής του δείγματος, στην οποία μια πρωτεΐνη μπορεί να μην έχει ακόμα εκκριθεί.

				Ταυτοποίηση πρωτεϊνών		
				wt	ΔSepD	wt
				2DE	2DE	1DE
				LB	LB	DMEM
	Accession No (Uniprot)	Όνομα πρωτεΐνης/ Λειτουργία	Secretion System			
LEE LOCUS GENES/ PROTEINS	B7UM99	Tir /T3SS Translocated intimin receptor	T3S			
	Q05129	EspB/ T3SS membrane translocator/actin-binding effector	T3S			
	B7UM94	EspA /T3SS needle sheath-like filament/membrane translocator	T3S			
	B7UMA0	Map /T3SS LEE-encoded effector Mitochondrial associated protein	T3S			
	B7UM93	EspD/ T3SS host cell membrane translocator	T3S			
	B7UM88	EspF /T3SS LEE-encoded effector	T3S			
	P19809	Intimin/ T3SS outer membrane adhesin	Sec/T5S			
	B7UM90	EscF /T3SS needle subunit	T3S			
	B7UMA9	EspZ(SepZ)/ T3SS LEE-encoded effector	T3S			
	B7UM96	EscD /T3SS outer membrane needle complex subunit	Sec			
	B7UMC8	EspG1/ T3SS LEE-encoded effector	T3S			
	B7UMA2	EspH/ T3SS LEE-encoded effector	T3S			
NON-LEE effectors	B7UR60	NleA/EspI /T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UNX2	NleI/NleG /T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UP11	EspJ /T3SS non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UR63	NleF/ T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7ULW4	NleH1/T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UR62	NleH2/ T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UI22	NleE1/ T3SS secreted effector	T3S			
	B7UP11	NleE2 /T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UNX6	NleD/ T3SS Non-LEE secreted effector	T3S			
	B7UH72	EspG2 /T3SS secreted effector	T3S			
	B7UI20	EspL/ T3SS secreted effector	T3S			
	B7UNX3	NleB1 /T3SS effector-like protein	T3S			
	B7UI21	NleB2 /T3SS secreted effector	T3S			
	B7UNX4	NleC /T3SS secreted effector	T3S			
	Other proteins secreted from EPEC	Q9EZE7	EspC /Serine protease	Sec/T5S		
B7USU2		FliC /Flagellar filament structural protein	Fla			
B7UP96		FlgK /Flagellar hook-filament junction protein	Fla			
B7USU3		FliD /Flagellar filament capping protein	Fla			
B7UTE1		BfpI/ Prepilin	T2S			
P33553		BfpA /Major structural subunit of bundle-forming pilus	T2S			
B7UI23		Efa1/LifA /protein cysteine-type endopeptidase	T5S			
B7UP10		Efa1/LifA-like protein	T5S			

Πίνακας 1: Όλες οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το EPEC.

Οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας. Διαχωρίστηκαν ανάλογα με το αν εκφράζονται από τον γενετικό τόπο LEE ή όχι και αν εκκρίνονται από το T3S ή όχι. Τα κουτάκια τα οποία έχουν χρωματιστεί με γκρι χρώμα, υποδεικνύουν την ταυτοποίηση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τον αντίστοιχο τρόπο ανάλυσης και από το αντίστοιχο βακτηριακό στέλεχος. Η συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από T3S, οδήγησε στην αναγνώριση και τον προσδιορισμό συνολικά 28 από τις 34 πρωτεΐνες που πιστεύεται ότι εκκρίνονται από αυτό.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μελέτη της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S in vitro και ex vivo**

---

Η διαδικασία της έκκρισης των μεταθετών και των μολυσματικών παραγόντων από το σύστημα έκκρισης τύπου III των EPEC παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς, ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες και συνθήκες οι οποίοι επηρεάζουν την διαδικασία της έκκρισης [53]. Στο κεφάλαιο αυτό, γίνεται μια εκτεταμένη προσπάθεια να προσδιοριστούν οι παράγοντες αυτοί καθώς και να οριστούν οι συνθήκες οι οποίες βελτιστοποιούν την έκκριση των πρωτεϊνών.

### **3.1 Προσδιορισμός των κατάλληλων συνθηκών έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S in vitro**

---

Για να μελετήσουμε τις διαφορετικές συνθήκες που επηρεάζουν την έκκριση των πρωτεϊνών από το σύστημα τύπου III και να τις βελτιστοποιήσουμε ώστε η έκκριση να είναι η μέγιστη, καλλιεργήσαμε αγρίου τύπου EPEC σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και παρατηρούσαμε την έκκριση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του χρόνου ανάπτυξης, συλλέγοντας δείγματα καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα και αναλύοντας τα πρωτεϊνικά δείγματα με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

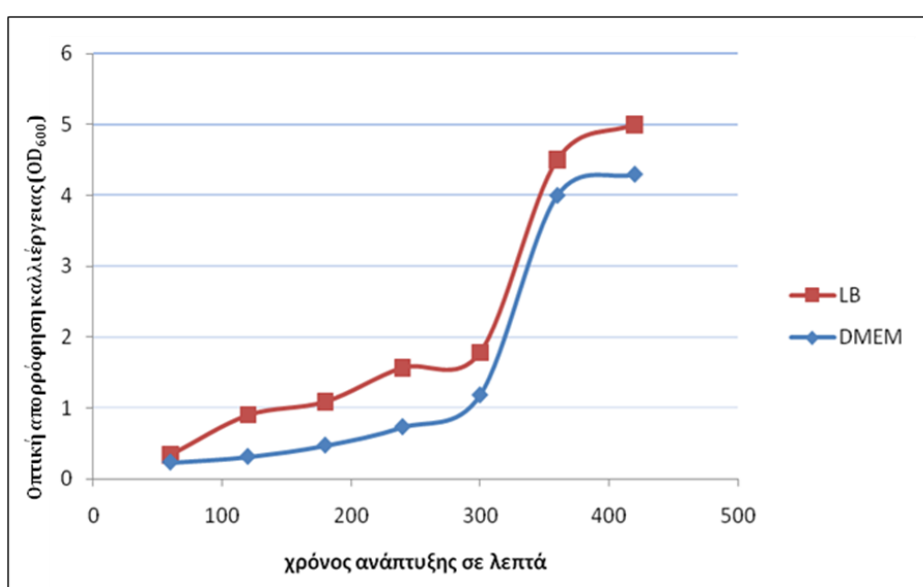
#### **3.1.1 Το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης βακτηρίων**

---

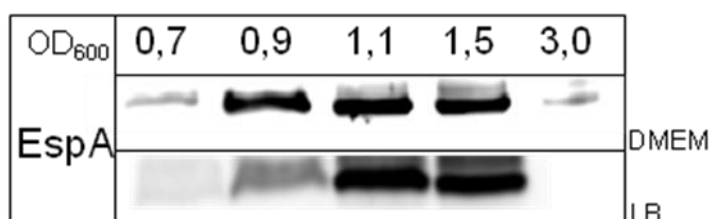
Το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσετε μια βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli* είναι συνήθως το Luria-Bertani (LB) το οποίο περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (πεπτίδια, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία και άλλα) για την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων. Για την ανάπτυξη ευκαρυωτικών κύτταρων χρησιμοποιείται κατά κόρων το θρεπτικό μέσο Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium (DMEM) το οποίο περιέχει τέσσερις φορές περισσότερες βιταμίνες και αμινοξέα και δυο φορές περισσότερη γλυκόζη σε σχέση με τα συνηθισμένα θρεπτικά μέσα [67]. Δεδομένου ότι τα EPEC αποτελούν ευκαρυωτικά παράσιτα και ότι το DMEM χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη των κυττάρων αυτών, θεωρήσαμε σκόπιμο να συγκρίνουμε την ανάπτυξη των κυττάρων στα δυο αυτά διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια ανάπτυξης των βακτηρίων στα διαφορετικά θρεπτικά



μέσα και επιπλέον καταγράφηκε η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας στις χρονικές αυτές στιγμές, ώστε να δημιουργηθεί η καμπύλη ανάπτυξης των κυττάρων (Σχήμα 13). Οι πρωτεΐνες που υπήρχαν στο δείγμα μετά από την απομάκρυνση των κυττάρων αναλύθηκαν σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίστηκαν με Coomassie R-250 και Νιτρικό Άργυρο. Επιπλέον, γνωστές εκκρινόμενες πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίθηκαν από κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο LB, δεν ήταν ανιχνεύσιμες ούτε με χρώση Coomassie R-250 ούτε με χρώση νιτρικού άργυρου.



Σχήμα 13: Καμπύλη ανάπτυξης των EPEC  
Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων EPEC μεγαλωμένα είτε σε θρεπτικό μέσο LB είτε σε DMEM



Σχήμα 14: Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης EspA.  
Ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης EspA σε κύτταρα που Α) αναπτύχθηκαν σε DMEM και Β) σε LB. Για να ανιχνεύσουμε την πρωτεΐνη EspA που είχε εκκριθεί στο LB με ανοσοαποτύπωση χρειαστήκαμε τρεις φορές περισσότερο δείγμα σε σχέση με αυτό του DMEM. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν με βάση την οπτική απορρόφηση των κυττάρων

Κατά την σύγκριση των δύο διαφορετικών θρεπτικών μέσων προκύπτει ότι όταν τα EPEC αναπτύσσονται στο DMEM μεγαλώνουν με μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης, δηλαδή πιο αργά, αλλά εκκρίνουν μεγαλύτερη ποσότητα μεταθετών και μολυσματικών παραγόντων. Σε αντίθεση με το LB, όπου μεγαλώνουν με ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης αλλά εκκρίνουν περίπου 2,5 φορές μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών (Σχήμα 14).

### **3.1.2 Προσδιορισμός συνθηκών στις οποίες βελτιστοποιείται η έκκριση**

---

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο DMEM έχει δειχθεί ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης καθώς και η τιμή του pH στην καλλιέργεια παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα του συστήματος να εκκρίνει της πρωτεΐνες [53].

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των τιμών του pH της καλλιέργειας, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των βακτηρίων. Οι διάφορες μεταβολές του pH στην καλλιέργεια καταγράφηκαν και συσχετίστηκαν με την ποσότητα των πρωτεϊνών που είχαν εκκριθεί. Οι διάφορες μεταβολές αυτές επηρέαζαν την ποσότητα έκκρισης των πρωτεϊνών. Από τον συσχετισμό αυτό, προσδιορίστηκε η βέλτιστη τιμή pH στο 7.4 Αξιοπερίεργο ήταν το γεγονός ότι ακόμα και σε μικρή μεταβολή του pH, για παράδειγμα από το 7,4 στο 7.0, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ποσότητας που εκκριθήκαν.

Επιπλέον, η θερμοκρασία επώασης των βακτηρίων συμβάλει σημαντικά στην έκκριση των πρωτεϊνών και επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα τους. Παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής, ότι όταν κύτταρα αναπτύσσονταν σε θερμοκρασία κάτω από 37°C, και μάλιστα μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας αυτής (πχ 36°C), τα κύτταρα αναπτυσσόταν πιο αργά, και επιπλέον η ποσότητα των πρωτεϊνών που εκκρινόταν μειωνόταν αισθητά. Συνεπώς, η θερμοκρασία επώασης πρέπει να είναι ακριβώς 37°C διότι σε διαφορετική περίπτωση η έκκριση των πρωτεϊνών μειώνεται δραματικά.

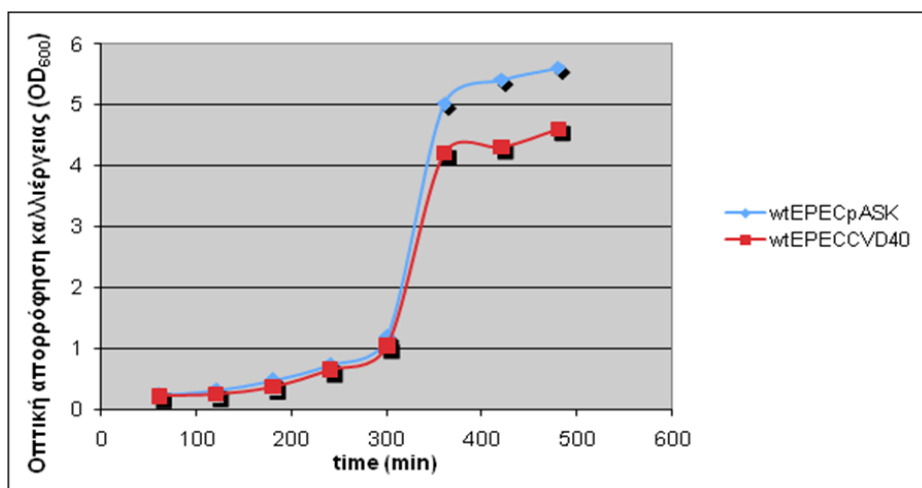
### **3.1.3 Σύγκριση με κύτταρα που φέρουν τον πλασμιδιακό φορέα CVD450**

---

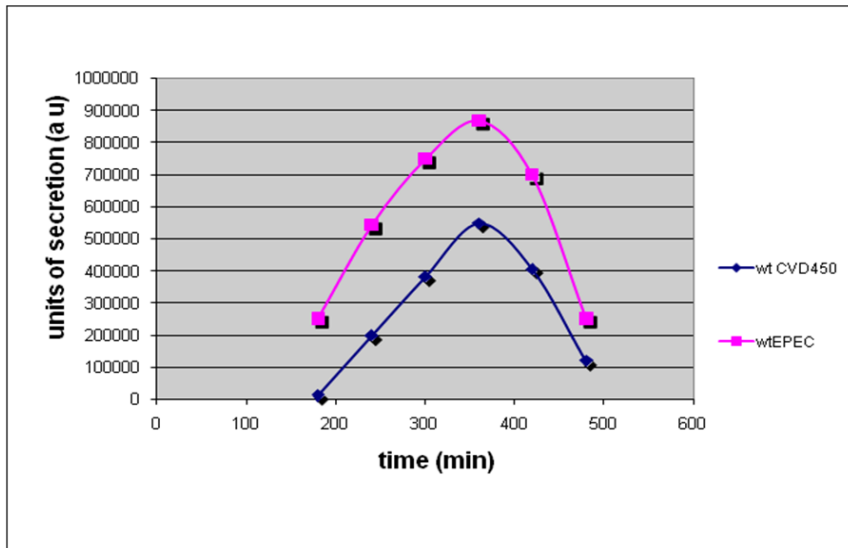
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία βακτηριακά στελέχη EPEC που έχουν μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα CVD450 εκκρίνουν τις πρωτεΐνες του

συστήματος τύπου III σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου [53]. Ο πλασμιδιακός φορέας CVD450 είναι ένα πλασμίδιο το οποίο φέρει τα γονίδια για την έκφραση των ρυθμιστικών παραγόντων *perA*, *B*, *C*, *D*. Οι πρωτεΐνες *perA*, *B*, *C* και *D* είχε δειχθεί ότι είναι απαραίτητες για την μέγιστη έκκριση της ιντιμίνης [53]. Επιπλέον, πιστεύεται ότι ρυθμίζουν την έκκριση των πρωτεϊνών και τον σχηματισμό του συριγγίου στα EPEC. Στα πλαίσια αυτής της εργασίας σκοπός ήταν η αύξηση της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S των EPEC κυττάρων [57, 68]. Για το λόγο αυτό συγκρίθηκε η έκκριση των πρωτεϊνών του αγρίου τύπου κυττάρων με αυτά που είχαν μετασχηματισθεί με το πλασμιδιακό φορέα CVD450. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα και τα πρωτεϊνικά δείγματα αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (Σχήμα 17). Επιπλέον, η συνολική ποσότητα των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από τις δυο διαφορετικά κυτταρικά στελέχη υπολογίστηκε και συγκρίθηκε με κατάλληλο λογισμικό (Σχήμα 15 Σχήμα 16)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της σύγκρισης, η διαφορά στην ποσότητα των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα δυο αυτά βακτηριακά δεν είναι αξιοσημείωτη και συγκεκριμένα τα κύτταρα αγρίου τύπου εκκρίνουν λίγο περισσότερο σε σχέση με τα μετασχηματισμένα κύτταρα, απλά τα δεύτερα εκκρίνουν για περισσότερο χρόνο. Δηλαδή, τα μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο CVD450 κύτταρα εκκρίνουν πρωτεΐνες για περισσότερο χρόνο κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι η συνεχόμενη έκφραση των πρωτεϊνών *perA*, *B*, *C* και *D* επάγει την έκκριση των πρωτεϊνών από το T3S των EPEC.

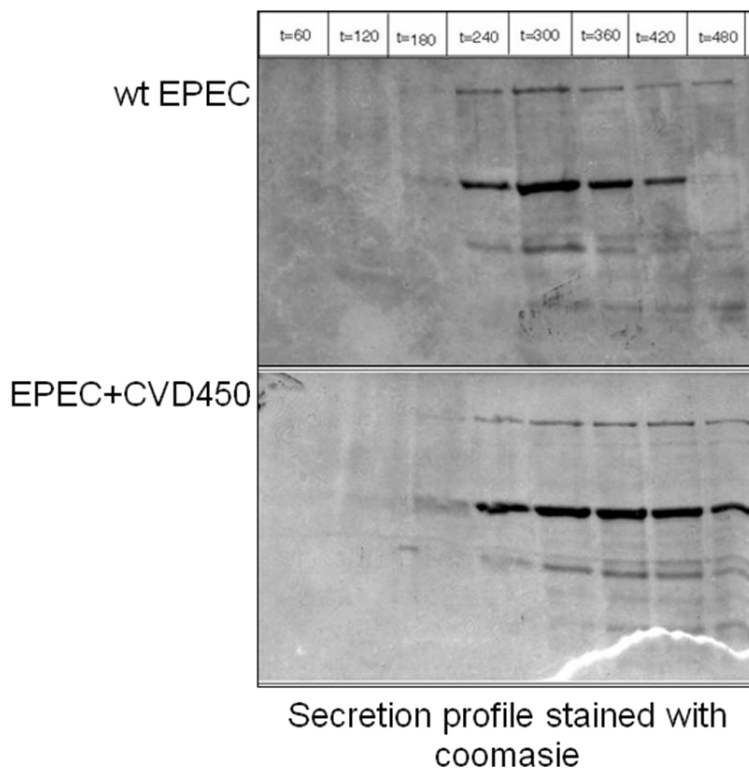


Σχήμα 15: Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων EPEC και κυττάρων EPEC μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο CVD450



Σχήμα 16: Σύγκριση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται ποσοτικά.

Σύγκριση της ποσότητας των πρωτεϊνών οι οποίες εκκρίνονται από τα άγριου τύπου EPEC και τα μετασχηματισμένα EPEC με το πλασμίδιο CVD450. Η σύγκριση έγινε χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 17 :Ανάλυση προφίλ των πρωτεϊνών που εκκρίνονται.

Ανάλυση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα άγριου τύπου EPEC (A) και από τα μετασχηματισμένα EPEC με το πλασμίδιο CVD450 (B) σε σχέση με τον χρόνο ανάπτυξης. Ο χρόνος συλλογής δειγμάτων ξεκινάει 60 λεπτά μετά από τον εμβολιασμό της καλλιέργειας. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε SDS-PAGE και ανιχνεύθηκαν με Coomassie R-250.

### 3.2 Μελέτη της έκκρισης του μεταθέτη EspA *in vitro* και *ex vivo*

---

Στην προσπάθεια που γίνεται για να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο το σύστημα έκκρισης τύπου III των EPEC εκκρίνει τις μολυσματικές πρωτεΐνες και τους μεταθέτες στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, εστίασαμε στην σαπερόνη CesAB και τα υποστρώματά της EspA και EspB. Από προηγούμενη δουλειά που έχει γίνει στο εργαστήριο γνωρίζουμε ότι για την έκκριση των υποστρωμάτων αυτών είναι απαραίτητη η παρουσία της σαπερόνης. Επιπλέον, επίσης από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου, ξέρουμε ότι σημειακές μεταλλαγές στην CesAB σαπερόνη επηρεάζουν έως και αποτρέπουν την έκκριση της EspA στον εξωκυττάριο χώρο (Balabanidou et al, unpublished data). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η έκκριση των πρωτεϊνών αυτών σε πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo*, όπου με τον όρο “*ex vivo*” εννοούμε την επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών με βακτηριακά στελέχη.

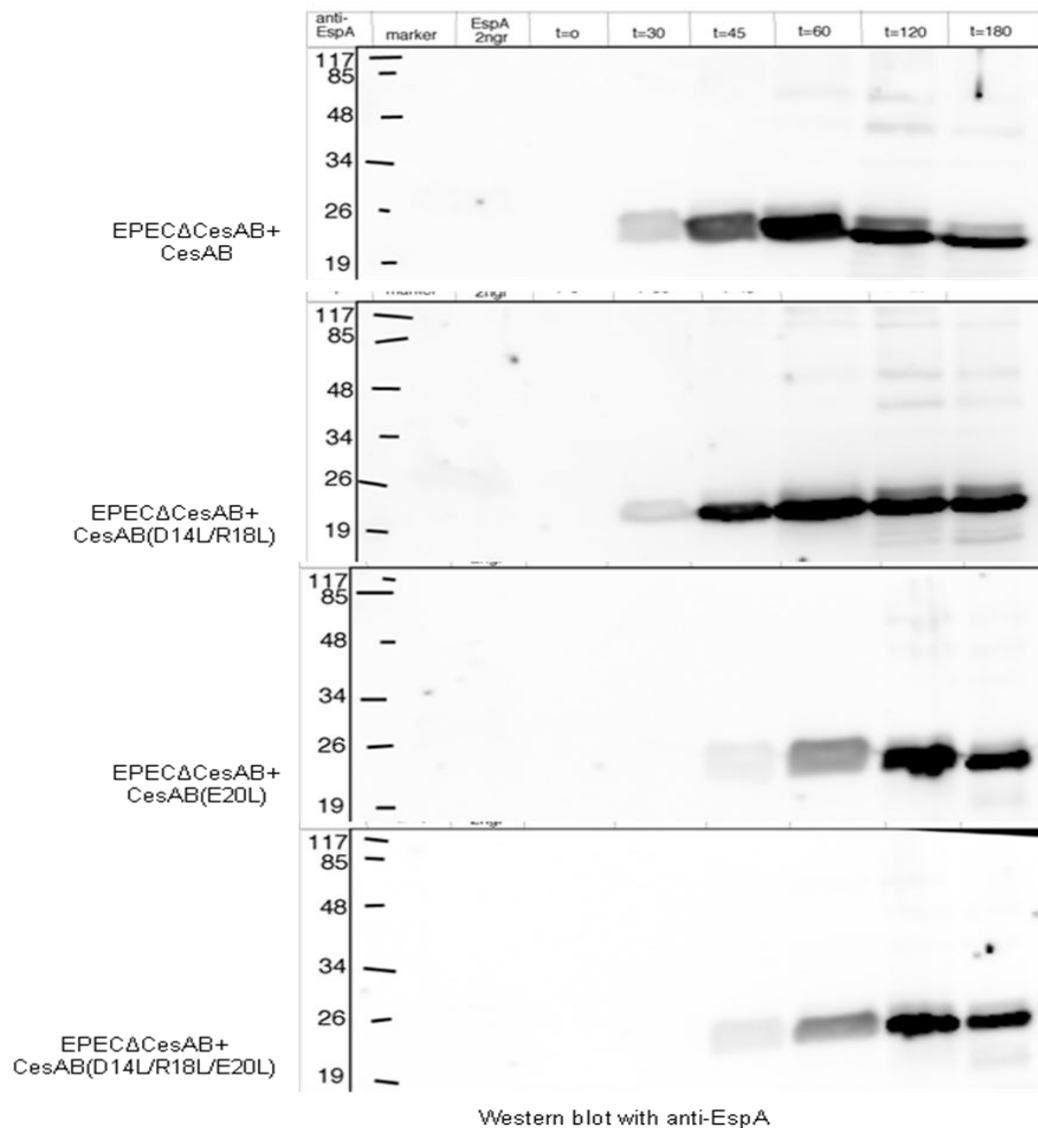
#### 3.2.1 Έκκριση του μεταθέτη EspA *in vitro*

---

Για την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο μεταθέτης EspA αλληλεπιδρά με την σαπερόνη του και εκκρίνεται από το T3S δημιουργήθηκαν και μελετήθηκαν γενετικά τροποποιημένα παράγωγα της δεύτερης. Η δομή της σαπερόνης CesAB έχει προσδιοριστεί με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και με βάση τα αποτελέσματα αυτά δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλαγές σε αμινοξέα τα οποία πιθανώς να επηρεάζουν τον τρόπο που αυτή αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά της, EspA. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις στο αμινο-τελικό άκρο της σαπερόνης, και προέκυψαν τα παράγωγα CesAB(E20L), CesAB(D14L/R18L), και CesAB(D14L/R18L/E20L). Για την μελέτη της έκκρισης της πρωτεΐνης EspA σε σχέση με τον χρόνο ανάπτυξης των βακτηρίων αγρίου τύπου και τα γενετικά τροποποιημένα παράγωγα αυτών *in vitro*, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καλλιέργειας βακτηρίων ανά τακτά χρονικά διαστήματα και ανίχνευση της πρωτεΐνης με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας αντίσωμα ενάντια σε αυτήν. Σε αυτή την περίπτωση, με τον όρο βακτήρια αγρίου τύπου, εννοούμε την βακτηριακή σειρά EPECΔCesAB μετασχηματισμένη με το πλασμίδιο pASK-IBA 7plus-CesAB, όπου με την κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη έχουμε ρυθμίσει την έκφραση της CesAB να είναι στα ίδια επίπεδα με αυτήν του αγρίου τύπου EPEC. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τετρακυκλίνη με τελική

συγκέντρωση 0,2 mg/l η έκφραση της σαπερόνης είναι μια με δυο φορές παραπάνω απ' ότι στο αγρίου τύπου.

Από τα πειράματα μελέτης της έκκρισης της EspA, *in vitro*, φαίνεται ότι η μεταλλαγή από γλουταμινικό οξύ στη θέση 20 σε λευκίνη είναι πολύ σημαντική και επηρεάζει αρκετά την έκκριση του μεταθέτη EspA. Επιπλέον, η διπλή μεταλλαγή από ασπαρτικό οξύ στη θέση 14 και από αργινίνη στη θέση 18 πάλι σε λευκίνη δεν εμφανίζει κάποιο φαινότυπο στην διαδικασία της έκκρισης της EspA. Αντίθετα, αν στο μετάλλαγμα αυτό προσθέσουμε την μεταλλαγή E20L, τότε εμφανίζεται ο ίδιος φαινότυπος με το πρώτο (Σχήμα 18)



Σχήμα 18: Ανίχνευση της πρωτεΐνης EspA, η οποία έχει εκκριθεί από διαφορετικά στελέχη EPEC. Ανίχνευση της πρωτεΐνης EspA, η οποία έχει εκκριθεί από διαφορετικά στελέχη EPEC με ανοσοαποτύπωση, σε σχέση με τον χρόνο. Έκκριση της EspA από EPECΔCesAB μετασηματισμένα με A) pASKCesAB, B) pASKCesAB(D14L/R18L), C) pASKCesAB(E20L) και D) pASKCesAB(D14L/R18L/E20L

### 3.2.2 Έκκριση του μετεθέτη EspA, *ex vivo*

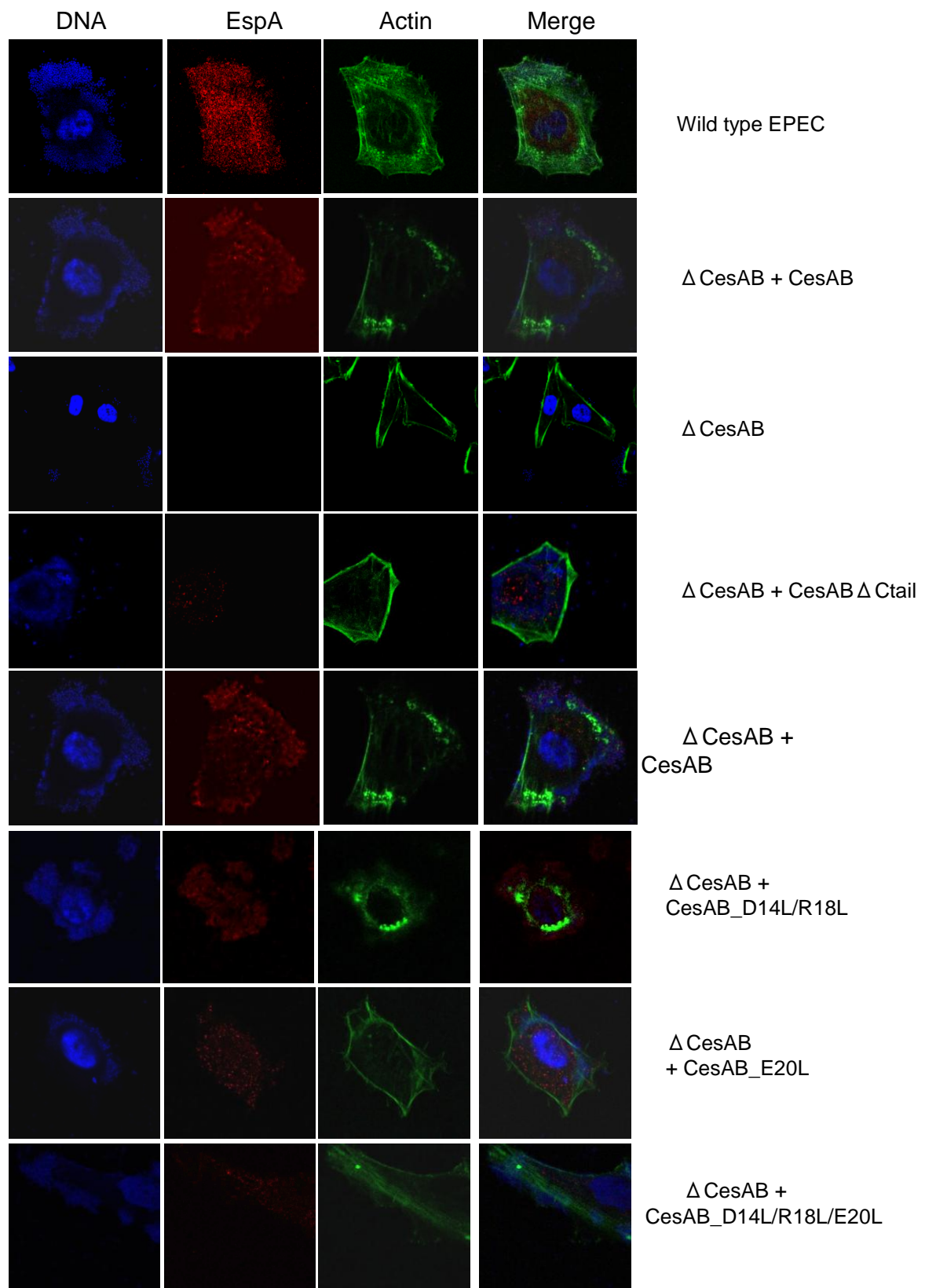
Σημαντική για τη μολυσματική ικανότητα του EPEC είναι η ικανότητα του να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο και να προκαλεί μια εντυπωσιακή κάκωση (attaching and effacing, A/E lesion) της εντερικής μεμβράνης. Η κάκωση αυτή χαρακτηρίζεται από την τοπική καταστροφή των μικρολαχνών του εντέρου, τη στενή επαφή του βακτηρίου στην ακραία μεμβράνη των κυττάρων του εντέρου, συχνά πάνω σε μια χαρακτηριστική προεκβολή, και τον πολυμερισμό της ακτίνης, όπως και άλλων κύτταροσκελετικών ινιδίων, ακριβώς κάτω από τα προσκολλημένα βακτήρια. Η συγκέντρωση της ακτίνης τοπικά στο σημείο της A/E κάκωσης έχει αποτελέσει τη βάση μιας απλής, αλλά ιδιαίτερα ευαίσθητης, διαγνωστικής δοκιμής για EPEC (δοκιμή της φθορίζουσας ακτίνης, FAS; Fluorescent-Actin Staining) [60], η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε διάφορες κυτταρικές σειρές [69].

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για να μελετήσουμε πως τα διάφορα γενετικά τροποποιημένα παράγωγα της σαπερόνης CesAB επηρεάζουν την έκκριση της EspA και την δημιουργία της A/E κάκωσης. Η κυτταρική σειρά που επιλέχθηκε για την πραγμάτωση των πειραμάτων αυτών ήταν τα κύτταρα HeLa. Τα κύτταρα HeLa, είναι μια κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται ευρέως για πειράματα *ex vivo*. Τα κύτταρα αυτά προέρχονται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας και για το λόγο αυτό δεν μπορούν να θεωρηθούν ως φυσικοί ξενιστές των EPEC [70]. Παρόλα αυτά, κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με το αγρίου τύπου στέλεχος EPEC και με παράγωγα αυτού. Η πολυμερισμένη ακτίνη ανιχνεύτηκε με φθορισμό (πράσινο χρώμα στο σχήμα), ενώ τα ινίδια της EspA ανιχνεύθηκαν με ανοσο-φθορισμό (κόκκινο χρώμα στο σχήμα). Τέλος, με μπλε χρώμα διακρίνεται ο πυρήνας του ευκαρυωτικού κυττάρου και το βακτηριακό χρωμόσωμα.

Σε αυτό το πείραμα παρατηρούμε πως τα αγρίου τύπου βακτήρια καθώς και η βακτηριακή σειρά EPECΔCesAB μετασηματισμένη με το πλασμίδιο που φέρει την αγρίου τύπου σαπερόνη τα οποία εκφράζουν ινίδια EspA προσκολλώνται στη μεμβράνη των HeLa και σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές μικρο-αποικίες και προκαλούν την A/E κάκωση. Επιπλέον, ίδια συμπεριφορά εμφανίζει και το παράγωγο CesAB(D14L/R18L). Αντίθετα, όταν τα στελέχη EPEC δεν εκφράζουν την σαπερόνη CesAB είτε εκφράζουν το παράγωγο CesABΔCtail, από το οποίο έχει αποκοπεί το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, μόνο ελάχιστα βακτήρια κατορθώνουν τελικά να προσκολληθούν στη μεμβράνη των κυττάρων HeLa. Επιπροσθέτως, η πρωτεΐνη EspA

δεν εκκρίνεται και συνεπώς τα βακτήρια αυτά δεν μπορούν να σχηματίσουν EspA ινίδια. Επιπλέον, σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρείται και η χαρακτηριστική κάκωση. Επίσης, κύτταρα HeLa μολύνθηκαν και με EPEC στελέχη τα οποία εκφράζουν τα παράγωγα CesAB(E20L), CesAB (E20L/E30L) και CesAB (D14I/R18L/E20L). Σε αυτήν την περίπτωση είχαμε έναν ενδιάμεσο φαινότυπο, όπου αρκετά βακτηριακά κύτταρα κατόρθωσαν να προσκολληθούν και να σχηματίσουν μικρό-αποικίες, ο μεταθέτης EspA εκκρίθηκε, αν και σε λιγότερη ποσότητα σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα, και τα κύτταρα αυτά δεν ήταν ικανά να προκαλέσουν την A/E κάκωση αφού δεν φαίνεται ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών δομών που σχηματίζει η πολυμερισμένη ακτίνη τοπικά κάτω από το σημείο προσκόλλησης των βακτηρίων ( actin pedestals ) .





Σχήμα 19: Μελέτη της έκκρισης της EspA ex vivo.

Επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων HeLa με βακτηριακά στελέχη EPEC και γενετικά τροποποιημένα παράγωγα αυτών. Με μπλε χρώμα σημαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων HeLa και το βακτηριακό χρωμόσωμα, με κόκκινη η πρωτεΐνη EspA και με πράσινο η ακτίνη.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάλυση των αλληλεπιδράσεων των EspA, EspB και CesAB κατά την διάρκεια της έκκρισης**

---

### **4.1 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων των μεταθετών EspA και EspB**

---

Κατά την διάρκεια της έκκρισης μιας πρωτεΐνης από το σύστημα έκκρισης τύπου III, αυτή μπορεί να αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες μέχρι την τελική της έξοδο από το κύτταρο. Στα πλαίσια της μελέτης του μηχανισμού έκκρισης των πρωτεϊνών από το σύστημα έκκρισης τύπου III, προσπαθήσαμε να αναλύσουμε τις αλληλεπιδράσεις των μεταθετών EspA και EspB με την σαπερόνη του συστήματος CesAB καθώς και την τυχόν αλληλεπίδραση των πρώτων με άλλους παράγοντες του συστήματος. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η ανίχνευση των τεταρτοταγών συμπλόκων που δημιουργούνται κατά την έκκριση των μεταθετών σε διαφορετικά υποκυτταρικά κλάσματα.

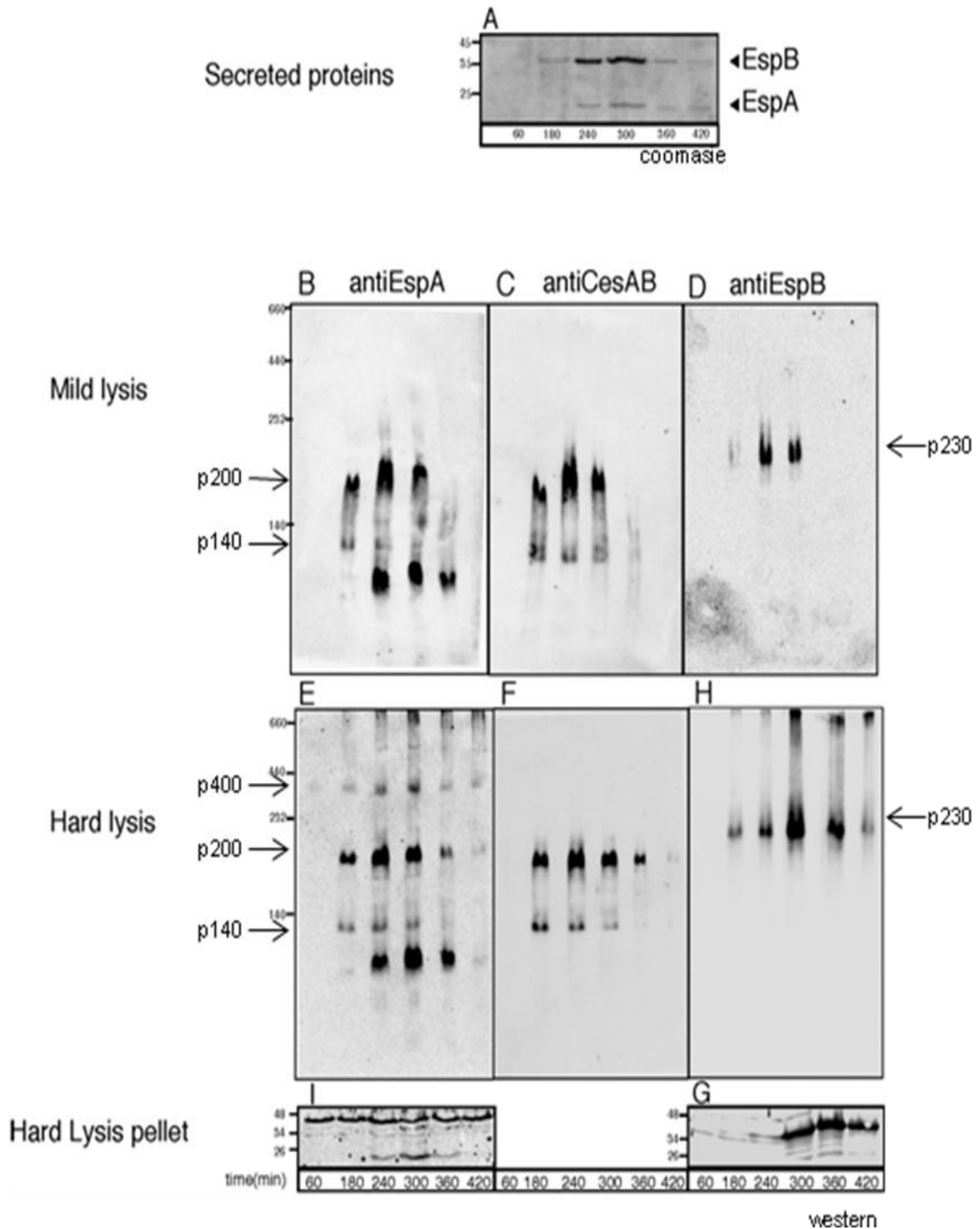
Για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές ήπιας και έντονης διάρρηξης των βακτηριακών κυττάρων. Κατά την ήπια διάρρηξη των κυττάρων, αυτά διαρρηγνύονται με επαναλαμβανόμενους κύκλους παγώματος-ξεπαγώματος και μετά από υπερφυγοκέντρωση απελευθερώνονται επιλεκτικά πρωτεΐνες στη διαλυτή φάση, οι οποίες αναλύονται με εγγενή ηλεκτροφόρηση. Κατά την έντονη διάρρηξη των κυττάρων, αυτά διαρρηγνύονται με ηχοβολισμό και έπειτα ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την ήπια διάρρηξη.

Για να παρακολουθήσουμε τα τεταρτοταγή σύμπλοκα που δημιουργούνται κατά την έκκριση των μεταθετών EspA και EspB σε σχέση με τον χρόνο στα διάφορα υποκυτταρικά κλάσματα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα, στη συνέχεια διάρρηξη με ήπιο ή έντονο τρόπο και τέλος διαχωρισμό αυτών με εγγενή ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση με ανοσοαποτύπωση (Σχήμα 20).

Κατά την ανάλυση του υποκυτταρικού κλάσματος που προκύπτει έπειτα από ήπια λύση των κυττάρων, παρατηρείται η απελευθέρωση ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου μοριακής μάζας περίπου 230 kDa το οποίο περιέχει τον μεταθέτη EspB (p230). Επιπλέον, προκύπτουν δυο μεγαλομοριακά σύμπλοκα μοριακού βάρους περίπου 200 και 140 kDa αντίστοιχα τα οποία περιέχουν τόσο τον μεταθέτη EspA όσο και την σαπερόνη του CesAB (p140 και p200 αντίστοιχα). Τα ίδια

μεγαλομοριακά σύμπλοκα ανιχνεύονται και κατά την ανάλυση του διαλυτού υποκυτταρικού κλάσματος που προκύπτει από την διάρρηξη των κυττάρων με ηχοβολισμό. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, ανιχνεύεται ένα επιπλέον μεγαλομοριακό σύμπλοκο μοριακής μάζας περίπου 400 kDa (p400) , το οποίο απαρτίζεται από τον μεταθέτη EspA αλλά όχι από την σαπερόνη του (Σχήμα 20). Τα σύμπλοκα p200 και p400, παρουσιάζουν ενδιαφέρον, διότι πιθανόν αποτελούν τεταρτοταγείς δομές που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της έκκρισης του μεταθέτη EspA και απαρτίζονται από παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην έκκριση αυτού. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο p200 εκτός από την CesAB και την EspA που περιέχει σίγουρα, θα πρέπει να περιέχει και από κάποιον τρίτο παράγοντα, διότι σύμφωνα με την στοιχειομετρία των πρωτεϊνών και το μοριακό τους βάρος δεν θα έπρεπε να ανιχνεύονται σε αυτό το ύψος στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αλλά σε μοριακό βάρος περίπου 70kDA. Επιπλέον, όσον αφορά το σύμπλοκο p400, το οποίο περιέχει αποδεδειγμένα την EspA, πρέπει να αποτελεί ένα μεγαλομοριακό πρωτεϊνικό ενδιάμεσο σύμπλοκο που δημιουργείται κατά την διαδικασία της έκκρισης του μεταθέτη, κοντά στην μεμβράνη του κυττάρου και αφού αυτός μεταφερθεί σε κάποιον άλλο παράγοντα από την σαπερόνη CesAB. Ο παράγοντας αυτός ενδεχομένως, αλληλεπιδρά με την CesAB οι οποία του μεταφέρει το υπόστρωμά την, την EspA, συμβάλλοντας έτσι στην έκκριση του υποστρώματος από την μεμβράνη του κυττάρου. Αυτά συμπεραίνονται αν λάβουμε υπ' όψιν ότι στο σύμπλοκο αυτό δεν ανιχνεύεται η σαπερόνη CesAB. Επιπλέον, το σύμπλοκο αυτό δεν ανιχνεύεται μετά από ήπια ρήξη των κυττάρων αλλά απελευθερώνεται μόνο μετά από διάρρηξη των κυττάρων με ηχοβολισμό, όπου κατά την διαδικασία αυτή απελευθερώνονται και πρωτεΐνες οι οποίες βρίσκονται κοντά στην μεμβράνη του κυττάρου. Συνεπώς, είναι ένα σύμπλοκο το οποίο δημιουργείται στην μεμβράνη του κυττάρου.

Τέλος αναλύθηκε το κλάσμα που προκύπτει μετά από έντονη διάρρηξη των κυττάρων με ηχοβολισμό και αποτελεί την μη διαλυτή φάση η οποία περιέχει τμήματα των μεμβρανών των κυττάρων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Στο κλάσμα αυτό ανιχνεύθηκαν οι μεταθέτες EspA και EspB με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Σχήμα 20) κάτι που υποδηλώνει την ύπαρξη τους εκεί και επιβεβαιώνει ότι τα παραπάνω σύμπλοκα που ανιχνεύθηκαν στα διάφορα υποκυτταρικά κλάσματα αποτελούν ενδιάμεσα στάδια του μονοποτιού έκκρισης των μεταθετών αυτών.



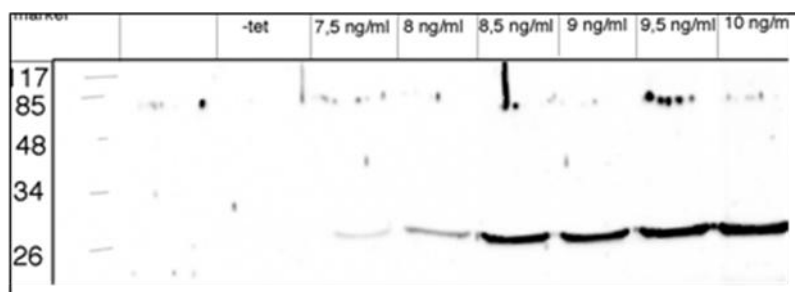
Σχήμα 20: Ανάλυση των μεγαλομοριακών συμπλόκων που δημιουργούνται μετά από διάρρηξη των EPEC σε συσχέτιση με τον χρόνο ανάπτυξης.

Τα συμπλοκα που δημιουργούνται διαχωρίστηκαν με εγγενή ηλεκτροφόρηση και ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση. Α) Οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο από τα EPEC, Β, C & D) τα συμπλοκα που προκύπτουν μετά από ήπια διάρρηξη των κυττάρων και περιέχουν EspA, CesAB και EspB αντίστοιχα, Ε, F & H) τα συμπλοκα που προκύπτουν μετά από έντονη διάρρηξη των κυττάρων και περιέχουν EspA, CesAB και EspB αντίστοιχα, Ι & G) ανίχνευση των πρωτεϊνών EspA και EspB στο υποκυτταρικό κλάσμα το οποίο περιέχει τις μεμβράνες των βακτηρίων.

## 4.2 Απομόνωση και ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA

Η ανάλυση με εγγενή ηλεκτροφόρηση της παραπάνω ενότητας, υπέδειξε τον σχηματισμό μεγαλομοριακών συμπλόκων με την EspA και CesAB (σύμπλοκο p200, σύμπλοκο p140). Επιπλέον, αποκάλυψε τον σχηματισμό μεγαλομοριακών συμπλόκων με την EspA και άλλους παράγοντες (σύμπλοκο p400) οι οποίοι είναι άγνωστοι μέχρι στιγμής. Για τον προσδιορισμό των παραγόντων οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τον μεταθέτη αυτό κατά την διάρκεια της έκκρισής του από το T3S, κρίθηκε αναγκαία η εγγενής απομόνωση των συμπλόκων αυτών και η ανάλυση τους με φασματομετρία μάζας.

Για την απομόνωση των συμπλόκων που σχηματίζονται στο υπο-κυτταρικό κλάσμα που προκύπτει έπειτα από ηχοβολισμό των κυττάρων και υπερφυγοκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος EPECΔEspA το οποίο μετασχηματίστηκε με το πλασμίδιο pASK-IBA 7plus-HisEspA. Στο κύτταρο αυτό εκφράζεται η πρωτεΐνη EspA μαζί με έναν εξαϊστιδινικό επίτοπο και μπορεί να απομονωθεί χρησιμοποιώντας σφαιρίδια σεφαρόζης με νικέλιο. Τα κύτταρα αυτά εκφράζουν την πρωτεΐνη μετά από επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου με άνυδρη τετρακυκλίνη. Αρχικά, τα μετασχηματισμένα EPEC συγκρίθηκαν με αυτά του αγρίου τύπου με σκοπό να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του επαγωγέα ώστε η ποσότητα πρωτεΐνης EspA που παράγεται να είναι στα ίδια επίπεδα με αυτά στο αγρίου τύπου κύτταρο. Για τον λόγο αυτό κύτταρα αγρίου τύπου αναπτύχθηκαν παράλληλα με μετασχηματισμένα κύτταρα EPECΔEspA όπου στα δεύτερα προσθέταμε διαφορετικές συγκεντρώσεις του επαγωγέα τετρακυκλίνη. Στη συνέχεια η έκφραση της πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε με την μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης (Σχήμα 21).



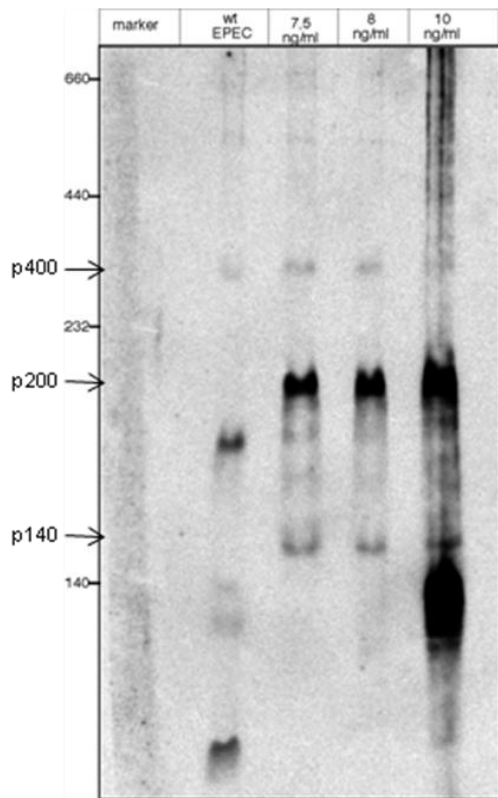
Western blot with anti-EspA

Σχήμα 21: Στοιχειομετρική ανάλυση της ποσότητας της έκφρασης της πρωτεΐνης EspA  
Ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης EspA με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις από τον επαγωγέα τετρακυκλίνη. Η ελάχιστη έκφραση που παρατηρείται στα 7,5ng/ml θεωρείται η ιδανική για τα περάματα μας.

Έπειτα, αφού ορίστηκε η ιδανική συγκέντρωση της τετρακυκλίνης στα 7,5 ng/ml αναλύθηκαν τα σύμπλοκα που δημιουργούνται από τα μετασχηματισμένα EPECΔEspA μετά από ηχοβολισμό των κυττάρων, σε σύγκριση με του αγρίου τύπου EPEC ώστε να βεβαιωθούμε ότι ανιχνεύουμε τα ίδια σύμπλοκα και στις δυο περιπτώσεις (Σχήμα 22) . Τα σύμπλοκα τα οποία ανιχνεύθηκαν από τα μετασχηματισμένα κύτταρα EPECΔEspA, εμφάνιζαν μια διαφορά ως προς το μέγεθος, σε σχέση με αυτά που δημιουργούνταν από τα αγρίου τύπου κύτταρα. Τα σύμπλοκα από τα μετασχηματισμένα κύτταρα ήταν λίγο πιο μεγάλα, κάτι που εξηγείται ίσως επειδή η EspA που εκφράζεται από αυτά περιέχει στο αμινοτελικό της άκρο τον εξαϊστιδινικό επίτοπο. Ο επίτοπος αυτός αυξάνει την μάζα του κάθε μορίου EspA κατά 1kDa, συνεπώς αν στα σύμπλοκα αυτά υπάρχουν πάνω από ένα μόρια EspA, δικαιολογείται η διαφορά που προκύπτει στην μοριακή τους μάζα.

Στη συνέχεια, για να προχωρήσουμε στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που απαρτίζουν αυτά τα σύμπλοκα, χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας, τα μετασχηματισμένα κύτταρα EPECΔEspA αναπτύχθηκαν σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργεια, συλλέχτηκαν και το επιθυμητό κυτταρικό κλάσμα διαχωρίστηκε μετά από διάρρηξη των κυττάρων με ηχοβολισμό και υπερφυγοκέντρηση. Το υπό-κυτταρικό κλάσμα αυτό χρωματογραφήθηκε μέσα από σφαιρίδια σεφαρόζης-Ni-NTA και χρησιμοποιώντας σαν «δόλωμα» την His-EspA απομονώθηκαν τα σύμπλοκα που σχηματίζει και κατά συνέπεια και οι υπόλοιποι παράγοντες που τα απαρτίζουν. Κατά τη διαδικασία την απομόνωσης των συμπλόκων αυτών, δεν χρησιμοποιήθηκαν καθόλου διαλύματα αλατιού, καθώς κάτι τέτοιο θα οδηγούσε στο σπάσιμο των ηλεκτροστατικών δεσμών που πιθανόν σχηματίζουν οι πρωτεΐνες μεταξύ τους για το σχηματισμό ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου.

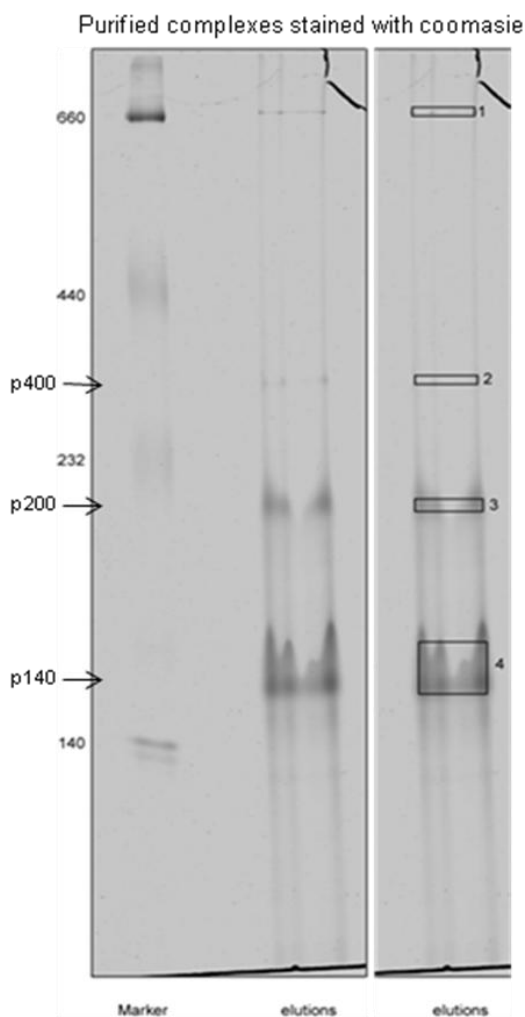
Το κλάσμα που προέκυψε μετά από την έκλυση της ρητίνης με 600mM ιμιδαζόλιο, αναλύθηκε με εγγενή ηλεκτροφόρηση και οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίστηκαν με Coomassie G-250. Στη συνέχεια, αποκόπηκαν οι πρωτεϊνικές αυτές ζώνες και αναλύθηκαν με την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας (Σχήμα 23).



Western blot with anti-EspA

Σχήμα 22: Ανίχνευση των συμπλόκων που περιέχουν His-EspA.

Ανίχνευση των τετατροταγών συμπλόκων που δημιουργούνται και περιέχουν EspA έπειτα από έντονη διάρρηξη των κυττάρων και χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης

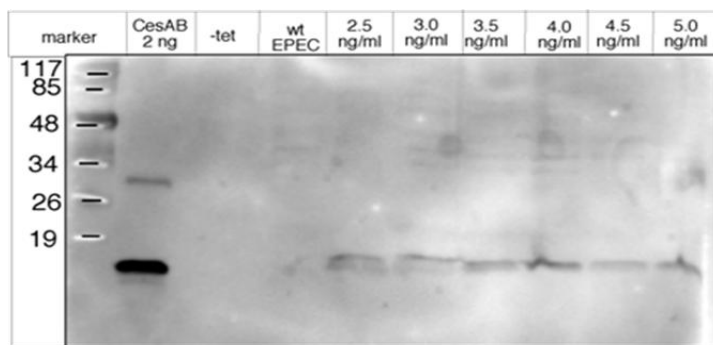


Σχήμα 23 : Σύμπλοκα τα οποία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας σαν «δόλωμα» την πρωτεΐνη His-EspA.

A) σύμπλοκα που έχουν απομονωθεί και έχουν διαχωριστεί με εγγενή ηλεκτροφόρηση, B) σύμπλοκα τα οποία αποκόπηκαν από το πήκτωμα και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας.

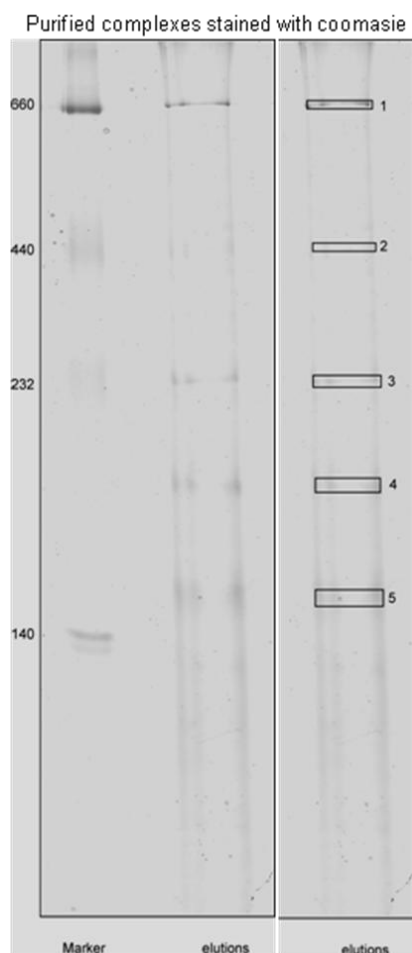
Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την απομόνωση των τεταρτοταγών συμπλόκων που δημιουργούνται από την σαπερόνη CesAB, χρησιμοποιώντας αυτή την φορά σαν «δόλωμα» την σαπερόνη του συστήματος. Αρχικά, προσδιορίστηκε η κατάλληλη συγκέντρωση τετρακυκλίνης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί ώστε η σύνθεση της σαπερόνης από βακτηριακά στελέχη EPECΔCesAB που έχουν μετασχηματιστεί με το πλασμίδιο pASK-IBA 7 plus-HisCesAB να είναι στα ίδια επίπεδα με αυτήν του αγρίου τύπου EPEC (Σχήμα 24). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν τα μεγαλομοριακά σύμπλοκα του διαλυτού υπο-κυτταρικού κλάσματος που προκύπτει μετά από ηχοβολισμό των κυττάρων χρησιμοποιώντας στήλη με σφαιρίδια Ni-NTA. Έπειτα, το κλάσμα της έκλουσης που προέκυψε αναλύθηκε με εγγενή ηλεκτροφόρηση και οι πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίστηκαν προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της φαματομετρίας μάζας (Σχήμα 25). Σκοπός της πειραματικής αυτής διαδικασίας ήταν αφενός η επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την ανάλυση των συμπλόκων που απομονώνονται χρησιμοποιώντας την HisEspA και αφετέρου ο τυχόν προσδιορισμός επιπρόσθετων πρωτεϊνικών μορίων που απαρτίζουν τα μεγαλομοριακά αυτά σύμπλοκα.





Western blot with anti-CesAB

Σχήμα 24: Στοιχειομετρική ανάλυση της ποσότητας της έκφρασης της CesAB.  
Ανίχνευση της έκφρασης της πρωτεΐνης CesAB με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις από τον επαγωγέα τετρακυκλίνη. Η ελάχιστη έκφραση που παρατηρείται στα 2,5ng/ml θεωρείται η ιδανική για τα περάματα μας.



Western blot with anti-CesAB

Σχήμα 25 : Σύμπλοκα τα οποία απομονώθηκαν χρησιμοποιώντας σαν «δόλωμα» την πρωτεΐνη His-CesAB.  
Α) Σύμπλοκα τα οποία έχουν απομονωθεί και έχουν διαχωριστεί με εγγενή ηλεκτροφόρηση, Β) σύμπλοκα τα οποία αποκόπηκαν από το πήκτωμα και αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC) είναι πολύ σημαντικό παθογόνο του εντερικού επιθηλίου και αποτελεί απειλή για την υγεία κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες [48]. Το κατά Gram αρνητικό αυτό βακτήριο, χρησιμοποιεί ένα εξειδικευμένο σύστημα έκκρισης το οποίο μεταφέρει τις μολυσματικές πρωτεΐνες του κυττάρου κατευθείαν μέσα στο κύτταρο-ξενιστή. Το σύστημα αυτό ονομάζεται σύστημα έκκρισης τύπου III (T3S) και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεια πολλών κατά Gram αρνητικών βακτηρίων [9]. Οι μολυσματικές αυτές πρωτεΐνες ή τοξίνες, που εκκρίνονται διαμέσου του συστήματος έκκρισης τύπου III, μιμούνται ευκαρυωτικούς παράγοντες ώστε να εκμεταλλεύονται ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου-ξενιστή προς όφελος του παθογόνου κατά την διάρκεια της μόλυνσης. Οι τοξίνες αυτές επηρεάζουν τόσο σημαντικά μονοπάτια, όπως αυτό της μεταγωγής σήματος και της ανοσοαπόκρισης, όσο και ευκαρυωτικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια του κυττάρου-ξενιστή [1]. Πρόσφατες μελέτες έχουν συμβάλει αρκετά στον προσδιορισμό των μολυσματικών πρωτεϊνών του EPEC και στον τρόπο που αυτές μεταφέρονται στο ευκαρυωτικό κύτταρο, παρόλα αυτά μια συγκεντρωτική μελέτη για τους παράγοντες αυτούς δεν υπάρχει. Επιπλέον, ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται και εκκρίνονται μέσα από το T3S παραμένει αινιγματικός.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν από τη μια ο συγκεντρωτικός προσδιορισμός των μολυσματικών παραγόντων που εκκρίνονται από το T3S, και από την άλλη η μελέτη του μηχανισμού έκκρισης των πρωτεϊνών από το σύστημα αυτό. Αρχικά χρησιμοποιώντας σαν οργανισμό-μοντέλο το EPEC, προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε όλες εκείνες τις πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το βακτήριο αυτό και να προσδιορίσουμε τους παράγοντες που ρυθμίζουν την έκκριση και την ιεραρχία της έκκρισης των μολυσματικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας σα μοντέλο τους μεταθέτες του συστήματος EspA και EspB και την σαπερόνη τους CesAB, προσπαθήσαμε να αναλύσουμε τον μοριακό μηχανισμό της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S, μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις των μεταθετών τόσο με την σαπερόνη, όσο και με μεταλλάγματα αυτής. Τέλος, προσπαθήσαμε να διασαφηνίσουμε το μονοπάτι έκκρισης της πρωτεΐνης EspA και να προσδιορίσουμε άλλους πιθανούς παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτό.

Αναλυτικότερα, στο κεφάλαιο 3 της εργασίας αυτής, περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο έγινε μια προσπάθεια να καταγραφθούν όλες οι πρωτεΐνες εκείνες που

εκκρίνονται από το εντεροπαθογόνο *E. coli*. Αρχικά, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της μονοδιάστατης και έπειτα την μέθοδο της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης αναλύθηκαν δείγματα από πρωτεΐνες οι οποίες είχαν εκκριθεί τόσο από κύτταρα EPEC αγρίου τύπου όσο και από γενετικά τροποποιημένα παράγωγα αυτών. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα EPEC στελέχη έγινε χρησιμοποιώντας την μέθοδο φασματομετρίας μάζας. Μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων με ειδικά λογισμικά, καταλήξαμε σε ένα πίνακα όπου πάνω από το 81% των πρωτεϊνών που εκκρίνεται είχε ταυτοποιηθεί. Συγκεκριμένα, καταφέραμε να αναγνωρίσουμε 28 από τις 34 πρωτεΐνες που πιστεύεται ότι εκκρίνονται από τα κύτταρα EPEC και παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογονικότητα του βακτηρίου αυτού. Βέβαια όλες οι πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται δεν αναγνωρίστηκαν με την μέθοδο αυτή. Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται στο ότι κάποιες πρωτεΐνες εκκρίνονται από τα κύτταρα αργότερα ή νωρίτερα από την δεδομένη χρονική στιγμή κατά την οποία συλλέχτηκαν τα δείγματα. Επιπλέον, ενδεχομένως, κάποιες πρωτεΐνες του κυττάρου να εκκρίνονται σε μικρότερη ποσότητα η οποία να μην είναι ανιχνεύσιμη με τις μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε.

Στη συνέχεια, σε μια προσπάθεια να προσεγγίσουμε παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την ιεραρχία της έκκρισης από το σύστημα έκκρισης τύπου III, πραγματοποιήσαμε πειράματα συγκριτικής πρωτεωμικής (comparative proteomics). Σε αυτά τα πειράματα μελετήσαμε ταυτόχρονα τις πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το αγρίου τύπου EPEC και αυτές που εκκρίνονται από το γενετικά τροποποιημένο παράγωγο EPECΔSepD, στο οποίο το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SepD έχει διαγραφεί πλήρως από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Το μετάλλαγμα αυτό επιλέχθηκε διότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη θεωρείται πολύ σημαντική για την έκκριση τόσο των μεταθετών όσο και των τοξινών από το T3S. Αναλυτικότερα, ανήκει σε μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες κωδικοποιούνται από το γενετικό τόπο LEE έχει δειχθεί ή υπονοηθεί στην βιβλιογραφία ότι αποτελούν μέρος του T3S και ονομάζονται πρωτεΐνες Sep (Secretion switching protein) . Η πρωτεΐνη SepD έχει αναφερθεί ότι είναι βασικό στοιχείο του συστήματος και συγκεκριμένα είναι αναγκαία για την έκκριση τόσο των μεταθετών όσο και των μολυσματικών στοιχείων των EPEC [1]. Η πρωτεΐνη SepD βρίσκεται στην κυταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και θεωρείται υπεύθυνη για την ρύθμιση της έκκρισης των πρωτεϊνών από το T3S. Πιστεύεται ότι ελέγχει την έξοδο των μεταθετών από την μεμβράνη του κυττάρου, δεδομένου ότι απουσία της

πρωτεΐνης SepD, οι μεταθέτες του συστήματος τύπου III, EspA, EspB και EspD δεν εκκρίνονται [71]. Συνεπώς, θεωρείται ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ιεραρχία της έκκρισης από το σύστημα αυτό. Τα πρωτεϊνικά δείγματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με την μέθοδο της δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης και συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλο λογισμικό ως προς την έκκριση ή όχι κάποιων πρωτεϊνών και ως προς την ποσότητα έκκρισης αυτών σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Στην συνέχεια, οι πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας. Όπως ήταν αναμενόμενο, πολλές ήταν οι διαφορές ανάμεσα στα δυο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη. Καταρχήν, υπήρχαν διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες οι οποίοι στα αγρίου τύπου κύτταρα δεν είχαν εκκριθεί ή είχαν εκκριθεί σε μικρή ποσότητα στη δεδομένη χρονική στιγμή (όπως ο παράγοντας Tir και η τοξίνη FliC). Επιπλέον, υπήρχαν μεταθέτες οι οποίοι είχαν εκκριθεί σε μεγάλη ποσότητα στα αγρίου τύπου κύτταρα την δεδομένη χρονική στιγμή (όπως η πρωτεΐνες EspA και EspB). Αντίθετα, στο EPECΔSepD στέλεχος, ανιχνεύθηκαν μολυσματικές πρωτεΐνες που είχαν εκκριθεί σε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα (η πρωτεΐνη Tir εμφανίζεται περίπου πέντε φορές περισσότερη σε σχέση με τα αγρίου τύπου, και η FliC περίπου δέκα). Επιπροσθέτως, ανιχνεύθηκαν τοξίνες οι οποίες είχαν εκκριθεί αποκλειστικά και μόνο στο μεταλλαγμένο βακτηριακό στέλεχος την δεδομένη χρονική στιγμή (όπως ο παράγοντας NleA). Επιπλέον, οι μεταθέτες δεν είχαν εκκριθεί καθόλου είτε υπήρχαν σε απειροελάχιστη ποσότητα, η οποία όμως δεν ήταν ανιχνεύσιμη με τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιήσαμε.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι κατά την διαδικασία της έκκρισης πρώτα εκκρίνονται οι μεταθέτες του T3S, EspA, EspB και EspD, ώστε να σχηματιστεί το συρρίγγιο. Παράλληλα, εκκρίνονται οι μολυσματικοί παράγοντες μέσω αυτού στο κύτταρο ξενιστή, όπως η πρωτεΐνη Tir, ώστε να δημιουργηθεί η πρωταρχική προσκόλληση με τον ξενιστή, και τέλος, εκκρίνονται οι τοξίνες. Η διαδικασία αυτή εξαρτάται απόλυτα από την πρωτεΐνη SepD, δεδομένου ότι απουσία της οποίας η ιεραρχία της έκκρισης δεν υφίσταται. Ενδεχομένως, η πρωτεΐνη SepD να αλληλεπιδρά με τους μολυσματικούς παράγοντες αποτρέποντας την πρόωρη έκκρισή τους από το κύτταρο, και στην συνέχεια η δράση της να αναστέλλεται από μια άλλη πρωτεΐνη του συστήματος. Συνεπώς, από τα παραπάνω δεδομένα, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η έκκριση των πρωτεϊνών μέσω του T3S, δεν είναι μια αυθαίρετη διαδικασία, αλλά υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση. Η έκκριση

των πρωτεϊνών ρυθμίζεται σε διάφορα στάδια και από πολλούς παράγοντες όπως τις σαπερόνες του συστήματος στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου και από ρυθμιστικές πρωτεΐνες κοντά στην μεμβράνη. Παρόλα αυτά, ο μοριακός μηχανισμός του πώς επιτελείται η ρύθμιση στην έκκριση των πρωτεϊνών παραμένει άγνωστος. Για τον λόγο αυτό, περισσότερα πειράματα χρειάζονται ώστε να ολοκληρωθεί η μελέτη του ρόλου που διαδραματίζει η πρωτεΐνη SepD στην διαδικασία της έκκρισης των πρωτεϊνών. Επίσης, περισσότερα γενετικά τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη EPEC πρέπει να αναλυθούν ώστε να έχουμε μια πιο εμπεριστατωμένη εικόνα για τους παράγοντες που ρυθμίζουν την έκκριση των μολυσματικών πρωτεϊνών. Και τέλος, να μελετηθούν διαφορετικές χρονικές στιγμές της ανάπτυξης των κυττάρων ώστε να αναγνωριστούν και να ταυτοποιηθούν και άλλες τυχόν πρωτεΐνες οι οποίες εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου III.

Στην συνέχεια αυτής της εργασίας, προσπαθήσαμε να διασαφηνίσουμε τον μοριακό μηχανισμό με τον οποίο οι πρωτεΐνες εκκρίνονται από το T3S και να διερευνήσουμε το μονοπάτι που ακολουθείται κατά την μεταφορά των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον εξωκυτταρικό χώρο.

Αρχικά, χρησιμοποιώντας σα μοντέλο τους μεταθέτες EspA και EspB και τη σαπερόνη τους CesAB, προσδιορίσαμε τις βέλτιστες συνθήκες για την έκκριση αυτών των πρωτεϊνών (τιμή pH, θερμοκρασία και θρεπτικό μέσο). Στην συνέχεια, μελετήσαμε πως επηρεάζεται η έκκριση των πρωτεϊνών αυτών από διάφορες σημειακές μεταλλαγές στην σαπερόνη, σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε πως οι μεταθέτες EspA και EspB αλληλεπιδρούν με την σαπερόνη τους, CesAB. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τόσο σε *in vitro* συνθήκες (καλλιέργεια βακτηρίων σε φλάσκα με θρεπτικό υλικό), όσο και *ex vivo* (επιμόλυνση με βακτηρία κυτταρικές σειρές HeLa). Οι σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργήθηκαν στην σαπερόνη CesAB σχεδιάστηκαν σε αμινοξικές περιοχές του μορίου οι οποίες φαίνεται να συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση αυτής με τα υποστρώματά της. Οι περιοχές αυτές ενδεχομένως να παίζουν σημαντικό ρόλο με βάση την δομή της CesAB η οποία έχει προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας την μέθοδο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), πειράματα που έλαβαν χώρα στο εργαστήριο του Dr X. Καλοδήμου.

Από τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν διαφαίνεται ο σημαντικός ρόλος του γλουταμινικού οξέος στην θέση 20 της σαπερόνης CesAB. Συγκεκριμένα, όταν το γλουταμινικό οξύ στην θέση 20 της σαπερόνης αντικαταστάθηκε με το

αμινοξύ λευκίνη, τότε ο μεταθέτης EspA δεν μπορούσε να εκκριθεί αποτελεσματικά, παρόλο που η EspB ανιχνευόταν σε φυσιολογικά επίπεδα. Συγκεκριμένα, η έκκριση του πρώτου ξεκινούσε πολύ αργότερα χρονικά σε σχέση με το αγρίου τύπου και σε λιγότερη ποσότητα.

Όλα τα παραπάνω γενετικά τροποποιημένα παράγωγα της CesAB, καθώς και κάποια επιπλέον που είχε δειχθεί από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου ότι παίζουν ρόλο στην έκκριση της EspA, ελέγχθησαν ως προς την ικανότητά τους να προσβάλλουν ευκαρυωτικά κύτταρα και να προκαλούν την χαρακτηριστική A/E κάκωση. Συγκεκριμένα, όταν ευκαρυωτικές σειρές επιμολύνθηκαν με κύτταρα τα οποία είτε δεν έφεραν το γονίδιο της CesAB, είτε έφεραν το μετάλλαγμα CesABΔC, από το οποίο έχει αποκοπεί η καρβοξυτελική τμήμα του μορίου, δεν παρατηρήθηκε έκκριση της EspA και κατά συνέπεια ούτε πρόκληση της A/E κάκωσης. Στην συνέχεια, όταν ευκαρυωτικές σειρές επιμολύνθηκαν με κύτταρα τα οποία έφεραν είτε το μετάλλαγμα CesAB(E20L), είτε το μετάλλαγμα CesAB(E20L/E30L), είτε τέλος το μετάλλαγμα CesAB(D14L/R18L/E20L), παρατηρήθηκε ελάχιστη έκκριση της EspA αλλά όχι ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών δομών της ακτίνης και κατά συνέπεια η πρόκληση της A/E κάκωσης. Τα *ex vivo* πειράματα σε ευκαρυωτικές σειρές HeLa που πραγματοποιήθηκαν, ουσιαστικά επαλήθευσαν τα *in vitro* αποτελέσματα και το πόσο σημαντικό ρόλο παίζει η σαπερόνη CesAB, το γλουταμινικό οξύ στην θέση 20 καθώς και το καρβοξυτελικό άκρο της σαπερόνης για την φυσιολογική έκκριση του μεταθέτη EspA. Με τα μέχρι τώρα δεδομένα, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι η CesAB αλληλεπιδρά με την EspA δημιουργώντας ηλεκτροστατικούς δεσμούς και την καθιστά ικανή να εκκριθεί από το κύτταρο. Παρόλα αυτά, περισσότερα πειράματα χρειάζονται τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo* ώστε να προσδιοριστεί ενδελεχώς ο τρόπος με τον οποίο η σαπερόνη αλληλεπιδρά με το υπόστρωμά της, και ποια δομικά χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση αυτή. Αντίθετα, η EspB ενδεχομένως να αλληλεπιδρά πιο ασθενικά με την CesAB, διότι αφενός απουσία της σαπερόνης δεν παρατηρείτε καθόλου έκκριση του μεταθέτη EspB, αφετέρου η έκκριση αυτού δεν επηρεάζεται από τα διάφορα μεταλλάγματα της CesAB που χρησιμοποιήθηκαν. Συνεπώς, από τα παραπάνω, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα, ότι για την έκκριση των πρωτεϊνών μέσω του συστήματος τύπου III η παρουσία των σαπερονών είναι καθοριστικής σημασίας και επιπλέον περισσότερες από μια σαπερόνες μπορεί να αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες οι οποίες πρέπει να εκκριθούν. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει άλλο ένα σημείο στο οποίο ο μηχανισμός έκκρισης του

συστήματος τύπου III ρυθμίζεται και μάλιστα αυστηρά, και δεν χρησιμοποιείται για την αυθαίρετη έκκριση μολυσματικών πρωτεϊνών.

Στην τρίτη ενότητα της εργασίας αυτής, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε το μονοπάτι που ακολουθούν οι μεταθέτες EspA και EspB κατά την μεταφορά τους από τον ενδοκυττάριο στον εξωκυττάριο χώρο καθώς και τυχόν παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν κατά την μεταφορά αυτή. Για τον σκοπό αυτό, προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε τυχόν υπερ-μοριακά σύμπλοκα που σχηματίζουν οι δυο μεταθέτες αναλύοντας τα υπο-κυτταρικά κλάσματα που δημιουργούνται κατά την έντονη ή ήπια διάρρηξη των κυττάρων EPEC με εγγενή ηλεκτροφόρηση.

Κατά την ανάλυση του υποκυτταρικού κλάσματος που προκύπτει έπειτα από ήπια λύση των κυττάρων, παρατηρείται η απελευθέρωση ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου μοριακής μάζας περίπου 230 kDa το οποίο περιέχει το μεταθέτη EspB (p230) όχι όμως και την σαπερόνη CesAB. Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με τα παραπάνω, υποδηλώνει ότι η CesAB αλληλεπιδρά πολύ νωρίς κατά την διαδικασία της έκκρισης με την EspB και την μεταφέρει σε κάποιο άλλο παράγοντα ο οποίος θα την οδηγήσει έξω από το κύτταρο. Ο παράγοντας αυτός ενδεχομένως είναι είτε κάποια άλλη σαπερόνη του συστήματος, άγνωστη μέχρι σήμερα, είτε κάποια ρυθμιστική πρωτεΐνη, η οποία να παίζει και το ρόλο της σαπερόνης για τον μεταθέτη EspB. Σημαντική υποστήριξη της υπόθεσης αυτής, είναι το γεγονός ότι απουσία του ρυθμιστικού παράγοντα SepD η πρωτεΐνη EspB δεν εκκρίνεται από τα EPEC. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν δεδομένα μέχρι στιγμής που να αποδεικνύουν τον άμεσο ρόλο της SepD σαν σαπερόνη, αλλά ούτε και την ύπαρξη της στα μεγαλομοριακά σύμπλοκα που δημιουργεί ο μεταθέτης EspB κατά την έκκρισή του.

Επιπλέον, στο ίδιο υπο-κυτταρικό κλάσμα, που προκύπτει έπειτα από ήπια διάρρηξη των EPEC, εμφανίζονται δυο μεγαλομοριακά σύμπλοκα μοριακού βάρους περίπου 200 και 140 kDa, τα οποία περιέχουν τόσο τον μεταθέτη EspA όσο και την σαπερόνη του CesAB (p140 και p200 αντίστοιχα). Τα ίδια μεγαλομοριακά σύμπλοκα ανιχνεύονται και κατά την ανάλυση του διαλυτού υποκυτταρικού κλάσματος που προκύπτει από την διάρρηξη των κυττάρων με ηχοβολισμό. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, ανιχνεύεται ένα επιπλέον μεγαλομοριακό σύμπλοκο μοριακής μάζας περίπου 400 kDa, το οποίο απαρτίζεται από τον μεταθέτη EspA αλλά όχι από την σαπερόνη του (p400). Τα σύμπλοκα p140, p200 και p400, χρήζουν προσοχής διότι πιθανόν αποτελούν τεταρτοταγείς δομές που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της έκκρισης του μεταθέτη EspA και απαρτίζονται από παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην

έκκριση αυτού. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο p200 εκτός από την CesAB και την EspA που περιέχει σίγουρα, πρέπει να αποτελείται και από κάποιον τρίτο παράγοντα, διότι σύμφωνα με την στοιχειομετρία των πρωτεϊνών (αναλογία 1:1) (Balabanidou et al, unpublished data) και το μοριακό τους βάρος δεν θα έπρεπε να ανιχνεύονται σε αυτό το ύψος στο πήκτωμα πολυακριλαμίδης. Επιπλέον, όσον αφορά το σύμπλοκο p400, το οποίο περιέχει σίγουρα την EspA, πιθανόν να αποτελεί ένα μεγαλομοριακό πρωτεϊνικό ενδιάμεσο σύμπλοκο που δημιουργείται κατά την διαδικασία της έκκρισης του μεταθέτη, κοντά στην μεμβράνη του κυττάρου και αφού αυτός μεταφερθεί σε κάποιον άλλο παράγοντα από την σαπερόνη CesAB. Αυτά συμπεραίνονται αν λάβουμε υπ' όψιν ότι στο σύμπλοκο αυτό δεν ανιχνεύεται η σαπερόνη CesAB και ότι απελευθερώνεται μόνο μετά από έντονη διάρρηξη των κυττάρων, κατά την οποία μπορούν να αποκολληθούν και μεμβρανικά σύμπλοκα. Με σκοπό τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών οι οποίες απαρτίζουν τα παραπάνω μεγαλομοριακά σύμπλοκα με την μέθοδο φασματομετρία μάζας, απομονώθηκαν τα σύμπλοκα αυτά χρησιμοποιώντας εγγενής συνθήκες απομόνωσης από κολώνα νικελίου έχοντας σαν «δόλωμα» τις πρωτεΐνες EspA και CesAB. Η ανάλυση αυτή ξεκίνησε κατά το τέλος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, με αποτέλεσμα τα δεδομένα που υπάρχουν να είναι πολύ πρώιμα. Μέχρι στιγμής έχουμε επαληθεύσει την ύπαρξη των πρωτεϊνών EspA και CesAB στα σύμπλοκα p140 και p200, κάτι που επιβεβαιώνει ότι τα σύμπλοκα αυτά αποτελούν ενδιάμεσα σύμπλοκα του μονοπατιού έκκρισης της EspA, στο οποίο έχει ζωτικής σημασίας ρόλο η σαπερόνη της, CesAB.

Συνεπώς, το γεγονός ότι τα σύμπλοκα αυτά δημιουργούνται και ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το κύτταρο εκφράζει τις μολυσματικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T3S, και τις διατηρεί ικανές να εκκριθούν, όταν αυτό κριθεί απαραίτητο, χρησιμοποιώντας τις εξειδικευμένες σαπερόνες του συστήματος. Συγκεκριμένα, οι σαπερόνες αυτές, αλληλεπιδρούν με τις μολυσματικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα διατηρώντας τις πρωτεΐνες σε μια μερικώς αποδιαταγμένη κατάσταση, δημιουργώντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό μεγαλομοριακών συμπλόκων. Στην συνέχεια, οι μολυσματικές πρωτεΐνες μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη του κυττάρου με τις σαπερόνες τους. Στο σημείο αυτό ενδεχομένως, να αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες οι οποίοι τελικά θα τις οδηγήσουν έξω από το κύτταρο. Παρόλο όμως, που η θεωρία αυτή μπορεί να ερμηνευτεί μερικώς από τα μέχρι στιγμής δεδομένα που υπάρχουν από τον τρόπο που αλληλεπιδρά η σαπερόνη



CesAB με τα υποστρώματά της, EspA και EspB, δεν έχει ακόμα αποδειχθεί σαν γενικός μηχανισμός έκκρισης από το σύστημα τύπου III και πολλά πειράματα πρέπει να γίνουν ακόμα μέχρι να πιστοποιηθεί.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 6.1 Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

---

#### 6.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

---

Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο Plasmid DNA purification της MACHEREY-NAGEL. Το πρωτόκολλο αυτό κάνει χρήση ρητινών ανιοντικής ανταλλαγής οι οποίες δεσμεύουν το DNA στις κατάλληλες ιοντικές συγκεντρώσεις και σε κατάλληλο pH. Το RNA, οι πρωτεΐνες και οι διάφορες προσμίξεις χαμηλού μοριακού βάρους απομακρύνονται με πλύσεις και το πλασμιδιακό DNA εκλύεται με ρυθμιστικό διάλυμα υψηλής ιοντικής συγκέντρωσης.

#### 6.1.2 Μετασηματισμός επιδεκτικών βακτηριών με πλασμιδιακό DNA.

---

Επιδεκτικά κύτταρα από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  τοποθετούνται για 10 min στον πάγο μέχρι τα κύτταρα να ξεπαγώσουν. 2-10 ng πλασμιδιακού DNA προστίθεται σε 100μL επιδεκτικών κυττάρων και αφήνονται για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ στους  $42^{\circ}\text{C}$  για 45 sec και αμέσως μετά τοποθετούνται στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί προσθήκη 900μL υγρού θρεπτικού LB και επώαση των κυττάρων για 60 min στην κατάλληλη θερμοκρασία υπό ανάδευση. Τέλος μέρος ή ολόκληρη η αντίδραση απλώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB και κατάλληλο αντιβιοτικό και επώάζεται σε κατάλληλη θερμοκρασία για 15 h.

#### 6.1.3 Παρασκευή επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων.

---

Με μία μοναδική αποικία εμβολιάζονται 50 ml Psi broth (θρεπτικό μέσο) και τα κύτταρα επώάζονται ολονύχτια στους  $30^{\circ}\text{C}$ . Με αραιώση 1:100, εμβολιάζουμε 100 ml Psi broth και επώαζουμε στους  $37^{\circ}\text{C}$  έως ότου η οπτική πυκνότητα γίνει ίση με 0.45-0.5 στα 550 nm. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στα 5000 g στους  $4^{\circ}\text{C}$  με απομάκρυνση του υπερκειμένου. Προστίθενται 40 ml παγωμένου διαλύματος TFBI στο καθίζημα των κυττάρων, ακολουθεί ελαφριά επαναδιαλυτοποίηση και το διάλυμα αφήνεται στον πάγο για 15 min. Τα κύτταρα συλλέγονται με μια φυγοκέντρηση για 5

min στα 5000 g στους 4 °C. Το ίζημα επανδιαλυτοποιείται σε 4 ml TFBII και αφήνεται στον πάγο για 30 min. Τέλος τα κύτταρα ψύχονται ανά 100μL σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες του 1,5 ml με την βοήθεια διαλύματος αιθανόλης/ ξηρού πάγου και αποθηκεύονται στους -80°C.

#### **6.1.4 Κατασκευή σημειακών μεταλλαγών στην CesAB πρωτεΐνη**

---

Για την δημιουργία του μεταλλάγματος CesAB( D14L/R18L/E20L) χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα το πλασμίδιο pASK-IBA 7plus-CesAB (D14L/R18L) (pIMBB1109) καθώς και κατάλληλοι εκκινιτές. Η σημειακή μετάλλαξη κατασκευάστηκε με μεταλλαξογένεση σημείου (Quick- Change; Stratagene) χρησιμοποιώντας την *PfuUltra*<sup>TM</sup> High Fidelity DNA polymerase. Επιλεκτικά βακτηριακά στελέχη DH5α μετασχηματίστηκαν με το προϊόν από την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και ελέγχθηκε με αλληλούχιση.

#### **6.2 Καθαρισμός αντισωμάτων έναντι σε διαλυτές πρωτεΐνες του T3S**

---

Μετά την διαδικασία παραγωγής πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών CesAB, EspA, EspB, ο τίτλος του κάθε αντισώματος κρίθηκε ικανοποιητικός, όχι όμως και απόλυτα ειδικός. Για τον λόγο αυτό ακολουθήθηκε η διαδικασία αρνητικής ανοσοπροσρόφησης. Κατά την διαδικασία αυτή, απομονώνονται μεμβρανικά τμήματα κυττάρων EPEC που δεν περιέχουν τις παραπάνω πρωτεΐνες και επωάζονται με τους αντίστοιχους ορούς. Οι μεμβράνες ανανεώνονται κάθε 4-6 ώρες και η διαδικασία απορρόφησης διαρκεί 3 μέρες στους 4°C. Στην παρούσα διατριβή μόνο ο καθαρισμένος ορός χρησιμοποιήθηκε για τις διαδικασίες ανοσοανίχνευσης.

#### **6.3 Διαχωρισμός πρωτεϊνών και πρωτεϊνικών συμπλοκών**

---

##### **6.3.1 Μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση**

---

###### *6.3.1.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)*

---

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ηλεκτροφορικά με βάση το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πρωτεϊνικό μίγμα επεξεργάζεται με ένα ανιονικό απορρυπαντικό, το SDS ( Sodium Dodecyl Sulfate), το

οποίο σπάει τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και οι πρωτεΐνες αναδιατάσσονται. Επίσης, β-μερκαπτοαιθανόλη ή και DTT προστίθενται στο διάλυμα ώστε να σπάσουν τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί. Ένα μόριο SDS αντιστοιχεί σε κάθε δυο αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεϊνικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σύμπλοκο SDS-αποδιαταγμένη πρωτεΐνη με μεγάλο αρνητικό φορτίο. Το σύμπλοκο αυτό είναι ανάλογο του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα γίνεται με βάση τα πρωτόκολλα της Biorad.

#### *6.3.1.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (εγγενής ηλεκτροφόρηση, NATIVE-PAGE)*

---

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία SDS, καλείται μη αποδιατακτική ή εγγενής. Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες μετακινούνται με βάση το υδροδυναμικό τους μέγεθος, αλλά και το φορτίο τους, σε αντίθεση με την SDS ηλεκτροφόρηση, όπου η κινητικότητα μιας πρωτεΐνης καθορίζεται από την μοριακή της μάζα. Η κινητήρια δύναμη στην περίπτωση της εγγενούς ηλεκτροφόρησης είναι το ενδογενές φορτίο της πρωτεΐνης στο pH του διαλύματος τρεξίματος. Το φορτίο αυτό εξαρτάται τόσο από το αμινοξικό περιεχόμενο όσο και από τις τυχόν μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης, για παράδειγμα την προσθήκη σιαλικών οξέων. Εφόσον, η πρωτεΐνη διατηρεί την φυσιολογική της διαμόρφωση, το υδροδυναμικό της μέγεθος και συνεπώς η κινητικότητα της μέσα στο πήκτωμα θα ποικίλει ανάλογα με την διαμόρφωση αυτή (πχ. αυξημένη κινητικότητα για τις πιο συμπαγείς μορφές και ελαττωμένη για τις μεγαλύτερες δομές). Στην παρούσα διατριβή, η ηλεκτροφόρηση αυτού του τύπου διεξήχθη κοντά σε ουδέτερο pH για την αποφυγή αλκαλικής ή όξινης αποδιάταξης, με σκοπό η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της διαμόρφωσης, ολιγομερισμού, συσσωμάτωσης ή και αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες.

#### **6.3.2 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση**

---

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνικών δειγμάτων και όχι μόνο, με υψηλή διαχωριστική ικανότητα. Κατά την διαδικασία αυτή, στην πρώτη διάσταση τα μόρια διαχωρίζονται με βάση μια ιδιότητά τους, και έπειτα στην δεύτερη διάσταση διαχωρίζονται σε κατεύθυνση 90° με βάση μια άλλη ιδιότητα.

Οι ιδιότητες των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό τους είναι κυρίως το ισοηλεκτρικό τους σημείο, η εγγενής τους κατάσταση και η πρωτεϊνική τους μάζα. Όταν διαχωρίζεται δείγμα πρωτεϊνών σε πρώτη διάσταση με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, η διαδικασία ονομάζεται «ισοηλεκτρική εστίαση» (Isoelectric focusing, IEF). Στην περίπτωση αυτή, γίνεται μια διαβάθμιση του pH πάνω σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρικό δυναμικό ασκείται κατά μήκος του πηκτώματος δημιουργώντας ένα θετικό και ένα αρνητικό πόλο στις άκρες αυτού. Σε όλα τα σημεία του πηκτώματος με το διαβαθμισμένο pH, εκτός από το ισοηλεκτρικό τους σημείο, οι πρωτεΐνες θα είναι φορτισμένες και θα μετατοπίζονται προς τον θετικό ή τον αρνητικό πόλο ανάλογα αν είναι φορτισμένες αρνητικά ή θετικά, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες θα συνεχίσουν να μετακινούνται πάνω στο πήκτωμα έως ότου συγκεντρωθούν στο ισοηλεκτρικό τους σημείο, όπου το συνολικό τους φορτίο είναι μηδέν. Μετά το πέρας του πρώτου διαχωρισμού με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται συνήθως με βάση την μοριακή τους μάζα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Στην παρούσα διατριβή, η διδιάστατη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό αγνώστων πρωτεϊνικών δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών αυτών και την σύγκριση των πρωτεϊνών που προήλθαν από διαφορετικές βακτηριακές σειρές.

#### **6.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα πολυακρυλαμίδης**

##### **6.4.1 Χρώση Coomassie Blue**

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση Coomassie Brilliant Blue (R-250) που χρωματίζει με μπλε χρώμα τις πρωτεϊνικές ζώνες και ανιχνεύει πρωτεΐνες μέχρι 0.5μg.

##### **6.4.2 Χρώση Blue Silver**

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση Blue Silver (Coomassie Brilliant Blue, G-250, colloidal) που χρωματίζει με μπλε χρώμα τις πρωτεϊνικές ζώνες και ανιχνεύει πρωτεΐνες μέχρι 0.1μg (Candiano et al).

##### **6.4.3 Χρώση με Νιτρικό Άργυρο**

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης πραγματοποιείται με χρώση Νιτρικού Αργύρου (Silver Nitrate, MERCK) που χρωματίζει με διαβαθμίσεις του μαύρου χρώματος τις πρωτεϊνικές ζώνες και ανιχνεύει πρωτεΐνες μέχρι 0.01 μg

#### **6.4.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με αντισώματα (Western Blot)**

---

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Biorad. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυκλωνικά που παράγονται από κουνέλια και καθαρίστηκαν με βάση το πρωτόκολλο της ενότητας 2.2. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι anti-rabbit IgGs και είναι συζευγμένα με το ένζυμο της HRP (Horseradish peroxidase) το οποίο οξειδώνει το peracid salt (παρουσία λουμινόλης), γεγονός που οδηγεί σε μια ανώτερη οξειδωτική κατάσταση της ομάδας αίμης του HRP ενζύμου. Καθώς το μόριο επιστρέφει στην κατώτερη ενεργειακά κατάσταση παράγονται ρίζες λουμινόλης, εκλύεται φως (χημειοφωταύγεια), η μεμβράνη μαυρίζει και ανιχνεύονται έτσι μόνο οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από το πρώτο αντίσωμα. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ECL (Enhanced Chemiluminescence) από την Pierce.

### **6.5 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών**

---

#### **6.5.1 Χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό φορέα pET**

---

Για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το pET σύστημα. Ένας pET φορέας είναι ένα βακτηριακό πλασμίδιο σχεδιασμένο να βοηθά την γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε πρωτεΐνης, όταν τεθεί σε λειτουργία. Το πλασμίδιο αυτό φέρει κάποια πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά- γονίδιο *lac I* που κωδικοποιεί για τον *lac* καταστολέα, T7 υποκινητή που είναι ειδικός για την T7 RNA πολυμεράση (μη βακτηριακή), *lac* χειριστή που μπορεί να μπλοκάρει τη μεταγραφή, έναν πολυσυνδέτη, *fl* σινιάλο έναρξης της αντιγραφής, γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη και ColEI σινιάλο έναρξης της αντιγραφής. Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο χειριστής δε βρίσκεται σε καταστολή, η μεταγραφή του γονιδίου προχωρά με πολύ γρήγορο ρυθμό. Επειδή ο T7 είναι ιικός υποκινητής μπορεί να μεταγράφει πολύ γρήγορα και ανεξέλεγκτα, αρκεί η T7 RNA πολυμεράση να είναι παρούσα. Η έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης αυξάνει, όσο αυξάνει και το

μεταγραφόμενο mRNA. Μέσα σε λίγες ώρες η πρωτεΐνη αυτή θα αποτελεί το κύριο συστατικό του κυττάρου.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει το μετασχηματισμό του πιο πάνω πλασμιδιακού φορέα στον κατάλληλο βακτηριακό ξενιστή που φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης του φάγου στο γένωμά του (λDE3), το οποίο επίσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *lac* υποκινητή και χειριστή. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος JM109 (DE3). Με την προσθήκη IPTG απομακρύνεται ο *lac* καταστολέας από τον *lac* χειριστή και μέσω της δράσης της πολυμεράσης από το *E. coli* παράγεται η T7 πολυμεράση, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στην έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου. Για να αποφευχθεί η έστω και μικρή παραγωγή της T7 πολυμεράσης και να εκφραστεί με τον τρόπο αυτό και η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, η οποία μπορεί για παράδειγμα να είναι τοξική για το κύτταρο, γίνεται χρήση του προαναφερθέντος βακτηριακού στελέχους που επιπρόσθετα φέρει και το πλασμίδιο pLysS. Το τελευταίο κωδικοποιεί για τη λυσοζύμη, το φυσικό αναστολέα της T7 πολυμεράσης, με αποτέλεσμα να έχουμε πιο αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει κάθε φορά.

Στο τελικό στάδιο πριν την παραγωγή και απομόνωση της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα, γίνονται δοκιμασίες με ανάπτυξη δοκιμαστικών καλλιιεργειών μικρού όγκου για να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες (κατάλληλη θερμοκρασία, συγκέντρωση IPTG στην καλλιέργεια, διάρκεια αύξησης των κυττάρων) για τη σταθερή έκφραση αλλά και τη μεγαλύτερη δυνατή διαλυτότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Όταν όλες οι υπόλοιπες συνθήκες καθοριστούν, προχωράμε στην ανάπτυξη μεγάλου όγκου καλλιιεργειών για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης.

### **6.5.2 Χρησιμοποιώντας πλασμιδιακό φορέα pASK-IBA**

Για την ρυθμιζόμενη επαγωγή έκφρασης μιας πρωτεΐνης καθώς και για την ρύθμιση της ποσότητας παραγωγής αυτής, χρησιμοποιείται η μέθοδος «Ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση μεταγραφής με τετρακυκλίνη» (Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation) κατά την οποία η επαγωγή της μεταγραφής εξαρτάται αυστηρά από την παρουσία ή όχι του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη καθώς και από την συγκέντρωση αυτού. Οι πλασμιδιακοί φορείς pASK-IBA χρησιμοποιούνται για την επαγωγή πρωτεϊνών κάτω από αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης παρουσία του tet υποκινητή. Ο tet καταστολέας εκφράζεται συνεχώς από το πλασμίδιο pASK με

αποτέλεσμα να υπάρχει μια ισορροπημένη στοιχειομετρία ανάμεσα στα μόρια του καταστολέα και στα μόρια του πλασμιδίου. Η έκφραση του επιθυμητού κλωνοποιημένου γονιδίου στον φορέα αυτό καταστέλλεται αποτελεσματικά μέχρις ότου να προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα άνυδρης τετρακυκλίνης στο διάλυμα. Η ποσότητα της επαγόμενης πρωτεΐνης εξαρτάται αποκλειστικά από την συγκέντρωση της άνυδρης τετρακυκλίνης στην καλλιέργεια και αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της δεύτερης. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να ρυθμίσουμε την ποσότητα της πρωτεΐνης που θα παραχθεί. Οι φορείς pASK- IBA σε αυτήν την διατριβή χρησιμοποιήθηκαν κυρίως σε πειράματα συμπληρωματικότητας με γενετικά τροποποιημένες βακτηριακές σειρές EPEC όπου η παραγωγή μιας πρωτεΐνης θέλαμε να είναι σε χαμηλά επίπεδα συγκρίσιμα με αυτά του αγρίου τύπου.

### **6.5.3 Καθαρισμός των His-πρωτεϊνών με Ni<sup>2+</sup>-NTA χρωματογραφία συγγένειας**

Όλες οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο. Ο επίτοπος αυτός έχει ένα τεράστιο πλεονέκτημα που αφορά την εύκολη και γρήγορη απομόνωση της πρωτεΐνης σε καθαρή μορφή με τη μέθοδο της χρωματογραφίας Ni<sup>2+</sup>-NTA. Η ρητίνη που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, περιέχει αγαρόζη ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το νικέλιο μέσω του νιτριλο-τριοξικού οξέος (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης υποκαταστάτη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος Ni<sup>2+</sup>, αφήνοντας δύο θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών. Έτσι τρία ιόντα Ni<sup>2+</sup> αντιστοιχούν σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 6 ιστιδίνες σε ένα από τα άκρα του. Η ρητίνη χρωματογραφίας θα κρατήσει μόνο την πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο και η τυχόν μη ειδική σύνδεση των μεμονωμένων ιστιδινών από άλλες πρωτεΐνες σχεδόν εξαλείφεται με τις εκπλύσεις της ρητίνης με ιμιδαζόλιο.

#### **6.5.3.1. Καθαρισμός πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας αλάτι**

Πλασμιδιακοί φορείς που εκφράζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη από το *E.coli*, πάντα με τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο στο αμινοτελικό άκρο τους, μετασηματίστηκαν σε JM109 DE3/pLysS βακτηριακά κύτταρα. Βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας αναπτύχθηκαν στους 30°C και η πρωτεϊνική σύνθεση ξεκίνησε με την προσθήκη IPTG (0.2mM, A<sub>600</sub>=0.5, 3 ώρες, 30°C). Με το τέλος της τριώρης επαγωγής τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση (6.000g/10 λεπτά/4<sup>0</sup> C) και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα A (50 mM Tris-HCl, pH:8.0, 1



M NaCl, 30 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v). Στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται ο PMSF αναστολέας των πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 2 mM. Ακολουθεί ρήξη των κυττάρων με ηχοβολισμό (10x3', συνολικά 30 λεπτά, 4° C), κατεβάζοντας σε κάθε στάδιο τη θερμοκρασία του κυτταρικού διαλύματος με ανάδευση σε διάλυμα αιθανόλης/ξηρού πάγου. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (100.000g/30 λεπτά/ 4° C). Συλλέγουμε το υπερκείμενο και το φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει την ρητίνη Ni<sup>2+</sup>-NTA, προ-εξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος A, ρυθμίζοντας το ρυθμό ροής ώστε αυτός να μην ξεπερνά το 1ml/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (flow through, FT) και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος A. Οι εκπλύσεις στη συνέχεια συνεχίζονται με 5 όγκους του διαλύματος B με χαμηλή περιεκτικότητα αλατιού (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v) και τελικά η πρωτεΐνη εκλύεται με 5 όγκους διαλύματος με 600 mM ιμιδαζόλιο. Η συλλογή των κλασμάτων έκλυσης γίνεται συνήθως σε μισό όγκο από αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί ανάλυση της καθαρότητας των δειγμάτων με SDS-PAGE, όπου τελικά τα δείγματα έκλυσης με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ενώνονται. Τα ενωμένα κλάσματα υπόκεινται πρώτα σε 12ωρη διαπίδυση ενάντια στο κατάλληλο διάλυμα (50 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% γλυκερόλη v/v) και στην συνέχεια αποθηκεύονται σε διάλυμα 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50% γλυκερόλη v/v.

#### 6.5.3.2. Καθαρισμός πρωτεϊνικών συμπλόκων κάτω από εγγενής συνθήκες

Πλασμιδιακοί φορείς pASK-IBA που εκφράζουν την επιθυμητή πρωτεΐνη που θα χρησιμοποιήσουμε σαν «δόλωμα», πάντα με τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο στο αμινοτελικό άκρο τους, μετασηματίστηκαν σε *EPEC* βακτηριακές σειρές στις οποίες το γονίδιο της εκάστοτε πρωτεΐνης δόλωμα έχει εξαλειφτεί. Βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας αναπτύχθηκαν στους 37°C και η πρωτεϊνική σύνθεση ξεκίνησε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας άνυδρης τετρακυκλίνης, ( $A_{600}=0.3$ , 3 ώρες, 37°C). Με το τέλος της τριώρης επαγωγής τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6.000g/10 λεπτά/4° C) και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα A (50 mM Tris-HCl, pH:8.0, 10% γλυκερόλη v/v). Στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται ο PMSF αναστολέας των πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 2 mM. Ακολουθεί ρήξη των κυττάρων με ηχοβολισμό (10x3',

συνολικά 30 λεπτά, 4° C), κατεβάζοντας σε κάθε στάδιο τη θερμοκρασία του κυτταρικού διαλύματος με ανάδευση σε διάλυμα αιθανόλης/ξηρού πάγου. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (100.000g/30 λεπτά/ 4° C). Συλλέγουμε το υπερκείμενο και το φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει την ρητίνη Ni<sup>2+</sup>-NTA, προεξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος A, ρυθμίζοντας το ρυθμό ροής ώστε αυτός να μην ξεπερνά το 1ml/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (flow through, FT) και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος A στο οποίο προσθέτουμε 5mM ιμιδαζόλιο. Οι εκπλύσεις στη συνέχεια συνεχίζονται με 5 όγκους του διαλύματος B (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM KCl, 50 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v) και τελικά η πρωτεΐνη εκλύεται με 2 όγκους διαλύματος B με 600 mM ιμιδαζόλιο. Τα κλάσματα έκλυσης που προκύπτουν ενώνονται σε ένα και συγκεντρώνονται σε ελάχιστο όγκο ώστε όλο το προϊόν να αναλυθεί με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

#### **6.5.4 Απομόνωση πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακριλαμίδης και τρυψινόλυση αυτών.**

Οι πρωτεϊνικές προς μελέτη ζώνες απομονώνονται και κόβονται ώστε το ελάχιστο μέγεθος του πηκτώματος να είναι 1mm x 1mm. Τοποθετούνται στη συνέχεια, σε δοκιμαστικούς σωλήνες του 1.5ml. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των κομματιών του πηκτώματος με 50%v/v acetonitrile και 50mM Ammonium Biscarbonate (ABS) για 15 λεπτά η καθεμία. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές και συμβάλλει στο “ξέβαμα” των πρωτεϊνικών ζωνών από την χρώση. Στην συνέχεια γίνεται αναγωγή των κυστεϊνών με προσθήκη 10 mM DTT / σε 50mM ABS για 45 min στους 56 °C. Ακολουθεί προσθήκη 55mM Iodoacetamide / σε 50mM ABS για 45 λεπτά υπό ανάδευση σε συνθήκες σκότους, για την οξειδωση των ελεύθερων κυστεϊνών. Πραγματοποιούνται δύο πλύσεις των κομματιών του πηκτώματος με 50%v/v acetonitrile και 50 mM Ammonium Biscarbonate (ABS) για 15 λεπτά η καθεμία. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Οι πρωτεΐνες επωάζονται για τουλάχιστον 15 ώρες με 0.1 mM τρυψίνη σε 50mM ABS στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέους σωλήνες Low-Binding Eppendorf. Τα κομμάτια του πηκτώματος ξεπλύνονται με Nano pure H<sub>2</sub>O για 20 λεπτά υπό ανάδευση. Το υπερκείμενο μεταφέρεται στους νέους σωλήνες Low-Binding Eppendorf. Ακολουθούν δυο επιπλέον πλυσίματα με 50%v/v acetonitrile και

0.1%v/v TFA/50% Acetonitrile για 20 λεπτά το καθένα. Τέλος συγκεντρώνουμε όλα τα υπερκείμενα στους νέους σωλήνες Low-Binding Eppendorf (περιέχουν τα πεπτίδια που προέκυψαν από την πέψη με την τρυψίνη), πραγματοποιείται λυοφιλοποίηση σε Speedvac σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C.

## **6.6 Βιοχημικές Διαδικασίες**

---

### **6.6.1 Έκκριση πρωτεϊνών *in vitro* από στελέχη EPEC σε σχέση με τον χρόνο.**

---

#### *6.6.1.1 Έκκριση πρωτεϊνών *in vitro* από αγρίου τύπου EPEC σε σχέση με τον χρόνο*

---

Η έκκριση πρωτεϊνών *in vitro* επάγεται με επώαση αγρίου τύπου EPEC καλλιέργειών στους 37°C σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Μέρος από την καλλιέργεια συλλεγόταν σε διάφορα χρονικά σημεία ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα και το μέσο αύξησης διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 20.000g και στους 4° C. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες που εκκρίθηκαν στο μέσο αύξησης κατακρημνίστηκαν με τριχλωρο-οξικό οξύ (20 % v/v; 30 λεπτά; 4 °C). Η περίσσια του τριχλωρο-οξικού οξέος απομακρύνθηκε με διαδοχικές πλύσης παγωμένης ακετόνης. Τελικά, τα εκκρινόμενα πολυπεπτίδια και οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με 15% SDS-PAGE και ακολούθησε άνοσο αποτύπωση χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις EspA, EspB και CesAB.

#### *6.6.1.2 Έκκριση πρωτεϊνών *in vivo* από στελέχη EPEC σε σχέση με τον χρόνο*

---

Έκκριση πρωτεϊνών *in vivo* επάγεται με επώαση EPEC καλλιέργειών στους 37°C σε θρεπτικό μέσο Luvia Broth (LB). Όλα τα υπό μελέτη γονίδια κλωνοποιήθηκαν κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της τετρακυκλίνης (tetracycline inducible promoter) και η έκφραση των διαφόρων γονιδίων επάχθηκε με την προσθήκη 0.2 mg/l ανυδρο-τετρακυκλίνης (IBA, Germany) στη βακτηριακή καλλιέργεια, όταν η οπτική πυκνότητα έφτανε 0.3. Μέρος από την καλλιέργεια συλλεγόταν σε διάφορα χρονικά σημεία ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα και το μέσο αύξησης διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 20.000g και στους 4° C. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες που εκκρίθηκαν στο μέσο αύξησης κατακρημνίστηκαν με τριχλωρο-οξικό οξύ (20 % v/v; 30 λεπτά; 4 °C). Η περίσσια του τριχλωρο-οξικού οξέος απομακρύνθηκε με διαδοχικές πλύσης παγωμένης ακετόνης. Τελικά, τα εκκρινόμενα πολυπεπτίδια και οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με 15%

SDS-PAGE και ακολούθησε άνοσο αποτύπωση χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις EspA, EspB και CesAB.

### **6.6.2 Υπο-κυτταρική κλασμάτωση**

---

Για να διαχωριστούν οι συνολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες του κυττάρου από τις υδατοδιαλυτές, βακτήρια EPEC αγρίου τύπου αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κατάλληλες για έκκριση, και το κυτταρικό ίζημά τους συλλέχθηκε. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και τα κύτταρα λύθηκαν ύστερα από ηχοβολισμό στον πάγο. Με φυγοκέντρωση στα 6.000g για 10 λεπτά απομακρύνθηκαν όλα τα άρρηκτα κύτταρα ως ίζημα, ενώ το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρωσης φυγόκεντρηθηκε ξανά στα 100.000 g/30 λεπτά /4°C. Το υπερκείμενο σε αυτή την περίπτωση αποτελεί το διαλυτό-κυτταροπλασματικό τμήμα του κυττάρου, ενώ το ίζημα περιείχε όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (ενσωματωμένες ή περιφερικά συνδεδεμένες).

Εναλλακτικά η μέθοδος του παγώματος/ξεπαγώματος (freeze/thaw) χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Εδώ, τα κύτταρα αρχικά επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, πάγωσαν σε διάλυμα ξηρού πάγου/αιθανόλης και στη συνέχεια έλιωσαν στους 30°C. Μετά από 5 κύκλους παγώματος και ξεπαγώματος, το κυτταρικό διάλυμα φυγόκεντρηθηκε στα 100.000 g/30 λεπτά/4 °C, ενώ οι πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αυτής αντιπροσωπεύουν ένα συγκεκριμένο υπο-κυτταρικό κλάσμα (mild lysis fraction).

Το κλάσμα αυτό χαρακτηρίστηκε με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, καθώς περιείχε επιλεκτικά τις πρωτεΐνες με ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτή (CesAB, EspB και EspA).

## **6.7 Χρήση κυτταρικών μοντέλων**

---

### **6.7.1 Επιμόλυνση κυττάρων HeLa**

---

Βακτηριακές καλλιέργειες EPEC στελεχών μετά από 18ωρη αύξηση σε θρεπτικό μέσο LB αραιώθηκαν (1/100) σε DMEM θρεπτικό για κυτταροκαλλιέργειες, προθερμασμένο στους 37 °C, και επώαστηκαν για 3 ώρες στους 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, ακίνητα (priming). Στην συνέχεια μονοστοιβάδες HeLa κυττάρων, που είχαν αναπτυχθεί σε γυάλινες καλυπτρίδες, επώαστηκαν για 2 ώρες με 500 μl των

παραπάνω προετοιμασμένων βακτηρίων. Τα μη προσκολλημένα βακτήρια απομακρύνθηκαν με διαδοχικά ξεπλύματα με διάλυμα PBS, και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 3% παραφορμαλδεϋδης (PFA) σε PBS για 20 λεπτά. Η PFA απομακρύνθηκε με νέα ξεπλύματα και στην συνέχεια τα κύτταρα έγιναν διαπερατά με διάλυμα 0.1% TRITON X-100 σε PBS. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με διάλυμα αντισωμάτων  $\alpha$ -EspA (1/500) για 30 λεπτά και τελικά τα EspA ινίδια ανιχνεύτηκαν με Goat  $\alpha$ -rabbit αντίσωμα (1/200 αραιώση) συνδεδεμένο με το φθοροφόρο TRITC (488 nm, κόκκινο χρώμα). Παράλληλα η κυτταρική ακτίνη ανιχνεύτηκε με διάλυμα phalloidin-fluorescein-isothiocyanate (1/500 αραιώση) (πράσινο χρώμα) και το DNA με διάλυμα TOPRO (1/1000 αραιώση) (μπλε χρώμα). Για την λήψη φωτογραφιών των επιμολυσμένων ευκαρυωτικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο συνεστίασης της Biorad.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. O'Connell, C.B., et al., *SepL, a protein required for enteropathogenic Escherichia coli type III translocation, interacts with secretion component SepD*. Mol Microbiol, 2004. **52**(6): p. 1613-25.
2. Vallance, B.A. and B.B. Finlay, *Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8799-806.
3. Robins-Browne, R.M., *Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea*. Rev Infect Dis, 1987. **9**(1): p. 28-53.
4. Bower, J.R., et al., *Escherichia coli O114:nonmotile as a pathogen in an outbreak of severe diarrhea associated with a day care center*. J Infect Dis, 1989. **160**(2): p. 243-7.
5. Senerwa, D., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(6): p. 1307-11.
6. DeVinney, R., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(6-7): p. 961-76.
7. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
8. Donnenberg, M.S., et al., *Effect of prior experimental human enteropathogenic Escherichia coli infection on illness following homologous and heterologous rechallenge*. Infect Immun, 1998. **66**(1): p. 52-8.
9. Cornelis, G.R. and F. Van Gijsegem, *Assembly and function of type III secretory systems*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 735-74.
10. Frankel, G., et al., *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements*. Mol Microbiol, 1998. **30**(5): p. 911-21.
11. McNamara, B.P. and M.S. Donnenberg, *A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic Escherichia coli via the type III export pathway*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **166**(1): p. 71-8.
12. Abe, A., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion*. Mol Microbiol, 1999. **33**(6): p. 1162-75.
13. Wainwright, L.A. and J.B. Kaper, *EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1998. **27**(6): p. 1247-60.
14. Elliott, S.J., et al., *A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic Escherichia coli to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2271-7.
15. Neves, B.C., et al., *CesD2 of enteropathogenic Escherichia coli is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 2130-41.
16. Creasey, E.A., et al., *CesAB is an enteropathogenic Escherichia coli chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3639-47.
17. Kubori, T., et al., *Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system*. Science, 1998. **280**(5363): p. 602-5.
18. Rosqvist, R., K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz, *Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells*. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 964-72.

19. Sekiya, K., et al., *Supramolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11638-43.
20. Tamano, K., S. Aizawa, and C. Sasakawa, *Purification and detection of Shigella type III secretion needle complex*. Methods Enzymol, 2002. **358**: p. 385-92.
21. Tamano, K., et al., *Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors*. EMBO J, 2000. **19**(15): p. 3876-87.
22. Cornelis, G.R., *The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 742-52.
23. Knutton, S., et al., *A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells*. Embo J, 1998. **17**(8): p. 2166-76.
24. Blocker, A., et al., *Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secretin*. Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 652-63.
25. Blocker, A., K. Komoriya, and S. Aizawa, *Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(6): p. 3027-30.
26. Feldman, M.F., et al., *SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the Yersinia enterocolitica type III Ysc system*. Mol Microbiol, 2002. **46**(4): p. 1183-97.
27. Woestyn, S., et al., *YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery*. J Bacteriol, 1994. **176**(6): p. 1561-9.
28. Blocker, A., et al., *The tripartite type III secretin of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 683-93.
29. Sory, M.P. and G.R. Cornelis, *Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells*. Mol Microbiol, 1994. **14**(3): p. 583-94.
30. Pettersson, J., et al., *The V-antigen of Yersinia is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation*. Mol Microbiol, 1999. **32**(5): p. 961-76.
31. Sarker, M.R., et al., *The Yersinia Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD*. J Bacteriol, 1998. **180**(5): p. 1207-14.
32. Hakansson, S., et al., *The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity*. EMBO J, 1996. **15**(21): p. 5812-23.
33. Dacheux, D., et al., *Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages*. Mol Microbiol, 2001. **40**(1): p. 76-85.
34. Shaw, R.K., et al., *EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells*. Cell Microbiol, 2001. **3**(4): p. 213-22.
35. Feldman, M.F. and G.R. Cornelis, *The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **219**(2): p. 151-8.
36. Ghosh, P., *Process of protein transport by the type III secretion system*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(4): p. 771-95.
37. Parsot, C., C. Hamiaux, and A.L. Page, *The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(1): p. 7-14.
38. Wattiau, P., S. Woestyn, and G.R. Cornelis, *Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria*. Mol Microbiol, 1996. **20**(2): p. 255-62.
39. Luo, Y., et al., *Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(12): p. 1031-6.

40. Birtalan, S.C., R.M. Phillips, and P. Ghosh, *Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 971-80.
41. Buttner, C.R., et al., *Crystal structure of Yersinia enterocolitica type III secretion chaperone SycT*. Protein Sci, 2005. **14**(8): p. 1993-2002.
42. Birtalan, S. and P. Ghosh, *Structure of the Yersinia type III secretory system chaperone SycE*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(11): p. 974-8.
43. Boyd, A.P., I. Lambermont, and G.R. Cornelis, *Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE*. J Bacteriol, 2000. **182**(17): p. 4811-21.
44. Page, A.L. and C. Parsot, *Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades*. Mol Microbiol, 2002. **46**(1): p. 1-11.
45. Swietnicki, W., et al., *Novel protein-protein interactions of the Yersinia pestis type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 38693-700.
46. Letzelter, M., et al., *The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones*. EMBO J, 2006. **25**(13): p. 3223-33.
47. Krall, R., Y. Zhang, and J.T. Barbieri, *Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and Yersinia YopE in mammalian cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2747-53.
48. Cornelis, G.R., *The type III secretion injectisome*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 811-25.
49. Neyt, C. and G.R. Cornelis, *Role of SycD, the chaperone of the Yersinia Yop translocators YopB and YopD*. Mol Microbiol, 1999. **31**(1): p. 143-56.
50. Yip, C.K., B.B. Finlay, and N.C. Strynadka, *Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 75-81.
51. Donnenberg, M.S., J.B. Kaper, and B.B. Finlay, *Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and host epithelial cells*. Trends Microbiol, 1997. **5**(3): p. 109-14.
52. Levine, M.M., et al., *The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic Escherichia coli is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor*. J Infect Dis, 1985. **152**(3): p. 550-9.
53. Kenny, B., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract*. Infect Immun, 1997. **65**(7): p. 2606-12.
54. Kresse, A.U., M. Rohde, and C.A. Guzman, *The EspD protein of enterohemorrhagic Escherichia coli is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4834-42.
55. Warawa, J., B.B. Finlay, and B. Kenny, *Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5538-40.
56. Taylor, K.A., P.W. Luther, and M.S. Donnenberg, *Expression of the EspB protein of enteropathogenic Escherichia coli within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 120-5.
57. Rosenshine, I., et al., *A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation*. EMBO J, 1996. **15**(11): p. 2613-24.
58. Warawa, J. and B. Kenny, *Phosphoserine modification of the enteropathogenic Escherichia coli Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation*. Mol Microbiol, 2001. **42**(5): p. 1269-80.



59. Shaw, R.K., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli translocate Tir and form an intimin-Tir intimate attachment to red blood cell membranes*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 5): p. 1355-65.
60. Knutton, S., et al., *Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun, 1989. **57**(4): p. 1290-8.
61. Goosney, D.L., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli inhibits phagocytosis*. Infect Immun, 1999. **67**(2): p. 490-5.
62. Sanger, J.M., et al., *Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 1996. **34**(4): p. 279-87.
63. Kalman, D., et al., *Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(6): p. 389-91.
64. Deng, W., et al., *A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of Citrobacter rodentium*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6790-800.
65. Deng, W., et al., *Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2135-46.
66. Levine, M.M., et al., *Escherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive*. Lancet, 1978. **1**(8074): p. 1119-22.
67. Pombinho, A.R., et al., *Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost Sparus aurata; evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix Gla protein and osteocalcin*. Cell Tissue Res, 2004. **315**(3): p. 393-406.
68. Kenny, B. and B.B. Finlay, *Protein secretion by enteropathogenic Escherichia coli is essential for transducing signals to epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7991-5.
69. Crepin, V.F., et al., *Structural and functional properties of chimeric EspA-FliC*i* filaments of EPEC*. J Mol Biol, 2008. **378**(1): p. 243-50.
70. Macville, M., et al., *Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 141-50.
71. Wang, D., et al., *Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from Escherichia coli O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir*. Mol Microbiol, 2008. **69**(6): p. 1499-512.