

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ

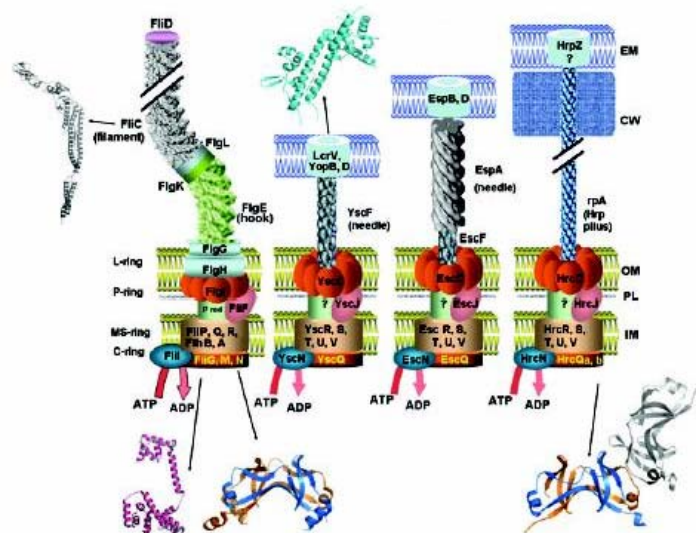
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Της

ΧΑΡΟΒΑ ΣΠΥΡΙΔΟΥΛΑΣ

Με θέμα

"Καθαρισμός και μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ
πρωτεϊνών που δομούν το Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III σε
παθογόνα βακτήρια"



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ν. Ι. ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ
ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΤΗΣ: Μ. Ι. ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

**ΥΠΟΓΡΑΦΕΣ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΩΝ:****ΝΙΚΟΛΑΟΣ Ι. ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΣ****ΜΙΧΑΛΗΣ Ι. ΚΟΚΚΙΝΙΔΗΣ**

Στους γονείς μου φυσικά
και σε όσους χαίρονται όταν με βλέπουν...

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μιας που, και αυτό το επεισόδιο του προσωπικού μου σίριαλ έφτασε στο τέλος του, θα ήταν αχαριστία εάν δεν ‘θυμόμουν’ όλους εκείνους που έπαιξαν τον ρόλο του ηθικού αυτουργού, είτε το ξέρουν είτε όχι...

Ευχαριστώ λοιπόν....

...Το πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας Φυτών που μου έδωσε την ευκαιρία να ανοίξω τα φτερά μου στον επιστημονικό στίβο.

...Το Κοινωφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης, για την υποτροφία που μου παρείχε καθ’ όλη τη διάρκεια του έτους, χάρη στην οποία κατάφερα να πραγματοποιήσω την εργασία μου αυτή...Είθε να στηρίζει πάντα τους νέους επιστήμονες της χώρας με τον τρόπο που στήριξε εμένα...

...Τον καθηγητή μου και κύριο επιβλέποντα της εργασίας μου κ. Πανόπουλο για όλα... για την επιστημονική επίβλεψη, τους προβληματισμούς, τις συζητήσεις, την συμπαράσταση, την έγνοια, το χιούμορ του...στάθηκε αληθινός επιστημονικός πατέρας και τον ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου...

...Τον δεύτερο επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μου κ. Κοκκινίδη για τις μακροσκελείς συζητήσεις ερμηνείας αποτελεσμάτων, την ουσιαστική καθοδήγηση στα ‘πρωτεϊνικά’ μου θέματα και όχι μόνο, για τον καταπληκτικό του τρόπο να ανακουφίζει τα άγχη μου και την αδιάκοπη παρουσία του δίπλα μου όποτε τον χρειάστηκα...

...Την Δρ. Ταμπακάκη για την διάθεση των πλασμιδιακών κατασκευών pET16B/HrcU C199, pET16B/HrcN C259, pT₇₋₇/HrcU C199, pT₇₋₇/HrcN C259, pT₇₋₇/HrcN, pT₇₋₇/HrcN N261, pT₇₋₇/HrcP και των φορέων pET26B & pDN18. Επίσης, την ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγησή της στα μικρά και μεγάλα πειραματικά μου αδιέξοδα.

...Τη Λιλίκα Σαραφίδου και τη Μαρία Κοκκινάκη από το εργαστήριο Μοριακής Γενετικής Ανθρώπου για την πρόθυμη βοήθειά τους να με μνήσουν στο σύστημα συγγένειας GST και να μου παράσχουν όλα τα απαραίτητα.

...Τη Ντίνα Κοτσιφάκη, τεχνικό του εργαστηρίου Κρυσταλλογραφίας για την ενασχόλησή της με τον καθαρισμό της πρωτεΐνης HT_{N10}-HrcU C199 σε μεγάλη κλίμακα, και την διενέργηση χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Η συνεργασία μας ήταν άψογη.

...Την υποψήφια διδάκτωρ Γαζή Αναστασία για τη διάθεση των πλασμιακών κατασκευών pPROEX-AvrPphF-ORF1, pPROEX-AvrPphF-ORF2 & pPROEX-AvrPphF-ORF1-ORF2, και για τη διάθεση της καθαρισμένης πρωτεΐνης AvrPphF-ORF1. Τη Δρ. Βίκυ Φαδούλογλου για τη διάθεση καθαρισμένης πρωτεΐνης HrcQb. Αλλά περισσότερο και πάνω και πέρα από τίτλους, ευχαριστώ την Τάνυα και τη Βίκυ για την αδελφосύνη, την αγάπη και τη συμπαράστασή τους...για τις πειραματικές ιδέες τους που ανιδιοτελώς μοιράστηκαν μαζί μου και που συχνά με 'ξελάσπωσαν' και με ώθησαν παραπέρα...

...Τον Νίκο και τον Παναγιώτη που ανέχτηκαν τις παραξενιές μου στο εργαστήριο για έναν ολόκληρο χρόνο...Την Μαρίνα που ήταν πρόθυμη να μου παράσχει τη βοήθειά της όποτε τη χρειάστηκα.

...Τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα και ιδιαίτερα την Ιωαννούλα, την Κατερίνα και το Νικολάκη για τη φοβερή παρέα, το κουτσομπολιό και τις αποδράσεις...

...Τους φίλους μου σε Ηράκλειο και Αθήνα που διαφύλαξαν (μάλλον εν αγνοία τους) την ψυχική μου υγεία και έτσι γλίτωσα τα χρήματα του ψυχαναλυτή...

...Και τελευταία αλλά όχι λιγότερο σημαντική, την οικογένεια...τι κι αν είμαι μακριά, πάλι κοντά σας είμαι...Ελπίζω να καμαρώνετε...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	6
Περίληψη	11
Εισαγωγή	
<i>Το φυτοπαθογόνο Pseudomonas syringae</i>	15
<i>Το Τύπου III Εκκριτικό Σύστημα (TTSS)</i>	15
<i>Η νησίδα παθογένειας hrp</i>	16
<i>Η δομή της εκκριτικής μηχανής τύπου III</i>	17
<i>Οικογένειες συντηρημένων πρωτεϊνών της συσκευής έκκρισης</i>	19
<i>Effectors & σαπερόνες</i>	20
<i>Η οικογένεια FlhB/ YscU/ HrcU</i>	21
Σκοπός της εργασίας	24
Υλικά & Μέθοδοι	
1. Απομόνωση μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA από <i>E.coli</i> με την βοήθεια κολόνας ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN).....	26
2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	26
3. Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού.....	28
4. Απομόνωση ζώνης DNA από gel αгарόζης.....	28
5. Αντίδραση λιγάσης.....	29
6. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων	
➤ Για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (heat-shock).....	29
➤ Για μετασχηματισμό με ηλεκτροσόκ.....	30
7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων	
➤ Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τη μέθοδο του θερμικού σοκ.....	30
➤ Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο του ηλεκτροσόκ.....	30
8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (minipreps).....	31
9. Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση.....	32
10. Αποτύπωση αποικίας (colony blot) για την ανίχνευση μετασχημα-	

τισμένων κλώνων που εκφράζουν την ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη.....	32
11. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα, (mini inductions) από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS), για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης.....	33
12. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών διαφόρων όγκων καλλιέργειας κυττάρων BL21(DE3)(pLysS), μετασχηματισμένων με το αντίστοιχο ανασυνδυσασμένο πλασμίδιο έκφρασης.....	33
13. Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό μη αποδιατακτικές (native) συνθήκες.....	34
14. Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες	
➤ από άθικτα κύτταρα.....	34
➤ από την πελέτα λυμένων κυττάρων.....	34
15. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αραρόζης, υπό φυσικές (native) συνθήκες.....	35
16. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αραρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	36
17. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από την πελέτα λυμένων κυττάρων και επαναδιάταξή της πάνω στη στήλη συγγένειας Ni-NTA αραρόζης.....	36
18. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διάλυμα με τη μέθοδο Bradford.....	37
19. Συμπύκνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με κατακρήμνιση με ακετόνη.....	37
20. Πέψη HT-πρωτεϊνών με την ειδική πρωτεάση Xa factor.....	38
21. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης.....	38
22. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	39
23. Χρόση της πηκτής με κυανό του Coomassie και αποχρωματισμός.....	40

24. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	40
25. Dot blot πρωτεϊνών.....	41
26. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών αποτυπωμένων σε μεμβράνη	
A) με ειδικό αντίσωμα.....	41
B) με το μόριο Ni-NTA AP conjugate.....	42
27. Μέθοδος gel overlay.....	42
28. Επαγωγή του τύπου III εκκριτικού συστήματος από κύτταρα	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> , στέλεχος Psp3121.....	43
29. Προετοιμασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έκλουσης	
από στήλη Ni-NTA αφαρόζης για ανάλυσή του σε κολώνα	
μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (gel filtration).....	44
Αποτελέσματα	
Εισαγωγή.....	47
A) Χαρακτηρισμός HrcU C199.....	56
1. Καθαρισμός της πρωτεΐνης His _{N10} -HrcU C199	
από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) με χρήση στήλης	
συγγένειας Ni-NTA αφαρόζης.....	56
2. Κοπή της πρωτεΐνης His _{N10} -HrcU C199 με τον παράγοντα Χα.....	57
3. Καθαρισμός της πρωτεΐνης His _{N10} -HrcU C199 από	
κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μεγάλη κλίμακα (2Lt καλλιέργειας)	
και προετοιμασία της για FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).....	57
4. Κλωνοποίηση του γονιδιακού θραύσματος HrcU C199	
στον φορέα έκφρασης pET26b.....	59
5. Αποτύπωση αποικίας (dot blot) από το πιάτο	
μετασηματισμού pET26b/HrcU C199 σε κύτταρα BL21(DE3)(pLysS).....	61
6. Επαγωγή της πρωτεΐνης HT _{C5} -HrcU C199 από	
κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μικρή κλίμακα.....	62
7. Αποδιατακτικός καθαρισμός των πρωτεϊνών	
His _{N10} -HrcU C199 και HT _{C5} -HrcU C199 από κύτταρα	
BL21(DE3)(pLysS) για σύγκριση των δύο προτύπων καθαρισμού.....	63
B) Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων της HrcU C199	

με άλλες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, όπως και μεταξύ άλλων πρωτεϊνών.....	64
1. Προσέγγιση χρήσης του βακτηριακού στελέχους <i>BL21(DE3)(pPL6)</i>	64
A. Μετασηματισμός του στελέχους <i>BL21(DE3)(pPL6)</i> με το πλασμίδιο <i>pET16b/HrcU C199</i> , επαγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης <i>His_{N10}-HrcU C199</i> υπό αποδιατακτικές και μή, συνθήκες.....	65
B. Μετασηματισμός του στελέχους <i>BL21(DE3)(pPL6)</i> με το πλασμίδιο <i>pET26b/HrcU C199</i> , επαγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης <i>HT_{C5}-HrcU C199</i> υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.....	66
2. Προσέγγιση συγκαθαρισμού πρωτεϊνών που συνεκφράζονται στο ίδιο κύτταρο: το ζεύγος <i>HrcU C199/HrcN C259</i>	67
3. Προσέγγιση συγκαθαρισμού πρωτεϊνών που εκφράζονται από διαφορετικά κύτταρα.....	72
A) το ζεύγος <i>HrcU C199/HrcN</i>	72
B) το ζεύγος <i>HrcU C199/HrcN N261</i>	74
Γ) το ζεύγος <i>HrcU C199/HrcN C259</i>	75
Δ) τα ζεύγη <i>HrcN C259/AvrPphF ORF1</i> , <i>HrcN C259/AvrPphF ORF2</i> και <i>HrcN C259/AvrPphF ORF1-ORF2</i>	76
E) το ζεύγος <i>HrcU C199/HrcN C259</i> με αντιστροφή του <i>His-tag</i>	79
ΣΤ) το ζεύγος <i>HrcU C199/HrpP</i>	80
4. Απόπειρα χρήσης συστήματος καθαρισμού συγγένειας της <i>GST</i>	81
5. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών <i>His_{N10}-HrcU C199</i> και <i>AvrPphF ORF1</i> μαζί με αρνητικούς μάρτυρες, αποτύπωση σε μεμβράνες, <i>gel overlay</i> με καθαρισμένη πρωτεΐνη <i>HrcN C259</i> και <i>western</i> με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα.....	82
6. Αποτύπωση κουκίδας (<i>dot blot</i>), <i>overlay</i> με καθαρισμένη πρωτεΐνη <i>HrcN C259</i> και <i>western</i> με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα.	83
7. Προσέγγιση επαγωγής του ψευδομοναδικού <i>TTSS</i> με ακόλουθο συγκαθαρισμό των πρωτεϊνών <i>His_{N10}-HrcU C199/HrcN_{Ps3121}</i>	87

Συζήτηση

<i>A. Χαρακτηρισμός HrcU C199.....</i>	90
<i>B) Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων της HrcU C199 με άλλες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, όπως και μεταξύ άλλων πρωτεϊνών.....</i>	92
➤ <i>Αξιολόγηση μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν.....</i>	92
➤ <i>Αξιολόγηση ζευγών αλληλεπιδράσεων που εξετάστηκαν.....</i>	94
Μελλοντικές Προοπτικές.....	96
Βιβλιογραφία.....	99

*If the doors of perception were cleansed everything would
appear to man as it is, infinite.* —William Blake

Εισαγωγή



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae*

Το Gram-αρνητικό βακτηριακό παθογόνο *Pseudomonas syringae* περιλαμβάνει περίπου 40 παθότυπους (pathovars) συνολικά που προκαλούν ασθένειες σε εκατοντάδες φυτικών ειδών. Διαφορετικοί παθότυποι του παθογόνου αυτού συχνά παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης παθογόνου ως προς λίγα φυτικά είδη ή μόνο μερικές ποικιλίες εντός των φυτικών ειδών. Στη φύση, οι παθότυποι του *Pseudomonas syringae* συχνά ζουν στις επιφάνειες του φυτού-ξενιστή (επιφυτική φάση), και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στους διακυττάριους χώρους του μολυσμένου φυτικού οργάνου (ενδοφυτική φάση). Εφόσον το φυτό είναι ευπαθές, το παθογόνο πολλαπλασιάζεται ενδοφυτικά σε υψηλό βαθμό (10^5 - 10^6 άνω του αρχικού μολύσματος) για μερικές μέρες πριν την εμφάνιση οποιουδήποτε μακροσκοπικού συμπτώματος, που συνήθως είναι η νέκρωση του ιστού (συμβατές αλληλεπιδράσεις, compatible interactions). Σε ανθεκτικά φυτά (είδη μη-ξενιστές) ή σε ανθεκτικές ποικιλίες του είδους του ξενιστή, το παθογόνο δεν πολλαπλασιάζεται ή πολλαπλασιάζεται σε περιορισμένο βαθμό ή καθόλου (ασύμβατες αλληλεπιδράσεις, incompatible interactions) και το παθογόνο θεωρείται 'αμολυσματικό' (avirulent). Ωστόσο, όταν μια υψηλή συγκέντρωση ενός τέτοιου μη παθογόνου στελέχους εγχυθεί τεχνητά στους διακυττάριους χώρους ενός φυτού μη-ξενιστή ή μιας ανθεκτικής ποικιλίας ενός φυτού ξενιστή, ο εμποτισμένος ιστός συχνά υφίσταται ραγδαία νέκρωση, φαινόμενο που είναι γνωστό ως αντίδραση υπερευαισθησίας (HR, Hypersensitivity Response). Η αντίδραση υπερευαισθησίας έχει πολλά χαρακτηριστικά απόπτωσης (προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου) και θεωρείται ότι είναι η μακροσκοπική εκδήλωση της φυτικής απόκρισης ανθεκτικότητας.

Το Τύπου III Εκκριτικό Σύστημα (TTSS)

Η ικανότητα των παθοτύπων του *Pseudomonas syringae* να πολλαπλασιάζονται ενδοφυτικά και να προκαλούν ασθένεια εξαρτάται από το σύστημα έκκρισης τύπου III (TTSS, Type Three Secretion System) και των πρωτεϊνών effectors που εκκρίνονται μέσω αυτού (Lindgren et al., 1997, Alfano et al., 1997, He et al., 1998). Το εκκριτικό σύστημα τύπου III πρωτοπαρατηρήθηκε στο παθογόνο των θηλαστικών *Yersinia* και έχει βρεθεί να υπάρχει σε έναν διαρκώς αυξανόμενο αριθμό Gram-αρνητικών βακτηρίων που είναι παθογόνα φυτών, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ζώων (He et al., 1998, Galan et al., 1999,

Cornelis et al., 2000, Staskawicz et al., 2001, Buttner et al., 2002). Η *Salmonella typhimurium*, *Yersinia spp.* & *E. coli*, έχουν δύο TTSS, όπου το καθένα παίζει το ρόλο του σε διαφορετικά στάδια της μόλυνσης. Επίσης, έχει παρατηρηθεί η παρουσία TTSS σε συμβιωτικά βακτήρια εντομοπαθογόνων νηματωδών (*Photorhabdus luminescens*) αλλά και σε συμβιωτικά ριζόβια όπως και σε μερικούς προκαρυώτες που θεωρούνται μη παθογόνοι (*Pseudomonas fluorescens*) (Hueck et al., 1998, Cornelis et al., 2000, Corinne et al., 2001, Dale et al., 2002, Buttner et al., 2003, Ma et al., 2003). Το σύστημα έκκρισης τύπου III θεωρείται μία πολυπρωτεϊνική συσκευή η οποία: α) είναι ικανή να εγχύει δομικά διαφορετικά μεταξύ τους μόρια πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα και διαμέσου των δύο μεμβρανών του βακτηρίου και της μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, β) πυροδοτείται όταν το παθογόνο έρθει σε στενή επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή και γ) λειτουργεί και υπό τις κατάλληλες *in vitro* συνθήκες, οι οποίες μιμούνται τις περιβαλλοντικές παραμέτρους του αποπλάστη του ξενιστή (Tampakaki et al., 2004). Μέσω του συστήματος αυτού, εκκρίνονται διάφορες πρωτεΐνες ‘effectors’ και μεταφέρονται στα κύτταρα του ξενιστή για να μεταβάλλουν τις κυτταρικές διεργασίες και να προάγουν την ανάπτυξη της ασθένειας. Εκτός από το TTSS, οι διάφοροι παθότυποι *Pseudomonas syringae* φέρουν και άλλους παράγοντες παθογένειας, όπως φυτοτοξίνες, για την περαιτέρω αύξηση της παθογονικής ισχύος τους (Katagiri et al., 2002, Bender et al., 1999).

Η νησίδα παθογένειας *hrp*

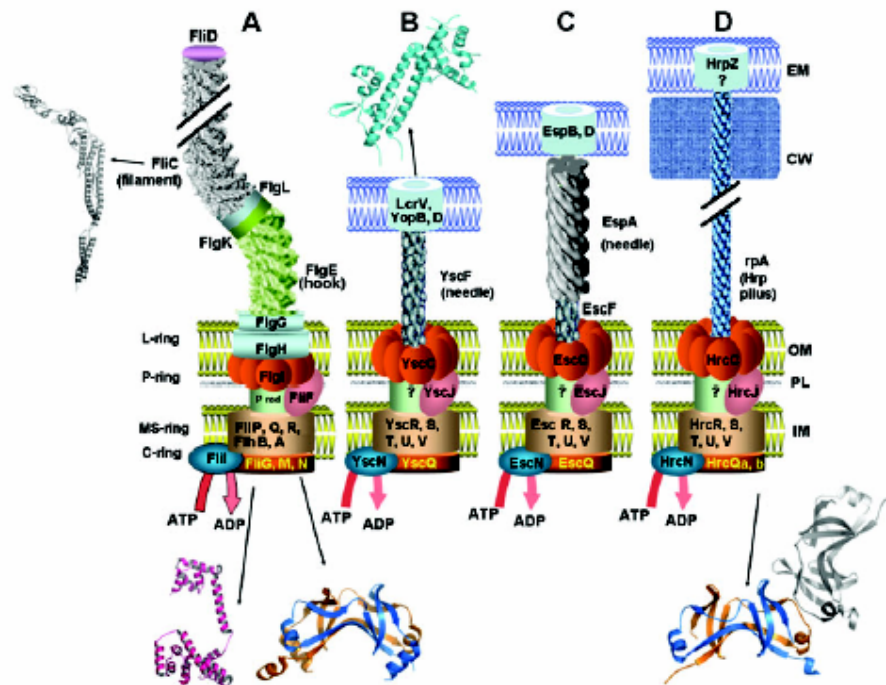
Στην *Pseudomonas syringae*, το TTSS κωδικοποιείται από τα γονίδια της αντίδρασης υπερευαισθησίας και παθογονικότητας (*hrp* genes, Hypersensitive Response and Pathogenicity). Τα γονίδια αυτά ανακαλύφθηκαν σε μια μελέτη-ορόσημο, που στόχευε στην ανάδειξη μεταλλαγών που αναιρούν την ικανότητα στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* να πυροδοτεί HR στο μη-ξενιστή φυτό του καπνού και ασθένεια στο φυτό-ξενιστή τους (Lindgren et al., 1986). Σε όλους τους παθότυπους *Pseudomonas syringae* που έχουν εξεταστεί, ο γενετικός τόπος *hrp* αποτελείται από 27 ανοικτά μεταφραστικά πλαίσια (ORFs, Open Reading Frames) και εδράζεται στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Τα 27 αυτά ORFs είναι οργανωμένα σε έξι οπερόνια και η έκφρασή τους ρυθμίζεται με συντονισμένο τρόπο στα φυτά και σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο επαγωγής (Rahme et al., 1992, Xiao et al., 1992). Εντός του γενετικού τόπου *hrp* υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ομάδες γονιδίων *hrp*. Η μία ομάδα κωδικοποιεί συστατικά του δομικού πυρήνα του συστήματος και περιλαμβάνει 8 γονίδια *hrc* (Hrp conserved genes), των

οποίων τα προϊόντα εμφανίζουν μεγάλο βαθμό πρωτοταγούς ομολογίας με τα γονίδια δόμησης του βακτηριακού μαστιγίου και είναι συντηρημένα σε όλα τα βακτήρια που φέρουν TTSS. Η δεύτερη ομάδα κωδικοποιεί ρυθμιστικές πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την έκφραση όλων των γονιδίων που σχετίζονται με το TTSS και η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες μερικές από τις οποίες είναι εξωκυττάρια συστατικά του TTSS. Ο γενετικός τόπος *hpr* της *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 περιβάλλεται από δύο περιοχές που είναι πλούσιες σε γονίδια πιθανών effectors του TTSS: τον συντηρημένο τόπο (conserved effector locus, EL) και τον ανταλλάξιμο τόπο των effectors (exchangeable effector locus, EEL) (Alfano et al., 2000). Οι effectors του πρώτου τόπου είναι παρόντες σε όλα τα στελέχη του παθογόνου που έχουν μελετηθεί, ενώ εκείνοι του δεύτερου τόπου ποικίλουν. Μαζί, οι τρεις αυτοί γενετικοί τόποι αποτελούν μια μεγάλη 'νησίδα παθογένειας' (pathogenicity island) (Alfano et al., 2000).

Η δομή της εκκριτικής μηχανής τύπου III

Όταν προκληθεί η επαγωγή των γονιδίων *hpr*, το επόμενο βήμα για το βακτηριακό κύτταρο είναι η κατασκευή της συσκευής έκκρισης. Το κεντρικό τμήμα της συσκευής έκκρισης, αποτελούμενο από Hgc πρωτεΐνες και αποκαλούμενο ως 'σύμπλοκο της βελόνας', έχει απομονωθεί από διάφορα παθογόνα θηλαστικών και είναι μορφογενετικά παρόμοιο με το βακτηριακό 'βασικό σωματίο' (basal body), κάτι που παρέχει ενδείξεις εξελικτικής σχέσης μεταξύ των TTSS και του μαστιγίου (Εικόνα 1). Το σύμπλοκο της βελόνας αποτελείται από δύο μέρη, μία κυλινδρική βάση που είναι βυθισμένη μέσα στην κυτταρική μεμβράνη και μία μικρή προεξοχή επί της επιφάνειας του κυττάρου που καλείται βελόνα (Kubori et al., 1998). Η βελόνα έχει διάμετρο 8nm και μήκος έως 100nm στα παθογόνα θηλαστικών και έως 2000nm σε φυτοπαθογόνα βακτήρια.. Μια τρίτη δομή η οποία προεξέχει από την εσωτερική μεμβράνη προς το βακτηριακό κυτταρόπλασμα και καλείται 'βολβός' έχει παρατηρηθεί περιστασιακά στην *Shigella* (Blocker et al., 1999). Ο βολβός είναι ανάλογος του βακτηριακού κυτταροπλασματικού συμπλόκου που αποτελείται από την ATPάση και άλλες πρωτεΐνες, ενώ ένα μέρος του θα μπορούσε να αντιστοιχίζεται στον βακτηριακό C-δακτύλιο. Το ολικό σύμπλοκο δεν έχει απομονωθεί ως τώρα από κάποιο φυτοπαθογόνο, με εξαίρεση ένα εξάρτημα τύπου III-εξαρτώμενου, με διάμετρο 8nm και αρκετά nm σε μήκος, το οποίο απομονώθηκε από την *Pseudomonas syringae* και άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια και καλείται 'αγωγός Hgc' (Roine et al., 1997, Jin et al., 2001, Gijsegem et al., 2000).

Η μόνη γνωστή πρωτεϊνική υπομονάδα του αγωγού Hrp είναι η πρωτεΐνη HrpA της *Pseudomonas syringae* (Roine et al., 1997). Η έκκριση μορίων effectors από το TTSS πραγματοποιείται μόνο από θέσεις του βακτηριακού κυττάρου όπου έχει συναρμολογηθεί ο αγωγός Hrp. Ο αγωγός αυτός επιμηκύνεται με την προσθήκη νέων υπομονάδων HrpA στο πιο απόμακρο άκρο του από την επιφάνεια του κυττάρου και ο μηχανισμός αυτός είναι παρόμοιος με τον τρόπο επιμήκυνσης του βακτηριακού μαστιγίου (Li et al., 2002). Οι Journet et al., (2003) έδειξαν ότι το μήκος της βελόνας στη *Yersinia* εξαρτάται από την πρωτεΐνη YscP. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει το μήκος της βελόνας δρώντας ως 'μοριακός χάρακας' κατά την συναρμολόγηση της βελόνας, και ότι τα δύο άκρα της πρωτεΐνης YscP δρουν ως άγκυρες που συνδέουν το βασικό σωματίο και το αυξανόμενο άκρο της βελόνας. Ο αγωγός Hrp είναι το λειτουργικό ισοδύναμο του συμπλόκου βελόνας των ζωοπαθογόνων στα φυτοπαθογόνα. Ενώ ο αγωγός Hrp είναι μια ευέλικτη, λεπτή και μακριά δομή, η βελόνα είναι άκαμπτη και μικρή. Οι διαφορές μεταξύ αγωγού και βελόνας ίσως είναι σημαντικές εξελικτικά, καθώς τα φυτοπαθογόνα πρέπει να προσπελάσουν το παχύ κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, δομή που απουσιάζει από τα ζωικά κύτταρα.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του βακτηριακού μαστιγίου (A) και των TTSS της *Yersinia* (B), της *E. coli* (C) και της *Pseudomonas syringae* (D). Το βασικό σωματίο του μαστιγίου αποτελείται από πρωτεΐνες που σχηματίζουν τους δακτυλίους C, MS, P και L. Έχουν σημειωθεί μόνο οι συντηρημένες πρωτεΐνες μεταξύ των τεσσάρων συστημάτων TTSS. EM: ευκαρυωτική μεμβράνη. OM: εξωτερική μεμβράνη (outer membrane). PL: στρώμα πεπτιδογλυκάνης (peptidoglycan layer). IM: εσωτερική μεμβράνη (inner membrane). CW: κυτταρικό τοίχωμα (cell wall) (Tampakaki et al., 2004)

Οικογένειες συντηρημένων πρωτεϊνών της συσκευής έκκρισης

Έχει προταθεί ότι ο συντηρημένος πυρήνας της συσκευής έκκρισης εμπλέκεται στην αναγνώριση ενός καθολικού σινιάλου έκκρισης στα διάφορα TTSS. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να εξηγήσει τον αδιάκριτο χαρακτήρα ως προς την έκκριση της συσκευής που έχει επισημανθεί σε έναν μεγάλο αριθμό ερευνητικών μελετών (Anderson et al., 1999, Rossier et al., 1999, Subtil et al., 2001), πχ. ο effector της *Yersinia* μπορεί να εκκριθεί από το TTSS φυτοπαθογόνων βακτηρίων όπως είδη των γενών *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Pseudomonas syringae*, το TTSS της *Yersinia* μπορεί να εκκρίνει τους effectors AvrB & AvrPto της *Pseudomonas syringae*, και το TTSS της *Xanthomonas campestris* εκκρίνει την πρωτεΐνη PopA της *Ralstonia* και την AvrB της *Pseudomonas syringae*.

Οι συντηρημένες πρωτεΐνες του TTSS έχουν κατηγοριοποιηθεί σε οικογένειες ομολόγων (Hueck et al., 1998) και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την θέση και τη λειτουργία τους (Πίνακας 1). Οι οικογένειες YscR/S/T είναι ισοδύναμες των μαστιγιακών πρωτεϊνών FliP/Q/R, οι οποίες έχει προταθεί ότι σχηματίζουν μια καθολική δομή μεμβρανικής διοχέτευσης (Aizawa et al., 2001). Μέλη των οικογενειών LcrD & YscU συμμετέχουν στο σχηματισμό της δομής της μαστιγιακής ράβδου. Η HrpL (*Erwinia amylovora*) και οι λιποπρωτεΐνες YscJ (*Yersinia*) & MxiJ (*Shigella*) εμπλέκονται στην έκκριση τύπου III και είναι ομόλογες του κεντρικού τομέα της FliF, η οποία ευθύνεται για το σχηματισμό του M-δακτυλίου του μαστιγίου (Deng et al., 1999). Οι YscU & YscP ρυθμίζουν συντονισμένα την έκκριση των πρωτεϊνών Yop και της πρωτεΐνης YscF που αποτελεί τη δομική πρωτεΐνη της δομής της βελόνας της *Yersinia*. Η YscU, ομοίως με την ομόλογή της στο μαστίγιο FlhB, πρωτεολύεται στο υψηλά συντηρημένο αμινοξικό μοτίβο NPTH που εντοπίζεται κοντά στο κυτταροπλασματικό της άκρο. Αν και η κοπή αυτή δεν φαίνεται απαραίτητη για τη λειτουργία της, ίσως εξασφαλίζει την μη τοξική διαμόρφωση της πρωτεΐνης μέσα στο βακτηριακό κύτταρο (Edqvist et al., 2003, Lavander et al., 2003).

Τα μέλη της οικογένειας YscN αποτελούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που διαθέτουν ένα μοτίβο πρόσδεσης ATP και μοιάζουν με την β-υπομονάδα F₀F₁ της ΑΤΡάσης. Δράση υδρόλυσης ATP έχει αποδειχθεί για μερικά από τα μέλη αυτής της οικογένειας και φαίνεται να έχει σαν προϋπόθεση τον ολιγομερισμό της πρωτεΐνης (Claret et al., 2003, Pozidis et al., 2003, Akeda et al., 2004).

Η YscO της *Yersinia* είναι ένα ευκίνητο συστατικό του TTSS και απαιτείται για την έκκριση των effectors. Το πιθανό ομόλογό της στο μαστίγιο, η FliJ είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη για την οποία έχει προταθεί δράση σαπερόνης για την εξαγωγή υποστρωμάτων που δομούν τη ράβδο και το άγκιστρο του μαστιγίου (Payne et

al., 1998, Minamino et al., 2000). Τέλος, τα μέλη της οικογένειας YscQ είναι περιφερικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες.

Πίνακας 1. Ισοδύναμες ή πιθανόν ισοδύναμες πρωτεΐνες από τα TTSS της *Yersinia*, *Pseudomonas syringae* και το μαστίγιο (Tampakaki et al., 2004)

Animal pathogens <i>Yersinia</i>	Plant pathogens <i>P. syringae</i>	Flagellum	Protein characteristics, function and location
YscR	HicR	FIF	Integral inner membrane proteins with periplasmic extensions, participate in the rod formation
YscS	HicS	FIQ	
YscT	HicT	FIR	
LcrD (YscV)	HicV (HrpI)	FhA	LcrD and FhA: regulation HicV: secretion
YscU	HicU	FhB	Integral inner membrane proteins with periplasmic extensions, participate in the rod formation
YscJ	HicJ	FIF	FIF: forms the MS-ring YscJ and HicJ: lipoproteins, putative connectors of the secretion apparatus across the periplasm
YscQ	HicQ ^a	FIN/FIY	FIN/Y: peripheral cytoplasmic protein, part of the switch complex that is connected with the MS-ring
YscH	HicH	FI	Soluble components, ATPases
YscC	HicC		Outer membrane proteins, may be considered the functional equivalents of flagellum P- and O-rings
YscO	HrpO	Fli	Fli: protein of the export apparatus, cytoplasmic, proposed a chaperone-like activity Proteins have limited sequence similarities
YopN	HrpJ		Hydrophilic proteins YopN: located on the bacterial surface, a putative stop-valve (also characterized as effector/translocator).

Effectors & σαπερόνες

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα λειτουργεί ανεξάρτητα από το μονοπάτι Sec (κύριο εκκριτικό μονοπάτι των βακτηρίων). Η φύση των σινιάλων έκκρισης επί των μορίων των effectors παραμένει ανοικτό θέμα, ακόμα και στα πιο καλά μελετημένα TTSS ζωοπαθογόνων βακτηρίων (*Yersinia spp.*). Η έκκριση μερικών effectors σε βακτηριακά παθογόνα θηλαστικών απαιτεί την παρουσία συγκεκριμένων σαπερονών (chaperones) (Cornelis et al., 2000). Συχνά, οι effectors και οι αντίστοιχες ειδικές σαπερόνες τους κωδικοποιούνται από παραπλήσια γονίδια. Οι σαπερόνες είναι γενικά μικρά όξινα πρωτεϊνικά μόρια με καμία συντήρηση αλληλουχίας μεταξύ τους. Ωστόσο, όλες περιέχουν ένα κοινό στοιχείο, μια αμφιπαθή α-έλικα στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Ο ρόλος τους είναι να καθοδηγούν τις πρωτεΐνες των effectors στην εκκριτική μηχανή του βακτηρίου, να τους προστατεύουν από πρωτεόλυση ή/και από πρόωμη συσσωμάτωση στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Το αμινοτελικό άκρο των effectors ή το 5' του mRNA τους φαίνεται να παίζει σπουδαίο ρόλο στην έκκρισή τους (Anderson et al., 1999). Οι Guttman et al. (2002) βρήκαν ότι η σύνθεση του αμινοτελικού άκρου 13 γνωστών μορίων effectors του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* δεν είναι τυχαία: όλα τα μόρια αυτά παρουσιάζουν υψηλό περιεχόμενο σε σερίνες και χαμηλό σε ασπαρτικό στο αμινοτελικό τους άκρο. Επίσης, οι Petnicki-Ocwieja et al. (2002) αναγνώρισαν ξεχωριστά συγκεκριμένες βιοφυσικές ιδιότητες στα 50 πρώτα κατάλοιπα 28 γνωστών effectors της *Pseudomonas syringae*: α) τα πρώτα πέντε κατάλοιπα είναι εκτεθειμένα στους διαλύτες, β)

μεταξύ των 12 πρώτων καταλοίπων απουσιάζουν όξινα αμινοξέα, και γ) τα κατάλοιπα 6-50 είναι αμφιπαθή.

Ο αποπλάστης είναι ένα προστατευμένο αλλά και εχθρικό περιβάλλον για την πλειονότητα των μικροβίων διότι πρόκειται για χώρο όπου συσσωρεύονται χημικά συστατικά της φυτικής άμυνας μολονότι παρέχει υγρασία και θρεπτικές ουσίες κατάλληλες για την ανάπτυξη των μικροβίων. Η επικρατούσα ιδέα είναι ότι οι effectors του TTSS συνεισφέρουν στην παθογένεια με δύο τρόπους: α) πυροδοτώντας την απελευθέρωση νερού και/ή θρεπτικών στοιχείων στον αποπλάστη από τα κύτταρα του ξενιστή, και β) καταστέλλοντας ή ξεπερνώντας τις αποκρίσεις άμυνας του ξενιστή (Jin et al., 2003). Βάσει του τόπου παρουσίας και δράσης τους, οι effectors του TTSS μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: αυτούς που δρουν σε εξωκυττάριους στόχους και αυτούς που έχουν ενδοκυττάριους υποδοχείς. Οι πρώτοι, με κυριότερες αντιπροσώπους τις πρωτεΐνες HrpZ και HrpW, είναι πλούσιοι σε γλυκίνη, χωρίς κυστεΐνες, θερμοσταθεροί και καλούνται χαρπίνες (He et al., 1993, Charkowski et al., 1998). Οι χαρπίνες μπορούν να πυροδοτήσουν μια απόκριση που μοιάζει στην HR όταν εγχύονται στον διακυττάριο χώρο των φυτικών φύλλων ή όταν παράγοντα από διαγενετικά φυτά σαν συντήγματα με φυτικά πεπτίδια έκκρισης (Tampakaki et al., 2000) και άρα δρουν εξωκυττάρια ή επί της επιφάνειας των φυτικών κυττάρων. Οι ενδοκυττάριοι effectors μεταφέρονται απευθείας εντός των κυττάρων του ξενιστή από το βακτηριακό κύτταρο, πχ. οι Avi πρωτεΐνες (Staskawicz et al., 2001, Dangl et al., 2001).

Η οικογένεια FlhB/ YscU/ HrcU

Οι πρωτεΐνες που σχηματίζουν την εκκριτική συσκευή τύπου III θεωρείται ότι με κάποιο τρόπο αναγνωρίζουν τα υποστρώματα προς έκκριση και τα προωθούν μέσα στον εκκριτικό αγωγό. Μια πρωτεΐνη-κλειδί στην εξαγωγή των μαστιγιακών συστατικών είναι η FlhB, μια μεμβρανική πρωτεΐνη με τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές και μια μεγάλη κυτταροπλασματική καρβοξυτελική περιοχή (Minamino et al., 1994, 1999)(Εικόνα 2). Κατά τη συναρμολόγηση του μαστιγίου, ένα κρίσιμο γεγονός συμβαίνει όταν συμπληρώνεται η δομή του άγκιστρου (hook): το εκκριτικό σύστημα αλλάζει την εξειδίκευση έκκρισης από τα υποστρώματα της δομής του άγκιστρου στα υποστρώματα της δομής του νηματίου. Η FliK είναι μια πρωτεΐνη που εκκρίνεται κατά την συναρμολόγηση του άγκιστρου και με κάποιο τρόπο 'αισθάνεται' την ολοκλήρωσή του και επικοινωνεί με την εκκριτική μηχανή για την έναρξη έκκρισης των υποστρωμάτων του νηματίου (filament) (Kutsukake et al., 1994, Minamino et al., 1999, Muramoto et al., 1998,

Williams et al., 1996). Μεταλλάγματα *fliK* έχουν δύο διαφορετικούς φαινοτύπους: α) αδυνατούν να ολοκληρώσουν το σχηματισμό του άγκιστρου και β) αδυνατούν να ξεκινήσουν το σχηματισμό του νηματίου και έτσι σχηματίζουν δομές που καλούνται ‘πολυ-άγκιστρα’ (‘polyhooks’) (Hirano et al., 1994, Patterson-Delafield et al., 1973, Suzuki et al., 1981). Μεταλλάγματα-καταστολείς του *fliK* φαινοτύπου που επιτρέπουν την έκκριση και τη συναρμολόγηση των υποστρωμάτων νηματίου έχουν απομονωθεί και χαρτογραφηθεί στο γονίδιο *flhB* κάτι που υποδεικνύει ότι οι FliK & FlhB αλληλεπιδρούν για να ρυθμίσουν τη σειρά με την οποία εκκρίνονται τα μαστιγιακά υποστρώματα (Kutsukake et al., 1994, Williams et al., 1996). Έχει προταθεί ότι η FliK κατά την ολοκλήρωση του άγκιστρου αλλάζει την εξειδίκευση υποστρώματος της συσκευής έκκρισης αλλάζοντας τη στερεοδιαμόρφωση της FlhB. Οι Minamino & Macnab (2000) έδειξαν ότι η FlhB πρωτεολύεται στο κατάλοιπο προλίνη-270 που βρίσκεται μέσα σε ένα μοτίβο τεσσάρων αμινοξέων ‘NPTH’ το οποίο είναι εξαιρετικά συντηρημένο σε όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής των πρωτεϊνών.

Το αγρίου τύπου μόριο της FlhB είναι εξαιρετικά ασταθές, έχει χρόνο ημιζωής 5 min και μετά την κοπή του στο μοτίβο NPTH δίνει δύο θραύσματα τα οποία έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Minamino et al., 2000). Το σύμπλοκο των δύο αυτών θραυσμάτων έχει φανεί να έχει μεγαλύτερη συγγένεια για υποστρώματα άγκιστρου και όχι για υποστρώματα νηματίου, ενώ η ανέπαφη μορφή της FlhB όπως επίσης και το καρβοξυτελικό της θραύσμα μόνο του προσδένουν τα υποστρώματα αυτά με την ίδια συγγένεια (Minamino et al., 2000). Οι συγγραφείς αυτοί προτείνουν ότι η FlhB διακρίνεται σε δύο καταστάσεις δέσμευσης υποστρώματος και μια αλλαγή στερεοδιαμόρφωσης που διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο θραυσμάτων της FlhB είναι υπεύθυνη για την αλλαγή στην εξειδίκευση του εκκρινόμενου υποστρώματος.

Η YscU, η αντίστοιχη πρωτεΐνη του TTSS της *Yersinia spp.* έχει επίσης αποδειχθεί ότι εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, περιέχει τέσσερις υδρόφοβες περιοχές και κατά την ενσωμάτωσή της στη μεμβράνη δημιουργεί τρεις λούπες, δύο περιπλασματικά και μια κυτταροπλασματικά (Allaoui et al., 1994) αφήνοντας επίσης μια μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή. Η YscU παρουσιάζει 33.3% ταυτότητα με την Spa40 της *Salmonella flexneri* (Sasakawa et al., 1993), 33.2% με την SpaS της *Salmonella typhimurium* (Groisman et al., 1993) και 31% με την HrcU της *Ralstonia solanacearum* (Gough et al., 1993) (Εικόνα 3). Η YscU υφίσταται πέψη στο ίδιο μοτίβο NPTH, στην προλίνη-264 (Lavander et al., 2002) και αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ενός καρβοξυτελικού θραύσματος 10 kDa. Οι διαφορετικές περιοχές της YscU φαίνεται να επιδρούν διαφορετικά στην έκφραση και έκκριση των Yop (*Yersinia* outer proteins).

Υψηλά επίπεδα έκφρασης της πλήρους μήκους YscU οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των Yop (πρόκειται για μεμβρανική πρωτεΐνη (Allaoui et al., 1994) και άρα είναι πιθανό υπερέκφρασή της να επηρεάζει το ρυθμό αύξησης και έμμεσα την έκφραση και έκκριση των Yop), ενώ η έκφραση του καρβοξυτελικού θραύσματος οδηγεί σε αυξημένη έκκριση των Yop (Lavander et al., 2002). Απενεργοποίηση της YscU οδηγεί σε βακτήρια ανίκανα να εκκρίνουν Yops (Allaoui et al., 1994). Μεταλλάγματα *yscU* παράγουν λιγότερη YopD & YopE σε σχέση με αγρίου τύπου βακτήρια, και αυτό υποδεικνύει ότι η σύνθεση των Yop επηρεάζεται από την απενεργοποίηση του γονιδίου *yscU*. Τα ίδια μεταλλάγματα όταν υπερεκφράζουν τον μεταγραφικό ενεργοποιητή VirF, ανακτούν την ικανότητα έκφρασης των Yop αλλά και πάλι δεν μπορούν να τις εκκρίνουν (Allaoui et al., 1994). Η απομάκρυνση των τεσσάρων καταλοίπων του μοτίβου NPTH καθιστά την YscU μη λειτουργική στην έκκριση των Yop, και στην περίπτωση αυτή η πρωτεόλυση συμβαίνει σε διαφορετικό σημείο (Lavander et al., 2002). Μοναδιαίες αντικαταστάσεις στο μοτίβο NPTH παρεμποδίζουν την πρωτεόλυση αλλά η πρωτεΐνη εξακολουθεί να είναι λειτουργική στην έκκριση, πράγμα που υποδεικνύει ότι η πρωτεολυτική κοπή της YscU δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία της στο TTSS (Lavander et al., 2002). Αντίθετα, φαίνεται ότι η κοπή αυτή είναι απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων, καθώς η άκοπη μορφή της πρωτεΐνης YscU είναι σημαντικά τοξική (Lavander et al., 2002). Το γεγονός ότι η YscU πρωτεολύεται τόσο στα παθογονικά όσο και στα μη παθογονικά στελέχη της *Yersinia* (δεν φέρουν καθόλου TTSS), όπως επίσης και στην *E. coli* K-12, υποδεικνύει ότι η πρωτεάση που είναι υπεύθυνη για την κοπή δεν είναι ειδική για το TTSS (Lavander et al., 2002).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού θραύσματος HrcU C199 (καρβοξυτελικό διαλυτό τμήμα της πρωτεΐνης HrcU) του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psph) και η ανάδειξη πιθανών αλληλεπιδράσεων του θραύσματος αυτού:

- με την ΑΤΡάση του Psph TTSS HrcN,
- με το αμινοτελικό τμήμα της HrcN (HrcN N261),
- με το καρβοξυτελικό τμήμα της HrcN (HrcN C259),
- με την πρωτεΐνη HrpP, και
- του πρωτεϊνικού τμήματος HrcN C259 με τις πρωτεΐνες AvrPphF-ORF1, AvrPphF-ORF2 & AvrPphF-ORF1-ORF2.

Υλικά & Μέθοδοι



1. Απομόνωση μεσαίας κλίμακας πλασμιδιακού DNA από *E.coli* με την βοήθεια κολώνας ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN)

Παραλαμβάνονται 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας φέρουσας το πλασμιδιακό DNA ενδιαφέροντος, η οποία επώαστηκε στους 37^o C για 14-16 ώρες. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται σε προαποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες των 50 ml για 30 λεπτά στις 3500 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4 ml διαλύματος 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase A. Κατόπιν προστίθενται 4 ml διαλύματος 200mM NaOH, 1%SDS (w/v) και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml παγωμένου διαλύματος 3M CH₃COOK pH 5.5, το διάλυμα αναμιγνύεται ελαφρά και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 30 λεπτά στους 4^oC και το υπερκείμενο φιλτράρεται σε υαλοβάμβακα. Ακολουθεί εξισορρόπηση της στήλης QIAGEN-tip 100 με 4 ml διαλύματος 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% ισοπροπανόλη (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v) σε θερμοκρασία δωματίου (το υλικό της στήλης περιέχει θετικά φορτισμένες ομάδες DEAE [diethylaminoethanol] που συγκρατούν τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό φωσφόρων του DNA. Παρουσία 750mM NaCl στην στήλη δεν μπορούν να κρατηθούν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, μεταβολίτες και χρωστικές). Το φιλτραρισμένο υπερκείμενο φορτώνεται στην στήλη και αφήνεται να περάσει με την βαρύτητα. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος 1M NaCl, 50mM MOPS pH 7 και 15% ισοπροπανόλη (v/v) (παρουσία 1M αλατιού απομακρύνονται από την στήλη tRNA, 5S RNA και rRNA που τυχόν κατακρατήθηκαν στο προηγούμενο βήμα). Η έκλουση του DNA γίνεται με 5 ml διαλύματος 1,25 M NaCl, 50mM TrisCl pH 8,5 και 15% ισοπροπανόλη (v/v) (σε αυτό το βήμα αυξάνεται το pH για να εκλουσθεί το πλασμίδιο σε μικρότερη συγκέντρωση NaCl, ίση με 1,25 M). Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 0,7 όγκων ισοπροπανόλης επί του όγκου του διαλύματος και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 15000 rpm για 30 λεπτά, στους 4^oC (κατακρήμιση με ισοπροπανόλη μειώνει την κατακρήμιση αλάτων). Το ίζημα ξεπλένεται με 2ml 70% αιθανόλης. Τέλος, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA στεγνώνεται και επαναδυναμύεται σε 100 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου H₂O.

2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR: polymerase chain reaction), μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση πολυμερίζει το DNA που οριοθετείται από γνωστές

αλληλουχίες. Οι γνωστές αυτές αλληλουχίες αποκρίνονται σε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που λειτουργούν ως εκκινητές για την έναρξη της αντίδρασης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (pair-dimers) και κυρίως στο 3' άκρο, το περιεχόμενο σε GC πρέπει να είναι από 40% ως 60%, η προσθήκη περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται στο 5' άκρο.

Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην PCR, τα οποία επαναλαμβάνονται από 25 μέχρι 40 φορές (κύκλοι). Αυτό πραγματοποιείται σε ένα αυτοματοποιημένο μηχάνημα (cycler), το οποίο είναι σε θέση να θερμαίνει και να ψύχει τις αντιδράσεις σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα:

1. **Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της μήτρας DNA** με επώαση στους 94°C :
Κατά την αποδιάταξη, η δίκλωνη έλικα ανοίγει σε δύο αλυσίδες μονόκλωνου DNA και όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (για παράδειγμα, η επιμήκυνση του προηγούμενου κύκλου).
2. **Υβριδισμός των εκκινητών:**
Οι εκκινητές υφίστανται στο διάλυμα σε διαρκή κίνηση Brown. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δικλώνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μήτρας και εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης.
3. **Επιμήκυνση** στους 72°C :
Η θερμοκρασία αυτή είναι η ιδεατή για τη δράση της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Οι εκκινητές όπου έχει γίνει η πρώτη προσθήκη βάσεων, έχουν ήδη αναπτύξει ισχυρή ιονική έλξη με τη μήτρα, πολύ ισχυρότερη σε σχέση με τις δυνάμεις αποδιάταξης. Εκκινητές που βρίσκονται σε θέσεις μη ειδικού υβριδισμού απελευθερώνονται από τη μήτρα σε αυτήν τη θερμοκρασία και δε δίνουν προϊόν επιμήκυνσης. Οι βάσεις τοποθετούνται

στο 3' του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει dNTPs στη διεύθυνση 5' → 3', διαβάζοντας τη μήτρα από το 3' προς το 5' άκρο)

Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε η Taq πολυμεράση (Minotech) είτε η DeepVent (Biolabs). Η Taq πολυμεράση δεν διαθέτει 3' προς 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης σε αντίθεση με την DeepVent, και έτσι δεν μπορεί να διορθώσει τα λάθη του πολυμερισμού.

3. Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων (Εικόνες 2 και 3) και των ενθέτων (προϊόντα PCR) για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation) όπως επίσης και για την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων μετά από τον μετασχηματισμό, πραγματοποιήθηκαν πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα των εταιρειών Biolabs και Minotech, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία 0.1μg/ml BSA όπου προτείνεται. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκαν στους 37⁰C για 2 ώρες. Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά υπάκουαν στον κανόνα-ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψει πλήρως 1 μg DNA σε 1 ώρα, στους 37⁰C.

4. Απομόνωση ζώνης DNA από gel αγαρόζης

Η ζώνη ενδιαφέροντος αποκόπτεται από την πηκτική αγαρόζης (low melting agarose) με ένα καθαρό νυστέρι, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αγαρόζης κατά το δυνατόν περισσότερο. Η μπάντα ζυγίζεται και σε αυτήν προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (διευκολύνει την διαλυτοποίηση της αγαρόζης και την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη silica gel της στήλης Qiagen). Ακολουθεί επώαση στους 50⁰C για 5', ούτως ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Κατόπιν, προστίθεται ίσος όγκος του αρχικού βάρους της μπάντας ισοπροπανόλη, βήμα που αυξάνει την απόδοση σε DNA όταν αυτό έχει μέγεθος μικρότερο από 500 bp ή μεγαλύτερο από 4 kbp. Στη συνέχεια, φορτώνουμε το διάλυμα στη στήλη Qiagen και φυγοκεντρούμε για 2' στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25⁰C). Απομακρύνουμε το διήθημα και προσθέτουμε 0.5 ml QG ακόμα για απομάκρυνση και των τελευταίων ιχνών αγαρόζης από την κολώνα. Φυγοκεντρούμε ομοίως με παραπάνω. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε την κολώνα με 0.75 ml PE (διάλυμα πλύσης που

περιέχει αιθανόλη) και τέλος εκλούουμε το DNA με 50 μl EB (10mM Tris-Cl pH 8.5) ή H₂O.

5. Αντίδραση λιγάσης

Η T4 DNA λιγάση καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' ομάδας -OH μεταξύ δύο άκρων δίκλωνων άκρων DNA, είτε αυτά είναι τυφλά είτε προεξέχοντα. Η αντίδραση λιγάσης πραγματοποιείται σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 10mM DTT, 1mM ATP, 25μg/ml BSA). Η ποσότητα DNA που χρησιμοποιείται στην αντίδραση μπορεί να κυμανθεί από 0.1 έως και 1 μg. Οι αντιδράσεις λιγάσης πραγματοποιήθηκαν με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση της Minotech, στους 16⁰C για 14-16 ώρες. Το ένζυμο μετά το πέρας της αντίδρασης απενεργοποιήθηκε με επώαση στους 65⁰C για 10'.

6. Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

➤ Για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (heat-shock)

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1ml LB + 20mM MgSO₄ και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37⁰C. Στη συνέχεια, εμβολιάζουμε με την ολονύκτια καλλιέργεια σε αναλογία 1:100, 100ml θρεπτικού μέσου LB + 20 mM MgSO₄ σε φλάσκα ενός λίτρου. Η καλλιέργεια επωάζεται για 2,5 με 3 ώρες στους 37⁰C, 250rpm μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου στο 0.6. Κατόπιν διαμοιράζεται σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες falcon των 50 ml και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά, στους 4⁰C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 15 με 20 ml παγωμένο διάλυμα TFB I (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη) για κάθε σωλήνα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 4ml ανά σωλήνα παγωμένου διαλύματος TFB II (10mM MOPS pH 7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% γλυκερόλη). Τέλος, το κυτταρικό διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 100μl ανά σωλήνα erpendorf, μεταφέρεται αμέσως σε υγρό άζωτο και κατόπιν αποθηκεύεται στους -80⁰C.

➤ **Για μετασχηματισμό με ηλεκτροσόκ**

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1ml LB και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37⁰C. Στη συνέχεια, εμβολιάζουμε με την ολονύκτια καλλιέργεια σε αναλογία 1:100, 100ml θρεπτικού μέσου LB σε φλάσκα ενός λίτρου. Ακολουθεί επώαση για 2,5 με 3 ώρες στους 37⁰C, 250rpm μέχρι η OD600 να φτάσει περίπου στο 0.6. Κατόπιν, τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 30 min και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στους 4⁰C για 15 min στις 4000 rpm.

Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 500 ml αποστειρωμένο και παγωμένο απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων σε συνθήκες όπως περιγράφηκε παραπάνω. Κατόπιν, το υπερκείμενο αφαιρείται και πάλι, προστίθενται 250 ml H₂O και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση. Αφαιρείται και πάλι το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml H₂O και τα κύτταρα ξαναφυγοκεντρώνονται. Στο τέλος, το ίζημα μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου επαναδιαλύεται σε 10ml H₂O, φυγοκεντρείται και επαναδιαλύεται σε 1,5 ml 10% γλυκερόλη. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 50μl ανά σωλήνα eppendorf, μεταφέρεται αμέσως σε υγρό άζωτο και κατόπιν για αποθήκευση στους -80⁰C.

7. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

➤ **Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με τη μέθοδο του θερμικού σοκ:**

Μια ποσότητα 100 μl δεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80⁰C όπου φυλάσσονται και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 μl της αντίδρασης λιγάσης στα κύτταρα και επωάζονται στον πάγο για 30'. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42⁰C για 90 sec. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2', ακολουθεί προσθήκη 900μl LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) και επώαση στους 37⁰C για 1 ώρα. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τριβλύα επωάζονται στους 37⁰C για 14-16 ώρες.

➤ **Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο του ηλεκτροσόκ:**

Μια ποσότητα 100 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* λαμβάνονται από τους -80⁰C στον πάγο και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Σε έναν μικρό

βακτηριολογικό σωλήνα προστίθεται 1ml LB και μεταφέρεται στον πάγο. Κατόπιν, στα κύτταρα προστίθεται 0.8-1μl από την αντίδραση λιγάσης και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα κυττάρων-DNA μεταφέρεται με μια πιπέτα σε κατάλληλη κυψελίδα ηλεκτρομετασχηματισμού, η οποία εν συνεχεία τοποθετείται στην κατάλληλη εγκοπή του μηχανήματος ηλεκτρομετασχηματισμού όπου εφαρμόζεται τάση 2,3 KV, στα 25μF και στα 200Ω. Η εφαρμογή της τάσης έχει ως αποτέλεσμα να διασταλούν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων, μέσω των οποίων εισέρχεται το DNA του μετασχηματισμού.

Μετά την εφαρμογή του ηλεκτροσόκ τα κύτταρα μεταφέρονται στο βακτηριολογικό σωλήνα με το LB, και ακολουθεί επώασή τους για 2 ώρες στους 37⁰C. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τριβλύα επωάζονται στους 37⁰C για 14-16 ώρες.

8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση (minipreps)

Επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες από τα τριβλύα μετασχηματισμού και προστίθενται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB εφοδιασμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη. Οι καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν στους 37⁰C υπό γρήγορη ανάδευση (250 rpm) για 14-16 ώρες. Την επόμενη ημέρα, 1.5 ml από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρεται σε πλαστικούς σωλήνες του 1.5 ml (eppendorf) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15' στις 3500 rpm. Το υπερκείμενο αφαιρείται και στο ίζημα προστίθενται 300μl διαλύματος I (25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0). Ακολουθεί επαναιώρηση των κυττάρων με vortex. Κατόπιν, προστίθενται 300μl διαλύματος II (0.2 M NaOH, 1% SDS), το διάλυμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5'. Ακολούθως, προστίθενται 300μl διαλύματος III (0.15M CH₃COOK pH 5.5), το διάλυμα αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται στον πάγο για 30'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15' στους 4⁰C στις 14000 rpm. Στο υπερκείμενο προστίθεται 0.8 του όγκου του διαλύματος ισοπροπανόλη και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30'. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4⁰C για 30' στις 14000 rpm. Το ίζημα του πλασμιδιακού DNA που κατακρημνίζεται με αυτόν τον τρόπο αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 50 μl H₂O ή TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0).

9. Παρασκευή βακτηριακών δειγμάτων καλλιέργειας σε γλυκερόλη προς μακρά αποθήκευση

Σε 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας προσθέτουμε 1 ml από διάλυμα 40% γλυκερόλης, ακολουθεί ήπια ανάδευση και μεταφορά σε υγρό άζωτο για άμεση κατάψυξη. Κατόπιν, ακολουθεί μεταφορά των καλλιέργειών για μακροχρόνια αποθήκευση στους -80°C.

10. Αποτύπωση αποικίας (colony blot) για την ανίχνευση μετασχηματισμένων κλώνων που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Από τα τριβλύα όπου έχουμε στρώσει το μείγμα μετασχηματισμού σικλώνουμε αποικίες και τις τοποθετούμε σε συγκεκριμένες αριθμημένες θέσεις σε δύο νέα τριβλύα με θρεπτικό υλικό και αντιβιοτικά και επωάζουμε ολονύκτια στους 37°C [με αυτόν τον τρόπο δημιουργούμε δύο αντίγραφα ακριβή, το ένα από τα οποία θα χρησιμοποιηθεί για την καθεαυτή διαδικασία της αποτύπωσης σε νιτροκυτταρίνη (replica plate) και το άλλο θα φυλαχτεί για να έχουμε έτοιμο το υλικό για παραπέρα χειρισμό του μετά τον προσδιορισμό των θετικών κλώνων (master plate)]. Στα τριβλύα αυτά μαζί με τους κλώνους από το πιάτο μετασχηματισμού προσθέτουμε και αποικίες που φέρουν τον φορέα έκφρασης χωρίς το γονίδιο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, ως αρνητικό μάρτυρα του πειράματος. Στο ένα από τα δύο αντίγραφα τοποθετούμε ένα φίλτρο νιτροκυτταρίνης σε επαφή με τις αποικίες, προσέχοντας να μην παγιδευτούν φυσαλίδες αέρα μεταξύ του φίλτρου και των αποικιών. Με μια βελόνα σύριγγας τρυπάμε το φίλτρο και το άγαρ σε ασύμμετρα σημεία. Απομακρύνουμε το φίλτρο με μία κίνηση. Μεταφέρουμε το φίλτρο με τις αποικίες προς τα πάνω σε νέο πιάτο το οποίο διαθέτει εκτός του θρεπτικού και των κατάλληλων αντιβιοτικών και 1mM IPTG για την επαγωγή της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Επωάζουμε στους 37°C για 4 ώρες. Προετοιμάζουμε ένα σύνολο από πιάτα όπου τοποθετούμε διηθητικό χαρτί WHATMAN 3MM εμπλουτισμένο σε α) διάλυμα SDS, β) διάλυμα αποδιάταξης (0.5M NaOH, 1.5M NaCl), γ) διάλυμα εξουδετέρωσης (1.5M NaCl, 0.5M TrisCl pH 7.4) και δ) 2xSSC. Μετά το πέρας της επαγωγής, τοποθετούμε το φίλτρο νιτροκυτταρίνης με τις αποικίες προς τα πάνω σε κάθε ένα από αυτά τα πιάτα και επωάζουμε ως εξής: 10 λεπτά στο SDS, 5 λεπτά στο διάλυμα αποδιάταξης, 5 λεπτά στο διάλυμα εξουδετέρωσης, 5 λεπτά σε νέο διάλυμα εξουδετέρωσης και 15 λεπτά στο 2x SSC. Στη συνέχεια ξεπλένουμε το φίλτρο 2x10min με διάλυμα TBS (10mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM NaCl) και ακολουθεί ανοσοανίχνευση της

ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα, έτσι όπως περιγράφεται στην παράγραφο 26Α.

11. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε μικρή κλίμακα, (mini inductions) από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS), για έλεγχο των επιπέδων έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια κυττάρων BL21(DE3)(pLysS) που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, χρησιμοποιούμε 0.5 ml και εμβολιάζουμε 10ml υγρού θρεπτικού μέσου LB, εφοδιασμένου με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37⁰C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0.5 και 0.7. Στο σημείο αυτό λαμβάνεται ένα δείγμα 1ml από την καλλιέργεια, και η κυτταρική πελέτα (non induced δείγμα) φυλάσσεται στον πάγο μέχρι το τέλος της επαγωγής. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης στους 28⁰C για 4-5 ώρες, με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Μετά το πέρας της επαγωγής, λαμβάνεται ένα ακόμα δείγμα καλλιέργειας 1ml (induced δείγμα). Τα δύο δείγματα, non induced & induced, επαναδιαλύονται σε 40 και 80 μl αντίστοιχα 1x διάλυμα Laemmli, βράζονται για 15min με ενδιάμεσες παύσεις για vortex και τέλος ηλεκτροφορούνται κατά SDS-PAGE (βλέπε παρακάτω).

12. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών διαφόρων όγκων καλλιέργειας κυττάρων BL21(DE3)(pLysS), μετασχηματισμένων με το αντίστοιχο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έκφρασης.

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια των κυττάρων BL21(DE3)(pLysS) που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος, εμβολιάζουμε σε αναλογία 1:100 υγρό θρεπτικό μέσο LB, εφοδιασμένο με 100μg/ml αμικικιλίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37⁰C με γρήγορη ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm της καλλιέργειας φτάσει μεταξύ 0.5 και 0.7. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η καλλιέργεια κατόπιν επωάζεται στους 28⁰C για 4-5 ώρες. Μετά το πέρας της επαγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 5000 rpm για 30' στους 4⁰C και το ίζημα φυλάσσεται στους -80⁰C.

13. Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό φυσικές (native) συνθήκες.

Η αποθηκευμένη στους -80°C κυτταρική πελέτα έκφρασης αφήνεται στον πάγο να ξεπαγώσει και επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης (20-50mM Tris-HCl pH 8.0 (ή πιο σπάνια, 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, με pH 8.0), 50-300mM NaCl, 5-10mM ιμιδαζόλιο, -1% Triton X-100 ή/και 20% γλυκερόλη σε ορισμένες περιπτώσεις-), 5ml ανά γραμμάριο υγρού βάρους. Ακολουθεί προσθήκη αναστολέων πρωτεασών και πιο συγκεκριμένα λευπεπτινής σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml και PMSF σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις προστίθενται και 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους, 14 x 30 sec, με διαστήματα παύσης 30 sec μεταξύ τους στον πάγο. Το διάλυμα των λυμένων κυττάρων φυγοκεντρείται για 30' στους 4°C στις 12000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

14. Προετοιμασία διαυγούς διαλύματος λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες

- από άθικτα κύτταρα

Η κυτταρική πάστα επαναδιαλύεται σε 5ml ανά γραμμάριο υγρού βάρους διαλύματος B (διάλυμα B: 100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl, 8M ουρία, pH 8.0). Παραλείπεται το βήμα πρόσθεσης αναστολέων πρωτεασών. Κατόπιν πραγματοποιείται σύντομη επεξεργασία με υπερήχους. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 14000 rpm για 30' σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

- από την πελέτα λυμένων κυττάρων

Η πελέτα των λυμένων και φυγοκεντρημένων κυττάρων επαναδιαλύεται σε 5ml ανά γραμμάριο υγρού βάρους διαλύματος λύσης (50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100 και 8M ουρία), αναδεύεται καλά και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα.

15. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό φυσικές (native) συνθήκες.

Οι ουρές ιστιδίνης που κωδικοποιούνται εμπροσθεν ή στο τέλος του γονιδίου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από το μίγμα του ολικού βακτηριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, καθώς προσδένονται στις Ni-NTA (nickel-nitriloacetic acid) ομάδες του προσροφητικού υλικού. Η ετικέτα αυτή δεν είναι ανοσογόνο και δεν εμπλέκεται στην δίπλωση της φυσικής πρωτεΐνης. Σε συνήθη pH οι ιστιδίνες είναι ουδέτερα φορτισμένες. Δεν επηρεάζονται, έτσι τα φυσικά χαρακτηριστικά και η ενεργότητα των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Επίσης για αυτούς τους λόγους η απομάκρυνση της ετικέτας δεν είναι απαραίτητη μετά το πέρας της χρησιμοποίησής της. Οι ιστιδίνες προσδένονται καλά σε άτομα νικελίου. Σε προσροφητικό υλικό με ακινητοποιημένο νικέλιο είναι δυνατόν να κατακρατηθούν και κατά συνέπεια να διαχωριστούν πρωτεΐνες που φέρουν ουρές ιστιδίνης.

Για να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση πρωτεϊνών στο υλικό, το διάλυμα λύσης περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Για να αποφευχθεί η δέσμευση στην στήλη ενδογενών πρωτεϊνών που περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης ακολουθείται διαδικασία έκπλυσης (wash) με αυξημένη συγκέντρωση ιμιδαζολίου. Η έκλουση (elution) γίνεται με υψηλή συγκέντρωση ιμιδαζολίου, οπότε η ουρά των δέκα ιστιδινών δεν μπορεί πλέον να ανταγωνιστεί το ιμιδαζόλιο για τις θέσεις πρόσδεσης στο Ni-NTA agarose. Ο καθαρισμός περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Αρχικά, σε μια κολώνα χρωματογραφίας κλειστή στο κάτω στόμιό της, φορτώνεται 1ml διαλύματος 50% Ni-NTA αγαρόζης σε 30% αιθανόλη και αφήνεται να πακεταριστεί. Αφού πακεταριστεί, ανοίγουμε το κάτω στόμιο και αφήνουμε να ρεύσει η αιθανόλη. Κατόπιν, εξισορροπούμε τη στήλη με 10 ml του εκάστοτε διαλύματος λύσης που χρησιμοποιείται κατά περίπτωση και φορτώνουμε το διαυγές διάλυμα λύσης που παρασκευάστηκε υπό φυσικές (native) συνθήκες. Αφήνουμε να περάσει από την κολώνα υπό την επίδραση της βαρύτητας και συγκεντρώνουμε το έκπλυμα (flowthrough) σε καθαρό σωλήνα. Ακολουθούν τρεις πλύσεις 10 ml η καθεμιά, με διάλυμα πλύσης το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το διάλυμα λύσης, αλλά μεταβάλλεται αυξανόμενα η συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε αυτό. Τα εκπλύματα συγκεντρώνονται σε ξεχωριστούς σωλήνες. Τέλος, ακολουθεί η έκλουση της πρωτεΐνης με ποικίλο αριθμό εκλούσεων, 0.5ml η καθεμιά με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, σε ένα εύρος από 80 έως 350 mM ιμιδαζόλιο. Όλα τα διαλύματα του καθαρισμού, δηλαδή εκπλύσεις και εκλούσματα

διατηρούνται βραχυπρόθεσμα στους 4⁰C και μακροπρόθεσμα στους -20⁰C με 20% γλυκερόλη.

16. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Η στήλη χρωματογραφίας πακετάρεται ως άνωθεν, με τη διαφορά ότι τώρα εξισορροπείται με 10 ml διαλύματος B (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M ουρία, pH 8.0). Το διαυγές διάλυμα λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (παράγραφος 14) φορτώνεται ακολούθως στη στήλη. Κατόπιν, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με διάλυμα C (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M ουρία, pH 6.3), και η πρωτεΐνη εκλούεται 4x0.5 ml με το διάλυμα D (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M ουρία, pH 5.9) και 4x0.5 ml με το διάλυμα E (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 8M ουρία, pH 4.5). Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα φυλάσσονται στους -20⁰C με 20% γλυκερόλη.

17. Καθαρισμός πρωτεΐνης φέρουσας ετικέτα δέκα ιστιδινών (His tag) από την πελέτα λυμένων κυττάρων και επαναδιάταξή της πάνω στη στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης.

Σε περιπτώσεις όπου η επαγόμενη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη δεν είναι διαλυτή, είτε επειδή έχει συγγένεια για τα μεμβρανικά συστατικά του κυττάρου, είτε επειδή υπερπαράγεται και δημιουργεί τα λεγόμενα έγκλειστα σωματίδια, μετά την κατεργασία των κυττάρων με υπερήχους και τη φυγοκέντρησή τους, αυτή κατακρημνίζεται μαζί με τα κυτταρικά υπολείμματα. Από την πελέτα αυτή μπορεί να γίνει καθαρισμός αυτής της πρωτεΐνης υπό αποδιατακτικές αρχικά συνθήκες (8M ουρία), και μετά την πρόσδεση της πρωτεΐνης στη στήλη νικελίου, να απομακρυνθεί η ουρία με πολυάριθμες πλύσεις, με διαλύματα πλύσης στα οποία η περιεκτικότητά τους σε ουρία κάθε φορά υποδιπλασιάζεται, για να φτάσει στην τελευταία πλύση σχεδόν να μηδενιστεί. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα παρακάτω: το διαυγές διάλυμα λύσης που παρασκευάζεται έτσι όπως περιγράφεται στην παράγραφο 14, φορτώνεται σε πακεταρισμένη στήλη νικελίου που έχει εξισορροπηθεί με το ίδιο διάλυμα λύσης. Το έκπλυμα συλλέγεται και ακολουθούν 10 πλύσεις με διαλύματα που περιέχουν 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 10mM ιμιδαζόλιο, και 1% Triton X-100 και κάθε φορά υποδιπλασιαζόμενη συγκέντρωση ουρίας (πλύση 1: 6M ουρία, πλύση 2: 4M ουρία, πλύση 3: 2M ουρία, πλύση

4: 1M ουρία... πλύση 10: 0.015M ουρία). Από την πλύση 5 και μετά, ο καθαρισμός συνεχίζεται στους 4⁰C και στα διαλύματα προστίθενται 5mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Οι εκλούσεις της πρωτεΐνης πραγματοποιούνται σε δύο συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου, 2x150mM και 2x350mM.

18. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών σε διάλυμα με τη μέθοδο Bradford

Κατά τη μέθοδο αυτή, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος σε διάλυμα, βάσει της απορρόφησής της σε σύγκριση με πρότυπη καμπύλη απορρόφησης πρωτεΐνης γνωστών συγκεντρώσεων. Αρχικά κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη με BSA (Bovine Serum Albumin) μετρώντας την απορρόφηση γνωστών της συγκεντρώσεων. Ακολούθως μετριέται η απορρόφηση του δείγματος, η τιμή της τοποθετείται πάνω στην πρότυπη καμπύλη της BSA και ακολούθως προσδιορίζεται η συγκέντρωσή της. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα πριν τη φωτομέτρηση, επεξεργαζόμαστε ως εξής: σε 5-20 μl δείγματος προσθέτουμε H₂O μέχρι τα 100 μl. Στο αραιωμένο δείγμα κατόπιν προστίθενται 1000 μl διαλύματος εργασίας Bradford (95% αιθανόλη, 80% φωσφορικό οξύ, 0.06% διαλύματος Bradford). Το διάλυμα Bradford αποτελείται από 95% αιθανόλη, 88% φωσφορικό οξύ και 3.5 mg/ml SERVA blue G και υπόκειται σε φιλτράρισμα. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε κατάλληλες κυψελίδες φωτομέτρησης ορατού φάσματος, και τέλος, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησής τους στα 595 nm σε φασματοφωτόμετρο. Ως τυφλό δείγμα για μηδενισμό του οργάνου, χρησιμοποιείται 1ml διαλύματος εργασίας Bradford και 100μl H₂O.

19. Συμπύκνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με κατακρήμνιση με ακετόνη

Σε 200μl πρωτεϊνικού δείγματος προστίθεται 1ml παγωμένης ακετόνης και ακολουθεί vortex. Το διάλυμα επωάζεται στους -20⁰C για 10min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, στις 14000 rpm. Η πρωτεϊνική πελέτα που προκύπτει στεγνώνεται καλά και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο 1x διάλυμα Laemmli.

20. Πέψη ΗΤ-πρωτεϊνών με την ειδική πρωτεάση Xa factor

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που φέρουν ουρά ιστιδινών μετά από έκφρασή τους από τον φορέα pET16b, φέρουν μεταξύ της ουράς ιστιδινών και της αρχικής μεθειονίνης της δικής τους αλληλουχίας μια θέση αναγνώρισης για τον παράγοντα Xa (Xa factor). Έτσι, κοπή της πρωτεΐνης με τον παράγοντα αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από την πρωτεΐνη. Το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο λειτουργεί η πρωτεάση αυτή αποτελείται από 20mM Tris-Cl pH 8.0, 100mM NaCl και 2mM CaCl₂. Συμπυκνωμένα πρωτεϊνικά ιζήματα προερχόμενα από 50μl αρχικού δείγματος επαναδιαλύθηκαν σε 50, 100 και 150μl του ρυθμιστικού διαλύματος του παράγοντα Xa χωρίς τα 100mM NaCl (τα πρωτεϊνικά ιζήματα φέρουν ήδη 300mM NaCl από τη διαδικασία καθαρισμού, οπότε με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται τρεις αραιώσεις άλατος, 300, 150 και 100 mM αντίστοιχα), κατόπιν προστέθηκε 1μg παράγοντα Xa (Biolabs) και οι αντιδράσεις επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 6 ώρες.

21. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμίδης

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου δια την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του. Στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συν-πολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά έστω και αναμεμειγμένα και πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N, - τετραμεθυλοαιθυλενο διαμίνη) πετυχαίνει την διάδοση ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού, (Kingsbury & Masters, 1970). Κατά την μη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτή συσσώρευσης, stacking gel). Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης του συστήματος περιέχει γλυκίνη και είναι ρυθμισμένο σε pH 8.3. Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της

πηκτής συσσώρευσης σε pH 6.8. Ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται μπροστά τους. Ακολούθως εισερχόμενες στην δεύτερη πηκτή (πηκτή διαχωρισμού) με pH 8.8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάσει του φορτίου τους και του μεγέθους τους. Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli έχουμε πολυμερισμό της πηκτής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτή συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (Laemmli, 1970). Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειικό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα των πρωτεϊνών αναμειγνύονται 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% Bromophenol blue, 200mM DTT). Ακολουθεί πεντάλεπτος βρασμός των πρωτεϊνών και γρήγορη φυγοκέντρησή τους πριν την φόρτωσή τους στην πηκτή. Για την κατασκευή της πηκτής στήνεται η συσκευή του πολυμερισμού (κατά Laemmli). Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού [10% μείγματος ακρυλαμίδης (29% ακρυλαμίδη, 1% N,N' – μεθυλενοδισακρυλαμίδη), 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.2% SDS, 0.2% APS, TEMED], τοποθετείται εντός του συστήματος και αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτή συσσώρευσης αποτελείται από 5% μείγμα ακρυλαμίδης, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% APS και TEMED. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης Laemmli αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM Glycine pH 8.3, 0.1% SDS. Η πηκτή μετά το φόρτωμα των δειγμάτων ηλεκτροφορείται σε τάση 100V αρχικά και αφού τα δείγματα εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού αυξάνεται σε 120V.

22. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε native πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Στην ηλεκτροφόρηση αυτού του είδους, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων που ηλεκτροφορούνται, διαχωρίζονται βάσει του φορτίου τους, της δομής και του μοριακού τους βάρους. Τέτοιες πηκτές δεν είναι πληροφοριακές ως προς το είδος και το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης που ηλεκτροφορείται σε σχέση με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, αλλά μπορούν να δώσουν κάποια στοιχεία για την κατάσταση και τη συμπεριφορά των φυσικών πληθυσμών της πρωτεΐνης σε ένα έκλουσμά της [αν η πρωτεΐνη απεικονίζεται μετά από τη χρώση της πηκτής ως μια συμπαγής μπάντα (ένας ή λίγοι διακριτοί φυσικοί

πληθυσμοί μορίων) ή ως ένα νέφος (smear) καθ' όλη τη στήλη της ηλεκτροφόρησης (πολλοί και διαφορετικοί φυσικοί πληθυσμοί μορίων)]. Και σαφώς είναι ένας τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνικών μορίων που είναι επιθυμητό να διατηρήσουν την στερεοδιαμόρφωσή τους για να πραγματοποιηθούν πειράματα που απαιτούν κάτι τέτοιο (πχ αποτύπωση σε μεμβράνη και gel overlay, βλέπε παράγραφο 27) Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και το διάλυμα φόρτωσης κατά την προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων δεν περιέχουν SDS ούτε αναγωγικούς παράγοντες, και τα πρωτεϊνικά δείγματα δεν βράζονται πριν τη φόρτωσή τους στο πήκτωμα. Η πηκτική διαχωρισμού έχει pH 8.0 αντί για 8.8 που έχει στην SDS εκδοχή της. Η ηλεκτροφόρηση τέλος πραγματοποιείται στους 4⁰C.

23. Χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie και αποχρωματισμός

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Κατά αυτήν η πηκτή τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 2.5% w/v Coomassie blue) όπου και αφήνεται για 30-40' σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 1 ώρα σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι εμφανίζονται οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

24. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αρχικά αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Όταν το πήκτωμα απομακρυνθεί από τις ηλεκτροφορητικές πλάκες, εμποτίζεται σε 1x Transfer Buffer (25mM Tris, 200mM Glycine, 20% Methanol). Στη συνέχεια παρασκευάζεται η διάταξη του sandwich Western, κατά την οποία, μέσα σε ένα σύστημα πλακών τοποθετούνται κατά σειρά: ένα κομμάτι σπόγγου, τρία κομμάτια διηθητικού χαρτιού στις διαστάσεις του πηκτώματος, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στις διαστάσεις του πηκτώματος, τρία κομμάτια διηθητικού χαρτιού στις διαστάσεις του πηκτώματος και ένα κομμάτι σπόγγου, όλα εμποτισμένα καλά σε 1x Transfer Buffer (η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης πρέπει να τοποθετηθεί ακριβώς πάνω στο πήκτωμα, χωρίς φυσαλίδες μεταξύ τους, διότι η παρουσία φυσαλίδων θα εμποδίσει την μεταφορά των πρωτεϊνών στα σημεία όπου αυτές υπάρχουν). Κατόπιν, η

διάταξη μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτρομεταφοράς όπου αφήνεται ολονύκτια, σε τάση 30V και ένταση 100mA και στους 4⁰C. Εάν πρόκειται να πραγματοποιηθεί ηλεκτρομεταφορά native πηκτώματος, ακολουθούνται τα ίδια βήματα, με τη διαφορά ότι στο 1x Transfer Buffer δεν περιέχεται μεθανόλη.

25. Dot blot πρωτεϊνών

Ένας πιο χονδρικός και πιο γρήγορος τρόπος ανοσοανίχνευσης μιας πρωτεΐνης σε ένα εκχύλισμα πραγματοποιείται με τη λεγόμενη μέθοδο αποτύπωσης κουκίδας (dot blot). Κατ' αυτή, ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης ή διαυγούς διαλύματος λύσης, περιεκτικότητας 50-400ng περίπου, τοποθετούνται επί μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ή PVDF (polyvinylidene difluoride) και η μεμβράνη αφήνεται να στεγνώσει. Μαζί με τα δείγματα ενδιαφέροντος, επί της μεμβράνης τοποθετούνται και θετικοί/αρνητικοί μάρτυρες. Στη συνέχεια, ακολουθεί ανοσοανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα, ή με το μόριο Ni-NTA AP conjugate αν πρόκειται για πρωτεΐνη που φέρει ουρά ιστιδινών (βλέπε ακόλουθη παράγραφο).

26. Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών αποτυπωμένων σε μεμβράνη

A) με ειδικό αντίσωμα

Μετά την αποτύπωση η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.1% της χρωστικής Ponceau S σε 1% CH₃COOH για να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες επί της μεμβράνης και να πιστοποιηθεί η μεταφορά τους. Ο μοριακός μάρτυρας μεγέθους αποκόπτεται από τη μεμβράνη και η τελευταία αποχρωματίζεται με 2-3 πλύσεις με 1x TBS (10mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM NaCl). Η διαδικασία της ανοσοανίχνευσης αρχίζει και όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη αρχικά επώαζεται με παρεμποδιστικό διάλυμα (blocking solution) το οποίο αποτελείται από 5% σκόνη γάλακτος και TBST (10mM Tris-HCl pH 7.5, 25mM NaCl, 0.1% Tween 20) με ανάδευση για μία ώρα. Η επώαση με το παρεμποδιστικό διάλυμα πραγματοποιείται για την κάλυψη επί της μεμβράνης όλων των σημείων όπου δεν υπάρχει πρωτεΐνη, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος επί της μεμβράνης. Στη συνέχεια ακολουθούν 3x10min πλύσεις της μεμβράνης με TBST και η μεμβράνη επώαζεται με το πρώτο αντίσωμα, παρασκευασμένο στις περιπτώσεις που μας απασχόλησαν σε κουνέλι. Το αντίσωμα αραιώνεται σε TBST και 5% σκόνη γάλακτος, 1:50000 ή 1:70000 κατά περίπτωση, και ακολουθεί επώαση με ανάδευση για 2 ώρες. Εν συνεχεία η μεμβράνη

ξεπλένεται 3x10min με TBST. Ακολουθεί επώαση με το δεύτερο αντίσωμα της αλκαλικής φωσφατάσης (anti-rabbit IgG AP conjugate) σε διάλυση 1:7500 σε TBST και 5% σκόνη γάλακτος για 1 ώρα. Κατόπιν πραγματοποιούνται 3x10min πλύσεις της μεμβράνης με TBST. Τελικά, πραγματοποιείται η ανάπτυξη του σήματος ως εξής: σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος AP (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 5 mM MgCl₂, 100mM NaCl) προστίθενται 0.33 mg/ml NBT (nitro blue tetrazolium) και 0.165 mg/ml BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indonylphosphate). Τα υποστρώματα αυτά είναι ικανά να αναπτύξουν χρώμα κατά την αντίδρασή τους με την ενζυμική ομάδα της αλκαλικής φωσφατάσης υπό τις συνθήκες του ρυθμιστικού της διαλύματος. Το διάλυμα των υποστρωμάτων προστίθεται σε ρηχό δοχείο όπου έχει τοποθετηθεί η μεμβράνη, και ακολουθεί επώασή της στο σκοτάδι χωρίς ανάδευση. Η αντίδραση συνήθως ολοκληρώνεται μετά από 10 min και σταματά ξεπλένοντας τη μεμβράνη καλά με νερό.

B) με το μόριο Ni-NTA AP conjugate

Το σύνθετο αυτό μόριο περιέχει ιόντα νικελίου τα οποία φέρουν προσδεμένη μια ομάδα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση. Η επώαση του μορίου αυτού (εν διαλύσει σε κατάλληλα διαλύματα) με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί οι ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες με τη μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς, επιτρέπει την πρόσδεση των ιόντων νικελίου στα σημεία εκείνα της μεμβράνης όπου υπάρχουν κατάλοιπα ιστιδίνης. Όσο περισσότερα και συγκεντρωμένα είναι τα κατάλοιπα ιστιδίνης, τόσο μεγαλύτερη και πιο ειδική η πρόσδεση του μορίου επ' αυτών. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η ανίχνευση πρωτεϊνών που φέρουν His-tag. Η διαδικασία έχει ως εξής: μετά την αποτύπωση, την χρωματική ανίχνευση των πρωτεϊνών επί της μεμβράνης και τον ακόλουθο αποχρωματισμό της, ακολουθεί μπλοκάρισμα της μεμβράνης με TBS και 3% BSA για μία ώρα, με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3x10min πλύσεις της μεμβράνης με TBST και επώασή της με το μόριο Ni-NTA AP conjugate σε αραιώση 1:1000 σε TBST. Ακολουθούν 3x10min πλύσεις της μεμβράνης με TBST και ανάπτυξη του σήματος έτσι όπως περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο.

27. Μέθοδος gel overlay

Πρόκειται για μία μέθοδο κατά την οποία πρωτεΐνες ακινητοποιημένες σε μεμβράνη που φέρουν τη φυσική τους στερεοδιαμόρφωση επωάζονται με διάλυμα καθαρής πρωτεΐνης ή διαυγές διάλυμα λύσης που την περιέχει και κατόπιν

πραγματοποιείται ανοσοανίχνευση γι' αυτήν την πρωτεΐνη, με σκοπό να προσδιορισθεί εάν κάποιες από τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη της διαλυτής φάσης. Τέτοιες μεμβράνες με πρωτεΐνες που έχουν τη φυσική τους στερεοδιαμόρφωση μπορεί να έχουν προκύψει με τρεις τρόπους: α) από ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη μετά από native ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης, β) μετά από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, αποδιάταξή τους πάνω στη μεμβράνη και εκτεταμένη πλύση τους για απομάκρυνση της ουρίας και επαναδιάταξή τους επί της μεμβράνης και γ) μετά από dot blot πρωτεϊνών που είναι καθαρισμένες υπό φυσικές (native) συνθήκες. Εν προκειμένω, τέτοιες μεμβράνες προέκυψαν κατά τους τρόπους α) και γ). Οι μεμβράνες με τις ακινητοποιημένες πρωτεΐνες πλένονται 2x 10min με TBS, και ακολουθεί μπλοκάρισμα με TBST και 5% σκόνη γάλακτος. Κατόπιν, ακολουθούν 3x10min πλύσεις με TBST και στις μεμβράνες προστίθεται TBST με 1% σκόνη γάλακτος, το οποίο περιέχει 200μg της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Οι μεμβράνες επώζονται ολονύκτια στους 4⁰C. Την επόμενη ημέρα, ακολουθούν 6x5min πλύσεις με TBST και πραγματοποιείται επώαση των μεμβρανών με το ειδικό αντίσωμα της πρωτεΐνης της διαλυτής φάσης καθώς και τα υπόλοιπα βήματα της ανοσοανίχνευσης που περιγράφεται στην παράγραφο 26.

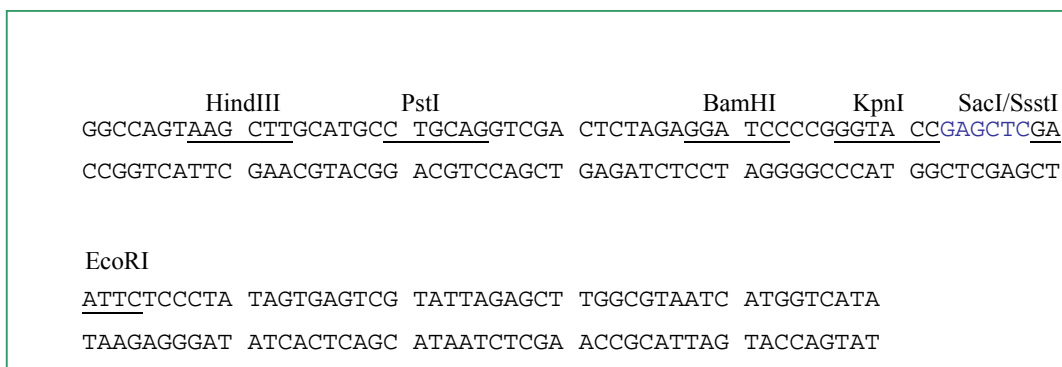
28. Επαγωγή του τύπου III εκκρηκτικού συστήματος από κύτταρα *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, στέλεχος Psp3121.

Από γλυκερολικό βακτηριακό stock αποθηκευμένο στους -80⁰C αναβιώνονται κύτταρα του ψευδομοναδικού στελέχους Psp3121 σε 2ml LB εφοδιασμένου με ριφαμυκίνη τελικής συγκέντρωσης 50μg/ml, με επώαση με ανάδευση στους 28⁰C για περίπου 40 ώρες. Η καλλιέργεια αυτή χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 100ml LB εφοδιασμένου με 50μg/ml ριφαμυκίνη και 10mM φρουκτόζη και ακολουθεί επώαση στους 28⁰C έως ότου η OD₆₀₀= 0.6-0.7. Στο σημείο αυτό, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 5000rpm για 30min, και η κυτταρική πελέτα ξεπλένεται δύο φορές με μέσο επαγωγής hrp (hrp inducing medium)(50mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, pH 5.8, 7.6mM (NH₄)₂SO₄, 1,7mM MgCl₂ και 1.7mM NaCl). Μετά τις πλύσεις, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 100ml μέσου επαγωγής hrp, εφοδιασμένου με 10mM φρουκτόζη, 10mM μαννιτόλη και 50μg/ml ριφαμυκίνη. Λαμβάνεται ένας όγκος 45ml ως non induced δείγμα, το οποίο φυγοκεντρείται και η κυτταρική πάστα αποθηκεύεται στους -80⁰C. Η υπόλοιπη καλλιέργεια μεταφέρεται στους 25⁰C και επώάζεται για 12 ώρες με ανάδευση,

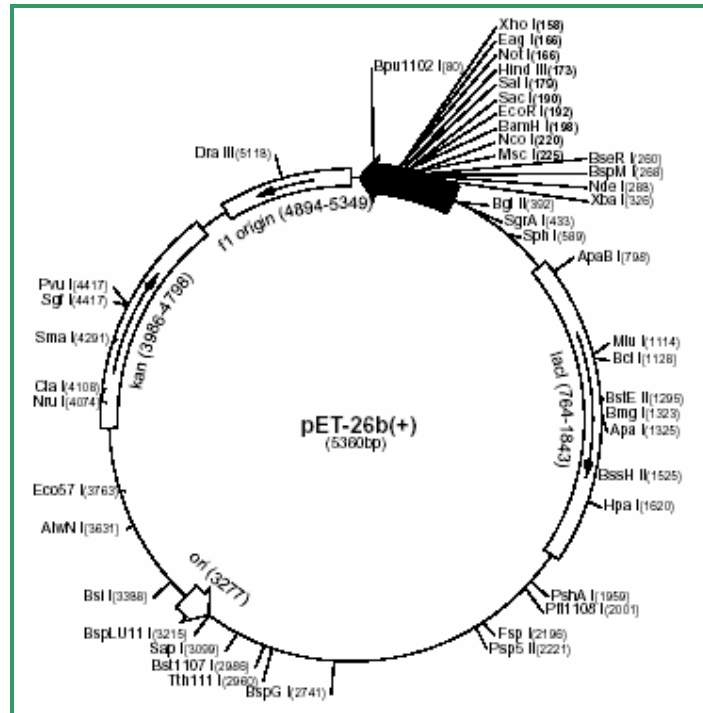
οπότε και λαμβάνεται 1ml για να φωτομετρηθεί ενώ η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρείται και η κυτταρική πάστα (induced δείγμα) αποθηκεύεται στους -80°C .

29. Προετοιμασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έκλουσης από στήλη Ni-NTA αγαρόζης για ανάλυσή του σε κολώνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 (gel filtration).

Τα εκλούσματα ανασυνδυασμένης HT-πρωτεΐνης που καθαρίστηκε από κυτταρική πάστα 2 Lt καλλιέργειας μέσω στήλης νικελίου ενώθηκαν και το δείγμα που προέκυψε υπεβλήθη σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl και 1mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Το διάλυμα αυτό στη συνέχεια συμπυκνώθηκε με χρήση μεμβράνης Amicon (3000 cut off: επιτρέπει τη διέλευση από τους πόρους της μορίων με μέγεθος ≥ 3000 Da). Στο συμπυκνωμένο δείγμα, όγκου 4 ml προστέθηκε 1mM DTT και στη συνέχεια αυτό εφαρμόστηκε σε κολώνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100, η οποία είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl και 1mM β-μερκαπτοαιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης συνελέγησαν κλάσματα όγκου 5ml το καθένα, και μετά το πέρας της διαδικασίας, δείγμα όλων των κλασμάτων ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15% για την αναγνώριση των φυσικών πληθυσμών που διαχωρίστηκαν κατά την εφαρμογή της μοριακής διήθησης.



Εικόνα 2. Ο πολυσυνδέτης του φορέα κλωνοποίησης και πρωτεϊνικής έκφρασης ευρέως φάσματος pDN18.



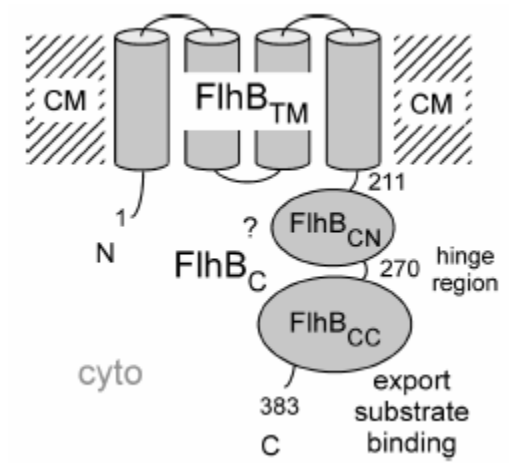
Εικόνα 3. Χάρτης του φορέα κλωνοποίησης και πρωτεϊνικής υπερέκφρασης pET26b.

Αποτελέσματα



Εισαγωγή

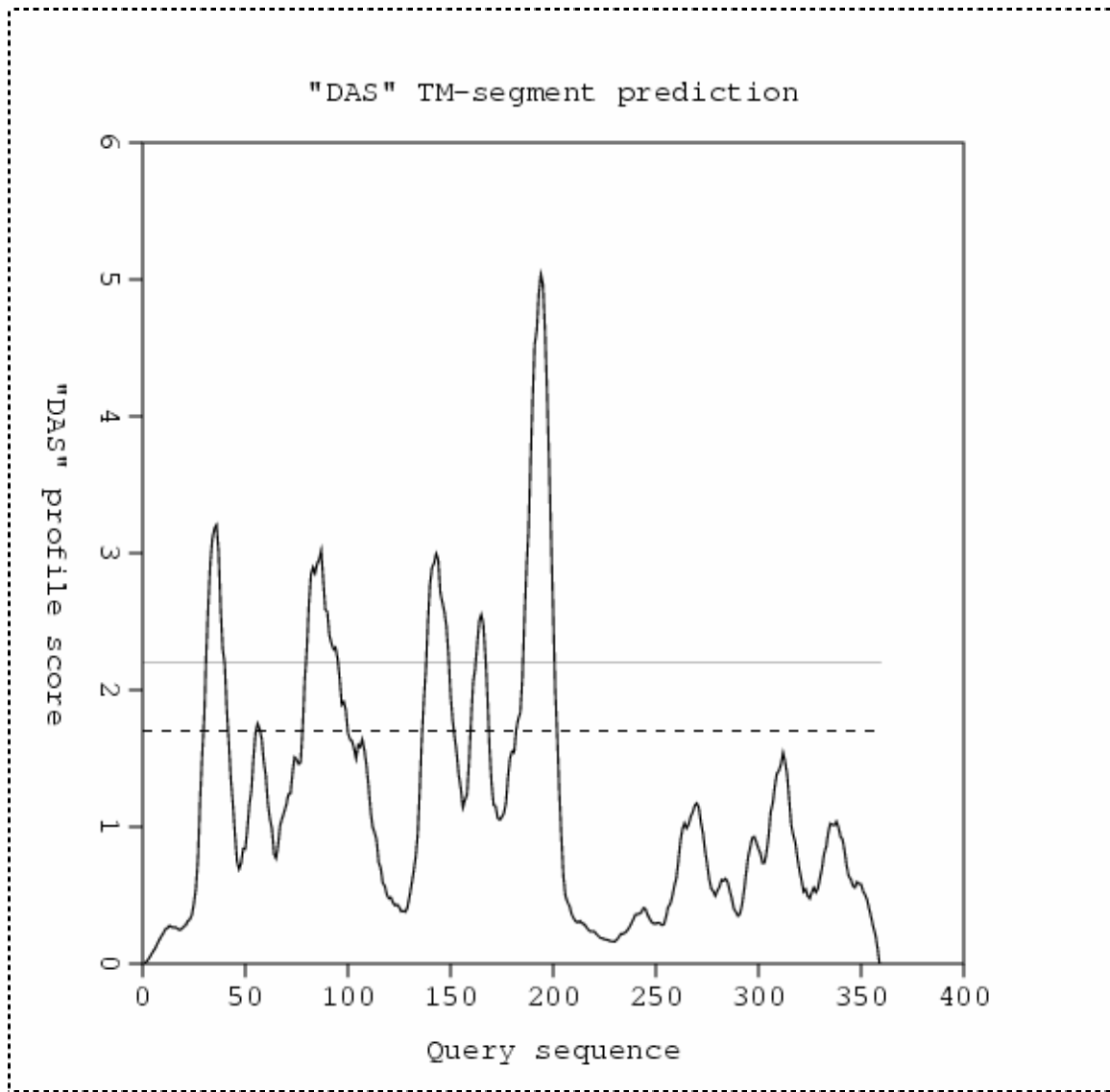
Η HrcU της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, ομόλογη της πρωτεΐνης FlhB του βακτηριακού μαστιγίου (Εικόνα 4) προβλέπεται ότι φέρει επίσης τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (Εικόνες 6 και 7) και μια εκτεταμένη καρβοξυτελική περιοχή η οποία εκτίθεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Φέρει το μοτίβο NPTH στις θέσεις 265-268 και προγράμματα πρόβλεψης μοτίβων μαρτυρούν την ύπαρξη ενός μοτίβου ABC μεταφορέων στις θέσεις 88-102. Στην εικόνα 5 ακολουθεί πολλαπλή στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας των τεσσάρων κυριότερων εκπροσώπων της οικογένειας FlhB/YscU/HrcU/SpaS.



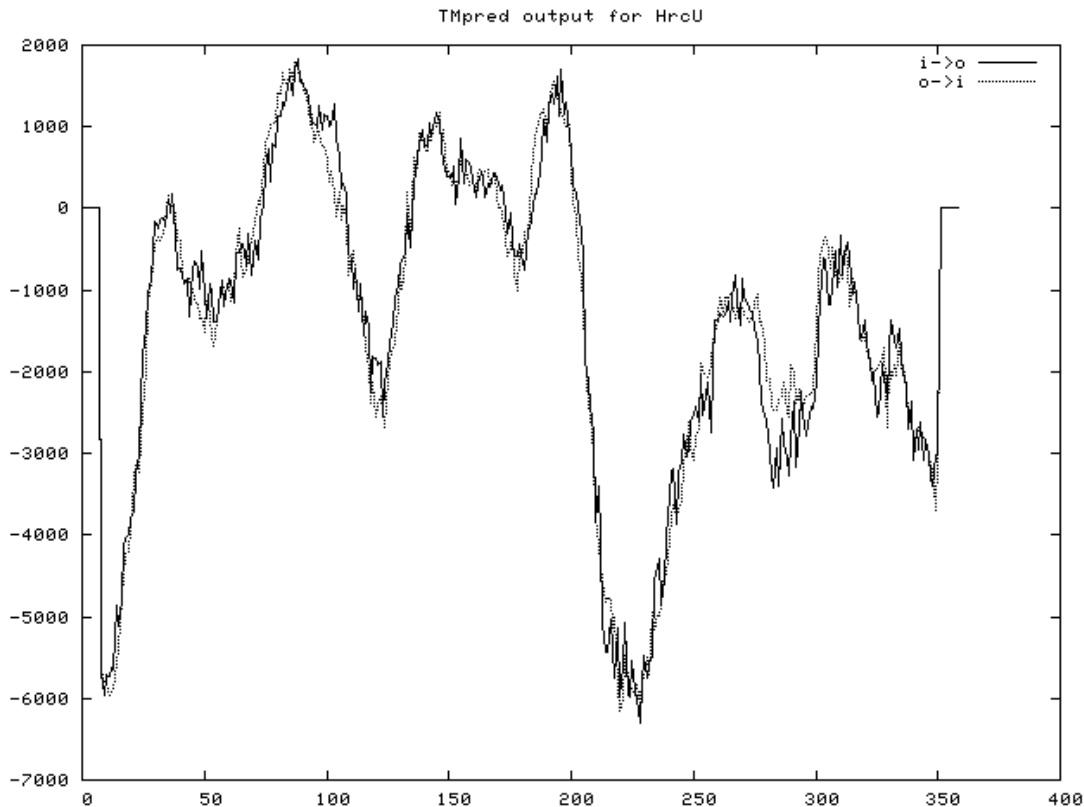
Εικόνα 4. Υποθετική δομή της πρωτεΐνης FlhB, αποτελούμενης από μια αμινοτελική διαμεμβρανική περιοχή (FlhB_{TM}), και μια καρβοξυτελική κυτταροπλασματική περιοχή (FlhB_C). Η περιοχή FlhB_C αποτελείται από δύο υποπεριοχές, την FlhB_{CN} και την FlhB_{CC} και συνδέονται από έναν πρωτεολυτικά ευαίσθητο αρμό, που έχει κέντρο την Pro-270. Η υποπεριοχή FlhB_{CC} φαίνεται να εμπλέκεται ευθέως στην πρόσδεση υποστρωμάτων προς έκκριση. Ο ρόλος της υποπεριοχής FlhB_{CN} είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Cyto: κυτταροπλασματικό διαμέρισμα (cytoplasmic compartment). CM: κυτταροπλασματική μεμβράνη (cytoplasmic membrane) (Minamino et al., 2000).

YscU_YersInIA	---MSGEKTEQPTPKKIRDARKKGQVAKSKEVVSTALIVALSAMLMGLSDYFHEHFSKL	56
SPAS_SALMoneLLA	---MSSNKTEKPTKKRLEDSAKKGQSFKSKDLIIACLTLGGIAYLVSYGSFN-EFMGII	55
HrcU_PseudoMonAs	----MSEKTEKATPKQIRDAREKGQVQSQDLGKLLVLMVVEITLGLADDSVDRLQAL	55
FlhB_FlAgeLLuM	MAEESDDDKTEAPTPhrLEKAREEGQIPRSRELTSLILLVGVCIWFVGESLARQLAGM	60
	. : * * . * : : : : . : * * : * : : : : : : . : : : . : :	
YscU_YersInIA	M--LIPAEQSYLPFSQALSYVVDNVLLEFFYLCPPLLTVAAALMAIAshVVQYGFLLISGEA	114
SPAS_SALMoneLLA	K--IIADN---FDQSMADYSLAVFGIGLYLIPFMLLCLVCSALPALLQAGFVLATEA	109
HrcU_PseudoMonAs	L--ALSFKGIIDRSFAASVELIASEGLSVLLSFTLCSVGMAMLMRLVSSWMQIGFLFAPKA	113
FlhB_FlAgeLLuM	LSAGLHFDHRMVNDPNLILGQIILLIKAAMALLPLIAGVVLVALISPVMLGGLIFSGKS	120
	: . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * : : : : :	
YscU_YersInIA	IKPDIKKINPIEGAKRIFSIKSLVEFLKSIKVVLLSILIWIIKGNLVTLLQLPTCGIE	174
SPAS_SALMoneLLA	LKPNLSALNPVEGAKLFSMRTVKDTPKTLVLYLSSFVVAIICWKKYKVEIFSQNLGNIV	169
HrcU_PseudoMonAs	LKLDINKINPFSHAKQMFSGQNILNLLSILKAVAIATLYMQVKPALGALILLANSDLT	173
FlhB_FlAgeLLuM	LQPKFKSKLNPVPGIKRMFSAQTGAELKAVLKSTLVGCVTGFYLNWNHPQMMRLMAESPI	180
	: : . : . : * * . : * : * * : . : : : : * . : : : : : : : : :	
YscU_YersInIA	CITPLLQIILRQLMVICTVGFVVISIADYAFEYYQYIKELKMSKDEIKREYKEMEGSPEI	234
SPAS_SALMoneLLA	GIAVIWRELLLALVLTCLACALIVLLDAIAEYFLTMKDMKMDKEEVKREMKEQEGNPEV	229
HrcU_PseudoMonAs	TYWHALVELFRHILRVILGLLLVVAMVDFAMQKYFHAKKLRMSHEDIKKEYKQSEGDPHV	233
FlhB_FlAgeLLuM	VAMGNALDLVGLCALVVLGVIPMVGFDFVFFQIFSHLKKLRMSRQDIRDEFKESEGDPHV	240
	: : . : : : : : : : * : : : : * : : * : : * : : : : * * : * * . * : :	
YscU_YersInIA	KSKRRQFHQEIQSRN---MRENVKRSSVVVANPHTHIAIGILYKRGETPLPLVTFKYTDAQ	291
SPAS_SALMoneLLA	KSKRREVHMEILSEQ---VKSDIENSRLIVANPHTITIGIYFKPELMPIPMISVYETNQR	286
HrcU_PseudoMonAs	KGHRRLSHEILNQEPsAAPNPVEEADMLLVNPHTYAVALYRPGETPLPLIHCKGEDEE	293
FlhB_FlAgeLLuM	KGKIRQMORAAAQRR---MMEDVPKADVIVTNPHTYSVALQYDENKMSAPKVVAKGAGLI	297
	* . : * : . : . . : . : : : : . * * * : : : : : . * : . : .	
YscU_YersInIA	VQTVRKIAEEEGVPILQRIPLARALYWDALVDHYIPAEQIEATAEVLRWLERQN-----	345
SPAS_SALMoneLLA	ALAVRAYAEKVGVPVVDIKLARSLFKTHRRYDLVSLLEEIDEVLRLLVWLEEVENAGKDV	346
HrcU_PseudoMonAs	ALALIAARAKKAGIPVQSIWLTRTLR-akvGKYIPRPTLQAVGHLYKVVRLDEITDEV	352
FlhB_FlAgeLLuM	ALRIREIGAEHRVPTLEAPPLARALYRHAIEGQIPGQLYAavaeVLAWVWLKRWRLAG	357
	. : . : . : : * : : * : * * : : . : . : . : . : . : . : .	
YscU_YersInIA	IEKQHSEML-----	354
SPAS_SALMoneLLA	IQPQENEVRH-----	356
HrcU_PseudoMonAs	IQVEVEL-----	359
FlhB_FlAgeLLuM	GQRPPQPEENLPVPEALDFMNEKNTDG	383
	: .	

Εικόνα 5. Πολλαπλή στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας των τεσσάρων κυριότερων εκπροσώπων της οικογένειας FlhB/ YscU/ HrcU/SpaS. Η στοίχιση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι συντηρημένες θέσεις στις τέσσερις αλληλουχίες, ενώ με πράσινο τα υδρόφοβα κατάλοιπα.



Εικόνα 6. Πρόβλεψη υδροφοβικότητας και διαμεμβρανικών περιοχών επί της αλληλουχίας της πρωτεΐνης HrcU. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχίζεται σε χαλαρό κατώφλι ενώ η συνέχεια σε αυστηρό κατώφλι αυστηρότητας πρόβλεψης. Βάσει του δεύτερου, η πρωτεΐνη προβλέπεται να έχει τέσσερις πιθανές διαμεμβρανικές περιοχές. Η πρόβλεψη πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα DAS (EXPASY TOOLS).



Εικόνα 7. Πρόβλεψη υδροφοβικότητας και διαμεμβρανικών περιοχών της πρωτεΐνης HrcU βάσει του προγράμματος TMpred. Εδώ αναγνωρίζονται τέσσερις πιθανές διαμεμβρανικές έλικες: 1^η. 28-45αα, με κέντρο το κατάλοιπο 36. 2^η. 78-96αα, με κέντρο το κατάλοιπο 88. 3^η. 139-157αα, με κέντρο το κατάλοιπο 147, και 4^η. 185-204αα, με κέντρο το κατάλοιπο 194.

Ακολουθεί πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής για τις τέσσερις κυριότερες πρωτεΐνες της οικογένειας FlhB/ YscU/ HrcU/ SpaS με το πρόγραμμα PsiPred:

YscU

Conf: Confidence (0=low, 9=high)

Pred: Predicted secondary structure (H=helix, E=strand, C=coil)

AA: Target sequence

Conf: 9878888844689999997188975420999999999999999997899999999999988

Pred: CCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHH

AA: MSGEKTEQPTPKKIRDARKKQVAKSKEVVSTALIVALSAMLMGLSDYYFEHFHFSKMLMLIP

FlhB

Conf: Confidence (0=low, 9=high)

Pred: Predicted secondary structure (H=helix, E=strand, C=coil)

AA: Target sequence

Conf: 9200241010457797845689999997188975410999999999999998999999

Pred: CCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

AA: MKLRVDLQFFAGEKTEKATPKKRKDTRKKGQVAKSSDVNTAVSLLVIFLSLIAIGPYMRD

10 20 30 40 50 60

Conf: 99999998722402105776689999998877314344378999998877778870233

Pred: HHHHHHHHHHCCCHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCC

AA: RLLSFIETFYTESLTMKLSESNVHTLFVSLKDMGMILAPILLVALVAGVVSNYMQVGFL

70 80 90 100 110 120

Conf: 54200263722367368889851478999999999999999999999981188998753

Pred: CCCCCCCCCCCHHH

AA: FSAEVIQPKLEKLDPIKGFKRIYSMRAIVELIKSILKIVVVGFAAFVLWLHYGEILRLP

130 140 150 160 170 180

Conf: 689989999999999999999999999999999999840689789999976278

Pred: CCCHHCC

AA: LLTPPEALS FVSKLTLWMGLSGAGALLILAGLDYLYQRFDYKNIKMSKQDIKDEYKSE

190 200 210 220 230 240

Conf: 998789999999999972015641586838875685068778632678999879882615

Pred: CCHHHHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHCCCCCEEEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCEEEECCH

AA: GDPIIKSKIKQRQREMAMRRMMQEVKADVIIIT**NPTH**YAIALKYDEEKMDAPYIVAKGVD

250 260 270 280 290 300

Conf: 89999999999778973408799999997288766589889999999999999801469

```
Pred: HHHHHHHHHHHHCCCCEEECHHHHHHHHHHCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCC
AA: HLALKIRKIAKEHDVMMVENRPLARALYDQVEIDQAVPEEFFKVLAEILAYVYKTKQKVY
      310      320      330      340      350      360
```

HrcU

Conf: Confidence (0=low, 9=high)

Pred: Predicted secondary structure (H=helix, E=strand, C=coil)

AA: Target sequence

```
Conf: 9888877346899999971889754309999999999999997899999999999986
Pred: CCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: MSEKTEKATPKQIRDAREKGQVGQSQDLGKLLVLMVSEITLGLADDSVDRLQALLALSF
      10      20      30      40      50      60
```

```
Conf: 421667777899999978898631311257899998887678872233552013637323
Pred: HHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: KGIDRSFAASVELIASEGLSVLLSFTLCSVGMAMLMRLVSSWMQIGFLFAPKALKLDINK
      70      80      90      100     110     120
```

```
Conf: 673678888514779999999999999999999999982088998753689989999999
Pred: CCHHHHHHHHHHCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: INPFSHAKQMFSGQNILNLLLSILKAVAIGATLYMQVKPALGALILLANSDLTTYWHALV
      130     140     150     160     170     180
```

```
Conf: 99999999999999999999999999999999999998406897899999976278998789999999
Pred: HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
AA: ELFRHILRVILGLLLVAMVDFAMQKYFHAKLRMSHEDIKKEYKQSEGDPHVKGHRRQL
      190     200     210     220     230     240
```

```
Conf: 999985023124456661637776670688777632788999879883615899999999
```


AA: ALVLTCLACALIVLLLLDAIAEYFLTMDKMDKKEEVKREMKEQEGNPEVKSRRREVHMEI
 190 200 210 220 230 240

Conf: 720255411747388656706887776236889997798727158999999999976897

Pred: HHHHHHHHCCCCCEEECCCEEEEEEECCCCCCCCCEEECCCHHHHHHHHHHHHHCCCC

AA: LSEQVKSDIENSRLIVANPTHITIGIYFKPELMPIPMISVYETNQRALAVRAYAEKVGVP
 250 260 270 280 290 300

Conf: 24087999999972887655898899999999999999997368865888888889

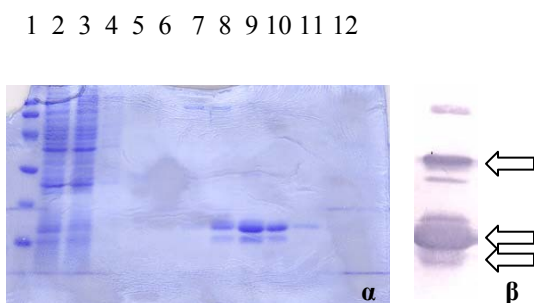
Pred: EECCHHHHHHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

AA: VIVDIKLARSLFKTHRRYDLVSLEEIDEVLRLLVWLEEVENAGKDVIQPQENEVRH
 310 320 330 340 350

A) Χαρακτηρισμός HrcU C199

1. Καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) με χρήση στήλης συγγένειας Ni-NTA αραρόζης

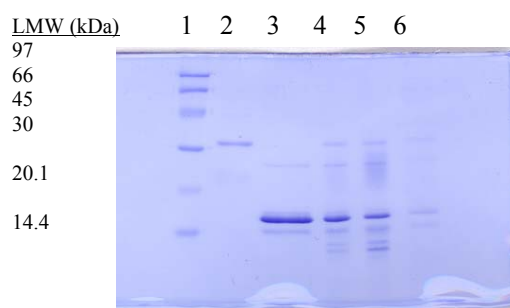
Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και ανιχνεύθηκαν τρεις ζώνες, 28, 17 και 15 kDa περίπου αντίστοιχα (Εικόνα 8α). Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης είναι 22 kDa και εάν ληφθεί υπόψη το γεγονός της πρωτεόλυσης που βάσει της βιβλιογραφίας (βλέπε Εισαγωγή) πραγματοποιείται στο μοτίβο NPTH, στη δική μας περίπτωση θα πρέπει να κόβει το μόριο σε δύο περίπου ίσα κομμάτια. Πρωταρχικό πείραμα ανοσοανίχνευσης με αντίσωμα για την HrcU (Εικόνα 8β) φανέρωσε ότι και οι τρεις ζώνες ανήκουν στην πρωτεΐνη καθώς και οι τρεις αναγνωρίζονται από το αντίσωμα.



Εικόνα 8. α. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των δειγμάτων καθαρισμού της His_{N10}-HrcU C199: Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διαυγές διάλυμα λύσης. Στήλη 3: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη (flowthrough). Στήλη 4, 5 και 6: πλύσεις σε 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 7, 8, 9, 10, 11 και 12: εκλούσματα της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο. Η μέγιστη ποσότητα της πρωτεΐνης φαίνεται να εκλύεται στα 150 mM ιμιδαζόλιο. **β.** Ανοσοανίχνευση της έκλουσης της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 με 150mM ιμιδαζόλιο, με το αντίσωμα για την πρωτεΐνη HrcU σε αραίωση 1:50000. Με τα βέλη προσδιορίζονται οι ζώνες που αναγνωρίζει το αντίσωμα για την HrcU και οι οποίες βάσει του μοριακού μάρτυρα μεγεθών αντιστοιχίζονται στις ζώνες 15, 17 και 28 kDa που είναι ορατές και στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

2. Κοπή της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 με τον παράγοντα Xa

Η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 εκφρασμένη από τον φορέα έκφρασης pET16b έχει αμινοτελικά δέκα κατάλοιπα ιστιδίνης. Ο σχεδιασμός του φορέα είναι τέτοιος που δίνει τη δυνατότητα αποκοπής της ουράς αυτής ιστιδινών από την παραγόμενη πρωτεΐνη, καθώς μεταξύ του his-tag και της αρχής της πρωτεΐνης υπάρχει ένα μοτίβο αναγνώρισης για την εξειδικευμένη πρωτεάση factor Xa. Θεωρήθηκε σκόπιμο, στα πλαίσια της προσπάθειας ταυτοποίησης των τριών ζωνών που δίνει ο καθαρισμός της His₁₀-HrcU C199, να πραγματοποιηθεί πέψη της πρωτεΐνης με τον παράγοντα αυτόν και τα προϊόντα πέψης να διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση. Δυστυχώς οι πέψεις που πραγματοποιήθηκαν δεν ήταν πλήρεις (Εικόνα 9), δηλαδή οι άκοπες ζώνες συνυπήρχαν με τις κομμένες, και δεν ήταν δυνατή η διεξαγωγή συμπερασμάτων από τα ηλεκτροφορητικά πηκτώματα.

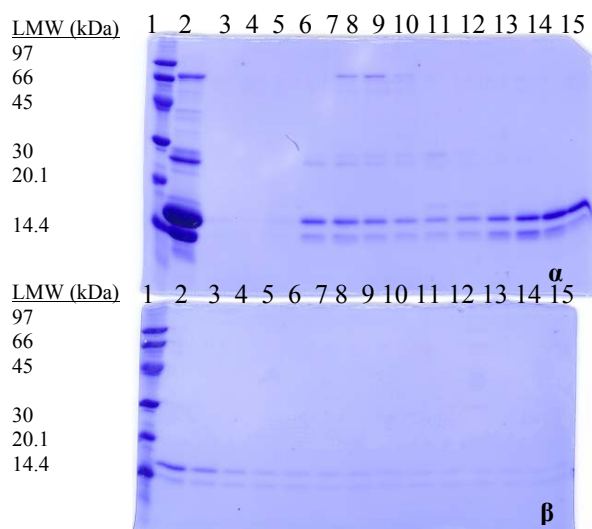


Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των προϊόντων πέψης των εκλουσμάτων της πρωτεΐνης His₁₀-HrcU C199 με τον παράγοντα Xa. Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: ηλεκτροφορημένος παράγοντας Xa. Στήλη 3: άκοπο έκλουσμα της πρωτεΐνης His₁₀-HrcU C199. Στήλες 4, 5, 6: προϊόντα πέψης της πρωτεΐνης His₁₀-HrcU C199 με τον παράγοντα Xa, σε τρεις διαφορετικούς τελικούς όγκους αντίδρασης (50, 100 και 150 μl αντίστοιχα)

3. Καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μεγάλη κλίμακα (2Lt καλλιέργειας) και προετοιμασία της για FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Σε συνεργασία με το εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μεγάλη κλίμακα (2Lt καλλιέργειας) από στήλη νικελίου. Τα εκλούσματα της πρωτεΐνης ενώθηκαν, υπεβλήθησαν σε διαπίδυση (dialysis) εναντίον διαλύματος συμβατού με τις συνθήκες της

χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, συμπυκνώθηκαν και φορτώθηκαν σε στήλη gel filtration. Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν ο διαχωρισμός βάσει μοριακού βάρους των φυσικών πληθυσμών μορίων που υπάρχουν μέσα στο διάλυμα έκλυσης της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199. Η διαδικασία αυτή ανέδειξε δύο φυσικούς πληθυσμούς της πρωτεΐνης, με τον ένα να βγαίνει από τη στήλη σε μεγάλα μοριακά βάρη, και τον δεύτερο και ποσοτικά σημαντικότερο, να ακολουθεί ακριβώς μετά (Εικόνα 10). Ο ακριβής προσδιορισμός των μοριακών βαρών των πληθυσμών αυτών δεν ήταν δυνατός σε πρώτη φάση, λόγω τεχνικών ελλείψεων του εργαστηρίου κρυσταλλογραφίας εκείνη την περίοδο. Ο δεύτερος και κύριος πληθυσμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 συνελέγη, το διάλυμα υπεβλήθη σε διαπίδυση και συμπύκνωση και το δείγμα που προέκυψε μετά από την κατεργασία αυτή προωθήθηκε για πρωταρχικά πειράματα κρυστάλλωσης. Τα πειράματα αυτά δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα, μάλλον λόγω ακαταλληλότητας του μορίου της πρωτεΐνης έτσι όπως αυτή εκφράζεται από την συγκεκριμένη πλασμιδιακή κατασκευή: στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης έτσι ως έχει, υπάρχουν 10 περίπου υδρόφοβα κατάλοιπα, τα οποία ευθύνονται για την τάση της πρωτεΐνης αυτής να σχηματίζει αδιάλυτα συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό καθιστά αδύνατη τη συμπύκνωση της πρωτεΐνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, κάτι που αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη οποιουδήποτε πειράματος κρυστάλλωσης.



Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων που προέκυψαν από την εφαρμογή gel filtration στο έκλουσμα που περιέχει την καθαρισμένη πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199. **α.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: έκλουσμα της πρωτεΐνης πριν περάσει από τη στήλη της gel filtration. Στήλη 3 έως 15: κλάσματα 20, 22, 24... έως 44 της gel filtration. **β.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2 έως 15: κλάσματα 46 έως 72 της gel filtration. Οι δύο πληθυσμοί μορίων που φαίνονται στα δύο πηκτώματα περιλαμβάνονται στα κλάσματα 26-34 (μεγαλομοριακός πληθυσμός) και 38-48 (μικρομοριακός πληθυσμός).

4. Κλωνοποίηση του γονιδιακού θραύσματος HrcU C199 στον φορέα έκφρασης pET26b.

Στα πλαίσια της προσπάθειας διερεύνησης της ταυτότητας των θραυσμάτων της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199, θεωρήθηκε σκόπιμη η κλωνοποίηση του γονιδιακού θραύσματος της αυτής πρωτεΐνης στον φορέα έκφρασης pET26b, ο οποίος προσδίδει μια ουρά 5 ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Το γονιδιακό θραύσμα αυτό απομονώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), με μήτρα το πλασμίδιο pET16b/HrcU C199. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

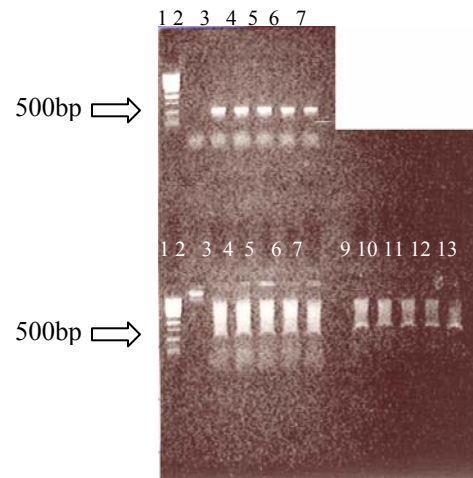
Forward (φέρει θέση περιορισμού για το ένζυμο NdeI): 5'- ctggctcgtccatgatggctgacttcg -3'

Reverse (φέρει θέση περιορισμού για το ένζυμο BamHI): 5' – cttggatccccacctcaac – 3'

και οι συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του θραύσματος DNA ενδιαφέροντος είναι οι παρακάτω:

1. 94⁰C για 5 min
2. 94⁰C για 30 sec
3. 55⁰C για 30 sec
4. 72⁰C για 1 min
5. Go to step 2 for 25 cycles
6. 72⁰C για 5 min
7. 4⁰C for ever

Μετά την αντίδραση, το προϊόν καθαρίστηκε και υπεβλήθη σε διαδοχικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού NdeI και BamHI. Στην ίδια διαδικασία πέψεων υπεβλήθη και ο φορέας έκφρασης pET26b. Τα θραύσματα αυτά μετά τον καθαρισμό τους από τα συστατικά των αντιδράσεων πέψης υπεβλήθησαν σε αντίδραση λιγάσης σε αναλογία άκρων 1:3 και 1:5 και οι αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ δεκτικών κυττάρων JM83. Πέντε από τους κλώνους που αναπτύχθηκαν στα τριβλύα μετασχηματισμού, αποτέλεσαν υλικό για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (minipreps), με σκοπό την ανίχνευση των θετικών κλώνων. Τα πλασμιδιακά DNA που προέκυψαν, υπεβλήθησαν α) σε διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα NdeI/BamHI και XbaI/SacI (τα δύο αυτά ένζυμα κόβουν εκατέρωθεν των θέσεων κλωνοποίησης και πολύ κοντά σε αυτές), β) σε PCR με τους εκκινητές της κλωνοποίησης, ως δεύτερη προσέγγιση, εναλλακτική των πέψεων. Η εικόνα των πέψεων και των αντιδράσεων PCR μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε 1% πήκτωμα αγαρόζης, εικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 11).



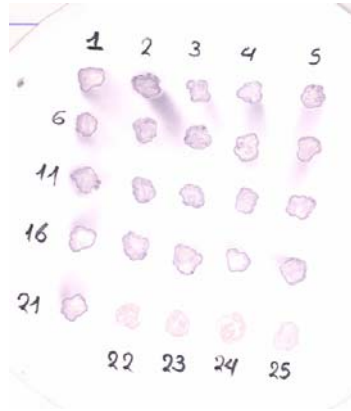
Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης των αντιδράσεων PCR (άνω τμήμα πηκτώματος) και των αντιδράσεων πέψης (κάτω τμήμα πηκτώματος) των πλασμιδιακών DNA από τα minipreps του τριβλύου μετασχηματισμού pET26b/HrcU C199. Άνω τμήμα πηκτώματος: Στήλη 1: μάρτυρας μεγέθους λ/PstI. Στήλη 2: αρνητικός μάρτυρας PCR. Στήλες 3 έως 7: προϊόντα PCR για τα πλασμιδιακά DNA των minipreps 1 έως 5. Το ενισχυμένο θραύσμα έχει αναμενόμενο μέγεθος 500 περίπου bp. Βάσει του μάρτυρα λ/PstI, όλα τα minipreps αντιστοιχούν σε θετικούς κλώνους. Κάτω τμήμα πηκτώματος: Στήλη 1: μάρτυρας μεγέθους λ/PstI. Στήλη 2: υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA από το miniprep 1. Στήλες 3 έως 7: αντιδράσεις πέψης των minipreps 1 έως 5 με το ζεύγος ενζύμων NdeI/BamHI. Το αναμενόμενο μέγεθος της ζώνης που αναμένεται είναι 500 περίπου bp. Στήλες 9 έως 13: αντιδράσεις πέψης των minipreps 1 έως 5 με το ζεύγος ενζύμων XbaI/SacI. Το αναμενόμενο μέγεθος της ζώνης που αναμένεται είναι 520 περίπου bp. Και για τα δύο ζεύγη πέψεων, το μέγεθος των ζωνών που ελήφθησαν φαίνεται να είναι σωστό.

Και οι πέντε κλώνοι που επελέγησαν ήταν θετικοί, και το DNA αυτών αποτέλεσε υλικό μετασχηματισμού με θερμικό σοκ δεκτικών κυττάρων BL21(DE3)(pLysS). Από τους νέους αυτούς κλώνους παρασκευάστηκαν γλυκερολικά stock για μακρόχρονη αποθήκευση στους -80°C .

5. Αποτύπωση αποικίας (dot blot) από το πιάτο μετασχηματισμού pET26b/HrcU C199 σε κύτταρα BL21(DE3)(pLysS).

Για την ανεύρεση λειτουργικών κλώνων που υπερπαραγάγουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη HT_{C5}-HrcU C199, πραγματοποιήθηκε αποτύπωση αποικίας, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν 21 αποικίες του τριβλύου μετασχηματισμού και 4 αποικίες κυττάρων BL21(DE3)(pLysS) που φέρουν τον φορέα pET26b ως αρνητικοί μάρτυρες. Η

ανοσοαποτύπωση έγινε με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την πρωτεΐνη HrcU σε αραιώση 1:50000. Το πείραμα έδειξε ότι όλοι οι κλώνοι παράγουν λειτουργική πρωτεΐνη (Εικόνα 12).

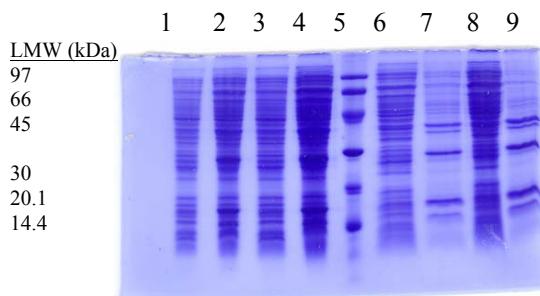


Εικόνα 12. Αποτύπωση αποικιών για έλεγχο της έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HrcU C199 από τον φορέα pET26b. Όλες οι αποικίες εκφράζουν την πρωτεΐνη (αποικίες 1 έως 21), ενώ οι αρνητικοί μάρτυρες (αποικίες 22 έως 25, φέρουν μόνο τον φορέα pET26b) δεν έχουν δώσει σήμα.

6. Επαγωγή της πρωτεΐνης HT_{C5}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μικρή κλίμακα.

Για την διερεύνηση της διαλυτότητας της εκφραζόμενης πρωτεΐνης HT_{C5}-HrcU C199 πραγματοποιήθηκε επαγωγή της από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) σε μικρή κλίμακα (10ml καλλιέργειας). Απομονώθηκαν δείγματα καλλιέργειας 1ml έκαστο πριν και μετά την επαγωγή, και η κυτταρική πάστα επαγωγής χωρίσθηκε σε δύο τμήματα. Αυτά επαναδιαλύθηκαν σε δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης: Διάλυμα 1: 20mM Tris-Cl pH 8.0, 300mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, και Διάλυμα 2: 20mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM NaCl, 5 mM ιμιδαζόλιο, 1% Triton X-100. Τα επαναδιαλυμένα κύτταρα υπεβλήθησαν σε κατεργασία με υπερήχους, και με φυγοκέντρηση διαχωρίσθηκαν οι πελέτες από τα υπερκείμενα διαλύματα. Οι πελέτες επαναδιαλύθηκαν στο αντίστοιχο διάλυμα λύσης. Όλα τα δείγματα που προέκυψαν μαζί με τα κύτταρα πριν και μετά την επαγωγή ετοιμάστηκαν για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και αναλύθηκαν. Η εικόνα του ηλεκτροφορημένου ηλεκτώματος φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 13). Βάσει αυτής, εξάγονται δύο βασικά

συμπεράσματα: α) η επαγωγή της πρωτεΐνης HT_{C5}-HrcU C199 έχει πραγματοποιηθεί, διότι εάν συγκρίνει κανείς το επαγόμενο δείγμα σε σχέση με το μη επαγόμενο, παρατηρεί το γνωστό πρότυπο των τριών ζωνώσεων στα 28, 17 και 15 περίπου kDa) και β) η περισσότερη ποσότητα της πρωτεΐνης HT_{C5}-HrcU C199 κατακρημνίζεται στο αδιάλυτο μεμβρανικό κλάσμα.

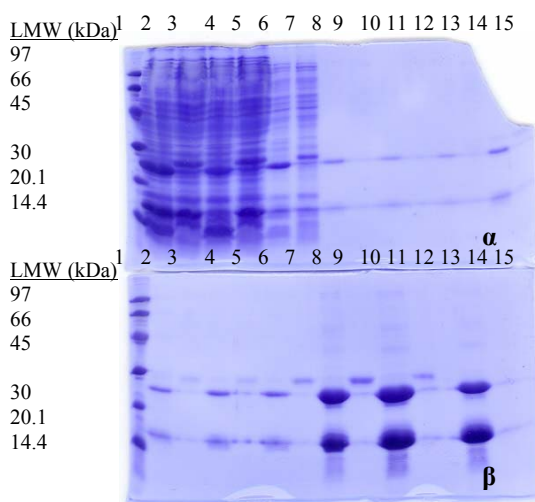


Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% μη επαγόμενου και επαγόμενου δείγματος της πρωτεΐνης His_C-HrcU C199, και υπερκειμένων και ιζημάτων μετά την επαγωγή στα δύο διαφορετικά διαλύματα λύσης: Στήλη 1: μη επαγόμενο δείγμα, όγκου 5μl. Στήλη 2: επαγόμενο δείγμα, όγκου 5μl. Στήλη 3: μη επαγόμενο δείγμα, όγκου 10μl. Στήλη 4: επαγόμενο δείγμα, όγκου 10μl. Στήλη 5: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλες 6 και 7: υπερκείμενο διάλυμα και ίζημα αντίστοιχα, στο διάλυμα λύσης με 300mM άλας και χωρίς Triton X-100. Στήλες 8 και 9: υπερκείμενο διάλυμα και ίζημα αντίστοιχα, στο διάλυμα λύσης με 50mM άλας και με 1% Triton X-100.

7. Αποδιατακτικός καθαρισμός των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HT_{C5}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) για σύγκριση των δύο προτύπων καθαρισμού

Οι δύο πρωτεΐνες καθαρίστηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες, με αρχικό υλικό άθικτα κύτταρα, και τα εκχυλίσματα καθαρισμού ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 15%. Η εικόνα αυτών παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 14). Η πρωτεΐνη HT_{C5}-HrcU C199 φέρει την ουρά ιστιδινών στο καρβοξυτελικό της άκρο, και αν πράγματι συμβαίνει κοπή στο μοτίβο NPTH, τότε η ουρά ιστιδινών θα φέρεται από το καρβοξυτελικό θραύσμα μετά την κοπή. Άρα, αναμένεται διαφοροποίηση στην εικόνα που θα δίνουν μετά από ηλεκτροφόρηση τα εκλούσματα από τον καθαρισμό των δύο μορίων. Πράγματι, η εικόνα μαρτυρά διαφορετικό πρότυπο για τις δύο πρωτεΐνες (για περισσότερα βλέπε στο κεφάλαιο της Συζήτησης), το οποίο όμως δεν μας βοηθά στην διεξαγωγή

συμπεράσματος περί της ταυτότητας των διαφόρων ζωνών που λαμβάνονται στα εκλούσματα.



Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των δειγμάτων αποδιατακτικού καθαρισμού των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199. **α.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλες 2 και 3: διαηγές διάλυμα λύσης των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα. Στήλες 4 και 5: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη (flowthrough) των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα. Στήλες 6, 7, 8, 9, 10 και 11: τρεις πλύσεις σε pH 6.3 των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 ανά ζεύγη αντίστοιχα. Στήλες 12, 13: πρώτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. Στήλες 14, 15: δεύτερο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. **β.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλες 2, 3: τρίτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. Στήλες 4, 5: τέταρτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. Στήλες 6, 7: πρώτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 4.5. Στήλες 8, 9: δεύτερο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. Στήλες 10, 11: τρίτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9. Στήλες 12 και 13: τέταρτο έκλουσμα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και His_C- HrcU C199 αντίστοιχα, σε pH 5.9.

B) Προσδιορισμός αλληλεπιδράσεων της HrcU C199 με άλλες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, όπως και μεταξύ άλλων πρωτεϊνών.

1. Προσέγγιση χρήσης του βακτηριακού στελέχους BL21(DE3)(pPL6).

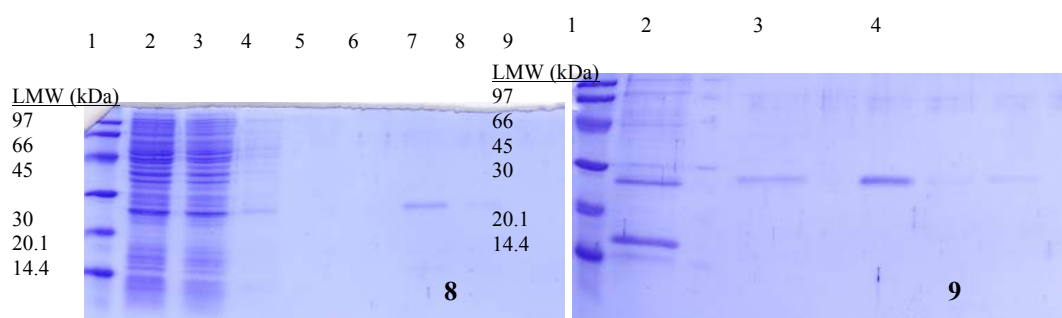
Το στέλεχος αυτό περιέχει το κοσμίδιο pPL6 το οποίο φέρει ολόκληρη την γενετική 'νησίδα' *hrp/hrc* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *phaseolicola*. Η σκέψη ήταν να πραγματοποιηθεί μετασχηματισμός των κυττάρων αυτών με φορείς έκφρασης που

περιέχουν το γονιδιακό θραύσμα της πρωτεΐνης HrcU C199 σε σύντηξη με ουρά ιστιδινών, ώστε να γίνει κατόπιν επαγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης His-HrcU C199, με την ελπίδα ότι θα συμπαρασύρει βάσει αλληλεπίδρασης και κάποια άλλη/άλλες από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται από τον κοσμιδιακό κλώνο (ο οποίος δεν υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο και εκφράζει τις πρωτεΐνες του συστατικά).

A. Μετασηματισμός του στελέχους BL21(DE3)(pPL6) με το πλασμίδιο pET16b/HrcU C199, επαγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 υπό αποδιατακτικές και μή, συνθήκες.

Παρασκευάστηκαν ηλεκτροδεκτικά κύτταρα του στελέχους BL21(DE3)(pPL6), τα οποία μετασηματίστηκαν με το πλασμίδιο pET16b/HrcU C199. Επιλεγμένοι κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν για επαγωγή της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 σε όγκους 100ml. Ακολούθησε καθαρισμός αυτής από στήλη συγγένειας Ni-NTA αгарόζης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και ηλεκτροφόρηση των εκχυλισμάτων καθαρισμού. Η πηκτή ηλεκτροφόρησης παρατίθεται παρακάτω (Εικόνα 15). Σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα του πειράματος, που δεν είναι άλλος από τον καθαρισμό της ίδιας πρωτεΐνης από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) που δεν φέρουν τον κοσμιδιακό κλώνο pPL6, μπορεί να εξαχθεί εύκολα το συμπέρασμα ότι: παρά το γεγονός ότι εκφράζεται η πρωτεΐνη, αυτή πέφτει ολοκληρωτικά στο αδιάλυτο κλάσμα, καθώς καμία από τις τρεις γνώριμες ζώνες που αποτελούν το πρότυπο της καθαρής His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) (βλέπε προηγούμενη εικόνα) δεν εμφανίζονται στα εκλούσματα καθαρισμού από κύτταρα με τον κοσμιδιακό κλώνο. Μια εξήγηση του αποτελέσματος αυτού ίσως είναι ότι κάποιος παράγοντας εκφραζόμενος από το κοσμίδιο, πολύ πιθανόν η ίδια η πρωτεΐνη HrcU (η οποία όπως έχει ήδη προαναφερθεί στην Εισαγωγή φέρει τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές) ή κάποια άλλη διαμεμβρανική δομική πρωτεΐνη του TTSS που αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό κομμάτι της HrcU, προσδένουν την ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 και την συμπαρασύρουν μαζί τους στο αδιάλυτο μεμβρανικό κλάσμα. Για να διαλευκανθεί το ενδεχόμενο αυτό, πραγματοποιήθηκε αποδιατακτικός καθαρισμός της πρωτεΐνης από τα ίδια κύτταρα, αλλά

το αποτέλεσμα ήταν σχεδόν το ίδιο (Εικόνα 16). Η μόνη ορατή διαφοροποίηση βάσει των ηλεκτροφορημένων πηκτωμάτων ήταν ότι η ζώνη που εμφανίζεται γύρω στα 30 kDa παρουσιάζεται πιο έντονη στον αποδιατακτικό καθαρισμό της πρωτεΐνης. Αρχικά, η ζώνη αυτή θεωρήθηκε ότι ήταν η 28 kDa ζώνη που παρατηρείται στο πρότυπο των τριών ζωνών της καθαρισμένης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS), αλλά όταν πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοανίχνευσης με το μόριο Ni-NTA AP conjugate, αυτή δεν έδωσε σήμα. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι αποτελεί προϊόν μη ειδικής πρόσδεσης κάποιας άλλης κυτταρικής πρωτεΐνης επί της στήλης.

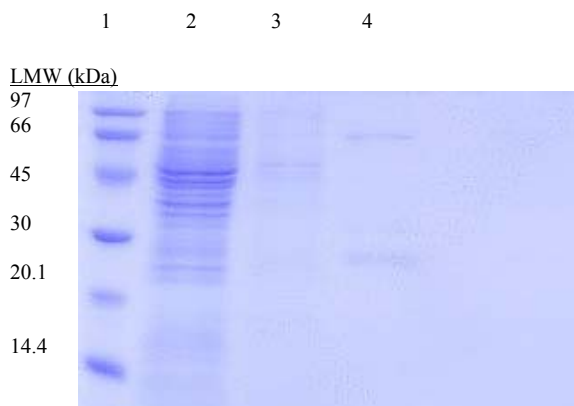


Εικόνες 15 και 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων καθαρισμού της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pPL6) υπό μη αποδιατακτικές και αποδιατακτικές συνθήκες αντίστοιχα. **Εικόνα 15.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διαγές διάλυμα λύσης. Στήλη 3: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη. Στήλες 4,5 και 6: διαλύματα πλύσης της στήλης. Στήλες 7, 8 και 9: εκλούσεις της στήλης με 250mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 16.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: καθαρισμένη πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (θετικός μάρτυρας). Στήλη 3: έκλουσμα της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pPL6) υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες. Στήλη 4: His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pPL6) υπό αποδιατακτικές συνθήκες

B. Μετασηματισμός του στελέχους BL21(DE3)(pPL6) με το πλασμίδιο pET26b/HrcU C199, επαγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης HT_{C5}-HrcU C199 υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες.

Για να διαλευκανθεί το ενδεχόμενο, η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 να κατακρημνίζεται στο αδιάλυτο μεμβρανικό κλάσμα επειδή η ουρά ιστιδινών δεν είναι προσβάσιμη από τα ιόντα νικελίου της στήλης συγγένειας, έγινε ηλεκτρομετασηματισμός του στελέχους BL21(DE3)(pPL6) με το πλασμίδιο pET26b/HrcU C199

(γενικά θεωρείται ότι οι ουρές ιστιδινών που τοποθετούνται στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών είναι περισσότερο εκτεθειμένες και άρα προσβάσιμες από στήλες νικελίου σε σχέση με τις αμινοτελικές συντήξεις), επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης HrcU C199 και καθαρισμός αυτής υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες από στήλη συγγένειας Ni-NTA αгарόζης. Το αποτέλεσμα ήταν το ίδιο με αυτό που ελήφθηκε από τον καθαρισμό της αμινοτελικής σύντηξης (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων καθαρισμού της πρωτεΐνης His_{C5}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pPL6) υπό native συνθήκες. Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη. Στήλη 3: διάλυμα πλύσης από τη στήλη. Στήλη 4: διάλυμα έκλουσης της πρωτεΐνης His_{C5}-HrcU C199 με 250mM ιμιδαζόλιο.

2. Προσέγγιση συγκαθαρισμού πρωτεϊνών που συνεκφράζονται στο ίδιο κύτταρο: το ζεύγος HrcU C199/HrcN C259

Βάσει της βιβλιογραφίας, η αντλία ενέργειας του TTSS είναι η πρωτεΐνη HrcN, η οποία φέρεται να αλληλεπιδρά περιφερειακά με κυτταροπλασματικά τμήματα πρωτεϊνών του αγωγού Hcp και είτε να ελέγχει μέσω αυτής της αλληλεπίδρασης θετικά ή αρνητικά τη λειτουργία της ως ATPάση του συστήματος είτε να εντοπίζεται στο κατάλληλο τοπολογικό περιβάλλον του TTSS. Με βάση κάποια προκαταρκτικά αποτελέσματα προηγούμενων ετών του εργαστηρίου που έδειξαν ολόκληρη την πρωτεΐνη HrcN να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HrcU C199 σε πειράματα Far Western, σχεδιάστηκε ένα πείραμα ταυτόχρονης έκφρασης σε βακτήρια δύο πλασμιδίων, από τα οποία το ένα θα εκφράζει την HrcU C199 και το άλλο το καρβοξυτελικό θραύσμα της HrcN, επονομαζόμενο ως HrcN C259

(εκφράζει τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης από 259 έως το τέλος της). Δεν επιλέχθηκε ολόκληρο το μόριο της HrcN αρχικά, για το λόγο ότι είναι λίγο διαλυτή και δεν είναι εύκολος ο καθαρισμός της. Από τα πλασμίδια αυτά, μια από τις δύο πρωτεΐνες θα αποκτά ουρά ιστιδινών κατά την έκφρασή της ενώ η άλλη δεν θα φέρει τέτοια ουρά. Έτσι, σε πείραμα καθαρισμού μετά από επαγωγή των πρωτεϊνών αυτών, εάν αλληλεπιδρούν, η His-tagged πρωτεΐνη αναμένεται να συμπαρασύρει την άλλη και έτσι θα συνυπάρχουν στις εκλούσεις, κάτι που θα φανεί είτε σε επίπεδο ηλεκτροφορημάτων με χρώση αυτών (εάν το επίπεδο έκφρασης και ο βαθμός αλληλεπίδρασης μεταξύ τους είναι μεγάλος), είτε σε επίπεδο ανοσοανίχνευσης με ειδικό αντίσωμα για την όχι σημασμένη με ουρά ιστιδινών πρωτεΐνη.

Για να μπορέσουν δύο πρωτεΐνες να συνεκφραστούν από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο, θα πρέπει αυτό να φέρει σε δύο συμβατούς φορείς (φορείς με διαφορετικού είδους αλληλουχία που αναγνωρίζεται ως σημείο έναρξης της αντιγραφής, origin of replication δηλαδή) τα γονίδιά τους. Για το λόγο αυτό, ήταν απαραίτητη η κλωνοποίηση του γονιδιακού τμήματος της μιας από τις δύο πρωτεΐνες σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Εν προκειμένω, θεωρήθηκε σκόπιμο να κλωνοποιηθεί το γονιδιακό τμήμα που εκφράζει την πρωτεΐνη HrcN C259 στον ευρέου φάσματος φορέα έκφρασης pDN18. Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε ως εξής: για την απομόνωση του γονιδιακού θραύσματος της πρωτεΐνης HrcN C259 πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, με μήτρα το πλασμίδιο pT_{7.7}/HrcN C259 και με χρήση των παρακάτω εκκινητών:

Forward(φέρει θέση περιορισμού για το ένζυμο EcoRI):5' – gagaattctatggtgctgttg – 3'

Reverse(φέρει θέση περιορισμού για το ένζυμο BamHI):5'–gcggatcggatcccagtgtgtcttcc–3'

και οι συνθήκες κατά τις οποίες πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση του θραύσματος DNA ενδιαφέροντος είναι οι παρακάτω:

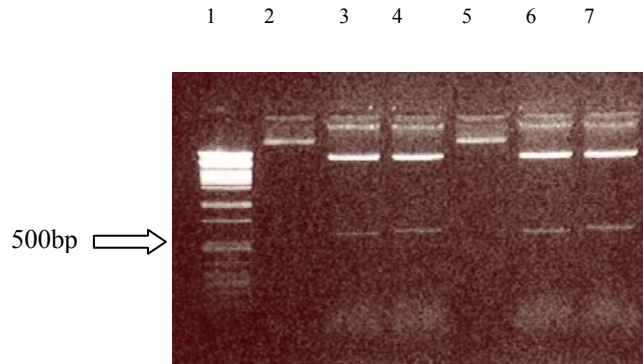
1. 94⁰C για 5 min
2. 94⁰C για 30 sec
3. 50⁰C για 30 sec
4. 72⁰C για 1 min
5. Go to step 2 for 25 cycles

6. 72⁰C για 5 min
7. 4⁰C for ever

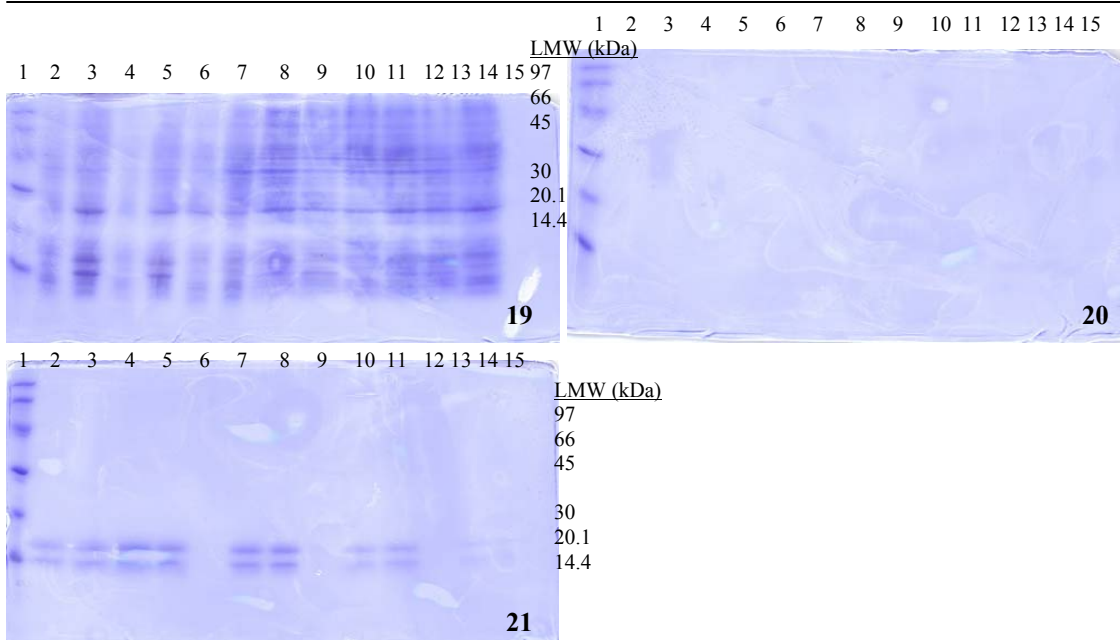
Μετά την αντίδραση, το προϊόν καθαρίστηκε και υπεβλήθη σε διαδοχικές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και BamHI. Στην ίδια διαδικασία πέψεων υπεβλήθη και ο φορέας έκφρασης pDN18. Τα θραύσματα αυτά μετά τον καθαρισμό τους από τα συστατικά των αντιδράσεων πέψης υπεβλήθησαν σε αντίδραση λιγάσης σε αναλογία άκρων 1:3 και 1:5 και οι αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ δεκτικών κυττάρων DH5a. Στα τριβλύα μετασχηματισμού αναπτύχθηκαν δύο αποικίες και αυτές αποτέλεσαν υλικό για απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας (minipreps), με σκοπό την ανίχνευση των θετικών κλώνων. Τα πλασμιδιακά DNA που προέκυψαν, υπεβλήθησαν σε διαγνωστικές πέψεις με τα ένζυμα EcoRI/BamHI και EcoRI/HindIII (το ένζυμο HindIII κόβει καθοδικά και δίπλα στη θέση αναγνώρισης του ενζύμου BamHI). Η εικόνα των πέψεων μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε 1% πήκτωμα αγαρόζης, εικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 18). Και οι δύο κλώνοι ήταν σωστοί. Το DNA αυτών αποτέλεσε υλικό μετασχηματισμού με θερμικό σοκ δεκτικών κυττάρων BL21(DE3)(pLysS). Επίσης, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων BL21(DE3)(pLysS) με μείγμα των πλασμιδίων pET16b/HrcU C199 & pDN18/HrcN C259. Από τους νέους κλώνους που προέκυψαν, παρασκευάστηκαν γλυκερολικά stock για μακρόχρονη αποθήκευση στους -80⁰C.

Το επόμενο βήμα ήταν η επαγωγή και καθαρισμός από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) του παρακάτω σετ πρωτεϊνών: α) His_{N10}-HrcU C199, β) His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 και γ) HrcN C259. Οι καθαρισμοί πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα με χρήση των ίδιων διαλυμάτων καθαρισμού (διάλυμα λύσης και πλύσεων: 50mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM NaCl, 50 mM ιμιδαζόλιο, 20% γλυκερόλη και 1% Triton X-100, διαλύματα έκλουσης: 50mM Tris-Cl pH 8.0, 50mM NaCl, 20% γλυκερόλη, 1% Triton X-100 και διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου: 80, 100, 150, 200, 250, 300 και 350 mM. Όλα τα διαλύματα των καθαρισμών αυτών ηλεκτροφορήθηκαν σε 15% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και η εικόνα τους ακολουθεί παρακάτω (Εικόνες 19, 20 και 21). Σε επίπεδο πήκτωματος πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση του, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφοροποίηση του προτύπου ζωνώσεων όταν η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 εκφράζεται μόνη της ή μαζί με την HrcN C259. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε και

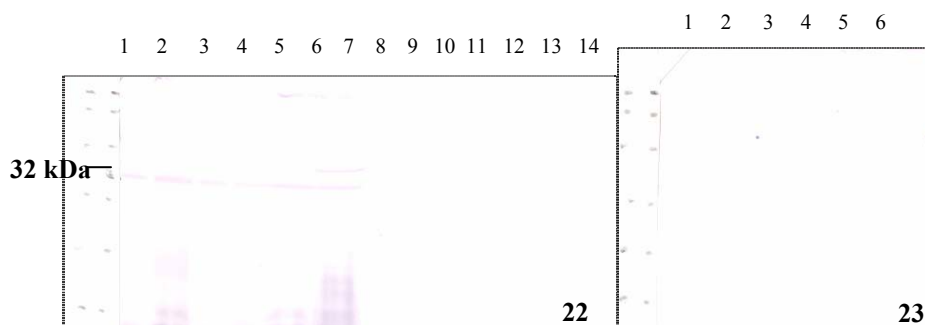
πείραμα ανοσοανίχνευσης, για να διερευνηθεί εάν σε αυτό το επίπεδο ανιχνεύεται η πρωτεΐνη HrcN C259. Η εικόνα της ανοσοανίχνευσης παρατίθεται παρακάτω (Εικόνες 22 & 23) και υποδεικνύει ότι με την προσέγγιση που ακολουθήθηκε, η πρωτεΐνη HrcN C259 δεν συγκαθαρίζεται με την πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε 1% πήκτωμα αγαρόζης των αντιδράσεων πέψης των δύο πλασμιδιακών DNA από τα mini-preps του τριβλύου μετασχηματισμού pDN18/HrcN C259. Στήλη 1: μάρτυρας μεγέθους λ/PstI. Στήλη 2: υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA από το mini-prep 1. Στήλες 3 και 4: αντιδράσεις πέψης του mini-prep 1 με τα ζεύγη ενζύμων EcoRI/BamHI και EcoRI/HindIII αντίστοιχα. Στήλη 5: υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA από το mini-prep 2. Στήλες 5 και 6: αντιδράσεις πέψης του mini-prep 2 με τα ζεύγη ενζύμων EcoRI/BamHI και EcoRI/HindIII αντίστοιχα. Βάσει του μάρτυρα λ/PstI τα μεγέθη των ζωνών που προέξυψαν φαίνονται να είναι σωστά (αναμενόμενα μεγέθη: πέψη EcoRI/BamHI: 600bp, πέψη EcoRI/HindIII: 610bp).



Εικόνες 19, 20 & 21. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων καθαρισμού των πρωτεϊνών α) His_{N10}-HrcU C199, β) His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 και γ) HrcN C259. **Εικόνα 19.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: μη επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199. Στήλη 3: επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199. Στήλη 4: μη επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 5: επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 6: μη επαγόμενο δείγμα HrcN C259. Στήλη 7: επαγόμενο δείγμα HrcN C259. Στήλη 8: διαυγές διάλυμα λύσης His_{N10}-HrcU C199. Στήλη 9: διαυγές διάλυμα λύσης His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 10: διαυγές διάλυμα λύσης HrcN C259. Στήλη 11: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της His_{N10}-HrcU C199. Στήλη 12: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 13: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της HrcN C259. Στήλη 14: διάλυμα πλύσης της His_{N10}-HrcU C199 με 10mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 15: διάλυμα πλύσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 10mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 20.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα πλύσης της HrcN C259 με 10mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 3: διάλυμα πλύσης της His_{N10}-HrcU C199 με 20mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 4: διάλυμα πλύσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 20mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 5: διάλυμα πλύσης της HrcN C259 με 20mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 6: διάλυμα πλύσης της His_{N10}-HrcU C199 με 30mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 7: διάλυμα πλύσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 30mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 8: διάλυμα πλύσης της HrcN C259 με 30mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 9: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 80mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 10: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 80mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 11: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 80mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 12: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 100mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 13: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 100mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 14: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 100mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 15: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 150mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 21.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 150mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 3: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 150mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 4: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 200mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 5: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 200mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 6: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 200mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 7: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 250mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 8: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 250mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 9: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 250mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 10: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 300mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 11: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 300mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 12: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 300mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 13: διάλυμα έκλουσης της His_{N10}-HrcU C199 με 350mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 14: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 350mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 15: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 350mM ιμιδαζόλιο.



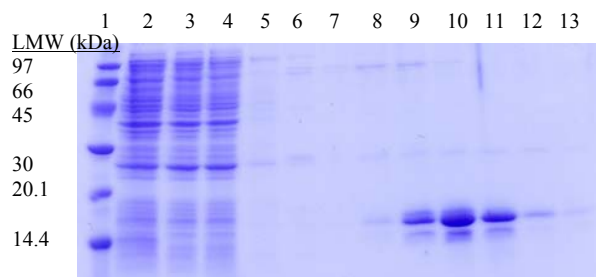
Εικόνες 22 & 23. Μεμβράνες ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. **Εικόνα 22.** Στήλη 1: μη επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 2: επαγόμενο δείγμα His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 3: μη επαγόμενο δείγμα HrcN C259. Στήλη 4: επαγόμενο δείγμα HrcN C259. Στήλη 5: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259. Στήλη 6: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της HrcN C259. Στήλη 7: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 80mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 8: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 80mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 9: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 100mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 10: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 100mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 11: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 150mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 12: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 150mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 13: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 200mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 14: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 200mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 23.** Στήλη 1: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 250mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 2: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 250mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 3: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 300mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 4: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 300mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 5: διάλυμα έκλουσης των His_{N10}-HrcU C199 & HrcN C259 με 350mM ιμιδαζόλιο. Στήλη 6: διάλυμα έκλουσης της HrcN C259 με 350mM ιμιδαζόλιο.

3. Προσέγγιση συγκαθαρισμού πρωτεϊνών που εκφράζονται από διαφορετικά κύτταρα

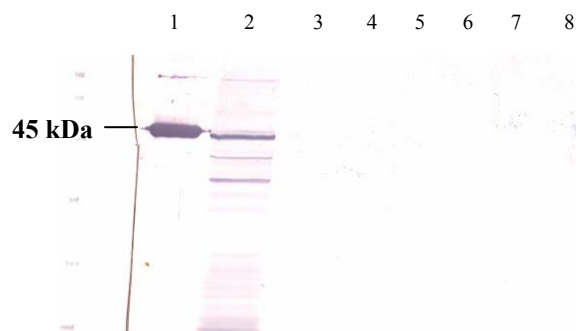
A) το ζεύγος HrcU C199/HrcN

Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες His_{N10}-HrcU C199 και HrcN (εκφραζόμενη από τον φορέα pT₇₋₇) εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν τα εξής πειραματικά βήματα: η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 προσδέθηκε σε στήλη νικελίου, και κατόπιν στην ίδια στήλη προστέθηκε το διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Τα διαλύματα του καθαρισμού αυτού αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η εικόνα τους ακολουθεί παρακάτω (Εικόνα 24). Για τα

δείγματα του καθαρισμού αυτού πραγματοποιήθηκε και πείραμα ανοσοανίχνευσης, και η εικόνα του ήταν αρνητική (Εικόνα 25): η πρωτεΐνη HrcN δεν φαίνεται να είναι παρούσα στα εκλούσματα του καθαρισμού.



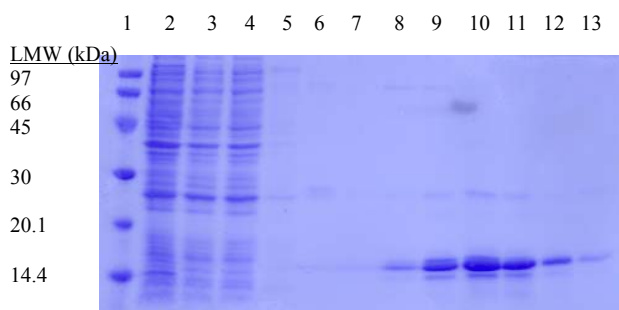
Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN. Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης της His_{N10}-HrcU C199 από τη στήλη. Στήλη 3: διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN από τη στήλη. Στήλη 4: διάλυμα έκπλυσης της HrcN από τη στήλη. Στήλες 5, 6 και 7: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 8 έως 13: διαλύματα έκλουσης των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN από τη στήλη, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο.



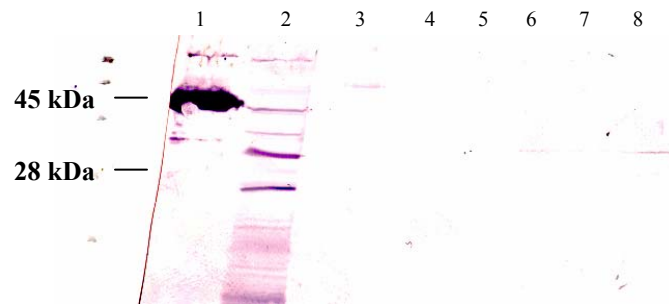
Εικόνα 25: Μεμβράνη ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN. Στήλες 3, 4, 5, 6, 7 και 8: Εκλούσματα συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και HrcN (από τον φορέα pT₇₋₇), σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο

B) το ζεύγος HrcU C199/HrcN N261

Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες His_{N10}-HrcU C199 και HrcN N261 (αποτελεί το αμινοτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης HrcN-εκφράζει τα κατάλοιπα από 1 έως 261 και εκφράζεται από τον φορέα pT₇₋₇) εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν τα εξής πειραματικά βήματα: η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 προσδέθηκε σε στήλη νικελίου, και κατόπιν στην ίδια στήλη προστέθηκε το διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN N261. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Τα διαλύματα του καθαρισμού αυτού αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η εικόνα τους ακολουθεί παρακάτω (Εικόνα 26). Για τα δείγματα του καθαρισμού αυτού πραγματοποιήθηκε και πείραμα ανοσοανίχνευσης, και η εικόνα του (Εικόνα 27) έδωσε ένα αμυδρό σήμα, το οποίο δεν τέθηκε πολύ σοβαρά υπόψη.



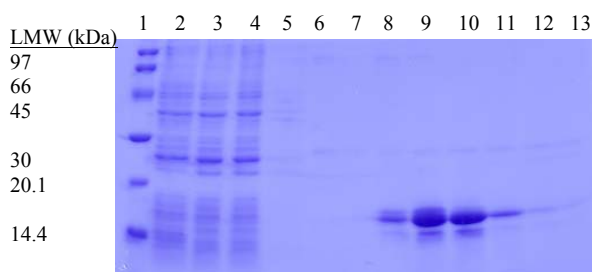
Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN N261. Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης της His_{N10}-HrcU C199 από τη στήλη. Στήλη 3: διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN N261 από τη στήλη. Στήλη 4: διάλυμα έπλυσης της HrcN N261 από τη στήλη. Στήλες 5, 6 και 7: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 8 έως 13: διαλύματα έκλουσης των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN N261 από τη στήλη, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο.



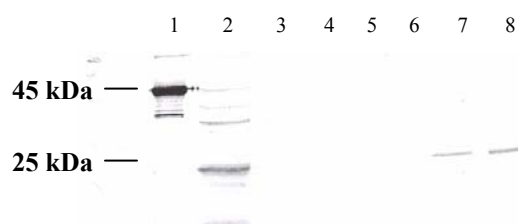
Εικόνα 27: Μembrάνη ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN N261. Στήλες Στήλες 3, 4, 5, 6, 7 και 8: Εκλούσματα συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και HrcN N261(από τον φορέα pT₇₋₇), σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο

Γ) το ζεύγος HrcU C199/HrcN C259

Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες His_{N10}-HrcU C199 και HrcN C259 (εκφραζόμενη από τον φορέα pT₇₋₇) εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν τα εξής πειραματικά βήματα: η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 προσδέθηκε σε στήλη νικελίου, και κατόπιν στην ίδια στήλη προστέθηκε το διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN C259. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Τα διαλύματα του καθαρισμού αυτού αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η εικόνα τους ακολουθεί παρακάτω (Εικόνα 28). Για τα δείγματα του καθαρισμού αυτού πραγματοποιήθηκε και πείραμα ανοσοανίχνευσης, και η εικόνα του ήταν θετική (Εικόνα 29): η πρωτεΐνη HrcN C259 φαίνεται να είναι παρούσα στα εκλούσματα που πραγματοποιήθηκαν με 200 και 250mM ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN C259. Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης της His_{N10}-HrcU C199 από τη στήλη. Στήλη 3: διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN C259 από τη στήλη. Στήλη 4: διάλυμα έκπλυσης της HrcN C259 από τη στήλη. Στήλες 5, 6 και 7: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 8 έως 13: διαλύματα έκλυσης των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και HrcN C259 από τη στήλη, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο.

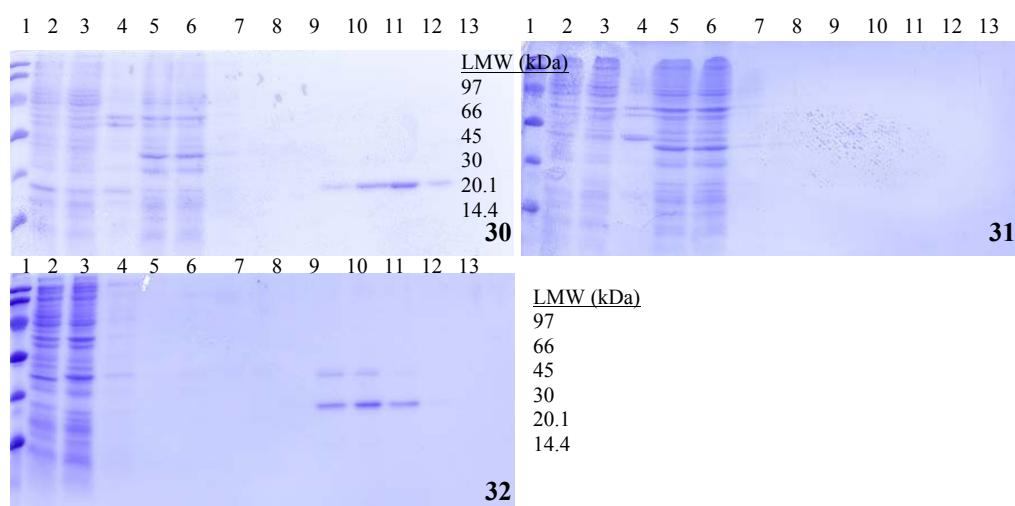


Εικόνα 29: Μεμβράνη ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 3, 4, 5, 6, 7 και 8: Εκλούσματα συγκαθαρισμού των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και HrcN C259 (από τον φορέα pT₇₋₇), σε 80, 100, 150, 200, και 250 mM ιμιδαζόλιο.

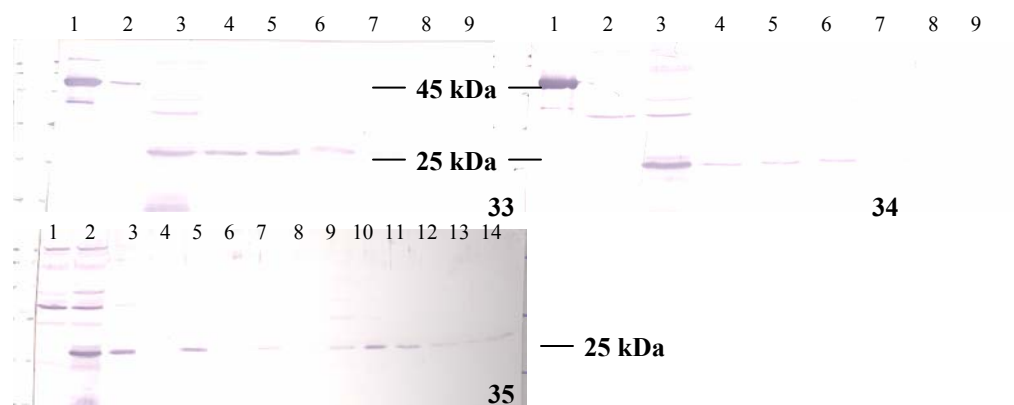
Δ) τα ζεύγη HrcN C259/AvrPphF ORF1, HrcN C259/AvrPphF ORF2 και HrcN C259/AvrPphF ORF1-ORF2

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί κατά πόσον η ATPαση του συστήματος της ψευδομονάδας αλληλεπιδρά με το ζεύγος chaperone-effector του AvrPphF, καθώς κάτι παρόμοιο υπάρχει στη βιβλιογραφία για το σύστημα της EPEC (Gauthier et al., 2003). Έτσι, οι πρωτεΐνες His_{N6}-AvrPphF-ORF1 και HrcN C259, (εκφραζόμενη από τον φορέα pT₇₋₇), His_{N6}-AvrPphF-ORF2 και HrcN C259 και His_{N6}-AvrPphF-ORF1-ORF2 και HrcN C259 εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν

τα εξής πειραματικά βήματα: οι πρωτεΐνες AvrPphF-His_{N6}-ORF1, AvrPphF-His_{N6}-ORF2 και AvrPphF-His_{N6}-ORF1-ORF2 προσδέθηκαν ξεχωριστά σε στήλες νικελίου, και κατόπιν στις στήλες προστέθηκε διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN C259. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Τα διαλύματα του καθαρισμού αυτού αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και η εικόνα τους ακολουθεί παρακάτω (Εικόνες 30, 31 και 32). Για τα δείγματα του καθαρισμού αυτού πραγματοποιήθηκε και πείραμα ανοσοανίχνευσης, και η εικόνα του ήταν θετική (Εικόνες 33, 34 και 35):

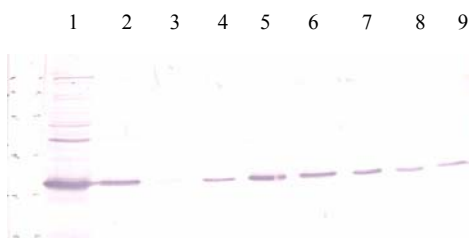


Εικόνες 30, 31 & 32. Ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 15% των κλασμάτων συγκαθαρισμού υπό native συνθήκες, των ζευγών πρωτεϊνών His_{N6}-AvrPphF-ORF1 και HrcN C259 (Εικόνα 30), His_{N6}-AvrPphF-ORF2 και HrcN C259 (Εικόνα 31) και His_{N6}-AvrPphF-ORF1-ORF2 και HrcN C259 (Εικόνα 32). **Εικόνα 30.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διαυγές διάλυμα λύσης της His_{N6}-AvrPphF-ORF1. Στήλη 3: επαναδιαλυμένη πελέτα λυμένων κυττάρων που εκφράζουν την His_{N6}-AvrPphF-ORF1. Στήλη 4: διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN C259. Στήλη 5: διάλυμα έκπλυσης της HrcN C259. Στήλες 6, 7 και 8: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 8 έως 13: διαλύματα έκλυσης των πρωτεϊνών His_{N6}-AvrPphF-ORF1 και HrcN C259, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 31.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διαυγές διάλυμα λύσης της His_{N6}-AvrPphF-ORF2. Στήλη 3: επαναδιαλυμένη πελέτα λυμένων κυττάρων που εκφράζουν την His_{N6}-AvrPphF-ORF2. Στήλη 4: διαυγές διάλυμα λύσης της HrcN C259. Στήλη 5: διάλυμα έκπλυσης της HrcN C259. Στήλες 6, 7 και 8: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 10, 20 και 30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 8 έως 13: διαλύματα έκλυσης των πρωτεϊνών His_{N6}-AvrPphF-ORF2 και HrcN C259, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο. **Εικόνα 32.** Στήλη 1: μοριακός μάρτυρας μεγεθών LMW. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης της His_{N6}-AvrPphF-ORF1-ORF2. Στήλη 3: διάλυμα έκπλυσης της HrcN C259. Στήλες 4 έως 9: διαλύματα πλύσης από τη στήλη με 2x10, 2x20 και 2x30 mM ιμιδαζόλιο. Στήλες 10 έως 15: διαλύματα έκλυσης των πρωτεϊνών His_{N6}-AvrPphF-ORF1-ORF2 και HrcN C259, με 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο.



Εικόνες 33, 34 και 35. Μεμβράνες ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. **Εικόνα 33.** Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN. Στήλη 2: καθαρισμένη πρωτεΐνη AvtPphF ORF1 ως αρνητικός μάρτυρας. Στήλη 3: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 4, 5, 6, 7, 8 και 9: Εκλούσματα των πρωτεϊνών His-AvtPphF ORF1 και HrcN C259, σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. **Εικόνα 34.** Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN. Στήλη 2: διαυγές διάλυμα λύσης της πρωτεΐνης AvtPphF ORF2 ως αρνητικός μάρτυρας. Στήλη 3: διάλυμα έκπλυσης από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 4, 5, 6, 7, 8 και 9: Εκλούσματα των πρωτεϊνών His-AvtPphF ORF2 και HrcN C259, σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. **Εικόνα 35.** Στήλη 1: διαυγές διάλυμα λύσης των πρωτεϊνών His-AvtPphF ORF1-ORF2. Στήλη 2: έκπλυση από τη στήλη της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 3 έως 8: πλύσεις της στήλης με 2x10, 2x20 και 2x30 mM ιμιδαζόλιο ανά ζεύγη αντίστοιχα. Στήλες 9 έως 14: Εκλούσματα των πρωτεϊνών His-AvtPphF ORF1-ORF2 και HrcN C259, σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα.

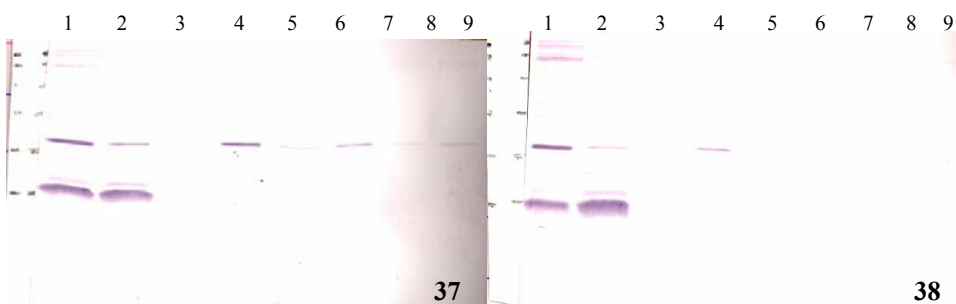
- Στο σημείο αυτό θεωρήθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί και ο αρνητικός μάρτυρας των παραπάνω πειραμάτων, ο οποίος θα έπρεπε να είχε λάβει χώρα από την αρχή, κι αυτός δεν είναι άλλος από καθαρισμό από στήλη νικελίου της πρωτεΐνης HrcN C259 μόνη της, χωρίς δηλαδή να έχει προσδεθεί προηγουμένως κάποια His-tagged πρωτεΐνη στη στήλη. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν ο καθαρισμός αυτός, τα δείγματά του ηλεκτροφορηθήκαν και το πήκτωμα αυτό υπεβλήθη σε τεστ ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα της HrcN. Δυστυχώς το αποτέλεσμα ήταν απογοητευτικό (Εικόνα 36). Η εικόνα της ανοσοανίχνευσης έδειξε ότι η πρωτεΐνη HrcN C259 μπορεί και προσδέεται και μόνη της επί της στήλης, παρά το γεγονός ότι δεν φέρει ουρά ιστιδινών.



Εικόνα 36. Αρνητικός μάρτυρας των ανοσοανιχνεύσεων των πειραμάτων συγκαθαρισμού που χρησιμοποίησαν την HrcN C259 ως untagged πρωτεΐνη. Στήλη 1: διάλυμα έκπλυσης από στήλη απ' όπου έχει περάσει διαυγές διάλυμα λύσης της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 2 και 3: πλύσεις της στήλης με 10 και 30 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. Στήλες 4 έως 9: Εκλούσματα της πρωτεΐνης HrcN C259, σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο

Ε) το ζεύγος HrcU C199/HrcN C259 με αντιστροφή του His-tag

Για να υπερπηδηθεί το πρόβλημα της μη ειδικής πρόσδεσης της HrcN C259 επί της στήλης Ni^{2+} , πραγματοποιήθηκε συγκαθαρισμός των πρωτεϊνών **His₁₀-HrcN C259** και της **HrcU C199** (από τον φορέα pT₇₋₇), δηλαδή, το His-tag στις δύο πρωτεΐνες αντιστράφηκε. Στην περίπτωση αυτή, οι πρωτεΐνες His₁₀-HrcN C259 και της HrcU C199 (από τον φορέα pT₇₋₇) εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν τα εξής πειραματικά βήματα: η πρωτεΐνη His₁₀-HrcN C259 προσδέθηκε σε στήλη νικελίου, και κατόπιν στην ίδια στήλη προστέθηκε το διαυγές διάλυμα λύσης της HrcU C199. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Ταυτόχρονα με τον καθαρισμό αυτό πραγματοποιήθηκε και ο αρνητικός του μάρτυρας, δηλαδή, καθαρισμός από στήλη νικελίου της πρωτεΐνης HrcU C199 μόνη της, χωρίς δηλαδή να έχει προσδεθεί προηγουμένως η πρωτεΐνη His₁₀-HrcN C259. Τα διαλύματα των καθαρισμών αυτών αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και εν συνεχεία υπεβλήθησαν σε πείραμα ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα για την πρωτεΐνη HrcU. Η εικόνα που ελήφθη (Εικόνες 37 και 38) ήταν επίσης απογοητευτική, διότι ενώ στην προσέγγιση του συγκαθαρισμού ελήφθη πάλι σήμα για την HrcU στα εκλούσματα, το ίδιο σήμα ελήφθη και στα εκλούσματα του αρνητικού μάρτυρα.

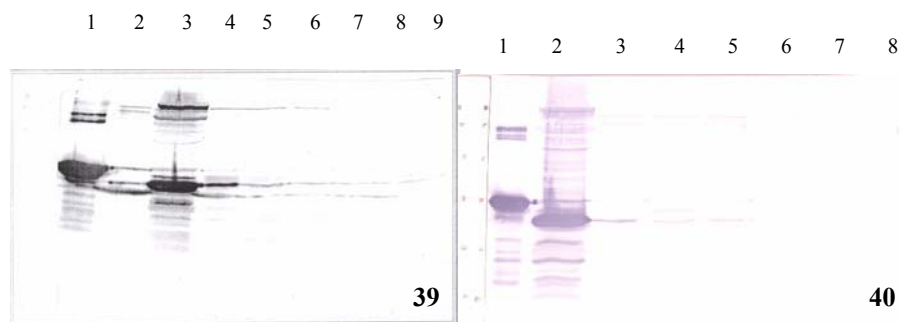


Εικόνες 37 & 38. Μεμβράνες ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcU. **Εικόνα 37.** Στήλη 1: διάλυμα έκπλυσης της πρωτεΐνης HrcU C199 (από τον φορέα pT₇₋₇). Στήλες 2 και 3: πλύσεις της στήλης με 10 και 30 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. Στήλες 4 έως 9: Εκλούσματα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcN C259 και της HrcU C199 (από τον φορέα pT₇₋₇), σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. **Εικόνα 38.** Αρνητικός μάρτυρας του παραπάνω πειράματος. Στήλη 1: διάλυμα έκπλυσης της πρωτεΐνης HrcU C199 (από τον φορέα pT₇₋₇) από στήλη όπου δεν έχει προσδεθεί η πρωτεΐνη His₁₀-HrcN C259. Στήλες 2 και 3: πλύσεις της στήλης με 10 και 30 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα. Στήλες 4 έως 9: Εκλούσματα της HrcU C199 (από τον φορέα pT₇₋₇), σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM ιμιδαζόλιο αντίστοιχα.

ΣΤ) το ζεύγος HrcU C199/HrpP

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε διότι υπάρχει μια βιβλιογραφική αναφορά που θέλει το ομόλογο της HrcU στην *Yersinia pseudotuberculosis* να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη YscP (Lavander et al., 2002). Η HrpP της *Pseudomonas* δεν είναι ομόλογη αλλά αντίστοιχη της YscP. Έτσι, οι πρωτεΐνες His_{N10}-HrcU C199 και HrpP (εκφραζόμενη από τον φορέα pT₇₋₇) εκφράστηκαν ξεχωριστά, παρήχθη διαυγές διάλυμα λύσης υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες για καθεμιά και ακολούθησαν τα εξής πειραματικά βήματα: η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 προσδέθηκε σε στήλη νικελίου, και κατόπιν στην ίδια στήλη προστέθηκε το διαυγές διάλυμα λύσης της HrpP. Κατόπιν η στήλη ξεπλύθηκε και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (από 80 έως 300mM). Τα διαλύματα του καθαρισμού αυτού αναλύθηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε αποτύπωση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και πείραμα ανοσοανίχνευσης με δύο αραιώσεις του αντισώματος για την πρωτεΐνη HrpP, 1:50000 και 1:70000. Η εικόνα των δύο ανοσοανιχνεύσεων ακολουθεί παρακάτω (Εικόνες 39 & 40) και ελήφθη ένα αμυδρό

σήμα και πολύς θόρυβος και ίσως γι' αυτό να ευθύνεται η όχι ικανοποιητική καθαρότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε.

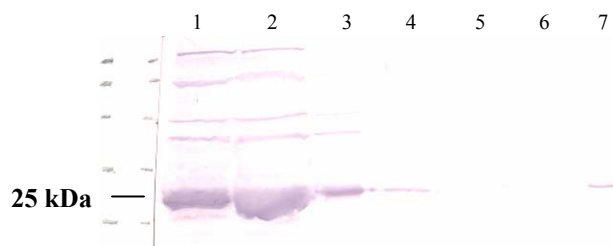


Εικόνες 39 και 40. Μεμβράνες ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrpP. Και οι δύο μεμβράνες περιέχουν την ίδια σειρά δειγμάτων. Στην μεμβράνη της εικόνας 39, η αραιώση του αντισώματος anti-HrpP που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:50000, ενώ στην μεμβράνη της εικόνας 40 η αραιώση ήταν 1:70000. Σειρά δειγμάτων: Στήλη 1: καθαρισμένη πρωτεΐνη His-HrpP ως θετικός μάρτυρας. Στήλη 2: καθαρισμένη His₁₀-HrcU C199 ως αρνητικός μάρτυρας (στην μεμβράνη της εικόνας 40 δεν υπάρχει το δείγμα αυτό). Στήλη 3: έκπλυση της πρωτεΐνης HrpP από τη στήλη όπου βρίσκεται προσδεσμένη η His₁₀-HrcU C199. Στήλες 4 έως 9: εκλούσματα των πρωτεϊνών His₁₀-HrcU C199 και HrpP από τη στήλη σε 80, 100, 150, 200, 250 και 300 mM μιδαζόλιο αντίστοιχα.

4. Απόπειρα χρήσης συστήματος καθαρισμού συγγένειας της GST

Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα που δημιουργήθηκε με τις στήλες Ni⁺, δοκιμάστηκε το σύστημα καθαρισμού συγγένειας της GST. Το σύστημα αυτό λειτουργεί ως εξής: το γονίδιο της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος κλωνοποιείται σε σύντηξη με την πρωτεΐνη GST (θειοτρανσφεράση της γλουταθειόνης) σε κατάλληλους φορείς. Η συντηγμένη πρωτεΐνη επάγεται και παρασκευάζεται διάλυμα διαυγούς λύσης από τα κύτταρα της επαγωγής. Ένας όγκος αυτού επωάζεται με GST beads, τα οποία αποτελούνται από ένα αδρανές υλικό επενδυμένο με γλουταθειόνη. Η GST σε σύντηξη με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος προσδένεται στη γλουταθειόνη και παραμένει μαζί με τα GST beads. Αυτά τα beads στη συνέχεια επωάζονται με διαυγές διάλυμα λύσης ή έκλουσμα δεύτερης πρωτεΐνης, για την οποία θέλουμε να δείξουμε ότι αλληλεπιδρά με την πρώτη. Αν η δεύτερη αυτή πρωτεΐνη αλληλεπιδρά πράγματι με την πρώτη, θα κρατηθεί μαζί με τα beads και μετά από κατάλληλο αριθμό πλύσεων, θα εκλουσθεί με γλουταθειόνη, ή το δείγμα θα βρασθεί για να αποδεσμευθούν οι πρωτεΐνες από τα beads. Εν προκειμένω, πριν την έναρξη της προσπάθειας οποιασδήποτε κλωνοποίησης των γονιδίων των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος

στους φορείς της GST, θεωρήθηκε συνετό να διενεργηθούν κατ' αρχάς τα πειράματα-αρνητικοί μάρτυρες, για να εξασφαλίσουμε ότι η HrcN C259 δεν αλληλεπιδρά με την GST από μόνη της. Δυστυχώς με ανοσοανίχνευση φάνηκε ότι αλληλεπιδρά και με την GST από μόνη της, και η μέθοδος εγκαταλείφθηκε (Εικόνα 41).



Εικόνα 41. Μεμβράνη ανοσοανίχνευσης με το αντίσωμα anti-HrcN. Στήλη 1: διαυγές διάλυμα λύσης της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλη 2: διάλυμα έκπλυσης των GST beads μετά από επώαση με το διαυγές διάλυμα λύσης της πρωτεΐνης HrcN C259. Στήλες 3, 4, 5, 6: πλύσεις των GST beads. Στήλη 7: βρασμένα GST beads για αποδέσμευση των όποιων πρωτεϊνών έχουν αλληλεπιδράσει μαζί τους.

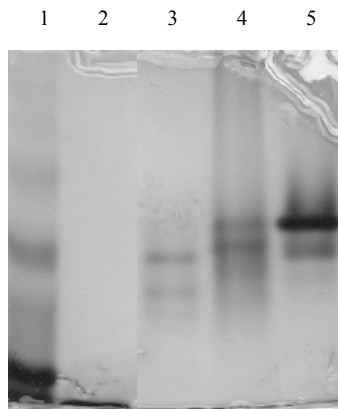
5. Μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199 και AvrPphF ORF1 μαζί με αρνητικούς μάρτυρες, αποτύπωση σε μεμβράνες, gel overlay με καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN C259 και western με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα

Σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ηλεκτροφορήθηκαν οι παρακάτω πρωτεΐνες:

- BSA (αρνητικός μάρτυρας)
- HrcQ_B (αρνητικός μάρτυρας)
- His_{N10}-HrcU C199
- AvrPphF ORF1 (απομόνωση #1)
- AvrPphF ORF1 (απομόνωση #2)

Η ηλεκτροφορημένη πηκτή (Εικόνα 42) αποτυπώθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, οι θέσεις οι μη κατειλημμένες από πρωτεΐνη επί της μεμβράνης μπλοκαρίστηκαν και στη συνέχεια η μεμβράνη υπεβλήθη σε επώαση με καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN C259 και

ακολουθώς σε ανοσοανίχνευση με το ειδικό αντίσωμα για την HrcN. Δεν ελήφθη κανένα σήμα και επιπλέον ο θόρυβος της μεμβράνης ήταν πάρα πολύς.



Εικόνα 42. Native ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προς ανοσοαποτύπωση, overlay με καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN C259 και ανοσοανίχνευση με το ειδικό για την HrcN αντίσωμα. Στήλη 1: native μοριακός μάρτυρας μεγέθους LMW. Στήλη 2: HrcQ_B. Στήλη 3: His_{N10}-HrcU C199. Στήλη 4: AvrPphF ORF1(απομόνωση #1). Στήλη 5: AvrPphF ORF1(απομόνωση #2).

6. Αποτύπωση κουκίδας (dot blot), overlay με καθαρισμένη πρωτεΐνη HrcN C259 και western με ειδικό γι' αυτήν αντίσωμα.

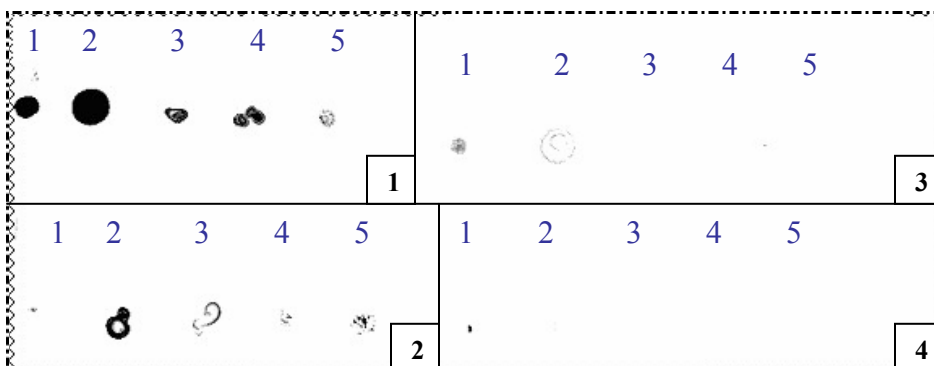
Πραγματοποιήθηκαν τρεις πειραματικές απόπειρες:

1. Ετοιμάστηκαν 4 dot blot με τα εξής δείγματα:

- **BSA (αρνητικός μάρτυρας): 10μg**
- **His_{N10}-HrcU C199: 3μg**
- **HrcQ_B (αρνητικός μάρτυρας): 3μg**
- **AvrPphF ORF1 (απομόνωση #1): 5.2μg**
- **AvrPphF ORF1 (απομόνωση #2): 5.38 μg**

Τα δύο από τα 4 blot πραγματοποιήθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και τα υπόλοιπα δύο σε μεμβράνη PVDF. Το ένα blot νιτροκυτταρίνης και το ένα PVDF προορίστηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (western χωρίς overlay με καθαρισμένη HrcN C259) και τα άλλα δύο blots για overlay με 200μg καθαρισμένης HrcN C259 και κατόπιν western. Οι εικόνες των ανοσοανιχνεύσεων ακολουθούν (Εικόνα 43). Δύο παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν βάσει των εικόνων αυτών: α) το σήμα που ελήφθη στους αρνητικούς μάρτυρες είναι το ίδιο με

αυτό που ελήφθη στις κυρίως πειραματικές μεμβράνες, κάτι που όπως φάνηκε αργότερα οφείλεται στην υπερβολική ποσότητα πρωτεΐνης για κάθε δείγμα επί του blot και β) οι μεμβράνες PVDF δίνουν περισσότερο θόρυβο σε σχέση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης.



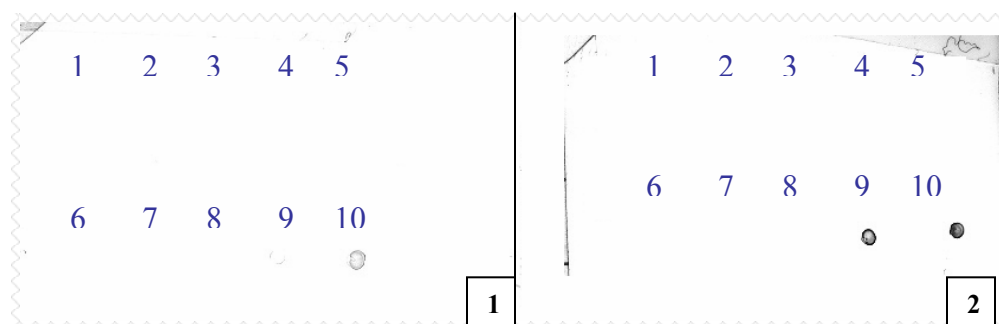
Εικόνα 43. Dot blots σε μεμβράνες PVDF και νιτροκυτταρίνης. Τα δείγματα επί των τεσσάρων μεμβρανών είναι τα ίδια και είναι τα εξής: Δείγμα 1: BSA 10μg. Δείγμα 2: His_{N10}-HrcU C199 3μg. Δείγμα 3: HrcQ_B 3 μg. Δείγμα 4: AvrPphF ORF1(απομόνωση #1) 5.2μg. Δείγμα 5: AvrPphF ORF1(απομόνωση #2) 5.38μg. Η μεμβράνη 1 και 2 είναι PVDF και οι 3 και 4 νιτροκυτταρίνης. Οι μεμβράνες 1 και 3 υπεβλήθησαν μόνο σε ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti-HrcN, ενώ οι 2 και 4 υπεβλήθησαν πρώτα σε overlay με καθαρισμένη HrcN C259 και κατόπιν σε ανοσοανίχνευση με το anti-HrcN

2. Για μείωση των μη ειδικών σημάτων, στα επόμενα blots που ετοιμάστηκαν, πραγματοποιήθηκαν: α) σημαντική μείωση και διαβαθμίσεις των πρωτεϊνικών ποσοτήτων επί των μεμβρανών, β) μείωση ποσότητας καθαρισμένης πρωτεΐνης HrcN C259 από τα 200μg στα 40μg, γ) χρήση μόνο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και δ) χρήση θετικού μάρτυρα επί του blot, εν προκειμένω καθαρής HrcN. Ετοιμάστηκαν δύο dot blots με τα εξής δείγματα:

- **BSA (αρνητικός μάρτυρας): 50ng**
- **BSA (αρνητικός μάρτυρας): 100ng**
- **His_{N10}-HrcU C199: 50ng**
- **His_{N10}-HrcU C199: 100ng**
- **AvrPphF ORF1 (απομόνωση #1): 50ng**
- **AvrPphF ORF1 (απομόνωση #1): 100ng**
- **AvrPphF ORF1 (απομόνωση #2): 50ng**

- **AnrPphF ORF1 (απομόνωση #2): 100ng**
- **HrcN (θετικός μάρτυρας): 50ng**
- **HrcN (θετικός μάρτυρας): 100ng**

Το ένα blot προορίστηκε ως αρνητικός μάρτυρας (western χωρίς overlay με καθαρισμένη HrcN C259) και το άλλο για overlay με 40μg καθαρισμένης HrcN C259 και κατόπιν western. Οι εικόνες των δύο blots ακολουθούν (Εικόνα 44). Δύο παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν επί αυτών: α) πέρα από τους θετικούς μάρτυρες (HrcN 50 και 100ng) δεν ελήφθη κάποιο άλλο σήμα, και β) τα δείγματα των θετικών μαρτύρων έδωσαν πιο έντονο σήμα όταν υπεβλήθησαν και σε overlay και σε western, σε σχέση με τα δείγματα που υπεβλήθησαν μόνο σε western (είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη HrcN αλληλεπιδρά με το εαυτό της για το σχηματισμό ολιγομερών (Pozidis C. et al., 2003)).



Εικόνα 44. Dot blots σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Τα δείγματα επί των δύο μεμβρανών είναι τα ίδια και είναι τα εξής: Δείγμα 1: BSA 50ng. Δείγμα 2: BSA 100ng. Δείγμα 3: His_{N10}-HrcU C199 50ng. Δείγμα 4: His_{N10}-HrcU C199 100ng. Δείγμα 5: AnrPphF ORF1 (απομόνωση #1) 50ng. Δείγμα 6: AnrPphF ORF1(απομόνωση #1) 100 ng. Δείγμα 7: AnrPphF ORF1 (απομόνωση #2) 50ng. Δείγμα 8: AnrPphF ORF1 (απομόνωση #2) 100ng. Δείγμα 9: HrcN 50 ng. Δείγμα 10: HrcN 100 ng. Η μεμβράνη 1 υπεβλήθη μόνο σε ανοσοανίχνευση με το αντίσωμα anti-HrcN (αρνητικός μάρτυρας), ενώ η μεμβράνη 2 υπεβλήθη πρώτα σε overlay με 40 μg καθαρισμένης HrcN C259 και κατόπιν σε ανοσοανίχνευση με το anti-HrcN

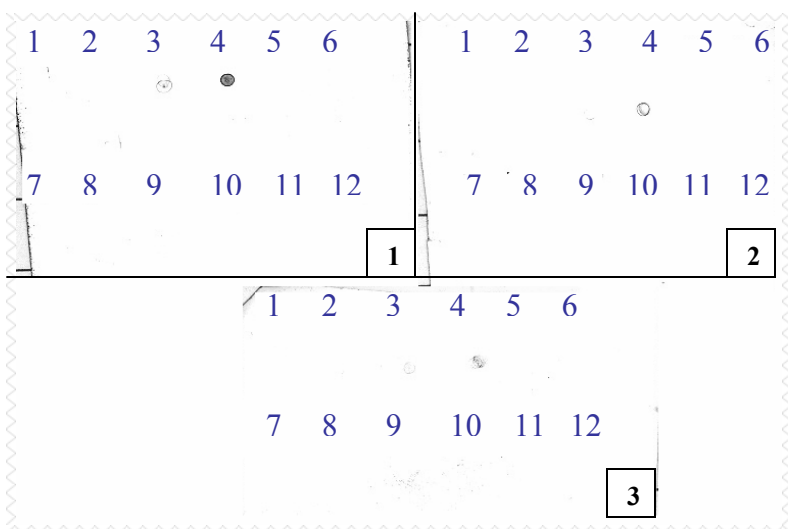
3. Χρήση στις ανοσοανιχνεύσεις αντί του αντισώματος anti-HrcN, του μορίου Ni-NTA AP conjugate:

Ετοιμάστηκαν 3 dot blots με τα παρακάτω δείγματα:

- **BSA (αρνητικός μάρτυρας): 50ng**
- **His_{N10}-HrcU C199 (θετικός μάρτυρας): 1 ng**
- **His_{N10}-HrcU C199 (θετικός μάρτυρας): 50 ng**

- **His_{N10}-HrcU C199 (θετικός μάρτυρας): 100 ng**
- **AnrPphF ORF1 (απομόνωση #1) (αρνητικός μάρτυρας): 50ng**
- **AnrPphF ORF1 (απομόνωση #2) (αρνητικός μάρτυρας): 50ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 215 ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 107 ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 72 ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 43 ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 21 ng**
- **Διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199: 2.2 ng**

Τα δύο από τα τρία blots χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Το ένα υπεβλήθη σε ανοσοανίχνευση με το μόριο Ni-NTA AP conjugate σε αραιώση 1:1000 και το άλλο σε ανοσοανίχνευση με το ίδιο μόριο σε αραιώση 1:5000. Το άλλο dot blot υπεβλήθη σε overlay με 100 μg καθαρής HrcN C259 και ανοσοανίχνευση με το μόριο Ni-NTA AP conjugate σε αραιώση 1:5000. Οι εικόνες των blots ακολουθούν (Εικόνα 45). Τα μόνα σήματα που ελήφθησαν επί των μεμβρανών αφορούσαν τα 50 και 100ng του θετικού μάρτυρα (His_{N10}-HrcU C199).



Εικόνα 45. Dot blots σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Τα δείγματα επί των τριών μεμβρανών είναι τα ίδια και είναι τα εξής: Δείγμα 1: BSA 50ng. Δείγμα 2: His_{N10}-HrcU C199 1 ng. Δείγμα 3: His_{N10}-HrcU C199 50ng. Δείγμα 4: His_{N10}-HrcU C199 100ng. Δείγμα 5: AnrPphF ORF1 (απομόνωση #1) 50ng. Δείγμα 6: AnrPphF ORF1(απομόνωση #2) 50 ng. Δείγμα 7: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 215 ng. Δείγμα 8: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 107 ng. Δείγμα 9: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 72 ng. Δείγμα 10: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 43 ng. Δείγμα 11: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 21 ng. Δείγμα 12: διαυγές διάλυμα λύσης HrcU C199, 2.15 ng. Οι μεμβράνες 1 και 2 υπεβλήθησαν σε ανοσοανίχνευση με το μόριο Ni-NTA AP conjugate σε αραιώσεις 1:1000 και 1:5000 αντίστοιχα, (αρνητικοί μάρτυρες), ενώ η μεμβράνη 3 υπεβλήθη πρώτα σε overlay με 100 μg καθαρισμένης HrcN C259 και κατόπιν σε ανοσοανίχνευση με το μόριο Ni-NTA AP conjugate σε αραιώση 1:5000.

7. Προσέγγιση επαγωγής του ψευδομοναδικού TTSS με ακόλουθο συγκαθαρισμό των πρωτεϊνών His_{N10}-HrcU C199/HrcN_{P_s3121}

Μια νέα πειραματική προσέγγιση που σχεδιάστηκε είχε την εξής διάρθρωση:

- Επαγωγή του εκκριτικού συστήματος τύπου III από την ψευδομονάδα.(στέλεχος Psp3121) και προσδιορισμός α) σε ποιο σημείο της επαγωγής εκφράζεται η HrcN, και β) σε τι διάλυμα λύσης λαμβάνεται ανιχνεύσιμη ποσότητά της στο υπερκείμενο (η HrcN δεν φέρει διαμεμβρανικές περιοχές, αλλά συνδέεται περιφερικά με τη μεμβράνη, και για το λόγο αυτό σε προσπάθειες καθαρισμού όλου του μορίου, αυτή εντοπίζεται σχεδόν εξολοκλήρου στο μεμβρανικό κλάσμα).

- Επανάληψη της επαγωγής και λήψη καλλιέργειας στο παραπάνω σημείο. Λύση των κυττάρων στο κατάλληλο διάλυμα λύσης, διαχωρισμός υπερκειμένου και ιζήματος.
- Πρόσδεση της πρωτεΐνης His₁₀-HrcU C199 σε στήλη Ni⁺ και φόρτωση του παραπάνω υπερκειμένου της ψευδομονάδας. Καθαρισμός, αποτύπωση, ανοσοανίχνευση.
- Επανάληψη του αυτού πειράματος και φόρτωση του υπερκειμένου της ψευδομονάδας σε στήλη Ni⁺ χωρίς την προσδεδεμένη His₁₀-HrcU C199 ως αρνητικό μάρτυρα του πειράματος.
- Εάν ο αρνητικός μάρτυρας το επιτρέψει, επανάληψη του αυτού πειράματος και με άλλες διαθέσιμες His-tagged πρωτεΐνες (πχ, His-AvrPphF ORF1, His-AvrPphF ORF2, His-AvrPphF ORF1-ORF2 κλπ.).

Η επαγωγή πραγματοποιήθηκε δύο φορές, αλλά σε καμία από τις δύο επαναλήψεις δεν μπόρεσε να προσδιοριστεί η χρονική στιγμή της επαγωγής στην οποία αρχίζει να επάγεται η έκφραση της πρωτεΐνης HrcN. Η προσπέλαση αυτού του προβλήματος και η συνέχιση των προαναφερθέντων βημάτων της προσέγγισης αυτής αναστάλησαν για να συνεχισθούν αργότερα, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής μου.

Συζήτηση



A. Χαρακτηρισμός HrcU C199

Η πρωτεΐνη HrcU είναι ομόλογη των FlhB και YscU του βακτηριακού μαστιγίου και του τύπου III της *Yersinia* αντίστοιχα, για τις οποίες έχει φανεί ότι πραγματοποιείται πρωτεόλυση στο μοτίβο NPTH. Αποτέλεσμα αυτής της κοπής είναι δύο θραύσματα, ένα αμινοτελικό που περιλαμβάνει και τις διαμεμβρανικές περιοχές του μορίου, και ένα μικρότερο καρβοξυτελικό, πλήρως διαλυτό που εδρεύει στο κυτταρόπλασμα. Τα δύο αυτά θραύσματα έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (καθώς συγκαθαρίζονται από στήλες συγγένειας), και αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται να περιλαμβάνει μόνο τα διαλυτά κυτταροπλασματικά τμήματα, και όχι το διαμεμβρανικό που φαίνεται να είναι αδρανές. Όλων των παραπάνω δεδομένων, και γνωρίζοντας ότι και η HrcU φέρει το μοτίβο αυτό πρωτεόλυσης, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS), βάσει μοριακών μεγεθών θα έπρεπε να δίνει δύο ζώνες, μία που να αντιστοιχίζεται στο ολόκληρο μόριο His_{N10}-HrcU C199 στα 22-25 kDa και μία διπλή ζώνη στα 11 kDa περίπου, η οποία θα αποτελούνταν από τα μόρια His_{N10}-HrcU C199_N και HrcU C199_C, μοριακού βάρους 11 kDa (το θραύσμα HrcU C199_N χωρίς το His-tag έχει μέγεθος 8.5 kDa) και 10.5 kDa αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες με αυτά τα μοριακά βάρη δεν θα ήταν δυνατόν να διαχωρισθούν σε πηκτώματα 15%, ενώ θα μπορούσαν να διαχωρισθούν με αντιστροφή του his-tag από το N- άκρο στο C- άκρο της πρωτεΐνης (το θραύσμα HrcU C199_C με το his-tag θα είχε μέγεθος 13 kDa περίπου). Παρόμοια αντιμετώπισαν και οι Minamino & Macnab (2000) το πρόβλημα ταυτοποίησης των μορφών της ομόλογης της HrcU πρωτεΐνης στο βακτηριακό μαστίγιο, FlhB. Τα αποτελέσματά τους ήταν όπως ακριβώς τα περίμεναν θεωρητικά και όπως περιγράφηκε παραπάνω. Εν προκειμένω όμως:

1) ο καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{N10}-HrcU C199 από κύτταρα BL21(DE3)(pLysS) έδωσε τρεις ζώνες, μία στα 25 kDa όπως αναμενόταν, και άλλες δύο: μία πολύ έντονη (διπλή;) στα 17 kDa και μία που την ακολουθεί λίγο πιο κάτω, στα 15 kDa. Θα μπορούσε ίσως η διπλή ζώνη στα 17 kDa να αντιστοιχίζεται στα θραύσματα His_{N10}-HrcU C199_N και HrcU C199_C, παρά το γεγονός ότι η ζώνη αυτή βρίσκεται σε μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με το πραγματικό τους. Η ταυτότητα της τρίτης ζώνης είναι όμως δύσκολο να προσδιορισθεί. Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι η εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης για το πλασμίδιο έκφρασης pET16b/HrcU C199: το γονιδιακό θραύσμα της πρωτεΐνης HrcU C199 έχει διατηρήσει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Αυτό σημαίνει, ότι δίπλα στην αλληλουχία του φορέα που αναγνωρίζεται ως σημείο πρόσδεσης στο ριβόσωμα, υπάρχουν δύο κωδικόνια έναρξης: ένα του φορέα, που μεταφράζει σε σύντηξη την ουρά των 10 καταλοίπων ιστιδίνης με την ανασυνδυασμένη

αλληλουχία, και ένα δεύτερο, του ενθέματος, το οποίο αναγνωριζόμενο δίνει την πρωτεΐνη HrcU C199 χωρίς την ουρά ιστιδινών. Τα δύο κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης έχουν απόσταση 60 ζεύγη βάσεων, και θα μπορούσαν να αναγνωρίζονται και τα δύο από τους κυτταρικούς μεταφραστικούς παράγοντες. Εάν κάτι τέτοιο συνέβαινε, θα περίμενε κανείς μαζί με τα προϊόντα His_{N10}-HrcU C199_N και HrcU C199_C και μια τρίτη ζώνη, που θα αντιστοιχίζεται στο προϊόν HrcU C199_N και το οποίο θα είχε μέγεθος όπως προαναφέρθηκε 8.5 kDa. Η πρωτεΐνη αυτή θα συγκαθαρίζεται μαζί με τα υπόλοιπα προϊόντα παρά το γεγονός ότι δεν φέρει ουρά ιστιδινών, μέσω της ειδικής της αλληλεπίδρασης με το θραύσμα HrcU C199_C, γεγονός που έχει αποδειχθεί για τις ομόλογες της HrcU πρωτεΐνες για το βακτηριακό μαστίγιο (FlhB) και για το TTSS της *Yersinia spp* (YscU). Ίσως μια τέτοια εξήγηση να μας αφορά στην πραγματικότητα και να ρίχνει φως στην δική μας περίπτωση.

II) ο καθαρισμός της πρωτεΐνης His_{C5}-HrcU C199 δεν διαχώρισε τα δύο πρωτεϊνικά θραύσματα όπως αναμενόταν (η επιπρόσθετη αλληλουχία της σύντηξης από τον φορέα, δηλαδή η ουρά των ιστιδινών μαζί με την αλληλουχία που αναγνωρίζονται από πρωτεάσες για την απομάκρυνση του his-tag, είναι του ίδιου μοριακού βάρους με την περίπτωση της His_{N10}-HrcU C199: 2.5 kDa προστίθενται στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη και στις δύο περιπτώσεις). Διαφοροποίησε μεν το πρότυπο ζωνώσεων σε σχέση με την πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199, αλλά όχι προς την κατεύθυνση της κατανόησης αλλά της περιπλοκής. Στην περίπτωση αυτή, δεν έχουμε δύο γειτονικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης, τα δύο κωδικόνια φορέα και ενθέματος συμπίπτουν. Οι ζώνες όμως που προέκυψαν ήταν μια ζώνη στα 11 kDa και μία μεταξύ 11 και 8.5 (ο μοριακός μάρτυρας μεγεθών που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν τόσο λεπτομερειακός). Επίσης, ακόμα και το ολόκληρο μόριο His_{C5}-HrcU C199 φαίνεται ελαφρώς μετατοπισμένο προς τα πάνω σε σχέση με το μόριο His_{N10}-HrcU C199, ίσως περίπου κατά 2 kDa μεγαλύτερο, γεγονός που επίσης δεν αναμένεται θεωρητικά. Τέλος, στην περίπτωση του μορίου His_{C5}-HrcU C199 προστέθηκε ένας ακόμα παράγοντας δυσκολίας: η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται όλη σχεδόν στο αδιάλυτο μεμβρανικό κλάσμα.

Η προσέγγιση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των φυσικών πληθυσμών που σχηματίζει η πρωτεΐνη His_{N10}-HrcU C199 υπό native συνθήκες, και για τον ακριβή προσδιορισμό των μοριακών βαρών των διαφόρων μορφών της πρωτεΐνης που παρατηρούνται στα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Μόνο ο πρώτος σκοπός κατορθώθηκε, καθώς λόγω τεχνικών ελλείψεων δεν ήταν δυνατή η βαθμονόμηση της στήλης μοριακής διήθησης με μοριακούς μάρτυρες μεγέθους. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης ανέδειξε δύο φυσικούς πληθυσμούς μορίων της

πρωτεΐνης. Ο ένας από αυτούς εξέρχεται νωρίς από τη στήλη και αντιστοιχίζεται σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα που σχηματίζει το μόριο υπό native συνθήκες, και ο δεύτερος και ποσοτικά σημαντικότερος εξέρχεται αργότερα, και σε σχέση με τον πρώτο είναι μικρομοριακός. Ενδιαφέροντα θα ήταν και όποια πληροφορία εξερχόταν από τα πρώτα βήματα κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης που επιχειρήθηκαν, αλλά λόγω ακατάλληλου σχεδιασμού του μορίου από τα πρώτα βήματα της κλωνοποίησής του στο φορέα έκφρασης, δεν ήταν δυνατή η προώθηση αυτού για κρυστάλλωση.

B. Προδιορισμός αλληλεπιδράσεων της HrcU C199 με άλλες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, όπως και μεταξύ άλλων πρωτεϊνών.

➤ Αξιολόγηση μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν

1. Προσέγγιση χρήσης στελέχους BL21(DE3)(pPL6): απεδείχθη ανεπαρκής κατά την εφαρμογή της. Η πρωτεΐνη HrcU C199 φαίνεται να συμπαρασύρεται στο αδιάλυτο μεμβρανικό κλάσμα μέσω αλληλεπίδρασης με το ολόκληρο μόριο HrcU του κοσμιδιακού κλώνου ή με κάποια άλλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται από αυτόν. Ίσως η πρώτη υπόθεση να πλησιάζει περισσότερο την αλήθεια, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το μόριο της HrcU μετά την πρωτεολυτική κοπή του στο μοτίβο NPTH δίνει δύο θραύσματα που συγκρατώνται μαζί μέσω αλληλεπίδρασης. Είναι πιθανόν άρα το κυτταροπλασματικό άκρο της HrcU να αλληλεπιδρά με την ανασυνδυσασμένη HrcU C199 και να την συμπαρασύρει μαζί της στην πελέτα λύσης, καθώς φέρει μαζί της και τέσσερις ισχυρά υδρόφοβες επικράτειες. Γενικά πρόκειται για μια μέθοδο που δεν ενδείκνυται για την ανάδειξη ζευγών αλληλεπιδράσεων, όταν η μία από τις δύο πρωτεΐνες είναι διαμεμβρανική ή εξαιρετικά υδρόφοβη.
2. Συνέκφραση πρωτεϊνών από το ίδιο κύτταρο και συγκαθαρισμός τους από στήλη συγγένειας: πρόκειται για μέθοδο πολύ συχνά εφαρμοζόμενη και αναφερόμενη σε πολλές ερευνητικές εργασίες. Στην προκειμένη περίπτωση, το αρνητικό αποτέλεσμα μάλλον δεν μπορεί να τεθεί υπόψη, διότι ο φορέας έκφρασης ευρέως φάσματος που χρησιμοποιήθηκε (pDN18), παρουσίασε πολλαπλές δυσκολίες στη χρήση του, απεδείχθη ασταθής και διασπώμενος σε επίπεδο DNA με την πάροδο του χρόνου, και επίσης υποβόσκει η αμφισβήτηση της επαρκούς και σταθερής έκφρασης της ανασυνδυσασμένης πρωτεΐνης (HrcN C259) από αυτόν.

3. Έκφραση των δύο υποψήφιων πρωτεϊνών από διαφορετικά κύτταρα και συγκαθαρισμός τους από στήλη συγγένειας.: η μέθοδος απεδείχθη εξαιρετικά προβληματική, όχι από θέμα αρχής, αλλά λόγω χρήσης ακατάλληλου υλικού. Στη χρωματογραφία συγγένειας όπως αυτή χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, έγινε χρήση του υλικού Ni-NTA αραρόζη. Το υλικό αυτό παρουσίασε την επιπλοκή της μη ειδικής πρόσδεσης σε αυτό, πρωτεϊνών που δεν φέρουν ουρά ιστιδινών: με τον τρόπο αυτό ακυρώθηκαν οι αρνητικοί μάρτυρες των πειραμάτων συγκαθαρισμού από διαφορετικά κύτταρα. Σαν μέθοδος με διάφορα ζεύγη πρωτεϊνών ως υποψήφιες αλληλεπίδρασης είναι πολυχρησιμοποιημένη, αλλά στην περίπτωση μας απεδείχθη ακατάλληλη. Και το σύστημα της GST όμως που επιχειρήθηκε ως εναλλακτική μέθοδος συγγένειας για συγκαθαρισμό απεδείχθη ομοίως ακατάλληλη. Μέχρι τώρα δεν έχει γίνει κάποια ικανοποιητική υπόθεση, γιατί η πρωτεΐνη HgcN C259 -η οποία κατά βάση εμφάνισε το πρόβλημα της μη ειδικής πρόσδεσης- μπορεί και προσδέεται στο υλικό τόσο της Ni-NTA αραρόζης όσο και στα GST beads, χωρίς να έχει το απαραίτητο tag που της δίνει την ιδιότητα αυτή.
4. Native ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών & overlay.: η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε αντί των όχι τόσο αξιόπιστων εξής μεθόδων, που παρ' όλα αυτά έχουν αναφερθεί πολλάκις στην πρόσφατη βιβλιογραφία: α) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη, overlay της μεμβράνης με την πρωτεΐνη-στόχο και ανοσοανίχνευση για την τελευταία, και β) ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, αποτύπωση των πρωτεϊνών σε μεμβράνη, αποδιάταξή τους επί της μεμβράνης και επαναδιάταξή τους με εκτεταμένες πλύσεις, overlay της μεμβράνης με την πρωτεΐνη - στόχο και ανοσοανίχνευση για την τελευταία. Θεωρήθηκε ότι πρωτεύοντα ρόλο για την αξιοπιστία και την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μιας τέτοιας προσέγγισης έχει η το δυνατόν καλύτερα διαφύλαξη της δομής των πρωτεϊνών που ακινητοποιούνται πάνω στη μεμβράνη, ακριβώς επειδή είναι άγνωστος ο βαθμός και η σημασία της διαμεσολάβησης της τρισδιάστατης δομής αυτής καθ' αυτής στο γεγονός της αλληλεπίδρασης. Η εφαρμογή της μεθόδου δεν καρποφόρησε κάποιο θετικό αποτέλεσμα, για δύο λόγους ίσως: α) δεν χρησιμοποιήθηκε σωστό είδος μεμβράνης (χρησιμοποιήθηκε νιτροκυτταρίνη αντί για PVDF που συνήθως χρησιμοποιείται σε τέτοια πειράματα – η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έδωσε εξαιρετικά μεγάλο θόρυβο, τέτοιο που δυνητικά να έπνιξε κάποιο υπαρκτό σήμα), και β) εφαρμόστηκε για πρώτη φορά και δεν ήταν στανταρισμένη – για παράδειγμα, ίσως χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα

πρωτεΐνης σε διαλυτή φάση, ή μεγάλη συγκέντρωση μπλοκαριστικού παράγοντα παρουσία της πρωτεΐνης κλπ.

5. Αποτύπωση κουκκίδας (dot blot) και overlay: η μέθοδος δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης για τις πρωτεΐνες για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε. Γενικά πάντως δεν παρουσίασε σημαντικά τεχνικά προβλήματα – οι συνθήκες κατά τις οποίες παρελήφθησαν καθαροί αρνητικοί μάρτυρες προέκυψαν σχετικά εύκολα.
6. Προσέγγιση επαγωγής του ψευδομοναδικού τύπου III εκκριτικού συστήματος και συγκαθαρισμού με άλλη πρωτεΐνη με χρωματογραφία συγγένειας: πρόκειται επίσης για μέθοδο που αναφέρεται συχνά στην βιβλιογραφία, και θα είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον αν γίνει εφικτό το σταντάρισμά της. Πάντως, θα ήταν προτιμότερη χρήση της μεθόδου αυτής σε συνδυασμό με αλλαγή υλικού χρωματογραφίας συγγένειας, για την αποφυγή των προβλημάτων που εισήγαγε η χρήση του υλικού Ni-NTA αγαρόζη.

➤ Αξιολόγηση ζευγών αλληλεπιδράσεων που εξετάστηκαν

1. HrcU-HrcN: το ζεύγος αυτό εξετάστηκε λόγω βιβλιογραφικών δεδομένων που θέλουν τις ομόλογες πρωτεΐνες της *Yersinia* να αλληλεπιδρούν (Minamino et al., 2000). Επιπροσθέτως, παλαιότερα αποτελέσματα της Δρ. Ταμπακάκη αναφέρουν μια πρώτη αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HrcN με το πρωτεϊνικό θραύσμα HrcU C199 (εφαρμογή μεθόδου Far western). Στην περίπτωση του ζεύγους HrcU C199-HrcN, έπειτα από πείραμα συγκαθαρισμού από στήλη συγγένειας, δεν φάνηκε κάποια αλληλεπίδραση. Στην περίπτωση του ζεύγους HrcU C199-HrcN N261, έπειτα από εφαρμογή της ίδιας μεθόδου, δεν φάνηκε παρά μόνο ένα αμυδρό σήμα, το οποίο δεν ελήφθη υπόψη. Για τον λόγο ότι το ζεύγος αυτό εγκαταλείφθηκε, δεν παρασκευάστηκε αρνητικός μάρτυρας του πειράματος. Ίσως χρήζει διαλεύκανσης. Στην περίπτωση δε του ζεύγους HrcU C199-HrcN C259, ελήφθη σήμα, αλλά αποτύχαμε στην παρασκευή καθαρού αρνητικού μάρτυρα του πειράματος. Όσον αφορά τις άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για το τελευταίο αυτό ζεύγος, η μέθοδος της αποτύπωσης κουκκίδας έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ η μέθοδος της συνέκφρασης από το ίδιο κύτταρο, έδωσε ένα μη ξεκάθαρο, και με πολλά ερωτηματικά αρνητικό αποτέλεσμα (βλέπε παραπάνω την αξιολόγηση της μεθόδου).

2. HrcU-AvrPph ORF1, HrcU-AvrPph ORF2 & HrcU-AvrPph ORF1-ORF2.: το ζεύγος επιλέχθηκε βάσει βιβλιογραφικών αναφορών που θέλουν τα ζεύγη chaperone-effector τόσο στα εκκριτικά τύπου III συστήματα παθογένειας όσο και στην περίπτωση της οργάνωσης του βακτηριακού μαστιγίου, να αγκυροβολούν στην βακτηριακή μεμβράνη μέσω αλληλεπίδρασης με την ΑΤΡάση του συστήματος, η οποία στη συνέχεια με την υδρόλυση ΑΤΡ προωθεί τη μεταφορά του effector μέσα από τον αγωγό του συστήματος (Minamino et al., 2000, Gauthier et al., 2003, Thomas et al., 2004). Το πρόβλημα που παρουσιάστηκε εδώ ταυτίζεται με αυτό που αντιμετωπίστηκε με το ζεύγος HrcU C199-HrcN C259. Δηλαδή δεν στάθηκε εφικτή η παρασκευή καθαρού αρνητικού μάρτυρα, ενώ οι αποτυπώσεις κουκίδας έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα.
3. HrcU-HrpP.: το ζεύγος αυτό τέλος επελέγη βάσει πολλών βιβλιογραφικών αναφορών που θέλουν το ομόλογο/ανάλογο ζεύγος στο βακτηριακό μαστίγιο κυρίως αλλά και στη *Yersinia* να αλληλεπιδρούν στα πλαίσια της ρύθμισης αλλαγής υποστρώματος έκκρισης κατά τη μετάβαση από τη δομή hook στη δομή filament του μαστιγίου (FlhB-FliK), και από τη δομή του pilus στην έκκριση YopS στην περίπτωση της *Yersinia* (YscU-YscP)(Minamino et al., 2000, Lavander et al., 2002, Edqvist et al., 2003). Δεν υπάρχει ομόλογη της FliK ή της YscP στην *Pseudomonas syringae*, αλλά ανάλογη πρωτεΐνη, και αυτή είναι η HrpP, η οποία και επελέγη να εξεταστεί ως ζεύγος με την HrcU C199 με πείραμα συγκαθαρισμού με χρωματογραφία συγγένειας. Το αποτέλεσμα ήταν μάλλον θολό, καθώς δεν ήταν διαθέσιμο αρκετά καθαρό αντίσωμα για την HrpP. Έτσι, ελήφθη κάποιο σήμα, αλλά και πολύς θόρυβος που μειώνει την αξιοπιστία του σήματος. Το ζεύγος εγκαταλείφθηκε και δεν παρασκευάστηκαν οι αρνητικοί μάρτυρές του. Ίσως χρήζει περισσότερης διερεύνησης με τη χρήση πιο έγκυρων εργαλείων από αυτά που ήταν διαθέσιμα στην παρούσα εργασία.

Μελλοντικές προοπτικές

Πολλές πειραματικές προσεγγίσεις μπορούν και πρέπει να προστεθούν ώστε να διαλευκάνουν και να τεκμηριώσουν αιωρούμενες πειραματικές ενδείξεις για την αλληλεπίδραση ή μη μεταξύ ζευγών πρωτεϊνών με τις οποίες καταπιιάστηκε η εργασία αυτή. Να σημειωθεί ότι πολλές πειραματικές διαδικασίες έμειναν στη μέση και παρουσιάζονται όχι καλά τεκμηριωμένα στην παρούσα εργασία ενώ άλλες διακόπηκαν για να γραφτεί η εργασία αυτή. Κατ' αρχάς, θα πρέπει να βρεθούν νέες μέθοδοι συγγένειας για συγκαθαρισμό, διότι η χρήση του υλικού Ni-NTA αγαρόζης δεν στάθηκε τόσο αποτελεσματική όσο φάνηκε αρχικά. Καθαροί αρνητικοί μάρτυρες και ξεκάθαρα θετικά σήματα σε σχέση με τους μάρτυρες αυτούς, όπως και απαραίτητοι καθαροί θετικοί μάρτυρες για την πιστοποίηση της πειραματικής επιτυχίας είναι συστατικά απαραίτητα τέτοιων νέων προσεγγίσεων, στα οποία δεν μπορεί να γίνει 'έκπτωση'. Οι πρωτεΐνες που επελέγησαν ως αντικείμενα των μελετών χαρακτηρισμού και αλληλεπίδρασης δεν είναι εύκολες, αλλά είναι σίγουρα πολλά υποσχόμενες καθώς φαίνεται να παίζουν κρίσιμο ρόλο στην δόμηση, τη ρύθμιση και τη λειτουργία του εκκριτικού συστήματος τύπου III στην ψευδομονάδα. Μελέτες δύο υβριδίων με βάση μια βιβλιοθήκη hgr θα οδηγήσουν σε απευθείας έγκυρη αναγνώριση αλληλεπιδράσεων όχι απλά μεταξύ πρωτεϊνών, αλλά μεταξύ domains πρωτεϊνών, κάτι που έχει και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον.

**And this was only the
beginning...**



Βιβλιογραφία



Aizawa, S.-I., **2001**. Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**: 157–164.

Akeda, Y., and Galan, J.E., **2004**. Genetic analysis of the *Salmonella enterica* type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* **186**: 2402–2412.

Alfano J.R., Charkowski A.O., Deng W.L., Badel J.L., Petnicki-Ocwieja T., van Dijk K., Collmer A., **2000**. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4856–4861.

Alfano J.R., Collmer A., **1997**. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death, *J. Bacteriol* **179**, 5655–5662.

Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluiter, and G. R. Cornelis. **1994**. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. *J. Bacteriol.* **176**: 4534–4542.

Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A., and Schneewind, O., **1999**. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 12839–12843.

Bergman T., Erickson K., Galyov E., Persson C., Wolf-Watz H., **1994**. The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, **176**(9), 2619-2626

Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., *et al.*, **2001**. Structure and composition of the *Shigella flexneri* ‘needle complex’, a part of its type III secreton. *Mol Microbiol* **39**: 652–663.

Buttner D., Bonas U., **2002**. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell, *EMBO J.* **21**, 5313–5322.

Buttner, D., and Bonas, U., **2003**. Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 312–319.

Charkowski A.O., Alfano J.R., Preston G., Yuan J., He S.Y., Collmer A., **1998**. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate, *J. Bacteriol* **180**, 5211–5217.

Claret, L., Calder, S.R., Higgins, M., and Hughes, C., **2003**. Oligomerization and activation of the FliII ATPase central to bacterial flagellum assembly. *Mol Microbiol* **48**: 1349–1355.

Corinne, M., Broughton, W.J., and Deakin, W.J., **2001**. *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol* **2**: 336–342.

Collmer A., Badel J. L., Charcowski A. O., Deng W-L., Fouts D. E., Ramos A. R., Rehm A. H., Anderson D. M., Schneewind O., van Dijk K., Alfano aj. R. **2000**. *Pseudomonas syringae* Hrp secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(16) 8770-8777

Cornelis, G.R., and Van Gijsegem, F., **2000**. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735–774.

Creasy E. A., Delahay R. M., Daniell S. J., Frankel G., **2003**. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**, 2093-2106.

Dalbey R. E., Chen M., Jiang F., Samuelson J. C., **2000**. Understanding the insertion of transporters and other membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 435-442

Dale, C., Plague, G.R., Wang, B., Ochman, H., and Moran, N.A., **2002**. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12397–12402.

Dangl J.L., Jones J.D.G., **2001**. Plant pathogens and integrated defense responses to infection, *Nature* **411**, 826–833.

Deng, W.L., and Huang, H.C., **1999**. Cellular locations of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrcC and HrcJ proteins, required for harpin secretion via the type III pathway. *J Bacteriol* **181**: 2298–2301.

Economou A., **2000**. Bacterial protein translocase: a unique molecular machine with an army of substrates. *FEBS Letters* **476**, 18-21

Edqvist, P.J., Olsson, J., Lavander, M., Sundberg, L., Forsberg, A., Wolf-Watz, H., and Lloyd, S.A., **2003**. YscP and YscU regulate substrate specificity of the *Yersinia* type III secretion system. *J Bacteriol* **185**: 2259–2266.

Fraser G. M., Gonzalez-Pedrajo B., Tame J. R. H., Macnab R. M., **2003**. Interactions of FliJ with the *Salmonella* type III flagellar export apparatus. *J Bacteriol* **185**(18), 5546-5554

Falnes P. O. & Sandvig K., **2000**. Penetration of protein toxins into cells. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 407-413

Galan J.E., Collmer A., **1999**. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells, *Science* **284**, 1322–1328.

Gauthier A. & Finlay B. B., **2003**. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**(23), 6747-6755

Gough, C. L., S. Genin, V. Lopes, and C. A. Boucher. **1993**. Homology between the HrpO protein of *Pseudomonas solanacearum* and bacterial proteins implicated in a signal peptide-independent secretion mechanism. *Mol. Gen. Genet.* **239**, 378-392.

Groisman, E. A. & Ochman H., **1993**. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J.* **12**, 3779-3787.

Guttman D.S., Vinatzer B.A., Sarkar S.F., Ranall M.V., Kettler G., Greenberg J.T., **2002**. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*, *Science* **295**, 1722–1726.

He S., Huang H., Collmer A. **1993**. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255–1266.

He S. Y. & Jin G., **2003**. The Hrp pilus: learning from flagella.. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 15-19

Hirano, T., Yamaguchi S., Oosawa K., Aizawa S., **1994**. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 5439–5449.

Holzinger A., Phillips K. S., Weaver T. E., **1996**. Single-step purification. solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. *Biotechniques* **20**, 804-808

Hueck, C.J., **1998**. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379–433.

Jackson M. W. & Plano G. V., **2000**. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiology Letters* **186**, 85-90

Jin Q., Hu W., Brown I., McGhee G., Hart P., Jones A.L., He S.Y., **2001**. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*, *Mol. Microbiol.* **40**, 1129–1139.

Jin Q., Thilmony R., Zwiesler-Vollick J., He S.Y., **2003**. Type III protein secretion in *Pseudomonas syringa*. *Microbes and Infection* **5**, 301-310

Journet, L., Agrain, C., Broz, P., and Cornelis, G.R., **2003**. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757–1760.

Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., **1998**. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602–605.

Kutsukake, K., Minamino T., Yokoseki T., **1994**. Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 7625–7629.

Lavander, M., Sundberg, L., Edqvist, P.J., Lloyd, S.A., Wolf-Watz, H., Forsberg, A., **2003**. Characterisation of the type III secretion protein YscU in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Adv Exp Med Biol* **529**, 109–112.

Lindgren P.B., Peet R.C., Panopoulos N.J., **1986**. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. 'phaseolicola' controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants, *J. Bacteriol* **168**, 512–522.

Lindgren P.B., **1997**. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol* **35**, 129–152.

Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J.C., Ramseier, T.M., and Saier, M.T. Jr., **2003**. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochim Biophys Acta* **1611**: 223–233.

Mansfield J., Jenner C., Hockernhull R., Bennett M. A., Stewart R., **1994**. Characterization of AvrPphE, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**(6), 726-739

Minamino, T., T. Iino, & K. Kutuskake., **1994**. Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium flhB* operon and its protein products. *J. Bacteriol.* **176**, 7630–7637.

Minamino, T., & Macnab R. M., **1999**. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.* **181**:1388–1394.

Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo B., Yamaguchi K., Aizawa S. I., and Macnab R. M., **1999**. FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol. Microbiol.* **34**:295–304.

Minamino, T., and Macnab R. M., **2000**. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J. Bacteriol.* **182**, 4906–4914.

Minamino, T., & Macnab. R. M. **2000**. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol. Microbiol.* **35**:1052–1064.

Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., and Macnab, R.M., **2000**. Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *J Bacteriol* **182**, 4207–4215.

Minamino T., Gonzalez-Pedrajo B., Kihara M., Namba K., Macnab R. M., **2003**. The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J Bacteriol* **185**(13), 3983-3988

Muramoto, K., S. Makishima, S. I. Aizawa, and R. M. Macnab, **1998**. Effect of cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **277**, 871–882.

Patterson-Delafield, J., Martinez R. J., Stocker B. A., Yamaguchi S., **1973**. A new *fla* gene in *Salmonella typhimurium*—*flaR*—and its mutant phenotype-superhooks. *Arch. Mikrobiol.* **90**, 107–120.

Payne, P.L., and Straley, S.C., **1998**. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J Bacteriol* **180**, 3882–3890.

Petnicki-Ocwieja T., Schneider D.J., Tam V.C., Chancey S.T., Shan L., Jamir Y., Schechter L.M., Janes M.D., Buell C.R., Tang X., Collmer A., Alfano J.R., **2002**. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7652–7657.

Pozidis, C., Chalkiadaki, A., Gomez-Serano, A., Stahlberg, H., Brown, I., Tampakaki, A.P. et al., **2003**. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem* **278**, 25816–25824.

Rahme L. G., Mindrinos M. N., Panopoulos N. J., **1991**. Genetic and transcriptional organization of the hrp cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J Bacteriol* **173**(2), 575-586

Rahme L.G., Mindrinos M.N., Panopoulos N.J., **1992**. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *J. Bacteriol* **174**, 3499–3507.

Roine E., Wei W., Yuan J., Nurmiaho-Lassila E.-L., Kalkkinen N., Romantschuk M., He S.Y., **1997**. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato DC3000*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3459–3464.

Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K., Bonas, U., **1999**. The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and animal bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 9368–9373.

Sasakawa, C., K. Komatsu, T. Tobe, T. Suzuki, and M. Yoshikawa., **1993**. Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* **175**, 2334-2346.

Silva-Herzog E. & Dreyfus G., **1999**. Interaction of FliI, a component of the flagellar export apparatus, with flagellin and hook protein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1431**, 374-383

Staskawicz B.J., Mudgett M.B., Dangl J.L., Galan J.E., **2001**. Common and contrasting themes of plant and animal diseases, *Science* **292**, 2285–2289.

Subtil, A., Parsot, C., and Dautry-Varsat, A., **2001**. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol* **39**, 792–800.

Tampakaki A., N. J. Panopoulos. **2000**. Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZ_{P_{sph}} produced in planta. *Mol. Plant-Microbe Interactions*. **13**: 1366-1374

Tampakaki A. P., Fadouloglou V.E., Gazi A. D., Panopoulos N. J., Kokkinidis M. I., **2004**. Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology* **6**(9), 805-816

Thomas J., Stafford G. P., Hughes C., **2004**. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**(11), 3945-3950

Van Gijsegem F., Vasse J., Camus J., Marena M., Boucher C., **2000**. *Ralstonia solanacearum* produces Hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. *Mol. Microbiol* **36**, 249–260.

Xiao Y., Lu Y., Heu S., Hutcheson S.W., **1992**. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. *J. Bacteriol* **174**, 1734–1741.