



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*“Πρωτεομική Ανάλυση του Φαγοσώματος του
Ενδοκυτταρικού Παθογόνου Βακτηρίου
Coxiella burnetii”*

Σαμοΐλης Γιώργος

Ηράκλειο, 2008

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ (ΙΒΕΑΑ)



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ: ΕΠΕΑΕΚ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΤΑΜΕΙΟ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ




ΠΑΙΔΕΙΑ ΜΠΡΟΣΤΑ
2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF SCIENCES AND TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY- DIVISION OF BIOCHEMISTRY

Ph.D. THESIS

***“Proteomic Analysis of the Phagosome of the
Intracellular Pathogenic Bacterium
Coxiella burnetii”***

Samoilis George
Heraklion, 2008

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- **Τσιώτης Γεώργιος** – Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας
- **Τσελέντης Ιωάννης** – Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής
- **Γανωτάκης Δημήτριος** – Καθηγητής, Τμήμα Χημείας

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- **Βαρώτσης Κωνσταντίνος** – Καθηγητής, Τμήμα Χημείας
- **Γανωτάκης Δημήτριος** – Καθηγητής, Τμήμα Χημείας
- **Γκίκας Αχιλλέας** – Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής
- **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος** – Καθηγητής, Τμήμα Χημείας
- **Περγαντής Σπυρίδων** – Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας
- **Τσελέντης Ιωάννης** – Ομότιμος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής
- **Τσιώτης Γεώργιος** – Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο: Σαμοΐλης Γεώργιος

Ημερομηνία γέννησης: 12 Δεκεμβρίου 1979

Επικοινωνία: Σταθερό τηλέφωνο: 210-6399572

Κινητό τηλέφωνο: 6938856356

e-mail: gsamoilis@hotmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2004 – 2007** Υποψήφιος διδάκτορας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, και υπότροφος του Ευρωπαϊκού Προγράμματος «Ηράκλειτος»
- 2003 – 2004** Εκπλήρωση στρατιωτικών υποχρεώσεων στο Σώμα Υγειονομικού του Ε.Σ., με την ειδικότητα του βοηθού μικροβιολογικού εργαστηρίου (απονεμήθηκε πτυχίο)
- 2001 – 2002** Master in Science (MSc) από το Πανεπιστήμιο του Λονδίνου (University of London) και Diploma of Imperial College (DIC) από το Αυτοκρατορικό Κολέγιο Επιστημών, Τεχνολογίας και Ιατρικής (Imperial College of Science, Technology and Medicine) στη «Μοριακή Βιολογία και Παθολογία Ιών»
- 1997 – 2001** Bachelor in Science (BSc) with Honors στην «Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία» από το πανεπιστήμιο Oxford Brookes University στην Οξφόρδη του Ηνωμένου Βασιλείου.
- 1997** Αποφοίτηση από το 1^ο Γενικό Λύκειο Αγίας Παρασκευής Αττικής, με βαθμό απολυτηρίου 17 και 1/11.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*Analysis of Whole Cell Lysate from the Intercellular Bacterium Coxiella burnetii Using Two Gel-Based Protein Separation Techniques*”; **Journal of Proteome Research**, 6(8):3032-41. Epub 2007 Jun 29.
- A. Turkmani, A. Psaroulaki, A. Christidou, G. Samoilis, T.A. Mourad, D. Tabaa, Y. Tselentis [2007], “*Uptake of ciprofloxacin and ofloxacin by two Brucella strains and their fluoroquinolone resistant variants under different conditions. An in vitro study*”; **Diagn Microbiol Infect Dis**. 59(4): 447-51. Epub 2007 Oct 17.
- G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, A. Gikas, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*A proteomics approach to understanding the pathogenesis mechanisms of the obligate intracellular pathogen Coxiella burnetii*”; **International Journal of Antimicrobial Agents**, Vol. 29, p. S493
- G. Tsiotis, G. Samoilis, A. Psaroulaki, and I. Tselentis [2005], “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase IP*”; **Molecular & Cellular Proteomics**, Vol. 4, No. 8, p. S96
- G. Samoilis, M. Aivaliotis, A. Psaroulaki, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*Possible effector molecules of the obligate intracellular parasite Coxiella burnetii*”, In preparation

ΑΝΑΦΟΡΕΣ – ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ – ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **2^ο Διεθνές Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Πρωτεομικής** (Μάιος 23-25, 2007, Κρήτη, Ελλάδα) “From Discovery to Applications”.
- **25^ο Διεθνές Συνέδριο Χημειοθεραπείας & 17^ο Ευρωπαϊκό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Λοιμογόνων Νόσων (25th International Congress of Chemotherapy & 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)**(Μάρτιος 31 - Απρίλιος 3, 2007, Μόναχο, Γερμανία)
Παρουσίαση Πόστερ: G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, A. Gikas, Y. Tselentis and G. Tsiotis, “*A proteomics approach to understanding the pathogenesis mechanisms of the obligate intracellular pathogen Coxiella burnetii*”.
- **Σεμινάριο Πρωτεομικής** (Νοέμβριος 24, 2006). Οργανώθηκε από την Ελληνική Εταιρεία Πρωτεομικής στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- **Σεμινάριο και workshop Πρωτεομικής** (Νοέμβριος 3-11, 2005, Αθήνα, Ελλάδα). Οργανώθηκε από την Ελληνική Εταιρεία Πρωτεομικής στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ).
- **HUPO 4th Annual World Congress** (Αύγουστος 2005, Μόναχο, Γερμανία)
Παρουσίαση Πόστερ: G. Tsiotis, G. Samoilis, A. Psaroulaki, and I. Tselentis, “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase IP*”.
- **1^ο Διεθνές Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Πρωτεομικής** (Μάιος 22-25, 2005, Αθήνα, Ελλάδα)

Παρουσίαση Πόστερ: G. Samoilis, A. Psaroulaki, I. Tselentis and G. Tsiotis; “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase I*”.

- **Summer School: Proteomics Basics** (Σεπτέμβριος 24-29, 2004, Opatija, Κροατία). Χρηματοδοτούμενο από το Γερμανικό Ομοσπονδιακό Υπουργείο για την Εκπαίδευση και την Έρευνα (BMBF).

Παρουσίαση Πόστερ: “*Isolation of Intact Paracitophorous Phagolysosomes from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase II*”.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΟΥΜΕΝΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- “Η φωσφοπρωτεομική (phosphoproteomics) ως εργαλείο για τον σχεδιασμό δραστικών και εκλεκτικών αναστολέων των κινασών των πρωτεϊνών”, χρηματοδοτούμενο από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας του Ελληνικού Υπουργείου Ανάπτυξης [2007].
- “Μεταφορά τεχνογνωσίας σε θέματα εργαστηριακής διάγνωσης και μεθοδολογίας μοριακής επιδημιολογίας ζωνόσων και διατροφικών λοιμώξεων”, χρηματοδοτούμενο από το Κυπριακό Ίδρυμα για την Προώθηση της Έρευνας [2006].
- “Παροχή βοήθειας στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής για τη συμμετοχή του στο δίκτυο του ΚΕΕΛ (Κέντρο Ελέγχου Ειδικών Λοιμώξεων), σε σχέση με τον εντοπισμό, καλλιέργεια και τυποποίηση στελεχών *Legionella* σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα”, χρηματοδοτούμενο από το Ελληνικό Υπουργείο Υγείας [2004].
- Χρηματοδότηση για την περάτωση της Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο: “Πρωτεομική Ανάλυση του Φαγολυσοσώματος του Παθογόνου Βακτηρίου *Coxiella burnetii*”, χρηματοδοτήθηκε από το Πανεπιστήμιο Κρήτης και το Ελληνικό Υπουργείο Παιδείας και συγχρηματοδοτούμενο από το European Social Fund & National Resources (ΕΠΕΑΕΚ II – ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ)[2003-2005].

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

- “Systematic determination of the packaging limit of vectors derived from the Human Foamy Virus” [The Wright-Fleming Institute, St. Mary’s Hospital, Imperial College, London, UK]
- “Construction of human P-glycoprotein mutants and their expression in the Baculovirus expression system” [John Radcliff Hospital, Oxford, UK]

ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

- Τεχνικές πρωτεομικής και πρωτεϊνικής βιοχημείας όπως: two-dimensional electrophoresis (2-DE), διάφορες προσεγγίσεις PAGE (π.χ. doubled-SDS-PAGE, SDS-Tricine-PAGE, 16-BAC-PAGE), western blot κ.λ.π.
- Διάφορες τεχνικές PCR, τόσο διαγνωστικά όσο και ερευνητικά (RT-PCR, nested PCR, site-directed mutagenesis κ.λ.π.).
- Τεχνικές βιοτεχνολογίας όπως: DNA restriction digestion και DNA agarose gel electrophoresis, transfections, transductions, και gene cloning.
- Μακρά εμπειρία σε κυτταροκαλλιέργειες (ευκαρυωτικές και βακτηριακές).
- Εμπειρία τριών χρόνων σε εργαστήριο αρνητικής πίεσης [(Επίπεδο Βιοασφάλειας 3 (BSL-30)].
- Διάφορες άλλες εργαστηριακές/ αναλυτικές τεχνικές όπως: διαφορική υπερφυγοκέντριση, κατακρήμνιση πρωτεϊνών, ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών κ.λ.π.
- Έμπειρος χειριστής οπτικού μικροσκοπίου και μικροσκόπιου φθορισμού.
- Εμπειρία στο σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών σε κύτταρα εντόμων (Baculovirus expression system).
- Τεχνικές ανοσοχημείας και ανοσοβιολογίας όπως: ανοσοφθορισμός, ELISA, western blot κ.λ.π.
- Έμπειρος χειριστής διαφόρων υπολογιστικών προγραμμάτων (Microsoft Office και πολλά web-based εργαλεία βιοπληροφορικής).

ΆΛΛΕΣ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

- Επίβλεψη και εκπαίδευση προπτυχιακών φοιτητών στα εργαστήρια Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (4 χρόνια).
- Εκπαίδευση διαφόρων επαγγελματιών υγείας και μεταπτυχιακών φοιτητών σε τεχνικές μοριακής βιολογίας και βιοχημείας στη διάγνωση και την έρευνα [WHO Collaborating Centre for Research and Training in Mediterranean Zoonoses, Faculty of Medicine, University of Crete (4 χρόνια)].
- Ιδρυτικό μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Πρωτεομικής.
- Alumni των Oxford Brookes University και Imperial College of Science Technology and Medicine.

ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ελληνικά (μητρική γλώσσα)
- Αγγλικά (άπαιστα, Certificate in Advanced English από το University of Cambridge)

CURRICULUM VITAE

GEORGIOS SAMOILIS

Personal details

- Nationality: Greek
- Date of birth: 12th December 1979
- E-mail: gsamoilis@hotmail.com
- Phone: [+30-2106399572](tel:+30-2106399572)
- Mobile: [+30-6938856356](tel:+30-6938856356)

Education

- 2004 – present** Doctoral thesis in the Department of Chemistry, University of Crete, Greece. PhD title: “Proteomic Analysis of the Phagolysosome of the Pathogenic Bacterium *Coxiella burnetii*”.
- 2003 – 2004** Military service in the Body of Sanitary of the Hellenic Army, with the speciality of Assistant Microbiologist (an official degree was granted).
- 2001 – 2002** Master in Science (MSc) from the University of London and Diploma (DIC) of Imperial College of Sciences, Technology and Medicine in the “Molecular Biology and Pathology of Viruses” (London, United Kingdom).
- 1997 – 2001** Bachelor in Science (BSc) with Honours in “Cell and Molecular Biology” from Oxford Brookes University (Oxford, United Kingdom).
- 1997** Graduation from the 1st General Lyceum of Aghia Paraskevi, Athens, Greece.

Publications

- G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*Analysis of Whole Cell Lysate from the Intercellular Bacterium Coxiella burnetii Using Two Gel-Based Protein Separation Techniques*”; **JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH**, 6(8):3032-41. Epub 2007 Jun 29.
- A. Turkmani, A. Psaroulaki, A. Christidou, G. Samoilis, T.A. Mourad, D. Tabaa, Y. Tselentis [2007], “*Uptake of ciprofloxacin and ofloxacin by two Brucella strains and their fluoroquinolone resistant variants under different conditions. An in vitro study*”; **Diagn Microbiol Infect Dis**. [Epub ahead of print]
- G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, A. Gikas, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*A proteomics approach to understanding the pathogenesis mechanisms of the obligate intracellular pathogen Coxiella burnetii*”; **International Journal of Antimicrobial Agents**, Vol. 29, p. S493
- G. Tsiotis, G. Samoilis, A. Psaroulaki, and I. Tselentis [2005], “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase II*”; **Molecular & Cellular Proteomics**, Vol. 4, No. 8, p. S96
- G. Samoilis, A. Psaroulaki, M. Aivaliotis, Y. Tselentis and G. Tsiotis [2007], “*Possible effector molecules of the obligate intracellular parasite Coxiella burnetii*”, In preparation

Reports – Abstracts – Participations in Conferences

- **2nd International Conference of the Hellenic Proteomics Society** (May 23-25, 2007, Crete, Greece) “From Discovery to Applications”.
- **25th International Congress of Chemotherapy & 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** (March 31 - April 3, 2007, Munich, Germany)
Poster Presentation: G. Samoilis, A. Psaroulaki, K. Vougas, A. Gikas, Y. Tselentis and G. Tsiotis, “*A proteomics approach to understanding the pathogenesis mechanisms of the obligate intracellular pathogen Coxiella burnetii*”.
- **Proteomics workshop** (November 24, 2006). Organized by the Hellenic Proteomics Society at the University of Crete.
- **Proteomics workshop and practical workshop** (November 3-11, 2005, Athens, Greece). Organized by the Hellenic Proteomics Society at the Foundation for Biomedical Research of the Academy of Athens
- **HUPO 4th Annual World Congress** (August 2005, Munich, Germany)
Poster Presentation: G. Tsiotis, G. Samoilis, A. Psaroulaki, and I. Tselentis, “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase II*”.
- **1st International Conference of the Hellenic Proteomics Society** (May 22-25, 2005, Athens, Greece)

Poster Presentation: G. Samoilis, A. Psaroulaki, I. Tselentis and G. Tsiotis; “*A Proteomics Approach to Analyze Paracitophorous Phagolysosomes Isolated from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase II*”.

- **Summer School: Proteomics Basics** (September 24-29, 2004, Opatija, Croatia). Funded by the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF)

Poster Presentation: “*Isolation of Intact Paracitophorous Phagolysosomes from Vero Cell Lines Infected with Coxiella burnetii Phase II*”.

Funded Projects Undertaken

- “Phosphoproteomics as a tool for the design of drastic and selective protein kinase inhibitors”, funded by the General Secretariat for Research and Technology of the Hellenic Ministry of Development [2007].
- “Transfer of know-how in matters of laboratory diagnosis and methodology for molecular epidemiology of zoonoses and food-borne diseases”, funded by the Cyprus Research Promotion Foundation [2006].
- “Aid of the Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine for the participation to the KEEL (Hellenic Center for Infectious Diseases Control) network, with regard to detection, culture and typing of *Legionella* spp. in clinical and environmental samples”, funded by the Hellenic Ministry of Health [2004].
- Funding for the conduction of the Doctorate entitled “Proteomic Analysis of the Phagolysosome of the Pathogenic Bacterium *Coxiella burnetii*”, funded by the University of Crete and the Greek Ministry of Education and co-funded by the European Social Fund & National Resources (EPEAEK II – HRAKLEITOS)[2003-2005].

Dissertations

- “Systematic determination of the packaging limit of vectors derived from the Human Foamy Virus” [The Wright-Fleming Institute, St. Mary’s Hospital, Imperial College, London, UK]
- “Construction of human P-glycoprotein mutants and their expression in the Baculovirus expression system” [John Radcliff Hospital, Oxford, UK]

Specialized Techniques

- Proteomics and protein biochemistry techniques: two-dimensional electrophoresis, various PAGE approaches (e.g. doubled-SDS-PAGE, SDS-Tricine-PAGE, 16-BAC-PAGE), isoelectric focusing of proteins in solution (Microrotorfor), western blot.
- Various PCR-based techniques for both diagnosis and research (RT-PCR, nested PCR, site-directed mutagenesis etc.).
- Biotechnological techniques: DNA restriction digestion and DNA agarose gel electrophoresis, transfections, transductions, and gene cloning.

- Long experience in cell cultures (both eukaryotic and bacterial).
- 3-years experience in working in a Biosafety Level 3 (BSL 3) laboratory.
- Various other laboratory/ analytical techniques such as: differential ultracentrifugation, protein precipitation, protein quantification etc.
- Experienced operator of light and fluorescent microscopes.
- Experience in the Baculovirus expression system.
- Immunochemical and immunohistochemical techniques such as immunofluorescence, elisa, western blot etc.
- Confident operator of various computer software (Microsoft Office and numerous web-based bioinformatics tools).

Other Academic Activities

- Supervision and training of undergraduate students in the Biochemistry laboratories of the Chemistry Department of the University of Crete (4 years).
- Training of various biomedical professionals and postgraduate students in molecular biology and biochemical techniques for diagnosis and/ or research at the WHO Collaborating Centre for Research and Training in Mediterranean Zoonoses, Faculty of Medicine, University of Crete (>4 years).
- Founding member of the Hellenic Proteomics Society.
- Alumni of Oxford Brookes University and Imperial College of Science Technology and Medicine.

Languages

- Greek (mother tongue)
- English (Certificate in Advanced English from the University of Cambridge; close to native speaker level)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του επίκουρου καθηγητή Γεώργιου Τσιώτη, και σε συνεργασία με το εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής (WHO Collaborating Center for Mediterranean Zoonoses) του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επιστημονική επιμέλεια του ομότιμου καθηγητή Ιωάννη Τσελέντη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους δυο, καταρχήν για το ότι με έφεραν σε επαφή με το Πανεπιστήμιο Κρήτης και μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την παρούσα μελέτη. Οι διαρκείς συμβουλές και βοήθεια τους, η ενθάρρυνση, η συμπαράσταση και η εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της διατριβής μου, ήταν καθοριστικής σημασίας για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Εξίσου καθοριστική ήταν η συμβολή της λέκτορος Άννας Ψαρουλάκη, του τμήματος Ιατρικής, σε θέματα εντός και εκτός εργαστηρίου σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε με την υποτροφία «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, με τη συγχρηματοδότηση της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 2^ο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης και Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης. Χωρίς την οικονομική υποστήριξη από τους παραπάνω φορείς, η εν λόγω μελέτη δε θα ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί.

Ευχαριστώ τους καθηγητές Δημήτριο Γανωτάκη, Κωνσταντίνο Βαρώτση, Χαράλαμπο Κατερινόπουλο και Σπυρίδωνα Περγαντή του Τμήματος Χημείας και Αχιλλέα Γκίκα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην επταμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Ευχαριστώ την Δρ. Αντωνία Βλάχου και τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας (ιδίως τους Δρ. Κ. Βουγά, Π. Δημητράκη και Α. Παπαδοπούλου) στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), για τις

συμβουλές τους, την βοήθεια τους και την άψογη φιλοξενία τους κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων μου στο ίδρυμα.

Ακόμη, ευχαριστώ τον Δρ. Μιχάλη Αϊβαλιώτη καταρχήν για τις πολύτιμες συμβουλές του και την καλή παρέα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής του στο εργαστήριο του καθηγητή Γεώργιου Τσιώτη. Τον ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη συνεργασία που είχαμε για την πραγματοποίηση πειραμάτων στο ινστιτούτο βιοχημείας Max Planck, στο Μόναχο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που κατά καιρούς συνεργαστήκαμε στο εργαστήριο βιοχημείας του καθηγητή Γ. Τσιώτη, και ιδιαίτερος τους Κάλλια Κουγιανού και Δημήτρη Παπασωτηρίου για όλες τις καλές στιγμές που περάσαμε μαζί, εντός και εκτός εργαστηρίου.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, και ιδίως τους Δημοσθένη Χοχλάκη, Χρύσα Κοκκινάκη, Ρένα Μακριδάκη, Σοφία Κοκκίνη, Σήφη Βρανάκη και Βασίλη Σανδαλάκη, που μου στάθηκαν πραγματικά σαν οικογένεια.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου βιοχημείας του καθηγητή Δ. Γανωτάκη για την πολύ καλή συνεργασία που είχαμε καθημερινά.

Τη διατριβή μου την αφιερώνω στους γονείς μου Σπύρο και Ιωάννα για την οικονομική και κυρίως ηθική υποστήριξη τους στις μακρόχρονες σπουδές μου, και στη Δήμητρα για την υπομονή της.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΑ

Περίληψη.....	1
Abstract.....	2
Συντομογραφίες.....	3
1. Εισαγωγή.....	4
1.1 Πυρετός “Q”.....	4
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	4
1.1.2 Επιδημιολογία και κλινική εικόνα.....	5
1.1.3 Διάγνωση και θεραπεία.....	8
1.2 <i>Coxiella burnetii</i>.....	10
1.2.1 Βακτηριολογία.....	10
1.2.2 Το ευκαρυωτικό φαγόσωμα και στρατηγικές ενδοκυττάριου παρασιτισμού.....	13
1.2.3 Ο ενδοκυττάριος κύκλος ζωής της <i>Coxiella burnetii</i>	14
1.3 Σκοπός της διατριβής.....	19
1.4 Γιατί η πρωτεομική προσέγγιση;.....	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	
Καλλιέργεια της <i>Coxiella burnetii</i>.....	22
Χρώση Gimenez.....	24
Πρωτόκολλο απομόνωσης <i>Coxiella burnetii</i> με την μέθοδο της ρενογραφίνης.....	25
Πρωτόκολλο απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων.....	28
Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, από κυτταρικές σειρές VERO μολυσμένες με <i>Coxiella burnetii</i>.....	30
Απομόνωση και κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετόνη ή TCA-ακετόνη.....	32

Πρωτόκολλα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	33
SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	33
SDS-Tricine polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Tricine-PAGE).....	34
Δισδιάστατη-SDS-Tricine polyacrylamide gel electrophoresis (doubled-SDS-Tricine-PAGE).....	35
Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two-dimensional electrophoresis).....	37
Συλλογή πρωτεϊνικών κηλίδων και πρωτεόλυση	39
Πρωτόκολλα φασματοσκοπίας μάζας	40
Matrix-assisted laser desorption/ ionization – time-of-flight – mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).....	40
Electron spray ionization – mass spectrometry (ESI-MS).....	42
Ταυτοποίηση πρωτεϊνών	43
Ανοσοφθορισμός (IFA)	45
Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	45
Western blot	47
<i>In silico</i> ανάλυση πρωτεϊνών	49
3. Αποτελέσματα	50
Χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προφίλ της ενδοκυττάριας μορφής της <i>Coxiella burnetii</i>	50
Ο δισδιάστατος πρωτεομικός «χάρτης» αναφοράς του βακτηρίου....	52
Ανάλυση ολικής πρωτεΐνης του βακτηρίου με την doubled-SDS-Tricine-PAGE.....	56
Ποιοτικά χαρακτηριστικά του πρωτεώματος της <i>Coxiella burnetii</i>	57
Προβλεπόμενη λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών της <i>Coxiella burnetii</i>	60
Πιθανές πρωτεΐνες “effectors” του βακτηρίου	64
SDS-PAGE και ταυτοποίηση πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος κυττάρων VERO μολυσμένων με <i>Coxiella burnetii</i>	66
<i>In silico</i> ανάλυση ταυτοποιημένων πρωτεϊνών.....	69

Χαρακτηρισμός των απομονωμένων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων.....	73
Χρώση Gimenez.....	75
Ανοσοφθορισμός.....	78
Κυτταρομετρία ροής.....	79
Western Blot.....	81
Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση.....	82
4. Συζήτηση.....	84
Χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προφίλ της ενδοκυττάριας μορφής της <i>Coxiella burnetii</i>.....	84
Προβλεπόμενη λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών.....	87
Σύγκριση με προηγούμενες πρωτεομικές μελέτες που έχουν γίνει στην <i>Coxiella burnetii</i>.....	91
Πιθανές πρωτεΐνες “effectors” της <i>Coxiella burnetii</i>.....	91
Παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα.....	97
5. Συμπεράσματα.....	100
Παράρτημα 1: Σύνολο πρωτεϊνών της <i>Coxiella burnetii</i> που ταυτοποιήθηκαν με 2-DE και dSDS-PAGE.....	103
Παράρτημα 2: Σύνολο πρωτεϊνών της <i>Coxiella burnetii</i> που ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά μόρια effector.....	118
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	123

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Coxiella burnetii* –ο αιτιολογικός παράγοντας του Πυρετού Q- είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο, το οποίο είναι εξαιρετικά προσαρμοσμένο στο να επιβιώνει μέσα στο ευκαρυωτικό φαγολυσόσωμα. Ο οξεόφιλος αυτός οργανισμός αποτελεί το μοναδικό γνωστό ενδοκυττάριο βακτήριο το οποίο καταφέρνει να επιβιώσει και να αναπτυχθεί μέσα σε ένα πλήρες σχηματισμένο, όξινο φαγολυσόσωμα. Η πρόσφατη ολοκλήρωση του γονιδιώματος του στελέχους αναφοράς Nine Mile ανέδειξε την αλκαλική φύση του θεωρητικού του πρωτεώματος, καθώς και την ανάγκη ενός όξινου περιβάλλοντος για την έκφραση πολλών γονιδίων του. Το γονιδίωμα αυτού του ιδιαίτερου παράσιτου φαίνεται να είναι πολύ δυναμικό, όπως μαρτυρά η ύπαρξη πολυάριθμων μεταθετών στοιχείων, ψευδογονιδίων και υποθετικών πρωτεϊνών. Η ολοκλήρωση του γονιδιώματος του στελέχους Nine Mile επιπλέον άνοιξε τον δρόμο για πρωτεομικές προσεγγίσεις. Τα ερωτήματα τα οποία τέθηκαν στην παρούσα μελέτη προκύπτουν από τον ιδιότυπο ενδοκυττάριο κύκλο ζωής του βακτηρίου, και ήταν τα εξής:

- I. Πώς επιβιώνει η *Coxiella burnetii* μέσα στο κύτταρο ξενιστή και δη, στο ιδιαίτερα αφιλόξενο περιβάλλον του φαγολυσόσωματος;
- II. Ποιοι είναι οι μηχανισμοί παθογένειας τους οποίους έχει αναπτύξει το βακτήριο;
- III. Ποιες είναι οι χαρακτηριστικές, υψηλής αφθονίας (high-abundant) πρωτεΐνες που εκφράζει η *Coxiella*;

Τα παραπάνω ερωτήματα προσεγγίστηκαν με μεθόδους πρωτεομικής ανάλυσης. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε ο πρωτεομικός χάρτης του στελέχους Nine Mile όπου και ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες «κλειδιά» σε σχέση με τα ερωτήματα που τέθηκαν, μελετήθηκαν οι πρωτεΐνες που πιθανώς εκκρίνονται από το βακτήριο στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, και τέλος απομονώθηκαν και μελετήθηκαν παρασιτοφώρα φαγολυσόσωματα.

ABSTRACT

Coxiella burnetii –the causative agent of Q Fever- is an obligate intracellular bacterium, which is highly adapted for survival within the eukaryotic phagolysosome. This acidophile is the only known intracellular bacterium which manages to survive and replicate within a fully formed, acidic phagolysosome. The recent completion of the genome of the reference strain Nine Mile, revealed the basic nature of the its theoretical proteome, as well as the need for an acidic environment in order for many of its genes to be expressed. The genome of this bizarre pathogen seems to be highly dynamic, since it bears numerous mobile elements, pseudogenes and hypothetical proteins. Moreover, the completion of the Nine Mile genome opened the way towards proteomics approaches. The questions that were set in this project were raised by the unique intracellular life-cycle that this bacterium exhibits. In particular, these questions were:

- I. How does *Coxiella burnetii* survive within the host cell and especially within the inhospitable environment of the phagolysosome?
- II. Which are the pathogenesis mechanisms that the bacterium has developed?
- III. Which are the characteristic, high-abundant proteins that are being expressed by the bacterium?

These questions were approached using proteomics methods. In particular, the proteomic reference map of strain Nine Mile was created in which we have identified “key” proteins in relation to the questions that were set, we have investigated proteins that are possibly secreted by the bacterium to the cytoplasm of the host cell, and finally we have isolated and investigated parasitophorous phagolysosomes.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΛΠΣ: λιποπολυσακχαρίτης

SST4: Secretion System Type 4, σύστημα έκκρισης τύπου 4

SST2: Secretion System Type 2, σύστημα έκκρισης τύπου 2

dpi: days post infection, μέρες μετά την μόλυνση

hpi: hours post infection, ώρες μετά την μόλυνση

PE: phycoerythrin, φυκοερυθρίνη

MALDI-TOF-MS: matrix-assisted laser desorption/ ionization – time-of-flight –
mass spectrometry

LC-ESI-MS: liquid chromatography – electrospray ionization – mass spectrometry

LAMP-1, -2: lysosome-associated membrane protein -1, -2

EEA-1: early endosome associated protein -1

PMF: peptide mass fingerprinting

2-DE: two-dimensional electrophoresis, δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

pI: isoelectric point, ισοηλεκτρικό σημείο

IPG: immobilized pH gradient, ακινητοποιημένη διαβάθμιση pH

SCV: small cell variant

LCV: large cell variant

BSL-3: biosafety level -3

bp: base pairs

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πυρετός “Q”

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Το καλοκαίρι του 1935 παρατηρήθηκαν στο Μπρίσμπεϊν της Αυστραλίας εκτεταμένα κρούσματα μίας αγνώστου αιτιολογίας εμπύρετης ασθένειας στο προσωπικό των τοπικών σφαγείων. Ο Ε. Η. Derrick, που κλήθηκε να διερευνήσει την υπόθεση, απέτυχε να διαγνώσει κάποιο γνωστό παθογόνο παράγοντα κι έτσι ονόμασε την ασθένεια “Q fever”, δηλαδή «Πυρετό Q» (το γράμμα Q προέρχεται από την λέξη query = ερωτηματικός, αινιγματικός)[5, 6]. Στη συνέχεια και με την βοήθεια του MacFarlane Burnet, η ασθένεια μεταδόθηκε σε ινδικά χοιρίδια στο εργαστήριο από δείγματα μολυσμένων εργατών και επιχειρήθηκε η απομόνωση του παθογόνου [7]. Την ίδια περίοδο δυο άλλοι ερευνητές, οι Η. R. Cox και G. Davis, στο Rocky Mountain Laboratory των Η.Π.Α. απομόνωναν έναν οργανισμό από κρότωνα, ο οποίος πίστευαν ότι ήταν ρικέτσια [8]. Περίπου τρία χρόνια αργότερα ο R. Dyer καθώς μελετούσε τα ευρήματα των Cox και Davis, παρουσίασε ο ίδιος μια εμπύρετη ασθένεια η οποία συνοδευόταν από οπισθοκογχική κεφαλαλγία και έντονη εφίδρωση. Απομονώθηκε από το αίμα του ένας μικροοργανισμός ο οποίος αποδείχτηκε ότι ήταν ταυτόσημος με αυτόν που απομόνωσαν οι Cox και Davis από τους κρότωνα (Nine Mile agent)[8]. Λίγο αργότερα, την ίδια χρονιά ο MacFarlane Burnet έστειλε στον Dyer δείγματα από τον σπλήνα ινδικών χοιριδίων τα οποία είχαν μολυνθεί με τον παράγοντα που προκαλούσε τον πυρετό “Q”. Ο Dyer κατάφερε να δείξει ότι ο παράγοντας που προκαλούσε τον πυρετό “Q” ήταν ουσιαστικά ο ίδιος μικροοργανισμός με τον Nine Mile agent, κι έτσι ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού “Q” ονομάστηκε *Coxiella burnetii* προς τιμή των Cox και Burnet [8, 9].

1.1.2 Επιδημιολογία και κλινική εικόνα

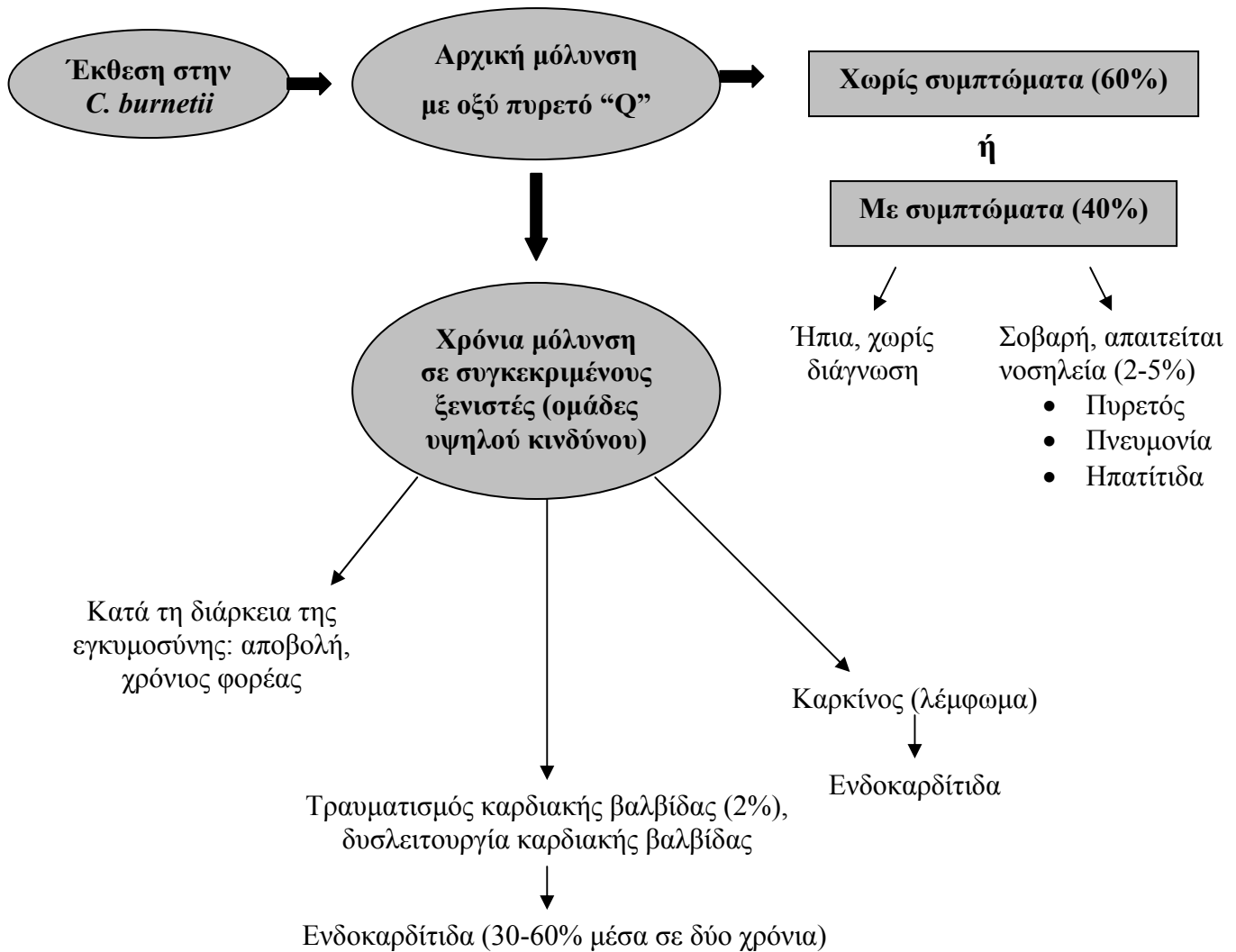
Σήμερα γνωρίζουμε ότι ο πυρετός “Q” είναι μια ανθρωπο-ζωνόσος με σχεδόν παγκόσμια εξάπλωση (εξαιρέση αποτελεί μόνο η Νέα Ζηλανδία [10]), αρκετά κρούσματα κάθε χρόνο και έντονη παρουσία στη λεκάνη της Μεσογείου [2, 3, 11-14]. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα το 1990 σύμφωνα με μια εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 3.686 δείγματα ασθενών οι οποίοι είχαν νοσήσει από «άτυπες πνευμονίες», το 4,7% των ασθενών είχαν αναπτύξει αντισώματα έναντι της *C. burnetii* [15]. Μεταξύ του 1989 και του 1993, στο Κέντρο Αναφοράς Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωνόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) στο Ηράκλειο της Κρήτης διαγνώστηκαν ορολογικά 98 περιπτώσεις πυρετού “Q” [16]. Η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (73,5%) ήταν άντρες, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις διαγνώστηκαν την περίοδο μεταξύ Ιανουαρίου και Ιουνίου. Το ένα τρίτο των ασθενών (35,4%) είχαν έρθει σε επαφή με ζώα ή/και μη-παστεριωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Το φάσμα των φυσικών δεξαμενών (reservoir) της *Coxiella burnetii* είναι πραγματικά πολύ εκτενές και συμπεριλαμβάνει άγρια και οικόσιτα θηλαστικά, πτηνά και αρθρόποδα [14, 17, 18]. Οι συνήθεις πηγές μόλυνσης του ανθρώπου με *Coxiella burnetii* είναι τα οικόσιτα μηρυκαστικά όπως βοοειδή, αίγες και πρόβατα [19]. Επιπλέον έχουν υπάρξει αναφορές όπου άλλα οικόσιτα ζώα όπως γάτες και σκύλοι αποτέλεσαν πηγή μόλυνσης με *C. burnetii* [20]. Η ασθένεια στα ζώα είναι κατά κανόνα ασυμπτωματική άλλα έχει συσχετιστεί με στειρότητα, αποβολές εμβρύων, θνησιγένεια και γενικότερα με τη γέννηση αδύναμων νεογνών [17, 21, 22]. Στα μολυσμένα ζώα, το βακτήριο εντοπίζεται στα ούρα, τα κόπρανα, το γάλα και ιδιαίτερος στα σωματικά υγρά που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια του τοκετού. Το τελευταίο αποτελεί και μια από τις πιο σημαντικές πηγές μόλυνσης του περιβάλλοντος με *C. burnetii*, αφού σε αυτά τα υγρά εντοπίζονται πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια τα οποία αποβάλλονται από τις διάφορες εκκρίσεις των μολυσμένων ζώων στο έδαφος είναι ιδιαίτερος ανθεκτικά στην αποξήρανση και παραμένουν ζωντανά στο περιβάλλον ακόμη και για χρόνια. Η μολυσματική αυτή σκόνη μπορεί στη συνέχεια να αποτελέσει πηγή μόλυνσης για ανθρώπους και ζώα. Το βακτήριο μεταδίδεται στον άνθρωπο μέσω του αέρα με μολυσματικά νέφη σταγονιδίων (aerosols) τα οποία προκύπτουν απευθείας

από τα υγρά του τοκετού μολυσμένων ζώων, τα οποία μπορούν επίσης να επιμολύνουν τα νεογνά, τον πλακούντα ή το μαλλί. Σπανιότερα, η μόλυνση στον άνθρωπο μπορεί να προκύψει δια μέσου του γαστρεντερικού σωλήνα ή του δέρματος [2, 23]. Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια, ωστόσο όμως έχει αναφερθεί [17, 24, 25].

Ο πυρετός Q στον άνθρωπο παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλομορφία κλινικών εκδηλώσεων και μπορεί να εκδηλωθεί σε δυο μορφές, την οξεία και τη χρόνια μορφή [26, 27]. Η παρουσίαση της ασθένειας είναι πράγματι ποικιλόμορφη και η αρχική μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε ασυμπτωματική ορομετατροπή, στην οξεία μορφή της νόσου (η οποία κυμαίνεται από μια ψευδογριπώδη συνδρομή μέχρι μια πολύ σοβαρή πνευμονία η οποία χρήζει εντατικής παρακολούθησης και θεραπείας), ή τέλος σε χρόνια μόλυνση (η οποία εκδηλώνεται κυρίως ως ενδοκαρδίτιδα ή ηπατίτιδα). Η παθοφυσιολογία της ασθένειας, καθώς και οι πιθανές κλινικές της εκδηλώσεις συνοψίζονται στην Εικόνα 1.1. Η οξεία λοίμωξη είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη, ενώ η χρόνια λοίμωξη με *Coxiella burnetii* μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρότατες επιπλοκές με κατάληξη τον θάνατο. Η πιο συνήθης επιπλοκή είναι η ενδοκαρδίτιδα, η οποία εμφανίζεται σε ποσοστό 78% αυτών των ασθενών.

Η *Coxiella burnetii* λόγω του τρόπου μετάδοσης της (αερογενής μετάδοση), της μεγάλης ανθεκτικότητας της σε πολλούς τρόπους απολύμανσης [28], του μεγάλου χρόνου ημιζωής της στο περιβάλλον, καθώς και της υψηλότερης μολυσματικότητας της (1 οργανισμός μπορεί να προκαλέσει μόλυνση) έχει καταταχθεί στην κατηγορία Β των πιθανών παραγόντων βιοτρομοκρατίας [2, 29, 30].



Αρχική μόλυνση με *Coxiella burnetii*

- Ασυμπτωματική 60%
- Οξεία, αυτοπεριοριζόμενη 38%
- Οξεία, απαιτήθηκε νοσηλεία 2%
- Οξεία νόσος κατά την εγκυμοσύνη <0,5%

Χρόνια μόλυνση με *Coxiella burnetii*

- Ενδοκαρδίτιδα 78%
- Αγγειοπάθεια 9%
- Χρόνια μόλυνση μετά τον τοκετό 5%
- Άλλες επιπλοκές 8%

Εικόνα 1.1 Παθοφυσιολογία και κλινικές εκδηλώσεις (κλινική εικόνα) του πυρετού "Q". Τροποποιημένο από Raoult D. *et al.* (2005)[2].

1.1.3 Διάγνωση και θεραπεία

Οι μέθοδοι για την διάγνωση της *Coxiella burnetii* στο εργαστήριο είναι περιορισμένες, κυρίως λόγω της φύσης του βακτηρίου. Το βακτήριο αυτό είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και έτσι η καλλιέργεια του σε θρεπτικό υλικό εξωκυττάρια είναι αδύνατη, και απαιτούνται κυτταροκαλλιέργειες ή γονιμοποιημένα αυγά όπου μολύνονται με αυτό. Η προσπάθεια απομόνωσης και καλλιέργειας της *C. burnetii* με καλλιέργεια από μολυσμένα δείγματα, θεωρείται ιδιαίτερος επικίνδυνος για το προσωπικό του εργαστηρίου και στις περισσότερες περιπτώσεις αποφεύγεται. Ακόμη πιο επικίνδυνος θεωρείται η μόλυνση εργαστηριακών ζώων και γονιμοποιημένων αυγών. Επιπλέον αυτές οι διεργασίες για να πραγματοποιηθούν προϋποθέτουν την ύπαρξη ενός εργαστηρίου επιπέδου βιο-ασφάλειας 3 (BSL-3). Η ανίχνευση του DNA της *Coxiella* καθώς και η ταυτοποίηση στελεχών αρχικά γινόταν με ραδιοσήμανση (radiolabeled DNA probing) σε κλινικά δείγματα και καλλιέργειες [31-34]. Σήμερα πλέον χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και κυρίως σε δείγματα ιστών (π.χ. καρδιακές βαλβίδες)[35-38]. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή και η ποσοτικοποίηση του βακτηρίου [39]. Ωστόσο, η διάγνωση με PCR δεν είναι πάντα αξιόπιστη, κυρίως σε δείγματα αίματος. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις όπου το δείγμα είναι αίμα ασθενούς, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα για ένα ψευδώς-θετικό αποτέλεσμα [3]. Η διάγνωση του πυρετού Q βασίζεται στον ορολογικό έλεγχο. Μια πληθώρα τέτοιων τεχνικών έχει αναπτυχθεί, με τις πιο κοινές να είναι: ο ανοσοφθορισμός (IFA)[40, 41], η ELISA [42-46], η δοκιμασία καθήλωσης του συμπληρώματος (complement fixation)[41, 47, 48], και η μικροσυγκόλληση (microagglutination)[49-51]. Ένα μειονέκτημα του ορολογικού ελέγχου, είναι ότι τα αντισώματα στην *C. burnetii* εμφανίζονται 2-3 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση, κι έτσι ο έλεγχος θα πρέπει να γίνεται σε ορούς τόσο κατά την οξεία φάση όσο και κατά την ανάρρωση. Η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση του πυρετού Q, είναι αυτή του IFA, η οποία και επιτρέπει την ανίχνευση αντισωμάτων μέσα στην τρίτη εβδομάδα μετά την αρχική μόλυνση στο 90% των περιπτώσεων [52, 53]. Μεταξύ των πλεονεκτημάτων αυτής της τεχνικής είναι: (α) η πολύ μικρή ποσότητα αντιγόνου που απαιτείται, (β) επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των αντισωμάτων της οξείας και της χρόνιας φάσης της νόσου, (γ) μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιγόνα τόσο από οργανισμούς της φάσης I όσο και της φάσης II (προερχόμενα από μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες και σπλήνες μολυσμένων

ποντικίων, αντίστοιχα), και (δ) μπορούν να καθοριστούν τα επίπεδα των υποομάδων αντισωμάτων (δηλ. IgG, IgM και IgA). Ο ορολογικός έλεγχος με IFA ωστόσο, γίνεται δύσκολο να ερμηνευτεί όταν λαμβάνονται τιμές ενδιάμεσες σε σχέση με τα cut-offs που έχουν οριστεί για την διάγνωση του πυρετού “Q”, και απαιτείται επανεξέταση. Ένα άλλο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η «υποκειμενικότητα» των αποτελεσμάτων σε ότι αφορά τον καθορισμό της αραίωσης (titer) από το εκάστοτε άτομο που πραγματοποιεί την εξέταση.

Στον οξύ πυρετό “Q”, όπου η ασθένεια είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη, η θεραπεία στοχεύει στο να προκαλέσει μια βακτηριοστατική δράση η οποία θα περιορίσει τη διάρκεια της νόσου και θα εμποδίσει την μετάπτωση στη χρονιότητα. Η φαρμακευτική αγωγή επιλογής είναι η τετρακυκλίνη, η οποία μειώνει τη διάρκεια του πυρετού “Q” κατά 50%, εφόσον χορηγηθεί μέσα σε τρεις μέρες από την έναρξη της νόσου [3, 54, 55]. Όσο αφορά τις κινολόνες, η χρήση της οφλοξασίνης, της πεφλοξασίνης και της ριφαμπίνης καθώς και οι μεταξύ τους συνδυασμοί μπορούν να έχουν θετικά αποτελέσματα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις [54]. Ένα σημαντικό στοιχείο σχετικά με τις κινολόνες είναι ότι διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, κι επομένως μπορούν να χορηγηθούν σε περιπτώσεις μηνιγγοεγκεφαλίτιδας του πυρετού “Q”.

Στο χρόνια πυρετό “Q”, όπου η νόσος είναι βαριά και συχνά θανατηφόρος, η *Coxiella burnetii* επιβιώνει μετά την αρχική μόλυνση, και παρά την χρόνια χορήγηση αντιβιοτικών υποτροπιάζει προκαλώντας σοβαρότατες επιπλοκές [3, 54]. Η ενδοκαρδίτιδα είναι η πιο σοβαρή επιπλοκή, με τα ποσοστά θνητότητας να ξεπερνούν το 65%. Η τετρακυκλίνη αποτελεί και πάλι την πρώτη γραμμή της φαρμακευτικής αντιμετώπισης της ενδοκαρδίτιδας του πυρετού “Q”, με τον συνδυασμό δοξυκυκλίνης-ριφαμπικίνης να παρουσιάζει ικανοποιητικά αποτελέσματα επίσης [3, 54, 55]. Η χλωραμφενικόλη, αν και είναι αποτελεσματική έχει το μειονέκτημα ότι η χρόνια χορήγηση της είναι απαγορευτική λόγω κόστους και τοξικότητας. Η χορήγηση φλουοροκινολονών (προφλοξασίνη, πεφλοξασίνη, οφλοξασίνη, σπαρφλοξασίνη) και σε συνδυασμό με ριφαμπικίνη, ελέγχει αρκετά αποτελεσματικά τον χρόνια πυρετό “Q” παρουσιάζοντας χαμηλότερα ποσοστά θνητότητας. Ωστόσο, το πρόβλημα με την χρόνια λοίμωξη είναι ότι έχουν απομονωθεί στελέχη *C. burnetii* από καρδιακές

βαλβίδες ασθενών που είχαν αφαιρεθεί χειρουργικά, μετά από 9-12 μήνες θεραπείας [54].

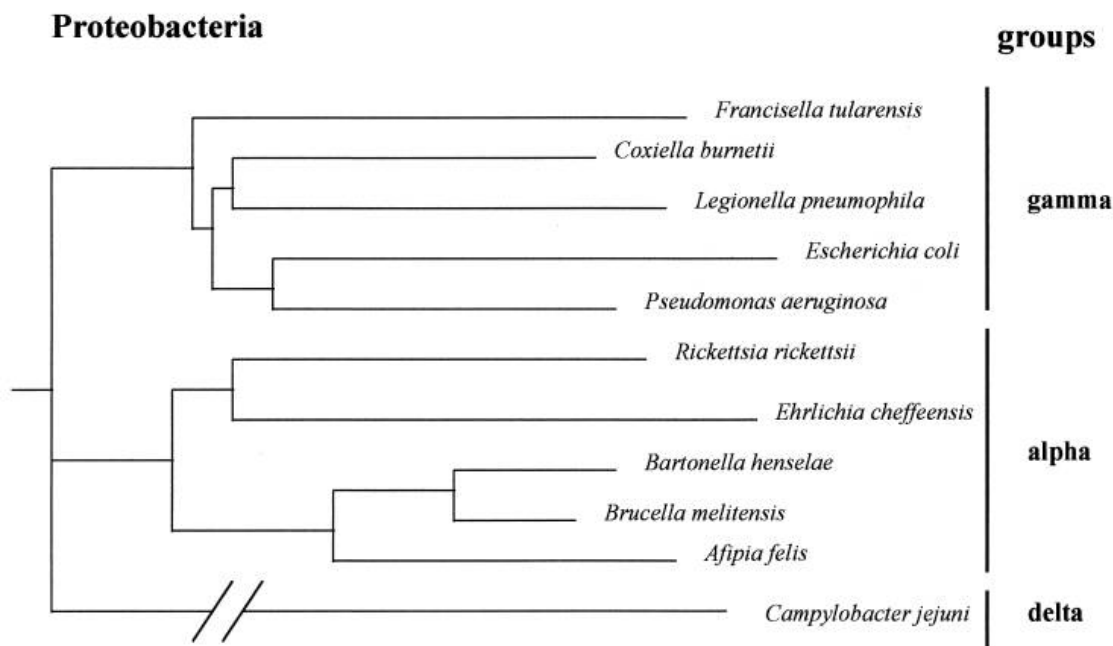
Όσο αφορά την προφύλαξη, έχουν αναπτυχθεί εμβόλια βασιζόμενα στα αντιγόνα τόσο της φάσης I όσο και της φάσης II [56-58]. Αν και ο εμβολιασμός ενδείκνυται για το προσωπικό των εργαστηρίων, τους εργάτες στα σφαγεία και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και γενικά για όλες τις ομάδες πληθυσμού που βρίσκονται σε κίνδυνο από την συχνή επαφή με ζώα ή τα προϊόντα τους, δεν υπάρχει ακόμη εμπορικά διαθέσιμο εμβόλιο.

1.2 *Coxiella burnetii*

1.2.1 Βακτηριολογία

Η *C. burnetii* είναι ένας υποχρεωτικά ενδοκυττάριος, και ιδιαίτερος πλειόμορφος μικρός κοκκοβάκιλος διαμέτρου 0,2-0,4 μm και μήκους 0,4-1 μm. Έχει καταταχθεί στο γένος *Coxiella* της γ υποκατηγορίας των Πρωτεοβακτηρίων, με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA και με τα γένη των *Legionella*, *Franciscella*, και *Rickettsiella* ως τα πιο συγγενή σε αυτό (Εικόνα 1.2)[3, 59]. Το κυτταρικό του τοίχωμα συγγενεύει περισσότερο με αυτό των Gram-αρνητικών βακτηρίων, δηλαδή αποτελείται από μια εξωτερική και μια εσωτερική μεμβράνη και ενδιάμεσα από τον περιπλασματικό χώρο. Ωστόσο, συνήθως δεν χρωματίζεται με την τεχνική Gram και η χρώση Gimenez είναι η κατεξοχήν χρώση που χρησιμοποιείται για αυτό το βακτήριο (Εικόνα 2.2)[60]. Ένα χαρακτηριστικό στοιχείο του λιποπολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος της *Coxiella burnetii*, είναι ότι παρουσιάζεται σε δυο παραλλαγές, κάτι το οποίο δημιουργεί δυο διαφορετικές «Φάσεις» του βακτηρίου [61-63]. Συγκεκριμένα, οι οργανισμοί της «Φάσης I» είναι αυτοί που βρίσκονται στη φύση σε μολυσμένα ζώα, αρθρόποδα και ανθρώπους, και είναι ιδιαίτερος μολυσματικοί. Αντιθέτως οι οργανισμοί της «Φάσης II» δεν είναι τόσο μολυσματικοί στη φύση, και ουσιαστικά προκύπτουν στο εργαστήριο μετά από διαδοχικά περάσματα σε κυτταροκαλλιέργειες ή σε καλλιέργειες γονιμοποιημένων αβγών. Οι διαφορές στον ΛΠΣ μεταξύ των δύο φάσεων έγκειται στο ότι, στη φάση I το κυτταρικό τοίχωμα περιέχει δυο μάλλον ασυνήθιστα σάκχαρα, τη virenose και τη

dihydroxyhydrdoxystreptose [64]. Τα δύο αυτά σάκχαρα φαίνεται να απουσιάζουν από τον ΛΠΣ των οργανισμών της φάσης II Περιέργως, τα αντιγόνα της Φάσης II είναι αυτά που εντοπίζονται πρώτα κατά τον οξύ πυρετό Q, ενώ υψηλά επίπεδα αντισωμάτων στη Φάση I εντοπίζονται στη χρόνια μορφή της νόσου [2].



Εικόνα 1.2 Φυλογενετικό δέντρο το οποίο δείχνει την σχέση της *Coxiella burnetii* με άλλα μέλη των πρωτεοβακτηρίων. Η συσχέτιση έγινε με βάση τις αλληλουχίες των γονιδίων που κωδικοποιούν για το 16S rRNA [από τους Maurin & Raoult (1999)[3]].

Το μέγεθος του γονιδιώματος της *C. burnetii* ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών στελεχών από 1,5 μέχρι 2,4 Mbp, ενώ το χρωμόσωμα είναι κυκλικό και προαιρετικά συνοδεύεται από ένα πλασμίδιο [2]. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί τέσσερις διαφορετικοί τύποι πλασμιδίων (της τάξης των 33, 36, 39 και 42 kbp) ενώ πολλά βακτήρια δε φέρουν καθόλου πλασμίδιο [65]. Η ολοκλήρωση του γονιδιώματος του στελέχους αναφοράς Nine Mile (RSA493) της *C. burnetii* φάσης I που έγινε το 2003 [4], άνοιξε το δρόμο για μια μεγάλη ποικιλία νέων ευκαιριών και δυνατοτήτων για να αποκτήσουμε νέες πληροφορίες σχετικά με τη πρωτεϊνική σύσταση του βακτηρίου καθώς και για την κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας τους οποίους χρησιμοποιεί.

Το γονιδίωμα της *C. burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης I αποτελείται από 1,995,275 ζεύγρια βάσεων και προβλέπεται να κωδικοποιεί 2,094 CDSs (coding sequences), από τις οποίες το ένα τρίτο είναι υποθετικές (Πίνακας 1.1). Με την ανάλυση του γονιδιώματος αποκαλύφθηκε ότι παραπάνω από το 60% του θεωρητικού πρωτεώματος είναι βασικό, με το μέσο όρο των ισοηλεκτρικών σημείων (pI) όλων των προβλεπόμενων πρωτεϊνών να βρίσκεται στο 8.25. Επιπλέον, σχεδόν το 45% των πρωτεϊνών της *C. burnetii* προβλέπεται να έχουν ισοηλεκτρικό σημείο πάνω από το 9. Το εν λόγω εύρημα δεν προκαλεί έκπληξη, καθώς έχει αναφερθεί και σε άλλα οξεόφιλα βακτήρια όπως το *Helicobacter pylori* [66]. Συγκεκριμένα, μια από τις υποθέσεις που έχουν γίνει είναι ότι το αλκαλικό πρωτέομα της *C. b.*, καθώς και άλλων οξιμόφιλων, θα μπορούσε να αποτελεί μια ασπίδα προστασίας έναντι στο ακραία όξινο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος [67]. Ωστόσο, το γονιδίωμα της *Coxiella burnetii* φαίνεται να είναι αρκετά δυναμικό και επίσης βρίσκεται στη διαδικασία της μείωσης του, όπως ομολογεί η ύπαρξη πολυάριθμων ενθεμάτων (insertion sequences), μεταθετών στοιχείων (mobile elements), ψευδογονιδίων και υποθετικών πρωτεϊνών [4].

Πίνακας 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος της *Coxiella burnetii*, Nine Mile, φάσης I. Τροποποιημένο από τους Seshadri *et al.* (2003)[4].

	Χρωμόσωμα
Μέγεθος, ζεύγη βάσεων (bp)	1.995.275
Σύσταση G + C, %	42,6
Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες:	
Παρόμοιες με γνωστές πρωτεΐνες	1.022
Παρόμοιες με πρωτεΐνες αγνώστου λειτουργίας	179
Συντηρημένες υποθετικές (conserved hypotheticals)	200
Υποθετικές	693
Σύνολο	2.094
Μέσο μέγεθος ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (ORF), bp	849
Γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, %	89,1
Σταθερά RNAs:	
rRNA	3
tRNA	42

1.2.2 Το ενκαρνωτικό φαγόσωμα και στρατηγικές ενδοκυττάριου παρασιτισμού

Τα λεγόμενα «επαγγελματικά μακροφαγικά» κύτταρα (δηλ. μακροφάγα και ουδετερόφιλα), είναι κύτταρα εξειδικευμένα στο να εντοπίζουν και στη συνέχεια να εξολοθρεύουν παθογόνα τα οποία προσπαθούν να εισβάλουν στον οργανισμό. Η διαδικασία της εξολόθρευσης ξεκινάει από την φαγοκυττάρωση τους και την ακόλουθη εγκόλπωση τους σε ένα κυστίδιο το οποίο προέρχεται από την κυτταρική μεμβράνη, και λέγεται φαγόσωμα. Το φαγόσωμα ακολουθεί στη συνέχεια μια πορεία ωρίμανσης, η οποία και το καθιστά τελικά βακτηριοκτόνο [68, 69]. Συγκεκριμένα, γίνεται σύμπτυξη του φαγοσώματος με διάφορα άλλα ενδομεμβρανικά τμήματα του κυττάρου (π.χ. λυσοσώματα, αυτοφαγοσώματα), τα οποία και του προσδίδουν βακτηριοκτόνες και γενικότερα αποδιατακτικές ιδιότητες (π.χ. χαμηλό pH, υδρολυτικά ένζυμα). Το αξιοσημείωτο είναι ότι, πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί εκμεταλλεύονται αυτόν τον μηχανισμό έτσι ώστε να εισβάλλουν στο κύτταρο ξενιστή και μετά από την τροποποίηση του φυσιολογικού μονοπατιού της φαγοσωμικής ωρίμανσης να εγκαταστήσουν τον ενδοκυττάριο παρασιτισμό τους [68, 70-73]. Σε πολλές περιπτώσεις τα ενδοκυττάρια παθογόνα έχουν την ικανότητα να επάγουν την φαγοκυττάρωση τους σε μη-επαγγελματικά μακροφαγικά κύτταρα. Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα του ενδοκυττάριου παρασιτισμού είναι ότι, το παθογόνο με αυτό τον τρόπο αποφεύγει τον εντοπισμό του από τους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Ο σημαντικότερος λόγος όμως για τον οποίο ένα παράσιτο αναπτύσσεται ενδοκυττάρια, είναι η έλλειψη απαραίτητων για την ανάπτυξη του παραγόντων, τους οποίους και βρίσκει στο κύτταρο ξενιστή. Αυτό γίνεται πιο εμφανές στις περιπτώσεις των υποχρεωτικά ενδοκυττάριων παθογόνων, όπως είναι η *Coxiella*. Γενικά, οι στρατηγικές επιβίωσης των ενδοκυττάριων παθογόνων βακτηρίων μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες [68]:

1. Μια στρατηγική είναι αυτή της διακοπής της φυσιολογικής ωρίμανσης του παρασιτοφόρου φαγοσώματος είτε σε πρώιμο στάδιο -όπως γίνεται στην περίπτωση του *Mycobacterium-*, είτε σε πιο προχωρημένο στάδιο -όπως συμβαίνει στην περίπτωση της *Salmonella*.
2. Σε μια άλλη στρατηγική τα ενδοκυττάρια παράσιτα «δραπετεύουν» από το φαγόσωμα, με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτά των βακτηρίων *Shigella*, *Rickettsia*, και *Listeria*.

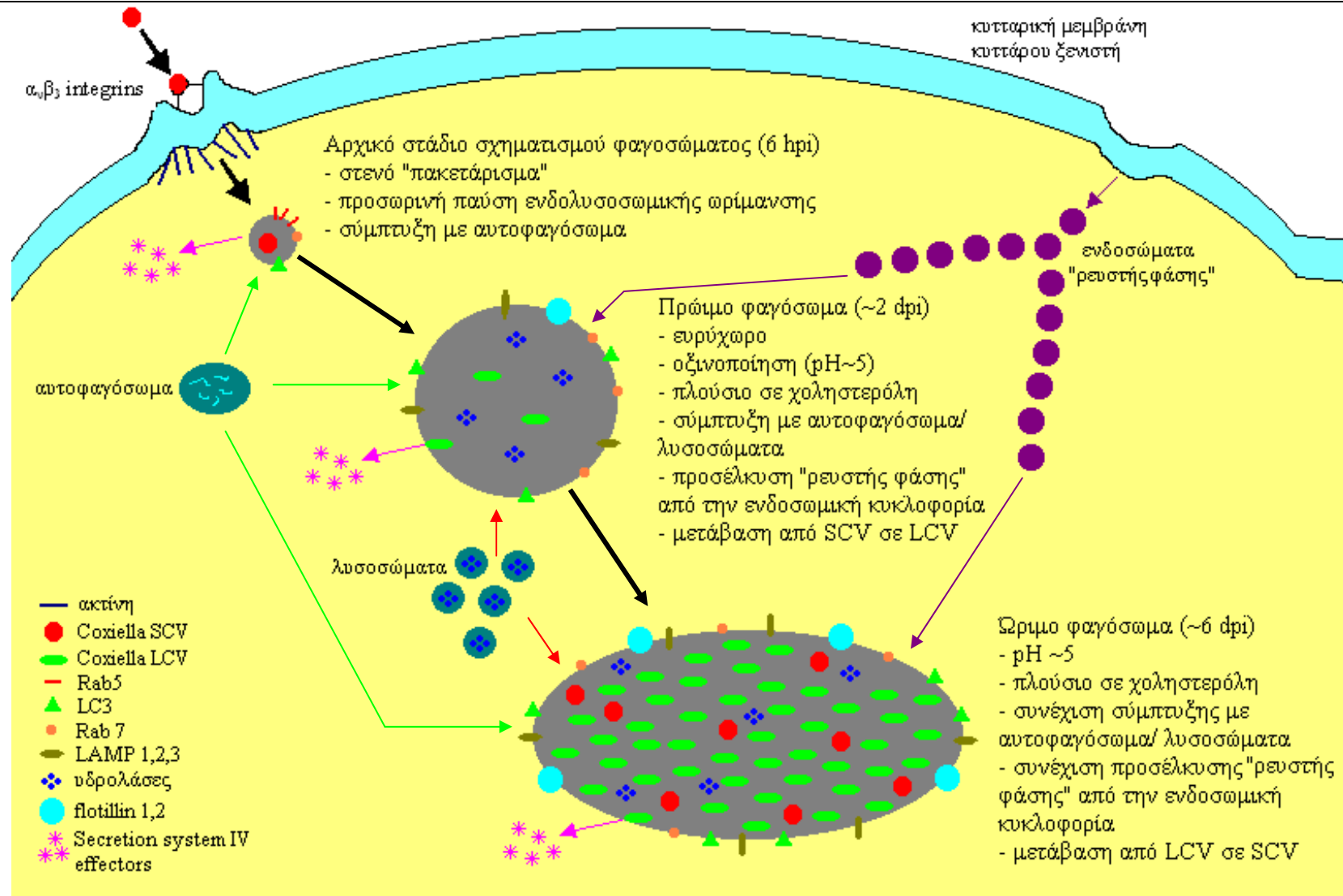
3. Τέλος, αρκετά ενδοκυττάρια παράσιτα έχουν αναπτύξει πιο σύνθετες στρατηγικές επιβίωσης, οι οποίες περιλαμβάνουν την τροποποίηση και εκμετάλλευση της διακίνησης των διαφόρων μεμβρανών του ξενιστή για τη δημιουργία ενός οργανιδίου (φαγοσωμικού ή μη) μέσα στο οποίο επιβιώνουν και αναπτύσσονται. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν αυτά των βακτηρίων *Legionella* –τα οποία δημιουργούν ένα οργανίδιο με πολλά χαρακτηριστικά και στοιχεία από το ενδοπλασματικό δίκτυο-, και *Chlamydia* –όπου δημιουργείται ένα μοναδικό σε χαρακτηριστικά κενοτόπιο-. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσεται και η *Coxiella*, της οποίας η στρατηγική επιβίωσης αναπτύσσεται εκτενώς παρακάτω.

1.2.3 Ο ενδοκυττάριος κύκλος ζωής της *Coxiella burnetii*

Η *Coxiella burnetii* είναι ένα οξεόφιλο βακτήριο, το οποίο είναι ιδιαίτερος επιτυχημένα προσαρμοσμένο για να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται μέσα στο ευκαρυωτικό φαγολυσόσωμα (Εικόνα 1.4)[74, 75]. Ουσιαστικά, είναι το μόνο γνωστό ενδοκυττάριο βακτήριο το οποίο επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται μέσα σε ένα πλήρως σχηματισμένο φαγολυσόσωμα, δηλαδή μέσα σε ένα πολύ όξινο (pH 4,7 – 5,2) μικροπεριβάλλον, το οποίο περιέχει υδρολυτικά και άλλα αποδιατακτικά ένζυμα [74, 76, 77]. Το μοναδικό ενδοκυττάριο παθογόνο που έχει αναπτύξει μια παρόμοια στρατηγική παρασιτισμού, είναι η αμαστιγωτή μορφή του πρωτόζωου *Leishmania* [78]. Επιπλέον ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σχεδόν τα 2/3 των γονιδίων της *Coxiella* ουσιαστικά απαιτούν ένα όξινο περιβάλλον για να εκφραστούν [4]. Τα κύτταρα «στόχοι» μπορούν να είναι πολλών ειδών, και συμπεριλαμβάνουν ινοβλάστες, επιθηλιακά και μακροφαγικά κύτταρα [79].

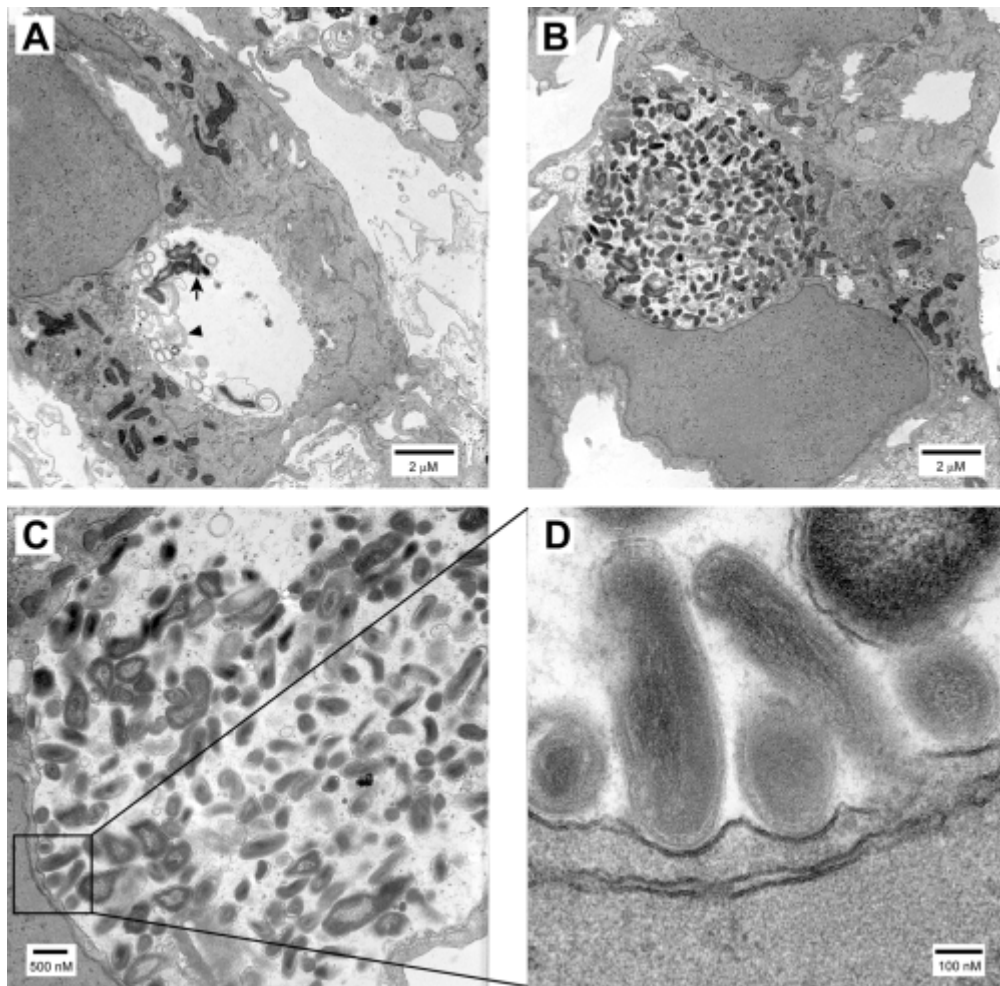
Το βακτήριο ακολουθεί ένα ιδιότυπο και σύνθετο ενδοκυττάριο κύκλο ζωής, ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό μορφών που μοιάζουν με σπόρια, τουλάχιστον όσο αφορά την ανθεκτικότητα τους και την περιορισμένη μεταβολική τους ενεργότητα [80]. Οι Voth και Heinzen (2007)[1] έχουν προτείνει το πιο πρόσφατο μοντέλο για τον ενδοκυττάριο κύκλο ζωής της *C. burnetii*, το οποίο και συνοψίζεται στην Εικόνα 1.3. Συγκεκριμένα, τα ενδοκυττάρια αναπτυξιακά στάδια της *C. burnetii* περιλαμβάνουν τα μεταβολικά ανενεργά “small-cell variants” (SCVs), τα οποία και

αντιστοιχούν στην εξωκυττάρια μορφή του βακτηρίου, και τα “large-cell variants” (LCVs), τα οποία αντιστοιχούν στη μεταβολικά ενεργή ενδοκυττάρια μορφή της *C. burnetii* [79, 81-83]. Τα SCVs προσδένονται στην επιφάνεια του κύτταρου στόχου, μέσω αγνώστου υποδοχέα, προκαλώντας την αναδιοργάνωση της ακτίνης εσωτερικά του κυττάρου, με αποτέλεσμα την εγκόλπωση τους σε φαγοσώματα [84, 85]. Η ωρίμανση του φαγοσώματος σε αυτή τη φάση διακόπτεται για περίπου 2 hpi, προκειμένου να αποκτήσει τους απαραίτητους «δείκτες» (markers) κυρίως από τα πρώιμα ενδοσώματα (Rab5), αλλά και από ώριμα ενδοσώματα (Rab7) και αυτοφαγοσώματα (LC3). Η προσέλκυση αυτών των δεικτών, είναι απαραίτητη για την περαιτέρω προσέλκυση λυσοσωμικών δεικτών και άρα για την οξινοποίηση του φαγοσώματος, και εξαρτάται από την σύνθεση πρωτεϊνών της *Coxiella*. Συγκεκριμένα για την αυτοφαγία, το βακτήριο επάγει αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των μολυσμένων κυττάρων, του μεγέθους του φαγολυσοσώματος, καθώς και συνολικά του πολλαπλασιασμό του [86]. Το πρώιμο φαγόσωμα, το οποίο σχηματίζεται περίπου 2 dpi, χάνει τον δείκτη Rab5, διατηρεί τους δείκτες Rab7 και LC3, και αποκτά επιπλέον τους λυσοσωμικούς δείκτες LAMP-1, -2 και -3 λόγω της σύμπτυξης του με λυσοσώματα. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός μεγάλου όξινου (pH~5) φαγοσώματος, με πλούσια σε χοληστερόλη μεμβράνη, το οποίο περιέχει υδρολάσες και μικρό αριθμό βακτηρίων. Η αλληλεπίδραση με την «ρευστή φάση» της ενδοσωμικής κυκλοφορίας, είναι συνεχής, όπως μαρτυρά η ύπαρξη των αντίστοιχων δεικτών. Σε αυτό το στάδιο ωρίμανσης γίνεται και η μετάβαση από τη μία μορφή του βακτηρίου (SCV) στην άλλη (LCV). Στο τελευταίο στάδιο ωρίμανσης διατηρούνται τα περισσότερα χαρακτηριστικά του πρώιμου φαγοσώματος, αλλά υπάρχουν και σημαντικές διαφορές. Το ώριμο πλέον φαγολυσόσωμα, είναι πολύ μεγάλο σε μέγεθος, μέσα στο οποίο συνωστίζεται ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων. Η μορφολογική μετάβαση των βακτηρίων εδώ είναι αντίστροφη, δηλαδή τα LCVs μετατρέπονται σε SCVs. Καθόλη τη διάρκεια της ωρίμανσης του φαγοσώματος φαίνεται να είναι απαραίτητη η έκφραση των πρωτεϊνών της *C. burnetii* τόσο για τη διατήρηση του μεγάλου μεγέθους του φαγοσώματος, όσο και της δομής του γενικότερα.



Εικόνα 1.3 Πιθανό μοντέλο για τη βιογένεση του φαγολυσοσώματος της *Coxiella burnetii*. Τροποποιημένο από την αυθεντική αναφορά των Voth και Heinzen (2007)[1].

Καθοριστικό ρόλο στην όλη αναδιοργάνωση των κυτταρικών συστημάτων του ξενιστή από την *C. burnetii* προς όφελος της, πιστεύεται ότι διαδραματίζουν τα εκκριτικά συστήματα που διαθέτει ο οργανισμός και ιδιαιτέρως το Σύστημα Έκκρισης Τύπου 4 (SST4). Εικάζεται, ότι η απαίτηση για συνεχή έκφραση πρωτεϊνών της *C. burnetii* σε όλα τα στάδια ωρίμανσης του φαγολυσοσώματος, ουσιαστικά αντικατοπτρίζει την αναγκαιότητα για την έκφραση και έκκριση πρωτεϊνών effector του SST4 [1]. Γενικά, τα συστήματα έκκρισης των βακτηρίων λειτουργούν ως διαβιβαστές γενετικού υλικού από το ένα βακτήριο στο άλλο. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις παθογόνων βακτηρίων και ιδίως για το SST4, έχουν εξελιχθεί σε συστήματα έκκρισης ιογενών παραγόντων [87, 88]. Το πιο συγγενές στην *Coxiella* βακτήριο, η *Legionella pneumophila*, φέρει ένα τέτοιο σύστημα (Dot/Icm system) το οποίο και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών [89, 90]. Ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι και η *Coxiella* εκφράζει πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν παρόμοια με πρωτεΐνες του Dot/Icm συστήματος της *Legionella* [91]. Εικάζεται ότι η *C. burnetii* μέσα στο φαγολυσόσωμα βρίσκεται σε πολύ στενό συσχετισμό με την μεμβράνη του φαγολυσοσώματος, προκειμένου να μπορεί να εκκρίνει τους effectors από το SST4 στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή διαμέσου της φαγολυσοσωμικής μεμβράνης (Εικόνα 1.4C και D)[1]. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί καμία πρωτεΐνη της *C. burnetii* ως υπόστρωμα του SST4. Επιπλέον, ο ρυθμός με τον οποίο ανακαλύπτονται γενικότερα οι ιογενείς/μολυσματικοί παράγοντες του βακτηρίου είναι αρκετά αργός, κυρίως επειδή δεν υπάρχει διαθέσιμη μεθοδολογία για τη δημιουργία συγκεκριμένων κατευθυνόμενων μεταλλάξεων.



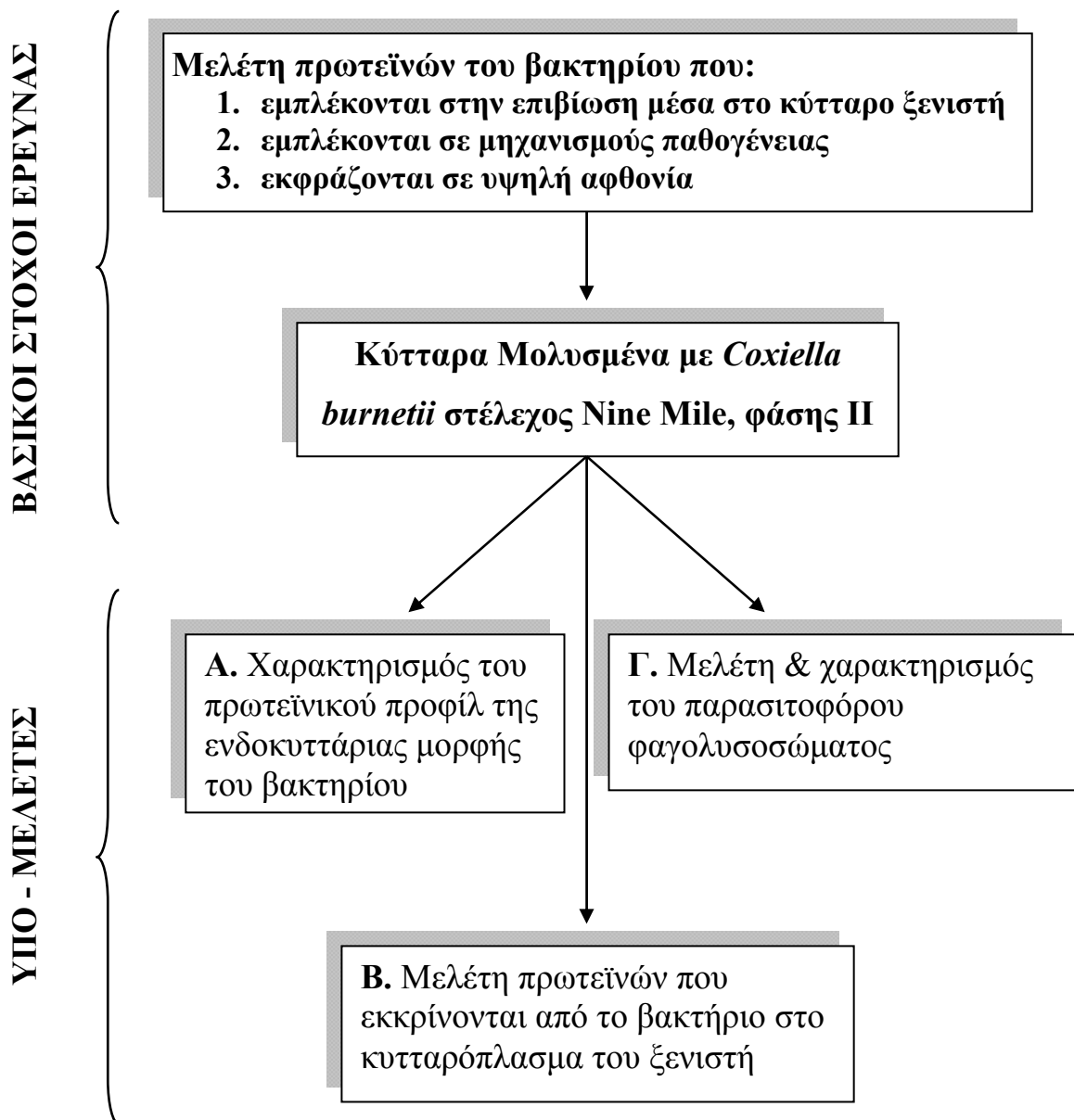
Εικόνα 1.4 Κύτταρα VERO μολυσμένα με *Coxiella burnetii*. Κατά το αρχικό στάδιο της μόλυνσης το φαγόσωμα είναι μικρό και περιέχει και μικρό αριθμό βακτηρίων (A, 2 dpi). B & C: 6 dpi το φαγολυσόσωμα πλέον καταλαμβάνει ένα πολύ μεγάλο μέρος του κυττάρου ξενιστή, και περιέχει μεγάλο αριθμό βακτηρίων. Πρόκειται για την στατική φάση της ανάπτυξης του. C & D: Εδώ φαίνεται ο στενός συσχετισμός του κάθε βακτηρίου με την μεμβράνη του φαγολυσοσώματος, ο οποίος εικάζεται ότι παίζει ρόλο στην έκκριση μορίων effector από το SST4 του βακτηρίου προς το κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Transmission electron micrographs [1]).

1.3 Σκοπός της διατριβής

Λαμβάνοντας υπό όψη όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως σε σχέση με τις ιδιαιτερότητες που παρουσιάζει η *Coxiella burnetii* τόσο στον κύκλο ζωής της, όσο και στην ικανότητα της να προκαλεί παθογένεια, εύλογα γίνονται τα ακόλουθα ερωτήματα:

- i. Πώς επιβιώνει η *Coxiella burnetii* μέσα στο κύτταρο ξενιστή και δη, στο ιδιαίτερα αφιλόξενο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος; Συγκεκριμένα, ποιες πρωτεΐνες εκφράζει το βακτήριο για να προστατευθεί από τις αποδιατακτικές συνθήκες του ευκαρυωτικού φαγολυσοσώματος;
- ii. Ποιοι είναι οι μηχανισμοί παθογένειας τους οποίους έχει αναπτύξει το βακτήριο, και ποιες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία;
- iii. Ποιες είναι οι χαρακτηριστικές, υψηλής αφθονίας (high-abundant) πρωτεΐνες που εκφράζει η *Coxiella burnetii* και που ενδεχομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν νέους, βελτιωμένους διαγνωστικούς ή θεραπευτικούς στόχους;

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων τα οποία, προσεγγίστηκαν με τον σχεδιασμό και την υλοποίηση τριών «υπό-μελετών» (Εικόνα 1.5). Καταρχήν, έπρεπε να αποκτηθεί μια σφαιρική εικόνα του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράζονται από την ενδοκυττάρια μορφή του βακτηρίου μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Κατά συνέπεια, η πρώτη υπό-μελέτη αφορούσε στο πρωτόμα της ενδοκυττάριας *Coxiella burnetii*. Το δεύτερο σκέλος αφορούσε στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών που εκφράζονται και πιθανότητα εκκρίνονται από το βακτήριο στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, με σκοπό την τροποποίηση και εκμετάλλευση των διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών του προς όφελος του βακτηρίου. Και τέλος, με την τρίτη υπό-μελέτη μελετήθηκαν τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα αυτά καθαυτά.



Εικόνα 1.5 Σχεδιασμός πειραμάτων για την απάντηση των ερωτήσεων που τέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Καταρτίστηκαν τρεις υπο-μελέτες, οι οποίες αναλύονται διεξοδικά παρακάτω (Κεφάλαιο 3).

1.4 Γιατί η πρωτεομική προσέγγιση;

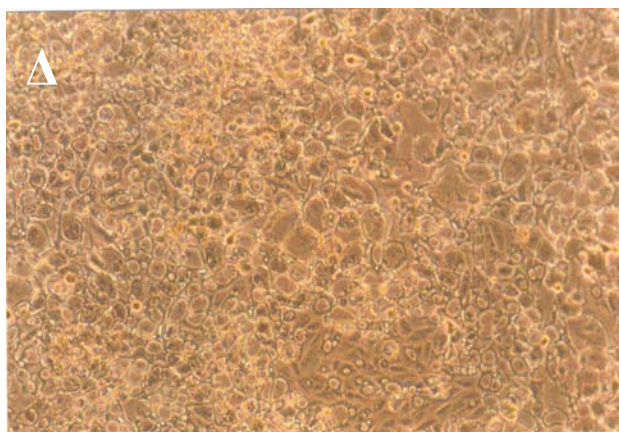
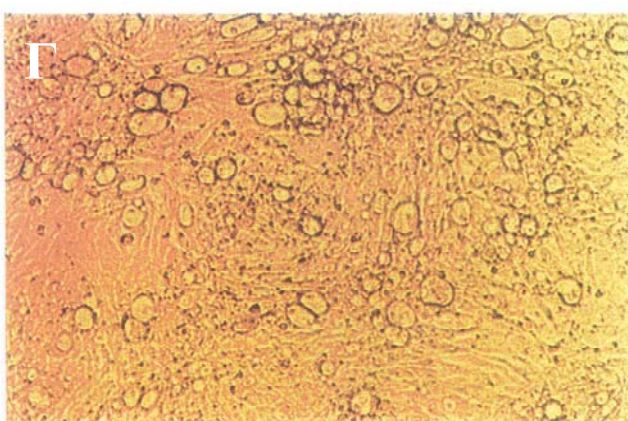
Καταρχήν με την ολοκλήρωση του γονιδιώματος ενός οργανισμού ανοίγει ο δρόμος για πρωτεομικές, και άλλες *-omics* προσεγγίσεις, καθότι η ολοκλήρωση του γονιδιώματος παρέχει την απαραίτητη βάση δεδομένων για αυτές τις προσεγγίσεις. Το γονιδίωμα της *Coxiella* ολοκληρώθηκε το 2003 [4], και συνεπώς μια πρωτεομική μελέτη ήταν εύλογα το επόμενο βήμα. Η ολοκλήρωση ενός γονιδιώματος παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις συνολικές δυνατότητες (capacity) σε επίπεδο γονιδίων, και την πιθανή εξελικτική πορεία του οργανισμού. Από την ανάλυση ενός γονιδιώματος προκύπτει ένας θεωρητικός αριθμός πρωτεϊνών που μπορούν να εκφραστούν. Αυτός ο αριθμός απέχει κατά πολύ από τον πρακτικό αριθμό των πρωτεϊνών που εκφράζονται όντως από τον οργανισμό σε μια οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Η απόκλιση αυτή οφείλεται σε πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι: η ύπαρξη ψευδογονιδίων, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των προϊόντων των γονιδίων, και οι συνθήκες στις οποίες βρίσκεται ο οργανισμός σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες είναι τα βασικά βιολογικά μακρομόρια τα οποία επιτελούν τις διάφορες λειτουργίες των κυττάρων. Έτσι όταν κάποιος θέτει ένα βιολογικό ερώτημα, αργά ή γρήγορα, καταλήγει να μελετά κάποια πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα στην *Coxiella burnetii*, η σημαντικότητα της μελέτης του πρωτεώματος της ενισχύεται από τρία δεδομένα τα οποία προέκυψαν με την ολοκλήρωση του γονιδιώματος της: (α) περιέχει μεγάλο αριθμό ψευδογονιδίων, (β) περιέχει μεγάλο αριθμό υποθετικών πρωτεϊνών, (γ) το γονιδίωμα της φαίνεται να είναι πολύ δυναμικό (genome plasticity), και (δ) πιστεύεται ότι το γονιδίωμα της βρίσκεται ακόμη σε μείωση (genome reduction [92]). Τέλος, λόγω της αντιγονικής φύσης των πρωτεϊνών, με την καταγραφή του πρωτεώματος της *Coxiella* ανοίγει ο δρόμος για την εφαρμογή ανοσο-ανιχνευτικών μεθόδων με ευεργετικά αποτελέσματα, όπως συζητείται αργότερα στα Κεφάλαια της Συζήτησης και των Συμπερασμάτων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii*

Το στέλεχος αναφοράς *Coxiella burnetii*, Nine Mile, φάσης II, το οποίο και χρησιμοποιήθηκε σε όλη την παρούσα μελέτη, ανήκει στη βακτηριακή συλλογή του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Για την καλλιέργεια των στελεχών χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές VERO [Νεφρικοί ινοβλάστες από τον πράσινο αφρικανικό πίθηκο (African green monkey kidney fibroblasts; CCL-81; ATCC)], οι οποίες καλλιεργήθηκαν σε μεγάλες φλάσκες (180cm², Nunclon ή 225cm², Corning) με 50ml Minimum Essential Medium Eagle (MEM; Gibco Laboratories), συμπληρωμένο με 10% ορού από έμβρυο βοδινό [fetal bovine serum (FBS; Gibco Laboratories) και 1% L-glutamine (Gibco Laboratories), στους 37⁰C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Ενιαίοι κυτταρικοί τάπητες VERO ενοφθαλμίστηκαν με *Coxiella burnetii*, Nine Mile, φάσης II σε 10ml MEM (4% FBS, 1% L-glutamine), και επώαστηκαν για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Συμπληρώθηκε το θρεπτικό υλικό μέχρι τα 50ml και οι μολυσμένες πλέον καλλιέργειες επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37⁰C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Μετά τις πρώτες 24 ώρες οι καλλιέργειες μεταφέρθηκαν στους 35⁰C απουσία CO₂, όπου παρέμειναν μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο μόλυνσης (90-95%). Η πορεία της μόλυνσης παρακολουθείται με οπτικό μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης όσο αφορά το ποσοστό μολυσμένων κυττάρων (Εικόνα 2.1A & B) κατευθείαν από τις φλάσκες, και με χρώση Gimenez όσο αφορά το βακτηριακό φορτίο (Εικόνα 2.2). 90-95% μόλυνση συνήθως επιτυγχάνεται 10-12 μέρες μετά την αρχική μόλυνση. Stock μολυσμένων και μη, κυττάρων VERO φυλάσσονταν σε 20% MEM, 72% FBS, 8% DMSO στους -80⁰C και -196⁰C (υγρό άζωτο). Επανακαλλιέργεια των παγωμένων φυλάξεων γίνεται σε MEM (15% FBS, 1% L-glutamine), αφού πρώτα απομακρυνθεί το τοξικό για τα κύτταρα DMSO. Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας, απομόνωσης και χειρισμού ζωντανών βακτηρίων *Coxiella burnetii* μέχρι και την απενεργοποίηση της, επιβάλλεται να γίνονται σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής τύπου 2 (Class-2 hood, Εικόνα 2.1B), μέσα σε εργαστήριο αρνητικής πίεσης επιπέδου βιο-ασφάλειας 3 (Bio-Safety Level 3;

BSL-3, Εικόνα 2.1Α), λαμβάνοντας όλα τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας όπως ορίζονται από τα διεθνή standards και SOP's.



Εικόνα 2.1 Καλλιέργεια της *Coxiella burnetii*. **Α:** Το εργαστήριο βιο-ασφάλειας επιπέδου 3 (BSL-3) στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης. **Β:** Εργασία σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής τύπου 2 μέσα σε εργαστήριο BSL-3. **Γ.** Ινοβλάστες τύπου VERO μολυσμένοι σε μικρό ποσοστό με *Coxiella burnetii*. Τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν την χαρακτηριστική επιμήκη ινοβλαστική μορφή, ενώ τα μολυσμένα στρογγυλά και «πρησμένα» (ανάστροφο μικροσκόπιο, x400). **Δ.** Κύτταρα VERO μολυσμένα κατά τουλάχιστον 90% με *Coxiella burnetii*. Τα περισσότερα κύτταρα είναι πλέον στρογγυλά (ανάστροφο μικροσκόπιο, x400).

2.2 Χρώση Gimenez

Με αυτή την μέθοδο, όπως περιγράφεται τον Gimenez D.F. το 1964 [60], στελέχη της οικογένειας των *Rickettsiales* και η *Coxiella* χρωματίζονται με βασική φουξίνη [1% (w/v) φουξίνη, 1,125% (w/v) φαινόλη, 10% (v/v) αιθανόλη σε d.d.H₂O, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για ένα χρόνο], ενώ το κύτταρο ξενιστής χρωματίζεται με πράσινο του μαλαχίτη [0,8% (w/v) οξαλικού μαλαχίτη σε d.d.H₂O, φυλάσσεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για τέσσερεις μήνες](Εικόνα 2.2). Το δείγμα μονιμοποιείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τρία σύντομα περάσματα από φλόγα, αφού προηγουμένως το έχουμε αφήσει να στεγνώσει. Το διάλυμα φουξίνης αναμιγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα (0,2M NaH₂PO₄, 0,2M NaHPO₄) σε αναλογία 2:5, και στη συνέχεια φιλτράρεται. Η επιφάνεια της πλάκας που φέρει το δείγμα καλύπτεται με το διάλυμα της βασικής φουξίνης και αφήνεται για τρία λεπτά με ήπια ανάδευση. Η πλάκα ξεπλένεται με νερό βρύσης και καλύπτεται για εννιά δευτερόλεπτα με το διάλυμα του πράσινου του μαλαχίτη. Η πλάκα ξεπλένεται με νερό βρύσης και επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα. Αφού η πλάκα ξεπλυθεί και στεγνώσει είναι έτοιμη για παρατήρηση.

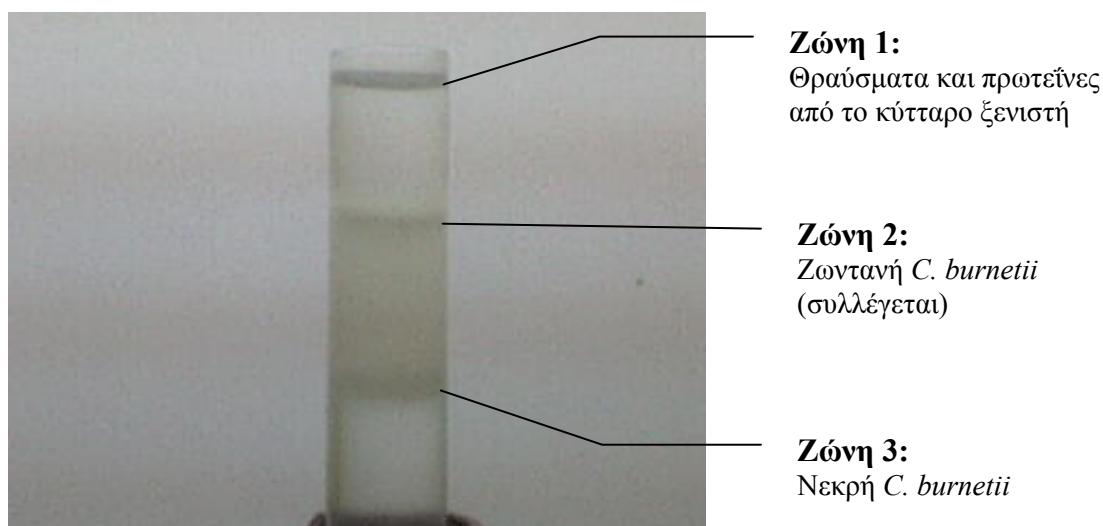


Εικόνα 2.2 Χρώση Gimenez σε κύτταρα VERO μολυσμένα με *Coxiella burnetii*. Τα βακτήρια χρωματίζονται φούξια (μαύρο βέλος), σε ένα μπλε κυτταρικό φόντο (άσπρο βέλος). Το πολύ μεγάλο φαγολυσόσωμα που καταλαμβάνει περίπου τα 2/3 όλου του κυττάρου ξενιστή, φέρει και πολύ μεγάλο βακτηριακό φορτίο (οπτικό μικροσκόπιο, x1000).

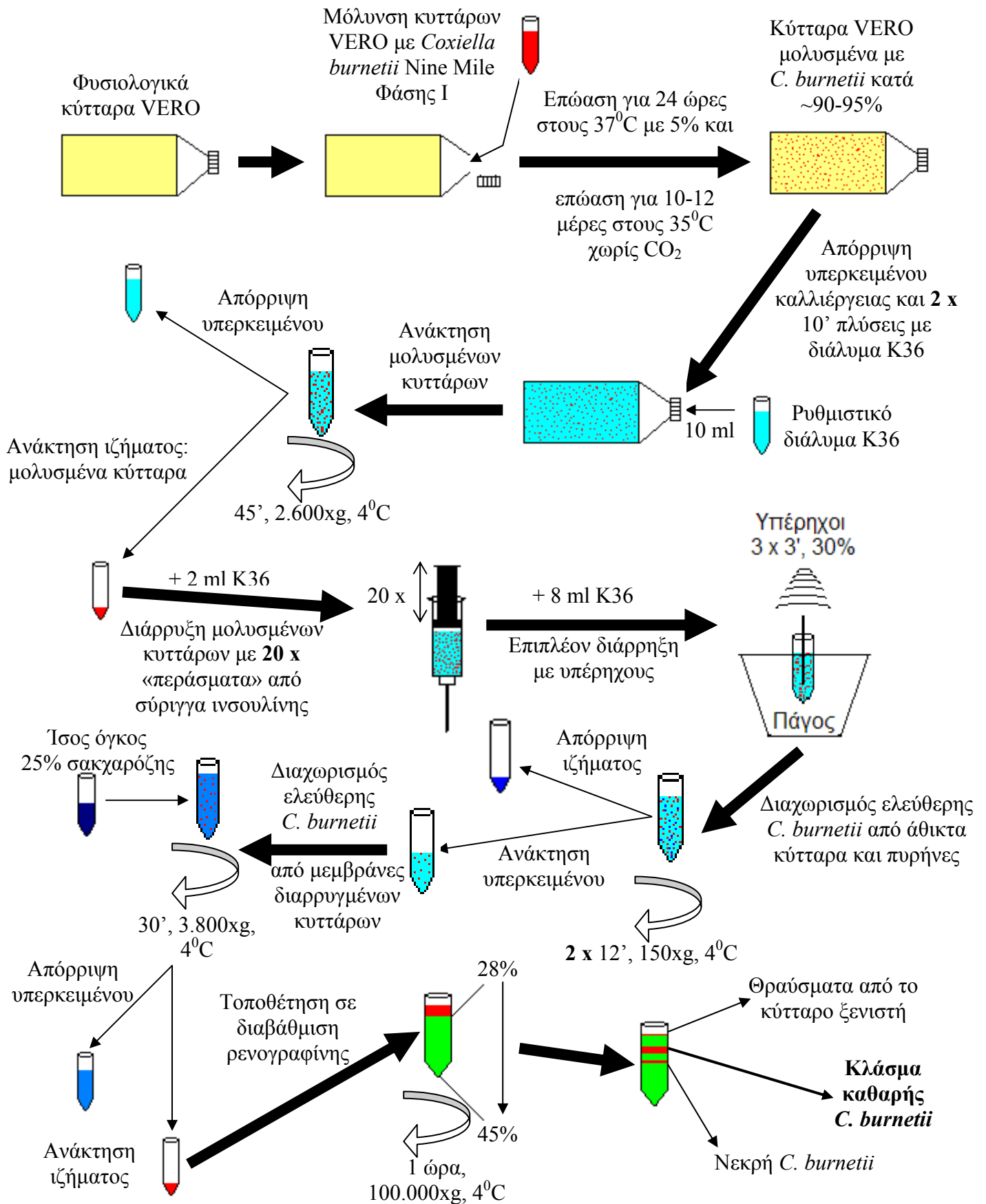
2.3 Πρωτόκολλο απομόνωσης *Coxiella burnetii* με την μέθοδο της ρενογραφίνης

Σκοπός αυτού του πρωτοκόλλου είναι ταυτόχρονα η απομόνωση ενδοκυττάριας *Coxiella burnetii* καθώς και ο καθαρισμός του βακτηρίου από στοιχεία του κυττάρου ξενιστή, όσο αυτό είναι εφικτό. Ο κύριος λόγος για τον οποίο εφαρμόζεται η διαβάθμιση ρενογραφίνης και όχι κάποιου άλλου τύπου διαβάθμιση πιο κοινή είναι ότι ο λιποπολυσακχαρίτης της *Coxiella burnetii* και κυρίως της φάσης II είναι ιδιαίτερα υδρόφοβος και έτσι τα βακτήρια τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα μέσα σε σακχαρόζη ή σε χλωριούχο κέσιο. Το πρωτόκολλο αναπτύχθηκε από τους Williams *et al.* (1981)[93] και στην Εικόνα 2.4 περιγράφεται όπως εφαρμόστηκε εδώ με τροποποιήσεις. Το σκεύασμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το Ultravist 370 (Shering), το οποίο χρησιμοποιείται ως σκιαγραφικό, περιέχει 0.769gr Iopromide/ ml και άρα έχει συγκέντρωση 77% (w/v). Η διαβάθμιση η οποία δημιουργήθηκε ήταν συνεχής από 45% (στον πυθμένα του σωλήνα) μέχρι 28% (στην κορυφή της διαβάθμισης), και σε συνολικό όγκο 11ml. Όλες οι αραιώσεις του σκευάσματος έγιναν σε Phosphate Buffered Saline (PBS) pH7,2. Για κάθε διαβάθμιση ρενογραφίνης απαιτούνται 8 μεγάλες φλάσκες VERO μολυσμένες. Το αρχικό υλικό (φλάσκες με κυτταροκαλλιέργειες μολυσμένες > 90% με *Coxiella burnetii* ή μολυσμένα κύτταρα από φύλαξη) ανακτήθηκε με την χρήση γυάλινων σφαιριδίων σε ρυθμιστικό διάλυμα K36 (16.5mM KH₂PO₄, 33.5mM K₂HPO₄, 100mM KCl, 15.5mM NaCl), αφού πρώτα ο κυτταρικός τάπητας είχε πλυθεί με K36 (2 x 10min). Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος K36 έχει σκοπό να προστατέψει τα βακτήρια από οσμωτική διάρρηξη. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 2600 x g για 45min στους 4⁰C, από την οποία ανακτήθηκε το ίζημα το οποίο και περιείχε κύτταρα μολυσμένα με το βακτήριο. Το ίζημα αυτό επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 2ml K36, και ακολούθησε η διάρρηξη των κυττάρων με συνεχείς εισαγωγές – εξαγωγές (τουλάχιστον 20 φορές) μέσα από βελόνα σύριγγας ινσουλίνης. Προστέθηκαν 8ml K36 και έγινε περαιτέρω διάσπαση των κυττάρων, καθώς και των συσσωματωμάτων των βακτηρίων με την εφαρμογή υπερήχων (3 x 3min, 30% ένταση, στον πάγο). Με μια φυγοκέντριση στα 150 x g για 12min στους 4⁰C, διαχωρίστηκαν τα ελεύθερα πλέον βακτήρια (υπερκείμενο) από τα άθικτα κύτταρα ξενιστές και τους πυρήνες τους (ίζημα). Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επαναλήφθηκε η τελευταία φυγοκέντριση μια φορά. Το υπερκείμενο ανακτήθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρισης των 30ml (Corning), και

προστέθηκε ίση ποσότητα με αυτή του δείγματος 25% (w/v) σακχαρόζης σε K36. Μετά από σύντομη και ήπια ανάδευση του δείγματος με το 25% σακχαρόζη, ακολούθησε φυγοκέντριση στα $\sim 3800 \times g$, για 30min στους $4^{\circ}C$. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1.7ml K36, και τοποθετήθηκε με μεγάλη προσοχή στην κορυφή της διαβάθμισης ρενογραφίνης (Beckman, 13ml). Εφαρμόστηκε υπερφυγοκέντριση στα $100000 \times g$ (25,800 rpm, Beckman S, Rotor: SW40Ti) για 60min στους $4^{\circ}C$. Στο τέλος της υπερφυγοκέντρισης στη διαβάθμιση εμφανίζονται 3 «ζώνες»: η πάνω μπάντα αποτελείται από θραύσματα του κυττάρου ξενιστή, η μεσαία από ζωντανή *Coxiella burnetii*, και η κάτω από νεκρή *C. burnetii* (Εικόνα 2.3). Η μεσαία μπάντα συλλέχθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρισης των 50ml (Falcon), προστέθηκαν 30ml K36, και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 2500-3000 $\times g$ για 60min στους $4^{\circ}C$, έτσι ώστε να καθαριστεί το βακτήριο από την ρενογραφίνη. Το ίζημα συλλέχθηκε και επαναλήφθηκε το τελευταίο βήμα. Τα βακτήρια (ίζημα) επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 300-600μl K36 ή Tris-HCl pH6.8 (ανάλογα με την επικείμενη χρήση των δειγμάτων) και φυλάχθηκαν στους $-20^{\circ}C$ για μικρό διάστημα ή στους $-80^{\circ}C$ για μεγαλύτερο. Η αξιολόγηση των συλλεχθέντων κλασμάτων έγινε με χρώση Gimenez.



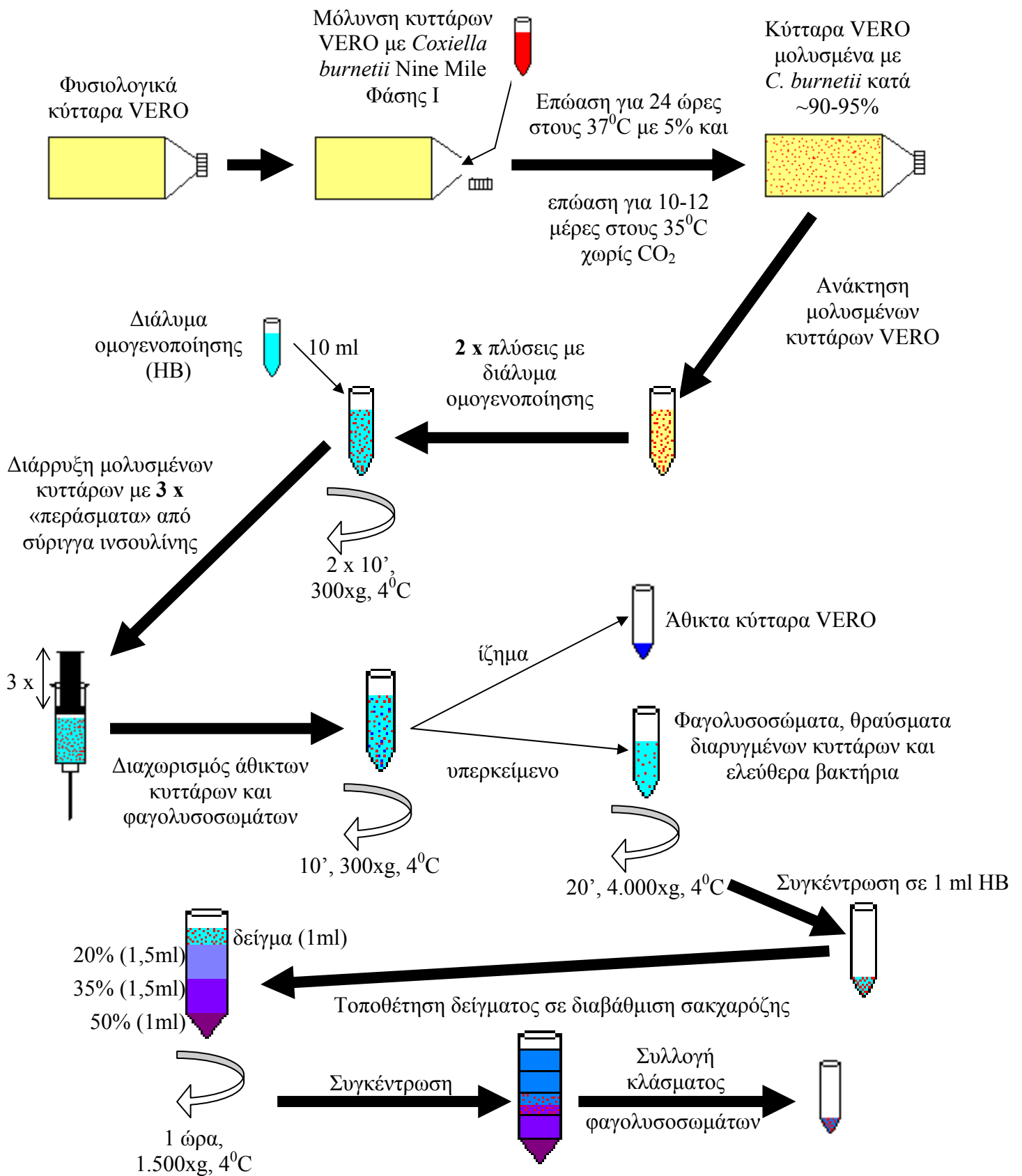
Εικόνα 2.3 Τελική εικόνα από την απομόνωση *Coxiella burnetii* σε διαβάθμιση ρενογραφίνης μετά την υπερφυγοκέντριση.



Εικόνα 2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης *Coxiella burnetii* από μολυσμένα κύτταρα VERO.

2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων

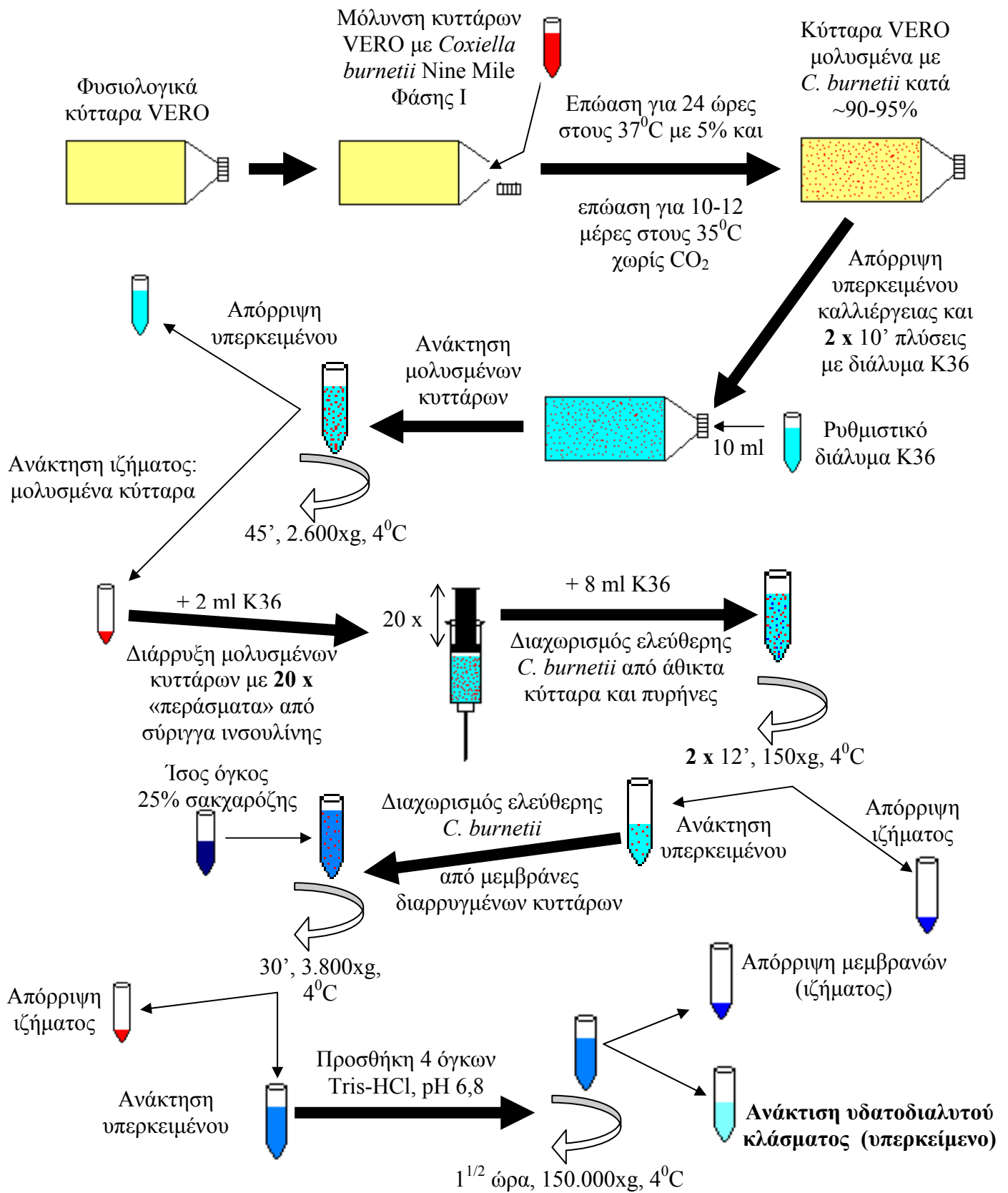
Για το παρόν πρωτόκολλο δαπανήθηκε πολύς χρόνος στο να δοκιμαστούν πολλές διαφορετικές συνθήκες σε σχέση με αυτό που περιγράφεται από τους Κοναγονα *et al.* (2002)[94], και τροποποιήθηκε αρκετές φορές πριν την τελική του μορφή η οποία περιγράφεται παρακάτω και στην Εικόνα 2.5. Αποτελείται από δυο μέρη: στο πρώτο γίνεται ουσιαστικά η διάρρηξη των μολυσμένων κυττάρων και στο δεύτερο η απομόνωση των παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων. Το αρχικό υλικό ήταν μια μεγάλη (180 ή 225cm²) φλάσκα κυττάρων VERO μολυσμένα ~90-95% με *Coxiella burnetii* στέλεχος Nine Mile φάσης II. Τα μολυσμένα κύτταρα συλλέχτηκαν με γυάλινα σφαιρίδια αφού προηγουμένως είχε απορριφθεί το υπερκείμενο της καλλιέργειας. Ακολούθησαν δυο πλύσεις (10min, 500 x g) σε ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης [HB: Homogenization Buffer (250 mM sucrose, 0,3 mM EDTA, pH 7,4 με ή χωρίς 3mM imidazole), έτσι ώστε να διαχωριστούν τα άθικτα κύτταρα από τα ελεύθερα βακτήρια. Στο τέλος αυτών των πλύσεων το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 10ml HB, και ακολούθησαν τρεις εισαγωγές-εξαγωγές από σύριγγα ινσουλίνης για να διαρρηχθούν τα μολυσμένα κύτταρα με όσο το δυνατό πιο ήπιο τρόπο, χωρίς δηλαδή να διαρρηχθούν και τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα. Στη συνέχεια ακολούθησε μια πολύ χαμηλή φυγοκέντριση στα 300 x g για 10', έτσι ώστε να κατακαθίσουν τα άθικτα κύτταρα και να ανακτηθεί το υπερκείμενο το οποίο και περιείχε τα άθικτα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα. Το υπερκείμενο συγκεντρώθηκε με μια φυγοκέντριση στα 4.000 x g για 20min, και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1ml HB. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στην κορυφή διαβάθμισης σακχαρόζης αποτελούμενη από κάτω προς τα πάνω από 1ml 50%, 1,5ml 35% και 1,5ml 20% σακχαρόζη. Εφαρμόστηκε φυγοκέντριση διάρκειας 1 ώρας στα 1.500 x g, και συλλέχθηκαν από την διαβάθμιση κλάσματα του 1ml, τα οποία και ελέγχθηκαν με την χρώση Gimenez. Άθικτα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα εντοπίστηκαν κυρίως στο κλάσμα 3. Όλες οι διαδικασίες και φυγοκεντρίσεις αυτού του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν στους 4⁰C ή στον πάγο.



Εικόνα 2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσσωμάτων.

2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, από κυτταρικές σειρές VERO μολυσμένες με *Coxiella burnetii*

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αποτελεί ουσιαστικά τροποποίηση του πρωτοκόλλου της ρενογραφίνης με τέτοιο προσανατολισμό ώστε αρχικά διαχωριστούν να τα ενδοκυττάρια βακτήρια από τα κυτταρικά συστατικά του ξενιστή και τελικά να απομονωθούν οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος. Η όλη διαδικασία περιγράφεται στην Εικόνα 2.6. Συγκεκριμένα, μεγάλες φλάσκες με σχηματισμένο ταπήτιο κυττάρων VERO μολύνθηκαν με *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II. Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν μέχρι να επιτευχθεί ~90-95% μόλυνση. Το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας απορρίφθηκε και ακολούθησαν δυο πλύσεις (2 x 10min) με ρυθμιστικό διάλυμα K36. Τα μολυσμένα κύτταρα ανακτήθηκαν με γυάλινα σφαιρίδια σε 10ml K36 και μετά από φυγοκέντριση στα 500 x g για 15min στους 4⁰C. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 2ml K36 και 330μl κοκτέιλ αναστολέων των πρωτεασών (Sigma). Ακολούθησαν 20 περάσματα από σύριγγα ινσουλίνης, και προστέθηκε K36 μέχρι τελικό όγκο 10ml. Στη συνέχεια έγιναν δυο φυγοκεντρίσεις στα 150 x g για 10min στους 4⁰C για να απορριφτεί το ίζημα το οποίο περιείχε άθικτα κύτταρα, και τελικά να ανακτηθεί το υπερκείμενο το οποίο περιείχε τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, μεμβράνες από τα διαρρηγμένα κύτταρα και βακτήρια. Ο διαχωρισμός των βακτηρίων από τα υπόλοιπα συστατικά έγινε προσθέτοντας ίση ποσότητα (10ml) από διάλυμα 25% σακχαρόζης σε K36, και με φυγοκέντριση στα 3.800 x g για 30min στους 4⁰C (Beckman J2-21 M/E, Rotor JA-20, 5.750 rpm). Στο τέλος αυτής της φυγοκέντρισης, όπως επιβεβαιώθηκε με την χρώση Gimenez, τα βακτήρια βρίσκονταν στο ίζημα ενώ όλα τα υπόλοιπα συστατικά στο υπερκείμενο, το οποίο και ανακτήθηκε. Για τον διαχωρισμό των μεμβρανών από τα υπόλοιπα υδατοδιαλυτά συστατικά έγινε 1:5 αραίωση των υπερκειμένων με Tris-HCl, pH 6,8 και ακολούθησε υπερφυγοκέντριση στα 150.000 x g για 90min [Sorval Ultra 80, Rotor TFT-50-38 (fixed angle), 34.000 rpm]. Το ίζημα, το οποίο περιείχε τις μεμβράνες, επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200μl Tris-HCl, pH 6,8 με την βοήθεια σύντομων κύκλων υπερήχων, ενώ το υπερκείμενο συγκεντρώθηκε με κατακρήμνιση ακετόνης όπως περιγράφεται στο σχετικό πρωτόκολλο.



Εικόνα 2.6 Πρωτόκολλο απομόνωσης υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα κυττάρων VERO μολυσμένων με *Coxiella burnetii* Nine Mile φάσης II.

2.6 Απομόνωση και κατακρήμνιση πρωτεϊνών με ακετόνη ή TCA-ακετόνη

Coxiella burnetii, απομονωμένη με το πρωτόκολλο της ρενογραφίνης, διασπάστηκε με πέντε κύκλους (5min/ κύκλο) ψύξης σε υγρό άζωτο (-196⁰C) και απόψυξης σε υδατόλουτρο στους 37⁰C. Ως πρόσθετο επιπλέον βήμα απενεργοποίησης των βακτηρίων προστίθεται καθαρή αιθανόλη μέχρι να επιτευχθεί συγκέντρωση αιθανόλης 70%, οπότε και τα δείγματα φυλάσσονται για ένα βράδυ στους -20⁰C. Εναλλακτικό, επιπλέον βήμα απενεργοποίησης των βακτηρίων είναι η επώαση των δειγμάτων για 3min στους 100⁰C σε heating block. Όσο αφορά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, αυτή έγινε κυρίως με ακετόνη. Συγκεκριμένα, το δείγμα των πρωτεϊνών αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 με παγωμένη (ice-cold) ακετόνη και επώαστηκε για 12-16 ώρες στους -20⁰C. Στην συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στη μέγιστη ταχύτητα μιας επιτραπέζιας ψυχόμενης μικροφυγόκεντρου (~10.000-13.000 x g) στους 4⁰C για 15min. Εναλλακτικά, 3000-4000 x g για 45min στους 4⁰C ήταν συνήθως αρκετά για την δημιουργία πρωτεϊνικού ιζήματος. Η ακετόνη απορρίφθηκε, το πρωτεϊνικό ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα (air-dry), και τελικά επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 200-300μl ρυθμιστικού ανάλογα με την επικείμενη τους χρήση (IEF sample buffer ή SDS-PAGE sample buffer). Η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με συνδυασμό τριχλωροοξικού οξέος (TCA) - ακετόνης, στην οποία το δείγμα επωάζεται για 12-16 ώρες με 10% TCA στους -20⁰C και αφού κατακρημνιστεί (15min σε max rpm στους 4⁰C) ξεπλένεται με ice-cold ακετόνη (1:1, 15min σε max rpm στους 4⁰C), παρουσίασε σημαντικά μειονεκτήματα. Εντοπίστηκαν σημαντικές ποιοτικές αλλά και ποσοτικές διαφορές υπέρ του πρωτοκόλλου της κατακρήμνισης με ακετόνη, οπότε και αυτό χρησιμοποιήθηκε στα επικείμενα πειράματα. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις επιχειρήθηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών με την χρήση “speed-vac”. Ωστόσο, εντοπίστηκαν και πάλι ποιοτικές και ποσοτικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με το πρωτόκολλο της ακετόνης, υπέρ της ακετόνης.

2.7 Πρωτόκολλα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

2.7.1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Η συγκεκριμένη μέθοδος που εφαρμόστηκε εδώ αποτελεί τροποποίηση της κλασσικής μεθόδου όπως περιγράφεται από τον Laemmli U. K. (1970)[95]. Στα πηγαδάκια (wells) φορτώθηκαν ~50μg πρωτεΐνης/ δείγμα, αφού πρώτα επώαστηκαν σε ίσο όγκο sample buffer (2x) στους 40°C για 1 ώρα. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή ένταση ρεύματος 30mAmp/ πηκτή, μέχρι η χρωστική εντοπισμού (tracking dye, dye front) να φτάσει στο θετικό άκρο της πηκτής. Οι πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν στις πηκτές με διάλυμα μονιμοποίησης (fixation buffer, 45% methanol, 1% glacial acetic acid) για τουλάχιστον 4 ώρες, και χρωματίστηκαν με κολλοειδή Coomassie brilliant blue (G250)[17% (w/v) ammonium sulphate, 34% μεθανόλη, 0,5% οξικό οξύ, 0,1% (w/v) Coomassie G250] για 12-16 ώρες [96]. Ο αποχρωματισμός έγινε με 3-4 x 10min πλύσεις με d.H₂O και ήπια ανάδευση. Στον πίνακα παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι συστάσεις των πηκτών.

Υλικά για SDS-PAGE:

- Sample buffer (2x): 0,125M Tris-HCl (pH 6,8), 20% (v/v) glycerol, 40% (v/v) διαλύματος SDS 10%, 10% (v/v) β-mercaptoethanol, 5% (v/v) διαλύματος bromophenol blue 1%
- Acrylamide stock solution: 30% (w/v) acrylamide – 2,6 (w/v) % bis-acrylamide
- Electrophoresis buffer (10x): 250mM Tris-HCl, 1,92M glycine, 1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Stacking gel buffer (4x): 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
- Separation gel buffer (4x): 1,5M Tris-HCl, pH 8,8

	Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για SDS-PAGE	
	Πηκτή στοίβαξης (4%)	Πηκτή διαχωρισμού (12%)
Acrylamide stock solution 30% (ml)	5,36	40
Stacking gel buffer (ml)	10	-
Separation gel buffer (ml)	-	25
10% SDS (ml)	0,4	1
Ultra-pure H ₂ O (ml)	24	33,2
10% APS (μl)	200	750
TEMED (μl)	40	50
Συνολικός όγκος (ml)	40	100

2.7.2 SDS-Tricine polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Tricine-PAGE)

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία περιγράφεται αναλυτικά στην αναφορά από τους Schagger και von Jagow (1987)[97] και Schagger H. (2006)[98]. 50μg πρωτεΐνης φορτώθηκαν ανά πηγαδάκι (well), αφού προηγουμένως είχαν επωαστεί με sample buffer στους 40⁰C για μια ώρα. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στα 50V/ πηκτή για μια ώρα και στη συνέχεια στα 100V/ πηκτή για 12-14 ώρες, με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα σε κάθε άκρο (ανόδου και καθόδου). Οι πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν στις πηκτές με 45% μεθανόλη, 1% οξικό οξύ για τουλάχιστον 4 ώρες και χρωματίστηκαν με κολλοειδή Coomassie brilliant blue (G250)[17% (w/v) ammonium sulphate, 34% μεθανόλη, 0,5% οξικό οξύ, 0,1% (w/v) Coomassie G250] για 12-16 ώρες [96]. Ο αποχρωματισμός των πηκτών έγινε με 3-4 x 10min πλύσεις με d.H₂O και ανάδευση. Στον πίνακα παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι συστάσεις των πηκτών.

Υλικά για SDS-Tricine PAGE:

- Sample buffer: 150mM Tris-HCl, 6% (v/v) β-mercaptoethanol, 12% (w/v) SDS, 30% (w/v) glycerol, 0,02% (w/v) bromophenol blue, pH 7
- Acrylamide stock solution: 48% (w/v) acrylamide – 1,5% (w/v) bis-acrylamide
- Gel buffer (3x): 3M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,45

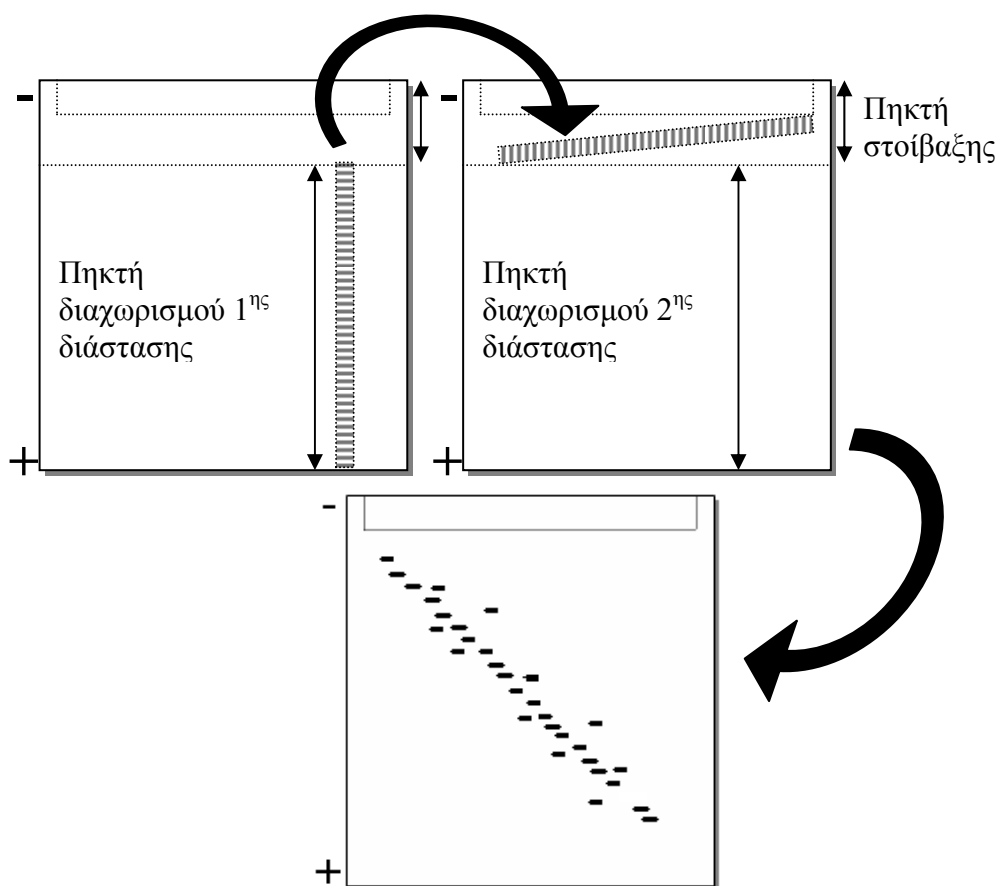
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου (anode buffer 10x): 1M Tris-HCl, pH 8,9
- Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου (cathode buffer 10x): 1M Tris-HCl, 1M Tricine, 1% (w/v) SDS, pH 8,25

	Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για SDS-Tricine-PAGE	
	Πηκτή στοίβαξης (4%)	Πηκτή διαχωρισμού (9,6%)
AB-mix (ml)	12	60
Gel buffer 3x (ml)	36	100
Glycerol (gr)	-	30
Ultra-pure H ₂ O	Μέχρι τα 145ml	Μέχρι τα 300ml
10% APS (μl)	1080	1500
TEMED (μl)	108	150
Συνολικός όγκος (ml)	145	300

2.7.3 Δισδιάστατη-SDS-Tricine polyacrylamide gel electrophoresis (doubled-SDS-Tricine-PAGE)

Η μέθοδος περιγράφεται αρχικά από τους Rais *et al.* (2004)[99] και εφαρμόστηκε εδώ με ορισμένες τροποποιήσεις. Το δείγμα (10-80 μg πρωτεΐνης) αναλύεται αρχικά στην «πρώτη διάσταση» σε μια πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 10% παρουσία 6M ουρίας, και στην συνέχεια η λωρίδα (lane) με το κάθε δείγμα αναλύεται σε μια δεύτερη πηκτή πολυακρυλαμιδίου πυκνότητας 16% χωρίς ουρία («δεύτερη διάσταση»)(Εικόνα 2.7). Με την απουσία της ουρίας καθώς και με την υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου στην δεύτερη διάσταση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση δυο διαφορετικούς παράγοντες: την υδροφοβικότητα τους και το μοριακό τους βάρος. Πιο αναλυτικά, κάθε δείγμα επωάστηκε με ίσο όγκο sample buffer στους 40⁰C για μια ώρα, στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σύντομοι κύκλοι υπέρηχων σε «μπανάκι» υπέρηχων για 15min και φορτώθηκε στο αντίστοιχο «πηγαδάκι» (well). Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε με σταθερά Volts, στα 50V/ πηκτή για μία ώρα και 100V/ πηκτή για 12-14 ώρες, με διαφορετικά ρυθμιστικά σε κάθε άκρο όπως και στην απλή SDS-Tricine PAGE. Η λωρίδα (lane) που φέρει το δείγμα κόπηκε, εξισορροπήθηκε σε 100mM Tris-HCl, pH 2 για 30min με ήπια ανάδευση, και τοποθετήθηκε οριζόντια σε σχέση με την πηκτή διαχωρισμού της δεύτερης διάστασης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.7.

Στη συνέχεια έγινε προσεκτικά η προσθήκη της πηκτής διαχωρισμού της δεύτερης διάστασης, και αφού πολυμερίστηκε προστέθηκε και η πηκτική στοίβαξης της δεύτερης διάστασης, η οποία περιείχε και 1-2 κόκκους bromophenol blue για να χρησιμοποιηθεί ως χρωστική εντοπισμού (tracking dye). Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών στη δεύτερη διάσταση έγινε με σταθερά Volts, στα 50V/ πηκτή για μία ώρα και 100V/ πηκτή για 12-14 ώρες. Οι πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν στις πηκτές με 45% μεθανόλη, 1% οξικό οξύ για τουλάχιστον 4 ώρες και χρωματίστηκαν με κολλοειδή Coomassie brilliant blue (G250)[17% (w/v) ammonium sulphate, 34% μεθανόλη, 0,5% οξικό οξύ, 0,1% (w/v) Coomassie G250] για 12-16 ώρες [96]. Ο αποχρωματισμός των πηκτών έγινε με 3-4 x 10min πλύσεις με d.H₂O και ανάδευση. Στον πίνακα παρακάτω αναφέρονται αναλυτικά οι συστάσεις των πηκτών.



Εικόνα 2.7 Διάταξη πηκτών πολυακρυλαμιδίου για την SDS-Tricine PAGE. Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε μια διαγώνιο, με τις πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες να αποκλίνουν εκατέρωθεν αυτής. Η λωρίδα (lane) που κόβεται από την πηκτική διαχωρισμού της 1ης διάστασης, τοποθετείται σκόπιμα με μια μικρή κλίση έτσι ώστε να αφαιρεθούν οι φυσαλίδες που θα εισχωρήσουν κατά την προσθήκη της πηκτικής στοίβαξης της 2ης διάστασης.

Υλικά για doubled-SDS-Tricine PAGE:

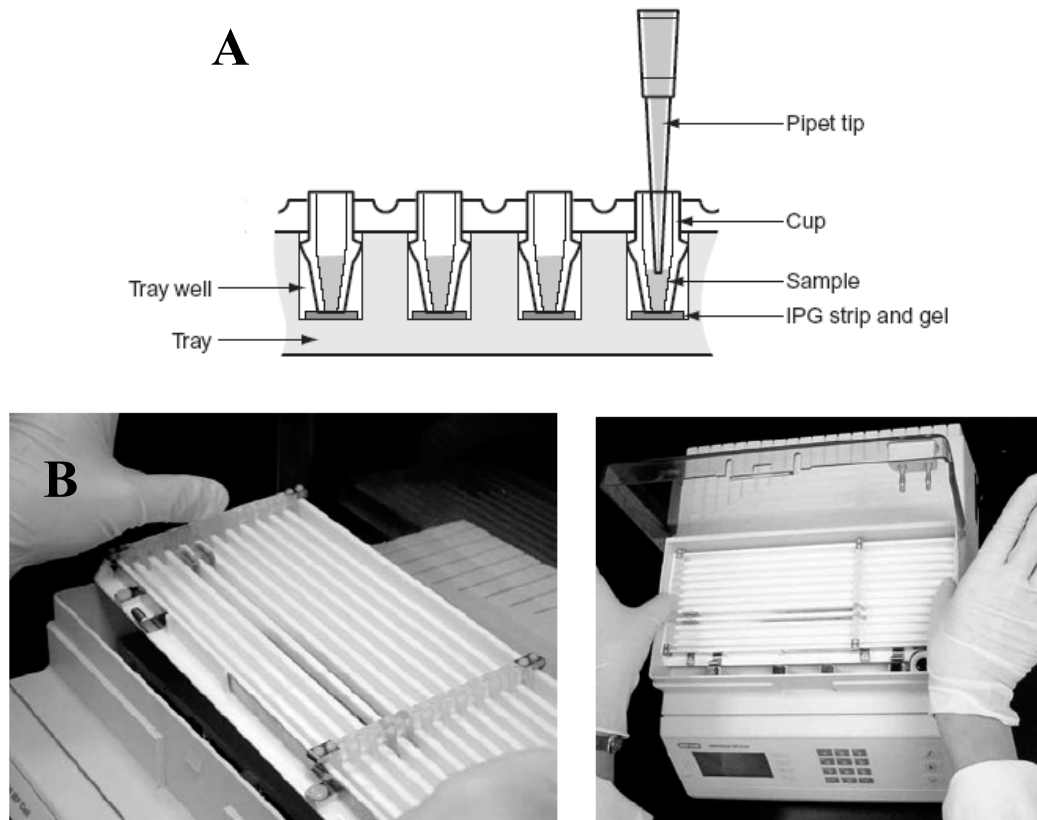
- Sample buffer: 150mM Tris-HCl, 6% (v/v) β-mercaptoethanol, 12% (w/v) SDS, 30% (w/v) glycerol, 0,02% (w/v) bromophenol blue, pH 7
- AB-mix: 48% (w/v) acrylamide, 1,5% (w/v) bis-acrylamide
- Gel buffer (3x): 3M Tris-HCl, 0,3% (w/v) SDS, pH 8,45
- Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου (anode buffer 10x): 1M Tris-HCl, pH 8,9
- Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου (cathode buffer 10x): 1M Tris-HCl, 1M Tricine, 1% (w/v) SDS, pH 8,25

Σύσταση πηκτών πολυακρυλαμιδίου για doubled-SDS-Tricine PAGE				
	Πηκτή στοίβαξης 1^{ης} διάστασης (4%)	Πηκτή διαχωρισμού 1^{ης} διάστασης (10%)	Πηκτή στοίβαξης 2^{ης} διάστασης (10%)	Πηκτή διαχωρισμού 2^{ης} διάστασης (16%)
AB-mix 48% (ml)	8,3	20	20	33,34
Gel buffer 3x (ml)	25	33	33	33,34
Urea (gr)	-	36,5	-	-
Glycerol (gr)	-	-	-	10
Ultra-pure H ₂ O	Μέχρι τα 100ml	Μέχρι τα 100ml	Μέχρι τα 100ml	Μέχρι τα 100ml
10% APS (μl)	750	500	500	333,34
TEMED (μl)	75	50	50	33,34
Συνολικός όγκος (ml)	100	100	100	100

2.7.4 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Two-dimensional electrophoresis, 2DE)

Δείγματα ολικής πρωτεΐνης από *Coxiella burnetii* (500μg – 1mg) διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης για ισοηλεκτρική εστίαση [IEF sample buffer: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) chaps, 1% (w/v) DTE, 2% (v/v) IPG, resin, protease inhibitors in lysis], και φορτώθηκαν στα ειδικά «πηγάδια» (wells) της συσκευής ισοηλεκτρικής εστίασης (Εικόνα 2.8Α) και στα δυο άκρα των IPG strips 18cm με pH3-10 (Bio-Rad, Amadora, Portugal). Σε ορισμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης IPG strips 18cm pH6-11 (Amersham). Τα IPG strips είχαν προηγουμένως ενυδατωθεί για τουλάχιστον 12 ώρες σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία της ισοηλεκτρικής εστίασης πραγματοποιήθηκε σε ένα

Protein IEF Cell System (Bio-Rad)(Εικόνα 2.8B) και στα εξής στάδια: (α) 250V με γρήγορη αύξηση για 30min, (β) 5000V με γραμμική αύξηση για 12 ώρες και ένα τελευταίο βήμα εστίασης (γ) στα 5000V με γρήγορη αύξηση για 16 ώρες (σύνολο ~90000-100000 Vhrs). Τα IPG strips εξισορροπήθηκαν (strip equilibration) στο SDS της 2^{ης} διάστασης με επώαση σε 50mM Tris/ HCl pH8.8, 30% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS και ίχνη Bromophenol blue για 20min παρουσία 10mg/ ml DTT, και στη συνέχεια για 20min ακόμη παρουσία 25mg/ ml ιοδοακεταμιδίου. Η δεύτερη διάσταση πραγματοποιήθηκε σε πηκτές SDS-πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 12% (όπως περιγράφεται παραπάνω), στο ψυχόμενο σύστημα ηλεκτροφόρησης Protein Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) και στα 3W/ πηκτή για 30min και 200V/ πηκτή για 5 ώρες, με ψύξη. Εναλλακτικά η ηλεκτροφόρηση στη 2^η διάσταση έγινε ολονύκτια στα 8-10mAmp/ πηκτή, με ψύξη. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι πρωτεΐνες μονιμοποιήθηκαν στις πηκτές πολυακρυλαμιδίου με επώαση σε 50% (v/v) μεθανόλη, 5,88% (v/v) φωσφορικό οξύ για τουλάχιστον 4 ώρες, και χρωματίστηκαν με κολλοειδή Coomassie (Colloidal Blue stain kit, Invitrogen) για τουλάχιστον 12 ώρες.



Εικόνα 2.8 Η μέθοδος “cup-loading” (A) για την φόρτωση του δείγματος στη συσκευή ισοηλεκτρικής εστίασης Protein IEF Cell System (B).

2.8 Συλλογή πρωτεϊνικών κηλίδων και πρωτεόλυση

Στις πηκτές δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης οι πρωτεϊνικές κηλίδες (spots) εντοπίστηκαν πάνω στη δισδιάστατη πηκτή με το λογισμικό Melanie 2D Gel Analysis Software, επεξεργασθήκαν επιπλέον και αριθμηθήκαν με το λογισμικό SPControl 3. Οι πρωτεϊνικές κηλίδες συλλέχθηκαν σε 96-well plates αυτόματα με το Bruker Spot Picker system (Bruker Daltonics) χρησιμοποιώντας “spot cutter” διαμέτρου 1.5mm (Εικόνα 2.9). Στις doubled-SDS-Tricine πηκτές τα πρωτεϊνικά spots συλλέχθηκαν χειροκίνητα, καθώς ο αριθμός των κηλίδων ήταν πολύ μικρότερος από αυτόν στα δισδιάστατα gels. Τα spots αποχρωματίστηκαν με 50mM διανθρακικό αμμώνιο (ammonium bicarbonate), 30% ακετονιτρίλιο (CAN, acetonitrile) με ανάδευση για 30', επί δυο φορές. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκαν με ultra-pure H₂O με έντονη ανάδευση για 10', επί δυο φορές, και αφυδατώθηκαν με την χρήση ενός συστήματος “speed-vac” για 30-45min ή μέχρι τα spots να αφυδατωθούν τελείως και να αποκτήσουν άσπρο χρώμα. Η πρωτεόλυση πραγματοποιήθηκε με την χρήση θρυψίνης μέσα στην πηκτή (in-gel tryptic digestion). Συγκεκριμένα, το κάθε spot επώαστηκε με 3-5μl/spot θρυψίνη [Roche, proteomics grade (10μg/ ml σε 10mM διανθρακικού αμμωνίου)], 12-16 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με υγρασία. Τα πεπτίδια που προέκυψαν με την θρυψινοποίηση εξήχθησαν με επώαση σε 10μl/spot 50% ακετονιτρίλιο, 0,1% τριφθοροοξικό οξύ (TFA) για 10-15min με έντονη ανάδευση. Τα δείγματα, τα οποία περιείχαν πλέον πεπτίδια, χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας.



Εικόνα 2.9 Το σύστημα Bruker Spot Picker system, για την αυτόματη συλλογή πρωτεϊνικών κηλίδων (spots) από πηκτές δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή σαρώνεται, η εικόνα καταλήγει σε υπολογιστή όπου καθορίζεται η θέση του κάθε spot, και στη συνέχεια δίνεται η εντολή για την συλλογή του.

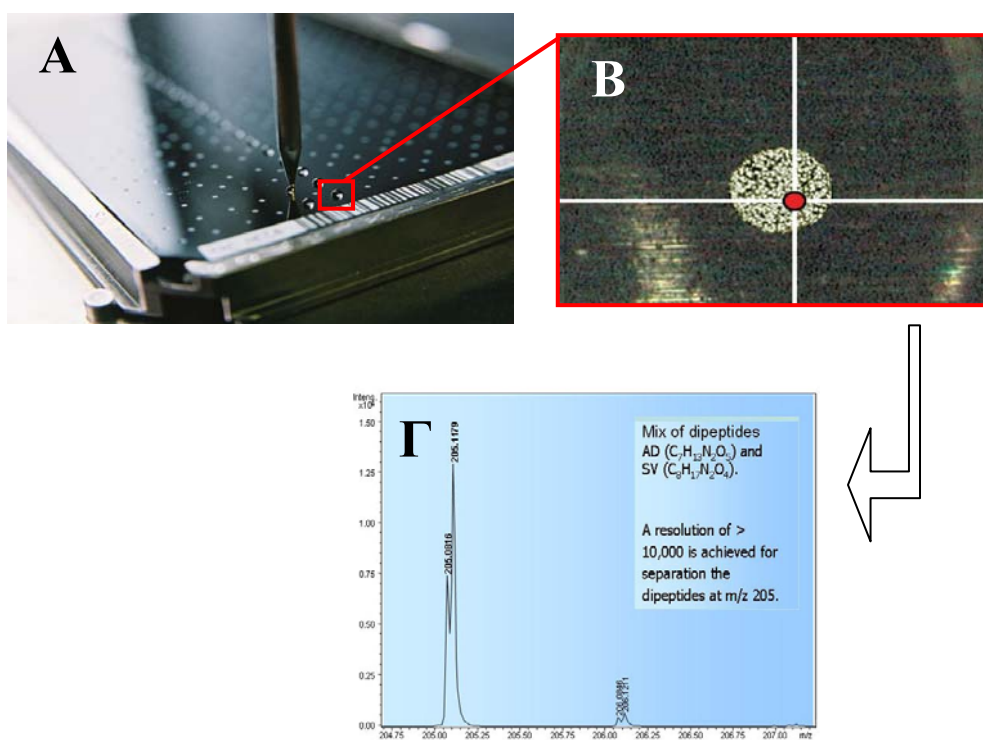
2.9 Πρωτόκολλα φασματοσκοπίας μάζας

Ένας φασματογράφος μάζας αποτελείται από μια πηγή ιονισμού η οποία μετατρέπει και μεταφέρει τα μόρια του δείγματος με τη μορφή ιόντων αέριας φάσης, από έναν αναλυτή μάζας ο οποίος διαχωρίζει ιόντα συγκεκριμένης τιμής μάζα/φορτίο (m/z) με τη χρήση ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, και από έναν ανιχνευτή για την ανίχνευση των ιόντων. Στη φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιούνται οι εξής αρχές οι οποίες επιτρέπουν την ταυτοποίηση πεπτιδίων : (α) το κάθε πεπτίδιο έχει συγκεκριμένη μάζα (m), (β) αποκτάει συγκεκριμένο φορτίο (z) με τον ιονισμό του, και (γ) ο λόγος m/z είναι χαρακτηριστικός για το κάθε πεπτίδιο.

2.9.1 *Matrix assisted laser desorption/ ionization – time-of-flight – mass spectrometry (MALDI – TOF – MS)*

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία το δείγμα πεπτιδίων συγκρυσταλλώνεται με ένα υλικό το οποίο ονομάζεται μήτρα (matrix), και στη συνέχεια ιονίζεται με πολλαπλές κρούσεις laser. Συγκεκριμένα, τα δείγματα πεπτιδίων εφαρμόστηκαν σε χαλύβδινο «στόχο» (steel target) MALDI, 384 θέσεων της Bruker (2-3μl/ θέση). Παράλληλα προστέθηκε 1μl/ spot «μήτρας» (matrix) το οποίο περιείχε επίσης και τα απαραίτητα «πρότυπα» (standards)[50% ACN, 0,1% TFA, 0,3% (w/v) cyano-4-hydroxycinnamic acid, 10pmol/ ml bradykinin fragment 1-8 (m/z 904.4861) και 20pmol/ml adrenocorticotropic hormone fragment 18-39 (m/z 2465.1983)]. Τα φάσματα αποκτήθηκαν με το σύστημα MALDI ULTRAFLEX (Bruker Daltonics) χρησιμοποιώντας το λογισμικό διαχείρισης Bruker Daltonics FlexControl Version 2.2. Το όργανο λειτούργησε με «ανακλαστικό τρόπο» (Reflector Mode), ρυθμίστηκε (calibrated) χρησιμοποιώντας 400 κρούσεις laser οι οποίες συσσωρεύθηκαν/ συλλέχθηκαν από τα εξωτερικά πρότυπα (external standards). Τα φάσματα αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας δύναμη laser της τάξης του 45-65%, και εύρος εντοπισμού 900-3500 m/z . Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 8 x 50 κρούσεις με laser για το κάθε spot. Η συγκέντρωση των φασμάτων έγινε μετά την αυτόματη αξιολόγηση τους, και όσα αναλύθηκαν είχαν ανάλυση μεγαλύτερη από 6500 στο εύρος των 1200-2700 m/z . Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το πρόγραμμα FlexAnalysis 8 Version 2.2 (Bruker Daltonics). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ο αλγόριθμος SNAP για την ανίχνευση, ο αλγόριθμος Centroid για το editing και ο

αλγόριθμος Savitzky Golay για το smoothing. Ο λόγος S/N των φασμάτων που αναλύθηκαν ήταν τουλάχιστον 2.5, και όσο αφορά τον ποιοτικό παράγοντα (quality factor) επιλέχθηκε κατώτερο όριο το 50. Η αφαίρεση των άσχετων κορυφών, προερχόμενες από την επιμόλυνση των δειγμάτων (background peaks), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της λίστας κορυφών κοινών επιμολυντικών παραγόντων που παρέχεται από την Bruker Daltonics και οι οποία περιέχει κορυφές από την αυτό-πρωτεόλυση της θρυψίνης και από κοινά θραύσματα κερατίνης.



Εικόνα 2.10 Το δείγμα πεπτιδίων προς ταυτοποίηση εφαρμόζεται στο «στόχο» (A), το laser χτυπάει πάνω στην κάθε θέση του στόχου (B), και συλλέγονται τα αντίστοιχα φάσματα (Γ)(MALDI ULTRAFLEX, Bruker Daltonics).

2.9.2 *Liquid Chromatography - Electrospray ionization – mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*

Σε αυτή την μεθοδολογία φασματομετρίας χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία (LC) σε ευθεία σύνδεση με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF). Εδώ ο ιονισμός των πεπτιδίων είναι πολύ πιο ήπιος και πραγματοποιείται με ηλεκτροσπασμό δια μέσου ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Συγκεκριμένα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Gevaert *et al.* (2002)[100] με τροποποιήσεις από τους Klein *et al.* (2005)[101]. Εν συντομία, τα αφυδατωμένα δείγματα πεπτιδίων μετά την πρωτεόλυση τους, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1μl φορμικού οξέως, αναδεύτηκαν, αραιώθηκαν με 9μl d.d.H₂O, και τέλος φιλτραρίστηκαν και απομακρύνθηκαν τα άλατα με τη χρήση μιας στήλης micro-RP [102]. Η έκλουση τους από την στήλη έγινε με 10μl 5% (v/v) φορμικού οξέως σε 80% μεθανόλη, και στη συνέχεια αφυδατώθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 10μl 10% (v/v) φορμικού οξέως. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν σε ένα αυτοματοποιημένο LC-MS/MS σύστημα το οποίο αποτελείτο από: μια CapLC (Waters, Milford, MA), μια βαλβίδα 10 θέσεων, και ένα φασματογράφο μάζας Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA). Οι παράμετροι που τέθηκαν ήταν τέτοιοι ώστε τα πολλαπλώς φορτισμένα ιόντα επιλέχθηκαν για τεμαχισμό. Για τις standard μετρήσεις το εύρος μάζας που σαρώθηκε ήταν μεταξύ 300 και 1500m/z. Για πειράματα σε «παράθυρα» μαζών [102], έγιναν 4 μετρήσεις για το κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας 4 διαφορετικά παράθυρα μαζών: 200-600, 580-750, 730-1000, and 980-1500 m/z, ενώ οι υπόλοιποι παράμετροι κρατήθηκαν σταθεροί.

2.10 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών στα πειράματα που έγιναν με MALDI-TOF/MS, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Peptide Mass Fingerprinting (PMF) σε τοπικό Mascot Server Version 2.0. Πραγματοποιήθηκαν αρκετοί κύκλοι ταυτοποίησης, με τους πιο αυστηρούς παράγοντες να είναι οι εξής: οι βάσεις δεδομένων των Swissprot/TrEMBL και NCBI, πρωτεοβακτηρίων και θηλαστικών, θρυψίνη με μηδέν και ένα missed cleavage, carbamidomethylation και methionine oxidation ως σταθερή (fixed) και ως μεταβλητή (variable) τροποποίηση αντιστοίχως, και με όριο λάθους τα 25ppm. Πρωτεΐνες οι οποίες θεωρήθηκαν ταυτοποιημένες είχαν τουλάχιστον 4 πεπτίδια κάτω από τα 10ppm. Οι αντίστοιχοι κωδικοί GO (GO annotations) αποκτήθηκαν αυτόματα και τροποποιήθηκαν χειροκίνητα από το EBI (<http://www.ebi.ac.uk/EGO>). Στην Εικόνα 2.11 φαίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελεσμάτων ταυτοποίησης. Τα φάσματα από LC-MS/MS επεξεργάστηκαν με τα προγράμματα MS vendor's software package MassLynx 4.0 και Mascot 2.1.0.3 (Matrix Science, Wyndham Place, U.K.). Οι παράμετροι αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: θρυψίνη ως ένζυμο, ένα missed cleavage site, carbamidomethylation ως σταθερή τροποποίηση και oxidized methionine, N-acetylation και pyroglutamate ως μεταβλητή τροποποίηση, 1.15 Da peptide tolerance, 0,4 Da MS/MS tolerance. Τα αποτελέσματα από το Mascot μεταφέρθηκαν στο MSQuant v.1.4a16 (<http://msquant.sourceforge.net>). Μόνο όσα πεπτίδια είχαν Mascot score πάνω από 10, και μήκος μεταξύ 7 και 25 αμινοξέων χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό του score ταυτοποίησης των πρωτεϊνών. Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο αξιοπιστίας (confidence level) ήταν πάνω από 99%.

Title	Comment	Pos_on_Scout	Score	Difference	Coverage	Protein MW	Status	BioT_Method
(O87903) DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6) (RNAP beta subunit)	Spot 1	A:1	95	56	14	153960.32	Identified (unique)	Tryptic Map (MALDI-TOF)
(O87903) DNA-directed RNA polymerase beta chain (EC 2.7.7.6) (RNAP beta subunit)	Spot 2	C:1	233	191	28	153960.32	Identified (unique)	Tryptic Map (MALDI-TOF)
(Q83ET0) DNA-directed RNA polymerase beta' chain (EC 2.7.7.6) (RNAP beta' subunit)	Spot 4	G:1	110	1	17	157633.20	Identified (multiple)	Tryptic Map (MALDI-TOF)
hypothetical protein CPS_0672 [Colwellia psychrerythraea 34H]	Spot 6	K:1	25	0	65	3496.81	Undefined	Tryptic Map (MALDI-TOF)
	Spot 58	C:8	0	-1	0	0.00	Error	Tryptic Map (MALDI-TOF)
(Q83AU0) Hypothetical protein	Spot 364	H:22	72	26	22	32222.10	Uncertain (unique)	Tryptic Map (MALDI-TOF)

Εικόνα 2.11 Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελεσμάτων ταυτοποίησης πρωτεϊνών. Με σκούρο πράσινο είναι οι πρωτεΐνες μοναδικώς ταυτοποιημένες πρωτεΐνες, με ανοιχτό πράσινο οι πολλαπλώς, με πορτοκαλί οι αβέβαιες, με κόκκινο οι μη-ταυτοποιήσιμες, και με κίτρινο τα λάθη.

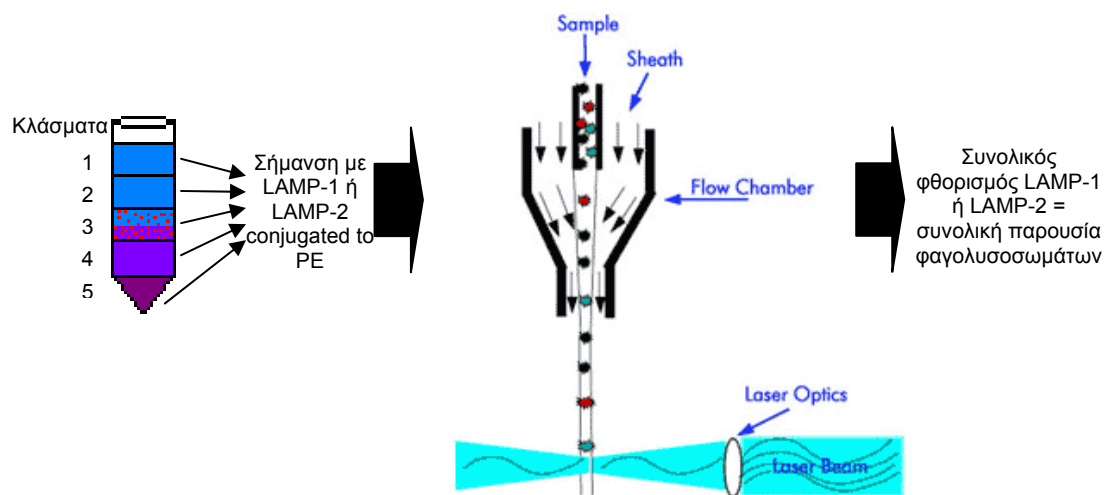
2.11 Ανοσοφθορισμός

Αναπτύχθηκαν και επιχειρήθηκαν ορισμένα πρωτόκολλα ανοσοφθορισμού για τον χαρακτηρισμό των απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων. Γενικά το πρωτόκολλο είχε ως εξής: πλάκες μικροσκοπίου καθαρίστηκαν με διάλυμα 70% αιθανόλης και τοποθετήθηκαν τα δείγματα των απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων με αρνητικό control κύτταρα VERO μη μολυσμένα. Αφού τα δείγματα στέγνωσαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες, μονιμοποιήθηκαν εμβαπτίζοντας τα για 10min σε παγωμένη (ice-cold) ακετόνη. Τοποθετήθηκαν σε κάθε δείγμα 10μl ορού αντισωμάτων στην *Coxiella burnetii* [είτε εμπορικά διαθέσιμου (*Coxiella burnetii* positive control), είτε από δείγμα ασθενούς με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων στην *Coxiella burnetii*], και επώαστηκαν για 30min στους 37°C με υγρασία. Στο τέλος της επώασης έγιναν δυο πλύσεις με PBS, pH 7,2 (10min) και μια με απεσταγμένο-απιονισμένο (d.d.) H₂O (10min). Αφού στέγνωσαν τα πλακάκια, τοποθετήθηκαν σε κάθε δείγμα 20μl anti-human IgG συνδεδεμένα (conjugated) με την φθορίζουσα ουσία fluorescein isothiocyanate (FITC) σε PBS ως αντί-αντίσωμα, και επώαστηκαν για 30min στους 37°C με υγρασία. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις όπως προηγουμένως, και προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 20μl αντισωμάτων στην LAMP-1 ή LAMP-2 (Santa Cruz) συνδεδεμένα (conjugated) με την φθορίζουσα ουσία φυκοερυθρίνη (phycoerythrin), και επώαστηκαν για 30min στους 37°C με υγρασία. Τέλος έγιναν πάλι τρεις πλύσεις όπως προηγουμένως, και τα πλακάκια αφέθηκαν να στεγνώσουν πριν τη μικροσκοπική παρατήρηση.

2.12 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

Δείγματα απομονωμένων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων σημάνθηκαν με τους λυσοσωμικούς «δείκτες» (markers) LAMP-1 και LAMP-2 οι οποίοι ήταν συνδεδεμένοι με την φθορίζουσα ουσία φυκοερυθρίνη (phycoerythrin)(Santa Cruz), και αναλύθηκαν σε όργανο κυτταρομετρίας ροής (Coulter, Epics Elite). Τα δείγματα των φαγολυσοσωμάτων προέρχονταν από τη διαβάθμιση σακχαρόζης του πρωτοκόλλου απομόνωσης φαγολυσοσωμάτων και συγκεκριμένα, από τα κλάσματα εκείνα στα οποία παρατηρήθηκαν με τη χρώση Gimenez τα περισσότερα άθικτα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα. Το πρωτόκολλο προετοιμασίας των δειγμάτων είχε

ως εξής: 150 μl δείγματος από τη διαβάθμιση σακχαρόζης αναμίχθηκαν με 1000 μl PBS, pH 7,2 και ακολούθησε μια φυγοκέντριση για 30min στα 6,000 rpm σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (JuanTo υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 600 μl PBS, pH 7,2 και διαχωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη (ένα θετικό control φθορισμού και ένα αρνητικό). Για την απαραίτητη απενεργοποίηση των βακτηρίων προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 700 μl 100% αιθανόλης –έτσι ώστε να επιτευχθεί 70% αιθανόλης- και έγινε επώαση στους 4⁰C για 24 ώρες. Το κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 6,000 rpm σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για 15min, στο τέλος της οποίας το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα. Προστέθηκε 1 ml “LAMP-1 conjugated to PE” αραιώσης 10⁻² ανά δείγμα και ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι για 20-30min. Στο τέλος της επώασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15min στα 6,000 rpm σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο, και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 500 μl PBS, pH 7,2. Η τελευταία πλύση επαναλήφθηκε 1-2 φορές. Φυσιολογικά κύτταρα VERO χρησιμοποιήθηκαν ως control άθικτων κυττάρων, και επίσης ως αρνητικό control φθορισμού. Οι βασικές αρχές της μεθοδολογίας φαίνονται στην Εικόνα 2.12.



Εικόνα 2.12 Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιούνται οι αρχές της διασποράς και διέγερσης του φωτός (light scattering και excitation) και η εκπομπή φθορίζοντων μορίων (fluorochrome emission). Σωματίδια ή/ και κύτταρα της τάξης 0,5-40 μm διαχωρίζονται και εστιάζονται υδροδυναμικά. Ένα σωματίδιο/ κύτταρο παρεμποδίζει την οπτική πηγή (συνήθως laser) κάθε φορά. Κατά συνέπεια προκαλείται διασπορά του φωτός και τα φθορίζοντα μόρια διεγείρονται και εκλύουν ενέργεια η οποία μπορεί να ανιχνευτεί και η οποία είναι συγκεκριμένη για την κάθε φθορίζουσα ουσία.

2.13 Western blot

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με SDS-PAGE σε συσκευές mini-gels και σύμφωνα με τις οδηγίες που περιγράφονται στον πίνακα παρακάτω. Τα δείγματα επωάστηκαν σε sample buffer στους 40°C για 30min – 1 ώρα. Για το κάθε δείγμα έγιναν 5 πηκτές: 4 για μεταφορά και western blot με το κάθε αντίσωμα «δείκτη» φαγολυσωμάτων (δηλ. LAMP-1, LAMP-2, EEA-1 και Rab5), και 1 για χρώση Coomassie προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση της μεταφοράς. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε στα 30mAmp/ gel για 90min. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πηκτές παρέμειναν εμβαπτισμένες σε transfer buffer για 12-16 ώρες στους 4°C. Φύλλα νιτροκυτταρίνης (Amersham) κόπηκαν ακριβώς στις διαστάσεις της κάθε πηκτής και εμβαπτίστηκαν σε transfer buffer για 10min με ήπια ανάδευση. Δύο φύλλα χαρτιού τύπου Whatman (1mm, Biorad) κόπηκαν για το κάθε φύλλο νιτροκυτταρίνης ακριβώς στις ίδιες διαστάσεις, και εμβαπτίστηκαν σε transfer buffer για 10min με ήπια ανάδευση. Η μεταφορά των πρωτεϊνών από τις πηκτές στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης έγινε σε συσκευή semi-dry μεταφοράς εφαρμόζοντας ρεύμα εντάσεως 1,2mAmp/ cm² νιτροκυτταρίνης για 90min. Στο τέλος της μεταφοράς τα φύλλα νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκαν σε TBS (3 x 5min) με ήπια ανάδευση, ενώ στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα του πρωτοταγούς αντισώματος και επωάστηκαν για 12-16 ώρες με ήπια ανάδευση. Οι πηκτές χρωματίστηκαν με Coomassie brilliant blue για τουλάχιστον 4 ώρες, και αποχρωματίστηκαν για 12-16 ώρες σε διάλυμα αποχρωματισμού (45% μεθανόλη, 1% glacial acetic acid). Τα φύλλα νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκαν σε TBS (3 x 10min), και ακολούθησε η επώαση με το διάλυμα του δευτεροταγούς αντισώματος για τουλάχιστον 2 ώρες με ήπια ανάδευση. Οι μεμβράνες ξεπλύθηκαν σε TBS (3 x 10min) και επωάστηκαν στο διάλυμα υποστρώματος της υπεροξειδάσης μέχρι να εμφανιστούν οι αναμενόμενες μπάντες. Η αντίδραση τερματίστηκε εμβαπτίζοντας τις μεμβράνες σε d.H₂O.

Υλικά:

- Sample buffer (2x): 0,125M Tris-HCl (pH 6,8), 20% (v/v) glycerol, 40% (v/v) διαλύματος SDS 10%, 10% (v/v) β-mercaptoethanol, 5% (v/v) διαλύματος bromophenol blue 1%
- AB-mix: 30% acrylamide – 0,8% bis-acrylamide
- Electrophoresis buffer (10x): 25mM Tris-HCl, 192mM glycine, 1% (w/v) SDS, pH 8,3
- Stacking gel buffer: 0,5M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 6,8
- Separation gel buffer: 1,5M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
- Transfer buffer: 15,6mM Trizma-BASE, 120mM glycine
- Tris-buffered saline (TBS): 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH7,4
- Blocking buffer: TBS, 5% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη
- Διαλύματα αντισωμάτων: 1/500 και 1/300 αραιώση σε TBS, 0,5% (w/v) αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, για τα πρωτοταγή [LAMP-1, LAMP-2, EEA-1, Rab5 (Santa Cruz)] και δευτεροταγή αντισώματα (Santa Cruz) αντιστοίχως
- Διάλυμα υποστρώματος για horseradish peroxidase (HRP): 0,6mg/ml chloronaphthol, 20% (v/v) μεθανόλη, 80% (v/v) TBS, 26μl H₂O₂ 35% (προσθήκη αμέσως πριν την χρήση)

	Σύσταση μικρών πηκτών πολυακρυλαμιδίου για SDS-PAGE και Western Blot	
	Πηκτή στοιβαξης (5%)	Πηκτή διαχωρισμού (13,5%)
AB-mix 30% (ml)	0,67	4,5
Stacking gel buffer (ml)	1	-
Separation gel buffer (ml)	-	2,5
10% SDS (ml)	-	3
Ultra-pure H ₂ O (ml)	Μέχρι τα 4ml	Μέχρι τα 10ml
10% APS (μl)	30	100
TEMED (μl)	10	10
Συνολικός όγκος (ml)	4	10

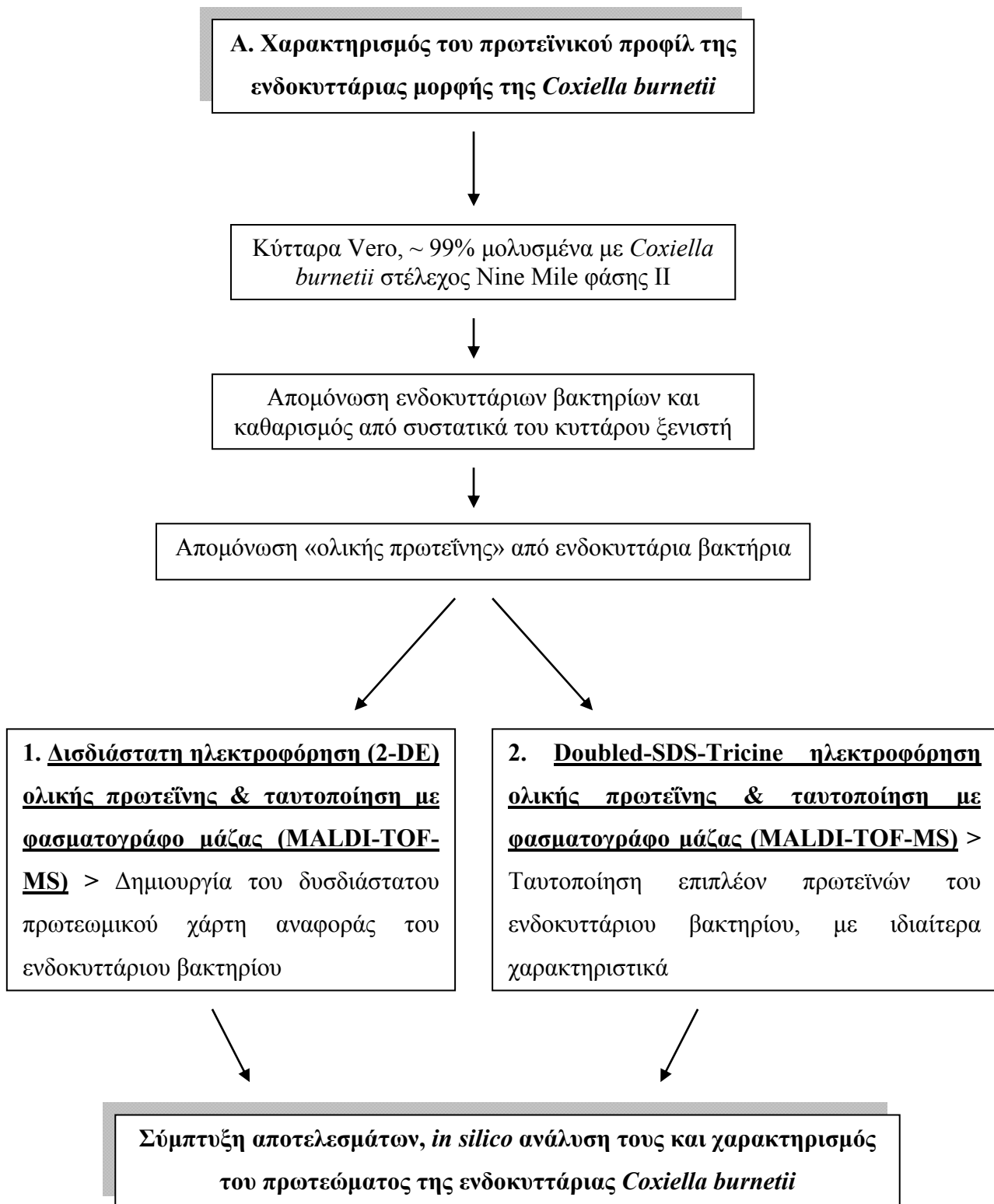
2.14 *In silico* ανάλυση πρωτεϊνών

Η ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν έγινε με την χρήση των κατάλληλων web-based software που διατίθενται με ελεύθερη πρόσβαση από το “ExPASy Proteomics Server” του Ελβετικού Ινστιτούτου Βιοπληροφορικής (SIB)[<http://au.expasy.org/>]. Σκοπός της ανάλυσης ήταν η ανάδειξη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, καθώς και άλλων χαρακτηριστικών, για την κάθε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα: το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο και ο βαθμός υδροφοβητικότητας (GRAVY score)(θεωρητικές τιμές) υπολογίστηκαν με τα προγράμματα *ProtParam Tool* [<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>] και *Compute pI/Mw Tool* [http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html]. Ο εντοπισμός διαφόρων γνωστών μοτίβων, domains και άλλων χαρακτηριστικών έγινε με τα προγράμματα *SMART* [<http://smart.embl-heidelberg.de/>] και *Motif Scan* [http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan]. Η υποκυτταρική τοπολογία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών προβλέφθηκε με το πρόγραμμα *PSORTbv.2.0* [<http://www.psort.org/>], οι διαμεμβρανικές έλικες με το πρόγραμμα *HMMTOP* [<http://www.enzim.hu/hmmtop/>], τα σηματοδοτικά πεπτίδια με τα προγράμματα *SignalP 3.0* [<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>] και *TatP 1.0* [<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>], τα μοτίβα τύπου Leucine Zipper, Leucine repeat και Coiled coil με τα προγράμματα *2ZIP* [<http://2zip.molgen.mpg.de/index.html>], *COILS* [http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html] και *Parcoil2* [<http://groups.csail.mit.edu/cb/paircoil2/>], και οι αμινοξικές ακολουθίες συγκεκριμένου τύπου με το πρόγραμμα *REP* [<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/papers/rep/search.html>].

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προφίλ της ενδοκυττάριας μορφής της *Coxiella burnetii*

Με αυτή την προσέγγιση επιχειρήθηκε να ταυτοποιηθούν όσο το δυνατό περισσότερες από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται από το βακτήριο στην ενδοκυττάρια του μορφή. Ουσιαστικά, πρόκειται για τον χαρακτηρισμό του πρωτεώματος του στελέχους Nine Mile της φάσης II της *Coxiella burnetii*, για το οποίο δεν υπήρχε καμία βιβλιογραφική αναφορά. Η όλη προσέγγιση περιγράφεται στην Εικόνα 3.1. Η ολική πρωτεΐνη που απομονώθηκε από ενδοκυττάρια βακτήρια αναλύθηκε με δυο διαφορετικές gel-based μεθόδους, και στη συνέχεια επιχειρήθηκε η ταυτοποίηση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, οι δυο gel-based τεχνικές διαχωρισμού που ακολουθήθηκαν ήταν αυτή της διδιάστατης ηλεκτροφόρησης (2-DE) και της doubled-SDS PAGE. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας MALDI-TOF-MS και PMF (Κεφάλαιο 2.10) 185 πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και 22 υποθετικές, οι οποίες και συνοψίζονται στο Παράρτημα 1.



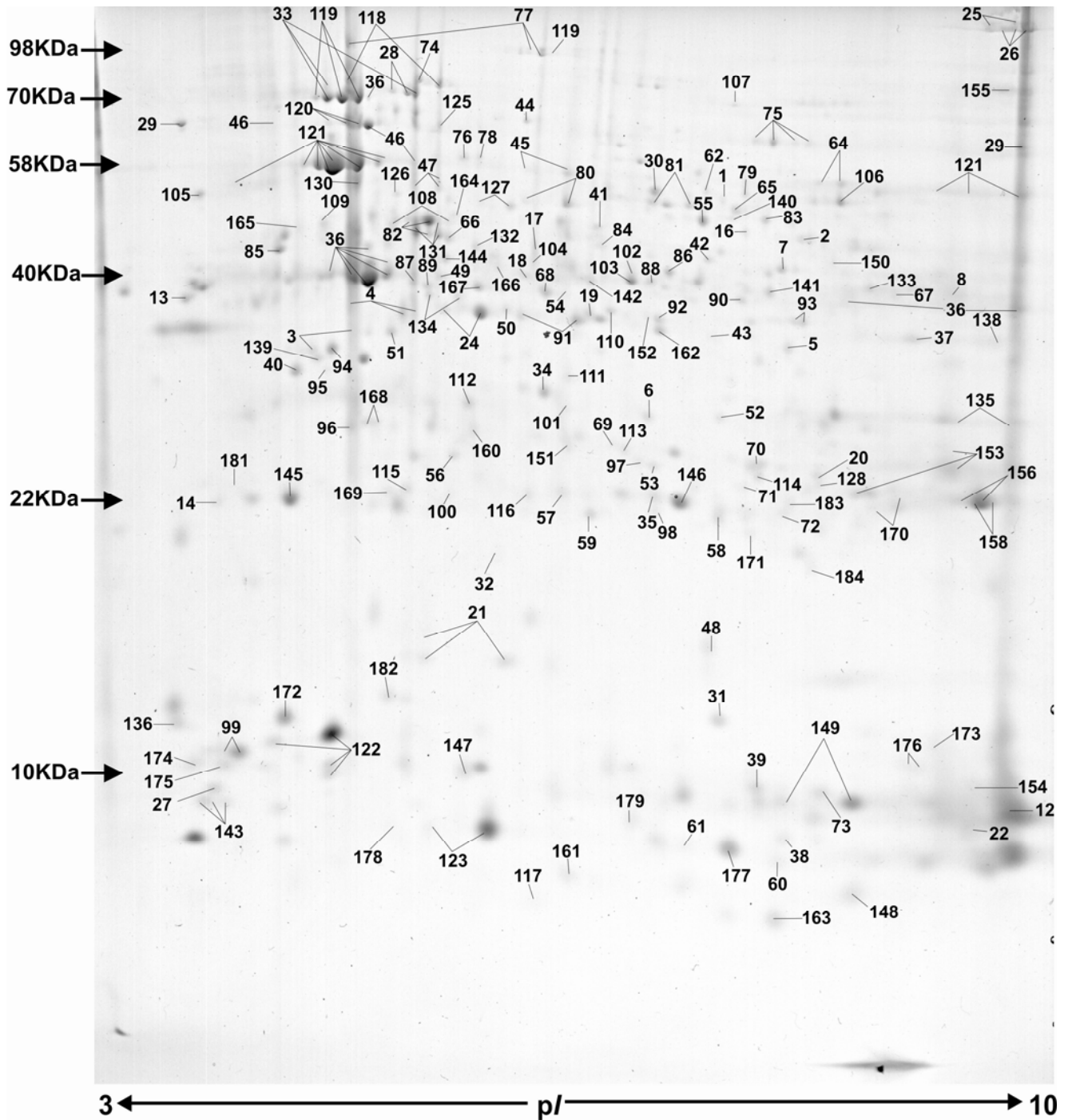
Εικόνα 3.1 Σχέδιο της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε για την ανάλυση και τον χαρακτηρισμό του συνολικού πρωτεώματος της ενδοκυττάριας μορφής της *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II.

3.1.1 Ο δυσδιάστατος πρωτεομικός «χάρτης» αναφοράς του βακτηρίου

Η δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση ολικής πρωτεΐνης του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με πρώτη διάσταση την ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών σε ακινητοποιημένη διαβάθμιση pH 3-10 (immobilized pH gradient), και με δεύτερη διάσταση την ανάλυση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με βάση το μοριακό τους βάρος. Η εν λόγω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ως μια “high-throughput” τεχνική για την ανάλυση όσο το δυνατό περισσότερων πρωτεϊνών του βακτηρίου. Με αυτή την πειραματική προσέγγιση (η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.7.4), επετεύχθη ένα δυσδιάστατο πρωτεϊνικό μοτίβο του συνολικού πρωτεώματος της ενδοκυττάριας *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II με μεγάλη επαναληψιμότητα. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίστηκαν κατ’ επανάληψη παραπάνω από 600 πρωτεϊνικές κηλίδες (spots) σε δυσδιάστατες πηκτές πολυακρυλαμιδίου χρωματισμένες με κολλοειδή Coomassie brilliant blue (Εικόνα 3.2). Οι πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση ήταν εμφανείς σε τουλάχιστον δύο πηκτές από το ίδιο βιολογικό δείγμα *Coxiella burnetii*. Οι εν λόγω κηλίδες αποκόπηκαν και συλλέχθηκαν από τις πηκτές αυτόματα, υπέστησαν πρωτεόλυση με θρυψίνη μέσα στην πηκτή, και ταυτοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Ο χαρακτηρισμός των φασμάτων των πεπτιδίων που προέκυψαν από την πρωτεόλυση έγινε σε φασματογράφο μάζας τεχνολογίας MALDI-TOF-MS και με την μέθοδο PMF. Τα δεδομένα (φάσματα) τα οποία συλλέχθηκαν συγκρίθηκαν με τις βάσεις δεδομένων του γονιδιώματος της *C. burnetii* για την αναγνώριση και ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών του βακτηρίου. Τα αποτελέσματα αυτά συγκεντρώνονται στο Παράρτημα 1, ενώ η κάθε πρωτεϊνική κηλίδα που ταυτοποιήθηκε σημειώθηκε πάνω στον δυσδιάστατο πρωτεομικό χάρτη (Εικόνα 3.3) με τον αντίστοιχο αριθμό της από το Παράρτημα 1. Περίπου 250 πρωτεϊνικές κηλίδες ταυτοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες της *C. burnetii*, οι οποίες αντιστοιχούν σε 172 διαφορετικές πρωτεΐνες του βακτηρίου (Εικόνες 3.6A και 3.3). Πρωτεΐνες οι οποίες, σύμφωνα με την ένταση της χρώσης, χαρακτηρίστηκαν ως πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται σε μεγάλη αφθονία (high-abundant proteins) ήταν: οι σαπερόνες dnaK, 60KDa και 10KDa (spots 119, 121 και 122, αντίστοιχα), η heat-shock πρωτεΐνη Hsp20 (spot 123), ο μεταφραστικός παράγοντας Tu (spot 36), δυο χαρακτηριστικές αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες (spots 145 και 146), και η χαρακτηριστική πρωτεΐνη των 27KDa της εξωτερικής μεμβράνης της *Coxiella burnetii* (spots 156 και 158).

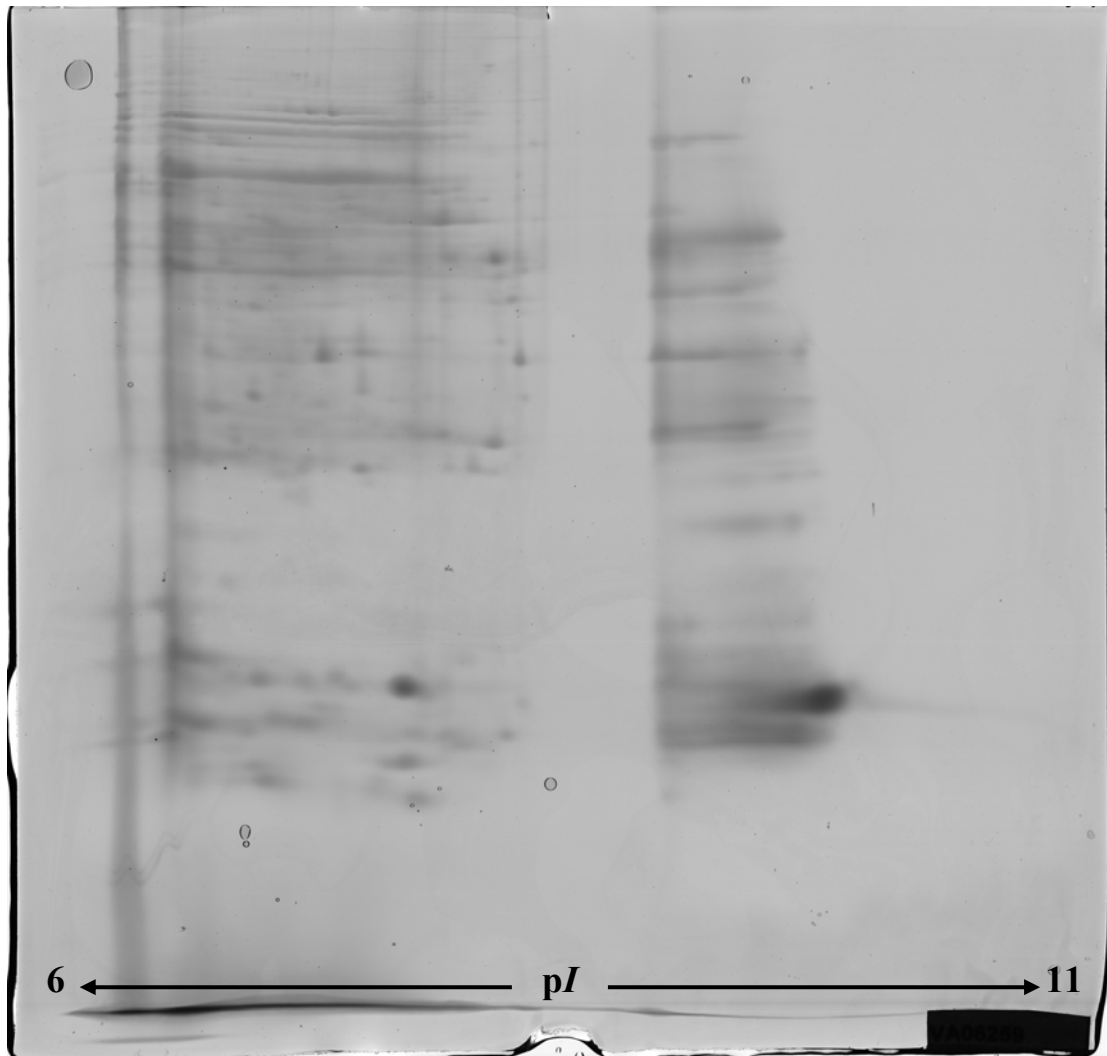


Εικόνα 3.2 Ο δυσδιάστατος πρωτεομικός χάρτης της *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II. Το δυσδιάστατο μοτίβο ολικής πρωτεΐνης παρουσίασε πολύ μεγάλη επαναληψιμότητα σε πηκτές χρωματισμένες με κολλοειδή Coomassie. Παραπάνω από 600 πρωτεϊνικά spots (πράσινοι κύκλοι) εντοπίστηκαν με το υπολογιστικό πρόγραμμα *SPControl*, και συλλέχθηκαν με τον automated spot-picker.



Εικόνα 3.3 Ο δυσδιάστατος πρωτεομικός χάρτης της *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II, με τα 250 πρωτεϊνικά spots που ταυτοποιήθηκαν. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του Παραρτήματος 1. Όπως είναι φανερό κάποιες πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν παραπάνω από μια φορά, σε διαφορετικά spots. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς λόγους οι κυριότεροι από τους οποίους είναι: τροποποιήσεις των πρωτεϊνών που αλλάζουν το μοριακό βάρος ή το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (π.χ. φωσφορυλίωση) και η αποδόμηση ορισμένης ποσότητας κάποιων πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση θραυσμάτων της πρωτεΐνης σε χαμηλότερα μοριακά βάρη. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 172 διαφορετικές πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii*.

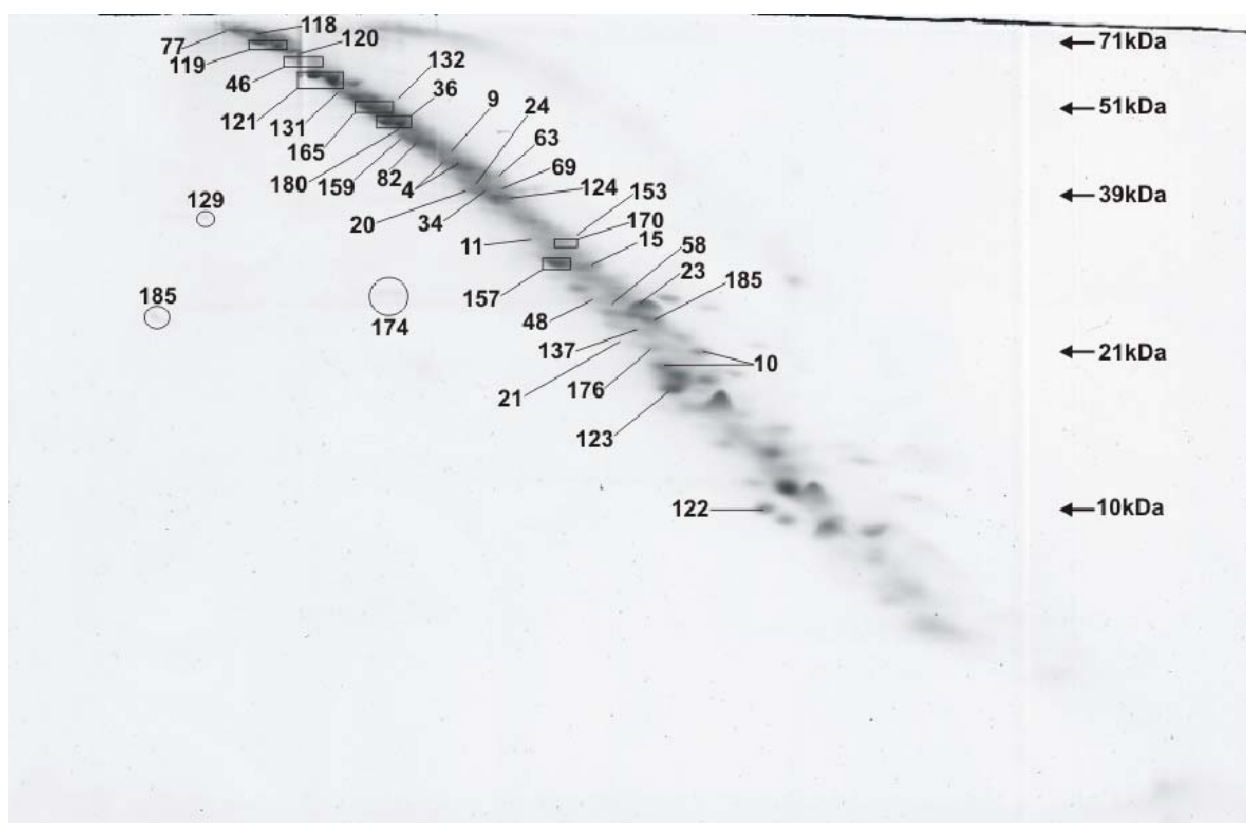
Αξίζει να αναφερθεί εδώ ότι, ολική πρωτεΐνη του βακτηρίου αναλύθηκε και με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε εύρος pI 6-11 (Εικόνα 3.4), στοχεύοντας πρωτεΐνες στη βασική περιοχή. Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις όχι μόνο δεν βελτίωσαν τον διαχωρισμό των βασικών πρωτεϊνών, αλλά μας έδωσε κατ' επανάληψη μη-ικανοποιητικά αποτελέσματα.



Εικόνα 3.4 Ανάλυση ολικής πρωτεΐνης ενδοκυττάριας *Coxiella burnetii* στέλεχος Nine Mile φάσης II, με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (2-DE) σε εύρος pI 6-11. Το οριζόντιο «σύρσιμο» των πρωτεϊνών που φαίνεται στην εικόνα, είναι αποτέλεσμα του μη επαρκούς διαχωρισμού των πρωτεϊνών στην πρώτη διάσταση (δηλ. κατά την ισοηλεκτρική εστίαση).

3.1.2 Ανάλυση ολικής πρωτεΐνης του βακτηρίου με την *doubled-SDS-Tricine-PAGE*

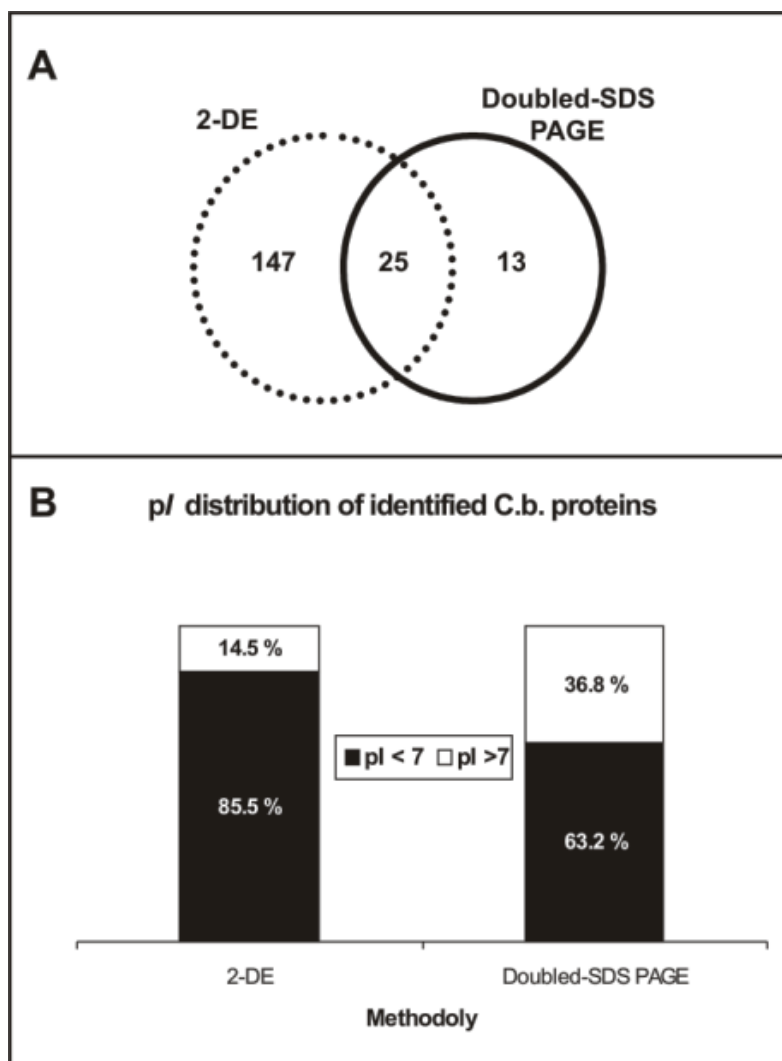
Η συγκεκριμένη μεθοδολογία εφαρμόστηκε ως ένα «εργαλείο» με σκοπό την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με πιο ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα πολύ βασικές ή μεμβρανικές πρωτεΐνες περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.7.3. Παρομοίως με την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση, επετεύχθη ένα πρωτεϊνικό προφίλ με μεγάλη επαναληψιμότητα και περίπου 125 πρωτεϊνικές κηλίδες ήταν εμφανείς σε πηκτές χρωματισμένες με κολλοειδή Coomassie brilliant blue (Εικόνα 3.5). 60 από αυτές ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο PMF ως πρωτεΐνες της *C. burnetii*, οι οποίες αντιστοιχούν σε 38 διαφορετικές πρωτεΐνες του βακτηρίου (Εικόνες 3.5 και 3.6A). Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στο Παράρτημα 1, και η κάθε πρωτεϊνική κηλίδα που ταυτοποιήθηκε σημειώθηκε πάνω στην εικόνα της χρωματισμένης πηκτής (Εικόνα 3.5) με τον αντίστοιχο αριθμό της από το Παράρτημα 1. Οι ίδιες σχεδόν high-abundance πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στην 2-DE, ταυτοποιήθηκαν και εδώ.



Εικόνα 3.5 Ανάλυση ολικής πρωτεΐνης ενδοκυττάριας *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II, με την μέθοδο *doubled-SDS PAGE*. Το μοτίβο ολικής πρωτεΐνης παρουσίασε τουλάχιστον 125 πρωτεϊνικά spots με χρώση κολλοειδούς Coomassie, με μεγάλη επαναληψιμότητα. Οι αριθμοί των πρωτεϊνικών spots που ταυτοποιήθηκαν αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες του Παραρτήματος 1.

3.1.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά του πρωτεώματος της *Coxiella burnetii*

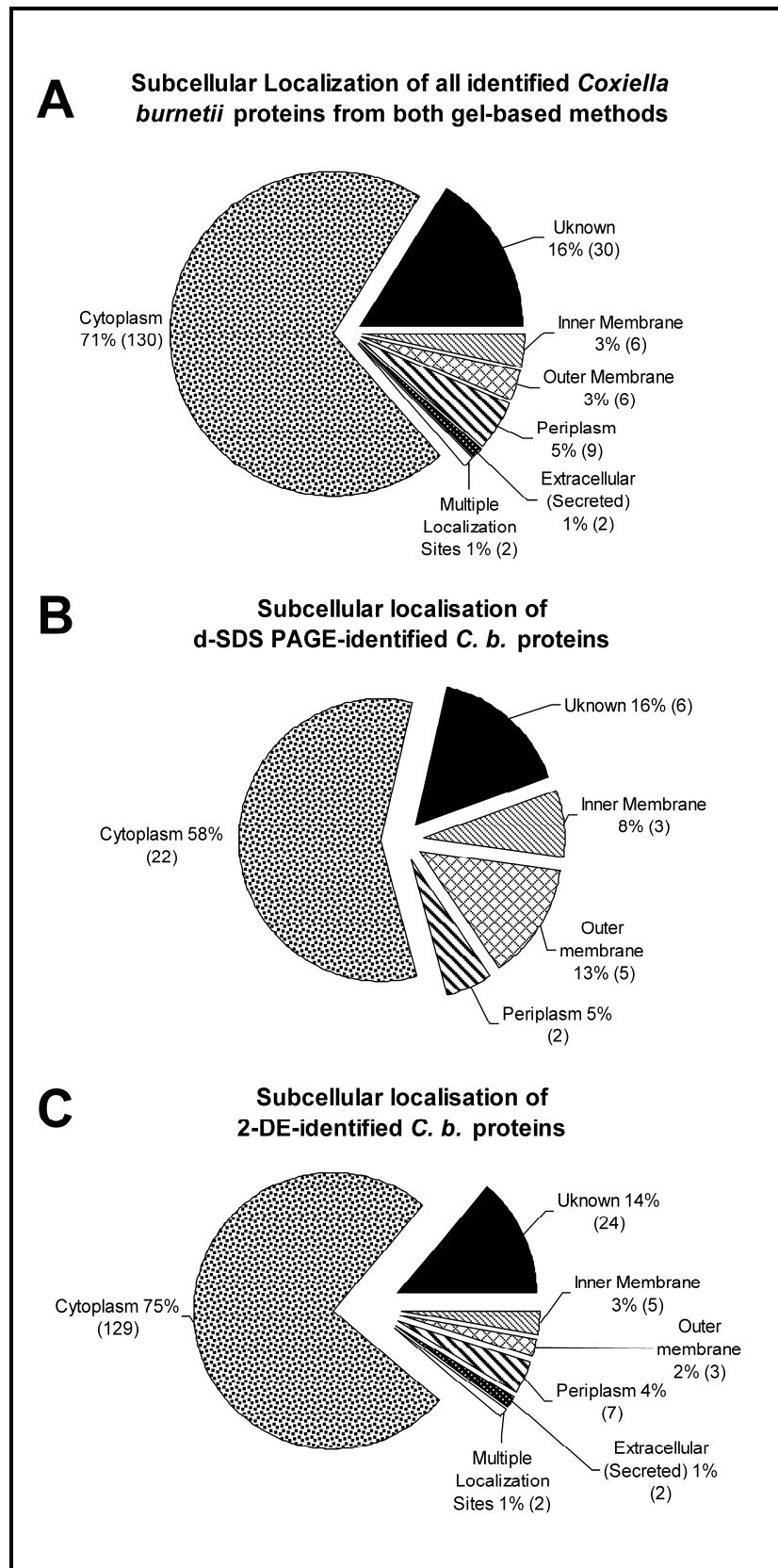
Οι περισσότερες πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* ταυτοποιήθηκαν με την 2-DE -172 έναντι 38 που ταυτοποιήθηκαν με την d-SDS-PAGE- ενώ 25 πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν και στις δυο προσεγγίσεις (Εικόνα 3.6A). Συνολικά, ταυτοποιήθηκαν παραπάνω από 20 υποθετικές πρωτεΐνες του βακτηρίου, πρωτεΐνες δηλαδή οι οποίες προβλέπεται ότι υπάρχουν βάσει του γονιδιώματος του οργανισμού, για τις οποίες όμως δεν υπάρχει καμία πειραματική απόδειξη για την έκφραση τους. Όσο αφορά τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την 2-DE, η υψηλότερη θεωρητική τιμή pI που παρατηρήθηκε ήταν 9,8 και η χαμηλότερη 4,54, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ότι συνολικά ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών στην πρώτη διάσταση ήταν επαρκής. Στο σύνολο τους, παραπάνω από το 85% των θεωρητικών pI 's ήταν όξινα ($pI < 7$), ενώ μόνο 14,5% ήταν βασικά ($pI > 7$)(Εικόνα 3.6B). Τα θεωρητικά μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν κυμάνθηκαν κυρίως μεταξύ 10 και 100 KDa, με ελάχιστες πρωτεΐνες να βρίσκονται πάνω από τα 100 KDa και μόνο μια κάτω από τα 10 KDa. Στην d-SDS-PAGE ο αριθμός των θεωρητικώς βασικών πρωτεϊνών ($pI > 7$) έφτασε τις 14 (36,8%) στο σύνολο των 38 που ταυτοποιήθηκαν με αυτή την μέθοδο, ενώ 24 (63,2%) από αυτές ήταν όξινες ($pI < 7$) (Εικόνα 3.6B). Αρκετές από τις βασικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν με την doubled-SDS-Tricine PAGE είχαν θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πάνω από το 10, με το υψηλότερο στο 11,89. Το χαμηλότερο pI ήταν 4,69, γεγονός το οποίο υποδεικνύει ένα ικανοποιητικό εύρος ανάλυσης pH συνολικά και σε αυτή την μέθοδο. Επιπλέον, σε αυτή την προσέγγιση, το ποσοστό εκείνων των πρωτεϊνών οι οποίες προβλέπεται να φέρουν τουλάχιστον μια διαμεμβρανική έλικα ήταν σχεδόν διπλάσιο. Τα θεωρητικά μοριακά βάρη των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών κυμάνθηκαν και πάλι μεταξύ 10 και 100KDa, με τις περισσότερες πρωτεΐνες να βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ 10 και 40KDa.



Εικόνα 3.6 **A:** Αριθμός των πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν με κάθε μια από τις μεθόδους ξεχωριστά και από κοινού. **B:** Ποσοστιαία κατανομή των θεωρητικών τιμών pI των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την κάθε μέθοδο.

Με την χρήση των κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων (Κεφάλαιο 2.14) προβλέφθηκε η υποκυτταρική τοπολογία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών. Συνολικά, στα αποτελέσματα και των δυο μεθόδων, πάνω από το 70% των 185 πρωτεϊνών χαρακτηρίστηκαν ως κυτταροπλασματικές, 11% μεμβρανικές ή πρωτεΐνες σχετιζόμενες με μεμβράνες, ενώ 16% παρέμειναν αγνώστου τοπολογίας (3.7 A). Στη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση τα τρία τέταρτα (75%) των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών ήταν κυτταροπλασματικές και μόλις 9% μεμβρανικές και περιπλασματικές (Εικόνα 3.7C). Όσο αφορά την υποκυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την doubled-SDS-Tricine PAGE, 8 από αυτές (21%) εντοπίστηκαν σε μεμβρανικά τμήματα (εξωτερική ή εσωτερική μεμβράνη), 2 στο περίπλασμα (5%), 6 (16%) ήταν

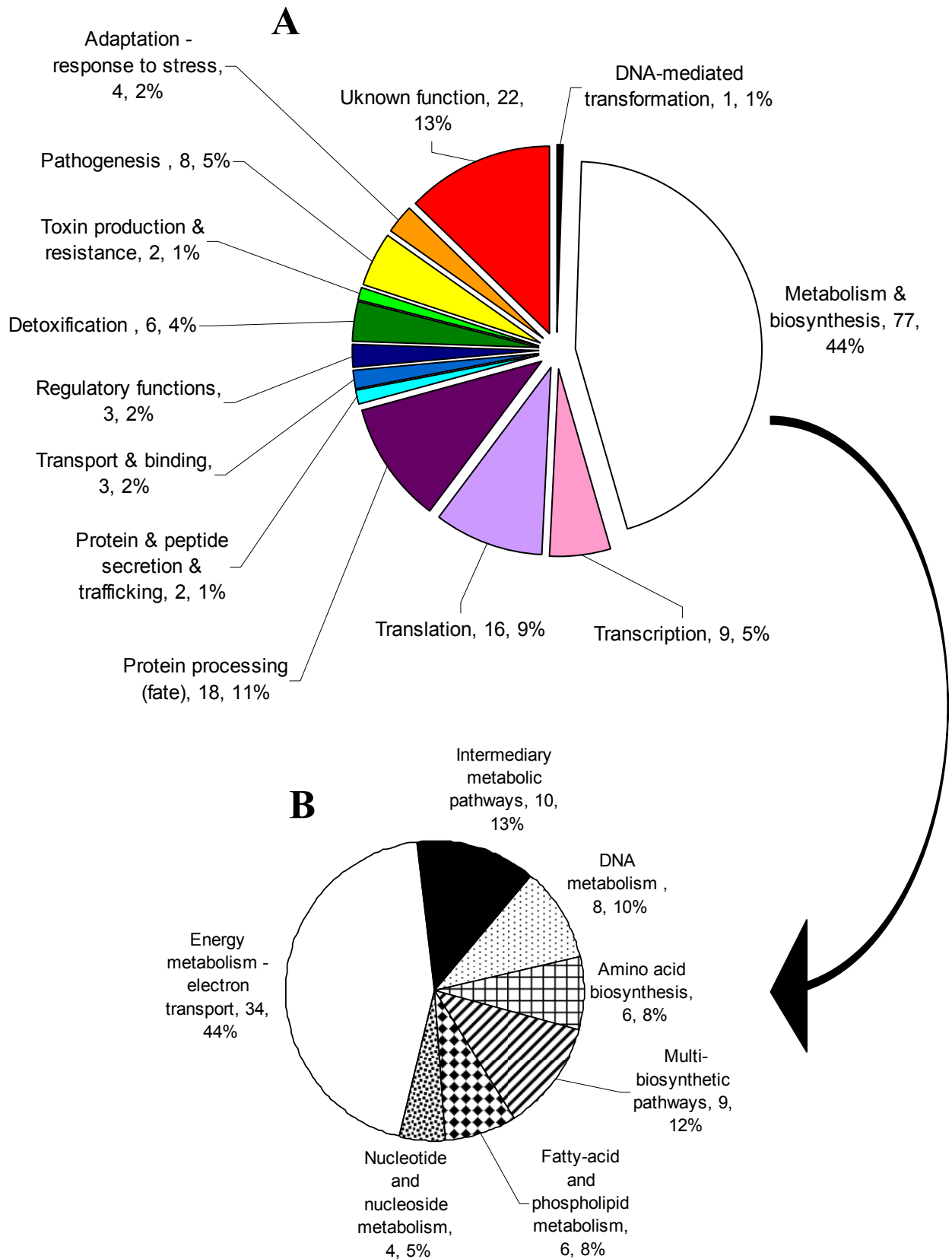
αγνώστου τοπολογίας και οι υπόλοιπες 22 (58%) εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 3.7B).



Εικόνα 3.7 Προβλεπόμενη υποκυτταρική τοπολογία του συνόλου των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και με τις δυο μεθόδους (A), με την d-SDS-PAGE (B), και με την 2-DE (C).

3.1.4 Προβλεπόμενη λειτουργία ταυτοποιημένων πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii*

Οι συνολικά 185 διαφορετικές πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και με τις δυο μεθόδους κατηγοριοποιήθηκαν ανάλογα με την προβλεπόμενη λειτουργία τους. Με αυτή την μεθοδολογία προέκυψαν 21 λειτουργικές κατηγορίες πρωτεϊνών οι οποίες και συνοψίζονται στο Παράρτημα 1 και την Εικόνα 3.8. Συγκεκριμένα αυτές οι κατηγορίες συμπεριλαμβάνουν: 12 πρωτεΐνες συσχετιζόμενες με τον κυτταρικό φάκελο, 2 που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση, 1 με DNA-mediated transformation, 77 πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν σε διάφορα μεταβολικά και βιοσυνθετικά μονοπάτια, 9 στην διαδικασία της μεταγραφής, 16 σε αυτή της μετάφρασης και της σύνθεσης των πρωτεϊνών, 18 συμμετέχουν στην μετά-μεταφραστική επεξεργασία και τροποποίηση των πρωτεϊνών (σαπερόνες, πρωτεάσες κ.λ.π.), 2 που σχετίζονται με την διακίνηση και απέκκριση πεπτιδίων και πρωτεϊνών, 3 με πρόσδεση και μεταφορά, 3 με ρυθμιστικές ιδιότητες, 6 με αντιοξειδωτικές αποτοξινωτικές (detoxifying) ιδιότητες, 2 που συμμετέχουν στην παραγωγή τοξινών και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, 8 στην παθογένεια, 4 στην προσαρμογή σε ασυνήθιστες συνθήκες και την ανταπόκριση στο stress, και τελικώς 22 πρωτεΐνες είχαν άγνωστη λειτουργία. Στον Πίνακα 3.1 συνοψίζονται οι πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και σχετίζονται με ζωτικούς για το βακτήριο μηχανισμούς όπως αυτοί της παθογένειας, της λοιμογόνου δράσης και της επιβίωσης μέσα στο φαγολυσόσωμα. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτών των κατηγοριών αναλύονται εκτενώς στο κεφάλαιο της συζήτησης (4.1), καθότι παρέχουν απαντήσεις σε βασικά ερωτήματα που τέθηκαν σε αυτή την μελέτη.



Εικόνα 3.8 **A:** Αριθμητική κατανομή των λειτουργικών κατηγοριών στο σύνολο των 185 ταυτοποιημένων πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II. **B:** Αριθμητική και ποσοστιαία κατανομή των λειτουργικών υποκατηγοριών των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μεταβολικές και βιοσυνθετικές διεργασίες.

Πίνακας 3.1 Πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* στελέχους Nine Mile φάσης II που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη και σχετίζονται με μηχανισμούς παθογένειας και επιβίωσης.

Spot No.	Method of analysis		UniProt KB/Swiss-Prot entry	Gene Locus Name	FUNCTIONAL CLASSIFICATION PROTEIN NAME	ID SCORE	Difference	Coverage	Theoretical Mr	Theoretical pI	GRAVY Score
	2-DE	Doubled-SDS PAGE									
CELL ENVELOPE (LPS/ PEPTIDOGLYCAN/ PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS-DEGRADATION)											
1	+	-	Q83BY7	CBU_1350	Phosphoglucosamine mutase	130	96	41	48158.5	6.44	-0.002
2	+	-	Q83F27	CBU_0124	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	125	68	32	47695.6	6.88	0.039
3	+	-	Q83E52	CBU_0479	3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase	200	149	76	28024.7	5.01	-0.255
4	+	+	Q83BN2	CBU_1471	Rod shape-determining protein MreB	228/80	154/ 22	63/ 36	37665.5	5.42	0.077
5	+	-	Q83BJ0	CBU_1518	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	167	127	62	36067.4	6.52	-0.085
6	+	-	Q83B43	CBU_1675	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	138	88	47	30507.3	6.01	0.015
7	+	-	Q83F20	CBU_0131	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	64	28	21	48773.0	6.77	-0.144
8	+	-	Q83C68	CBU_1261	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	114	63	41	46368.3	9.36	-0.192
9	-	+	Q83AY6	CBU_1741	Lipoprotein, putative	75	30	32	44289.7	9.76	-0.203
10	-	+	Q83FA1	CBU_0045	Lipoprotein, putative	133	95	58	21150.6	10.87	-0.138
11	-	+	Q83ED0	CBU_0395	Lipoprotein, putative	79	35	40	24494.1	8.91	-0.094
12	+	-	Q83DT1	CBU_0612	Outer membrane protein OmpH, putative	73	29	43	18823.8	9.71	-0.461
PROTEIN AND PEPTIDE SECRETION AND TRAFFICKING											
136	+	-	Q83BI9	CBU_1519	Protein-export protein secB	73	40	37	18376.6	4.54	-0.463
137	-	+	P39917	CBU_1190	Outer-membrane lipoprotein carrier protein precursor	77	39	46	23800.4	10.04	-0.163

DETOXIFICATION

144	+	-	Q83E15	CBU_0521	Chlorohydrolase family protein	155	109	37	49559.8	5.56	-0.042
145	+	-	Q83B14	CBU_1706	Antioxidant, AhpC/Tsa family	147	82	66	21849.9	5.07	0.034
146	+	-	P19685	CBU_1708	Superoxide dismutase [Fe]	166	118	61	22274.0	6.19	-0.684
147	+	-	Q83F83	CBU_0065	Rhodanese domain protein	168	124	85	14114.1	5.42	-0.455
148	+	-	Q83D04	CBU_0943	Rhodanese-like domain protein	108	51	71	13981.1	7.73	-0.563
149	+	-	Q83CY8	CBU_0963	Bacterioferritin co-migratory protein	169	110	60	16850.4	7.65	-0.264

TOXIN PRODUCTION AND RESISTANCE

150	+	-	Q83F59	CBU_0090	Protein tolB precursor	73	42	23	47792.4	8.48	-0.165
151	+	-	Q83EE5	CBU_0379	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	178	133	54	30153.3	6.02	-0.569

PATHOGENESIS

152	+	-	Q83B70	CBU_1645	DotB protein	220	174	42	41336.1	6.05	-0.235
153	+	+	P51752	CBU_0630	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Mip precursor	122/ 69	78/ 43	45/ 45	25517.5	9.80	-0.451
154	+	-	Q83CH8	CBU_1137	Enhanced entry protein EnhB, putative	77	30	41	20909.2	9.12	-0.148
155	+	-	Q83CH9	CBU_1136	Enhanced entry protein EnhC	106	53	25	117740.3	9.34	-0.471
156	+	-	O07646	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein	146	14	62	27584.5	9.21	-0.285
157	-	+	Q9EYN0	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein (Fragment)	77	0	49	26723.5	9.23	-0.236
158	+	-	Q9EYP0	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein (Fragment)	118	0	53	26755.6	9.23	-0.231
159	-	+	Q83DY0	CBU_0560	Hypothetical protein CBU_0560	76	16	35	46425.4	6.57	-0.140

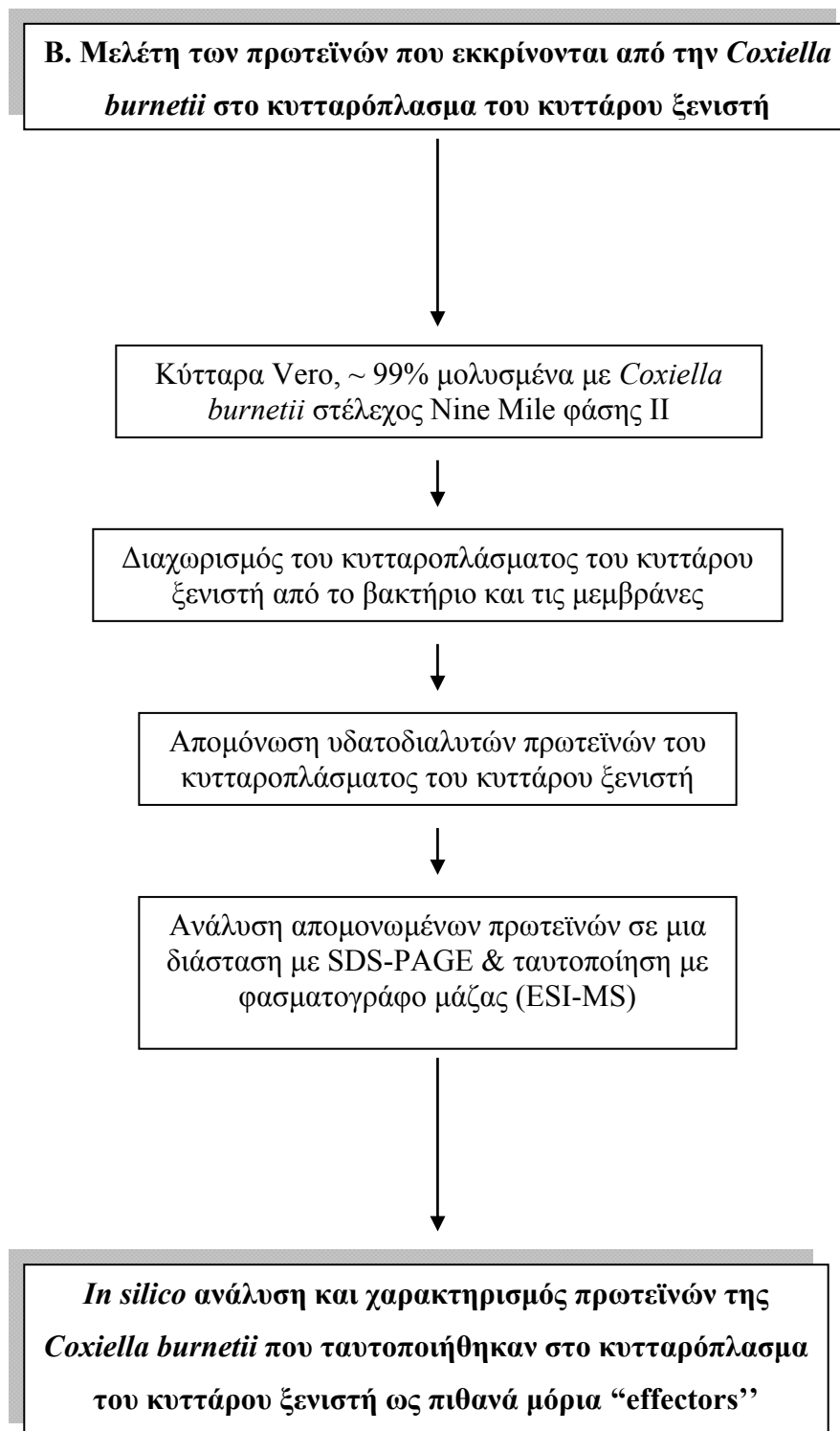
ADAPTATION TO ATYPICAL CONDITIONS – RESPONSE TO STARVATION

160	+	-	Q83AY0	CBU_1747	Stringent starvation protein A	119	75	50	24415.2	5.55	-0.231
161	+	-	Q83AC1	CBU_1983	Universal stress protein A	98	52	59	15746.1	5.96	0.098
162	+	-	Q83DX4	CBU_0568	PhoH family protein	190	144	53	36704.9	6.13	-0.414
163	+	-	P45680	CBU_1916	Hypothetical protein CBU_1916	84	51	41	15779.2	6.58	0.017

Όλες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη σημειώθηκαν με τον αντίστοιχο αριθμό τους από το Παράρτημα 1 και τον Πίνακα 3.1, πάνω στις φωτογραφίες των πηκτών στις οποίες ταυτοποιήθηκαν (Εικόνες 3.4 & 3.6). Πρωτεΐνες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στις δυο τεχνικές, σημειώνονται με τον ίδιο αριθμό (από το Παράρτημα 1 και τον Πίνακα 3.1) και στις δυο εικόνες. Η λειτουργική κατηγοριοποίηση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών βασίστηκε στην κυτταρική διεργασία (cellular process) στην οποία η κάθε πρωτεΐνη εμπλέκεται ή πιθανώς εμπλέκεται. Για τα μεγέθη ID Score, Difference, και Coverage, όπου αναφέρονται δυο τιμές (π.χ. χ/ ψ) αυτές αντιστοιχούν στις τιμές που λήφθηκαν από την κάθε μέθοδο, με πρώτη την 2-DE και δεύτερη την doubled-SDS PAGE.

3.2 Πιθανές πρωτεΐνες “effectors” του βακτηρίου

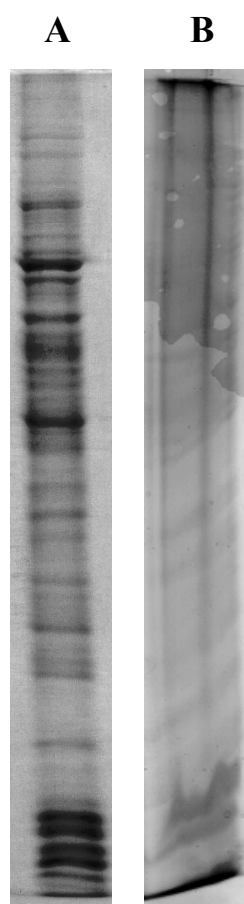
Όπως προαναφέρθηκε, είναι αυτονόητο ότι για ένα οποιοδήποτε υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παράσιτο υπάρχει η απαραίτητη ανάγκη να μπορεί να τροποποιεί τις φυσιολογικές λειτουργίες του ξενιστή του και να τις κατευθύνει προς όφελος του, δηλαδή προς την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του. Η υπόθεση σε αυτή την προσέγγιση ήταν ότι πρωτεΐνες effectors του βακτηρίου θα πρέπει να βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή όπου και επιτελούν το έργο τους. Επομένως, θα μπορούσαν και να ταυτοποιηθούν μέσα στο κυτταρόπλασμα, φυσικά ανάμεσα και σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες του ξενιστή. Κυτταρικές καλλιέργειες μολύνθηκαν με *Coxiella burnetii*, στέλεχος Nine Mile φάσης II. Αφού σχηματίστηκαν τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα τα μολυσμένα κύτταρα διασπάστηκαν, το κυτταρικό υλικό του ξενιστή διαχωρίστηκε από τα βακτήρια, και τελικά απομονώθηκαν οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες που βρισκόντουσαν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Οι απομονωμένες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με απλή SDS-PAGE και ταυτοποιήθηκαν με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας ESI-MS/MS. Το πιο ουσιαστικό ίσως, μέρος αυτής της δουλειάς έγινε *in silico*. Οι πρωτεΐνες effectors φέρουν συνήθως στις αμινοξικές τους αλληλουχίες συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως ευκαρυωτικά μοτίβα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων και repeats. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να εντοπιστούν με εξειδικευμένα υπολογιστικά προγράμματα αναλύοντας την αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης. Συνεπώς, πρωτεΐνες του βακτηρίου οι οποίες ταυτοποιούνται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και φέρουν κάποιο τέτοιο χαρακτηριστικό είναι πολύ πιθανό να είναι πρωτεΐνες effectors, η οποίες εκκρίνονται μέσω των συστημάτων έκκρισης που διαθέτει το βακτήριο. Η όλη προσέγγιση απεικονίζεται στην Εικόνα 3.9.



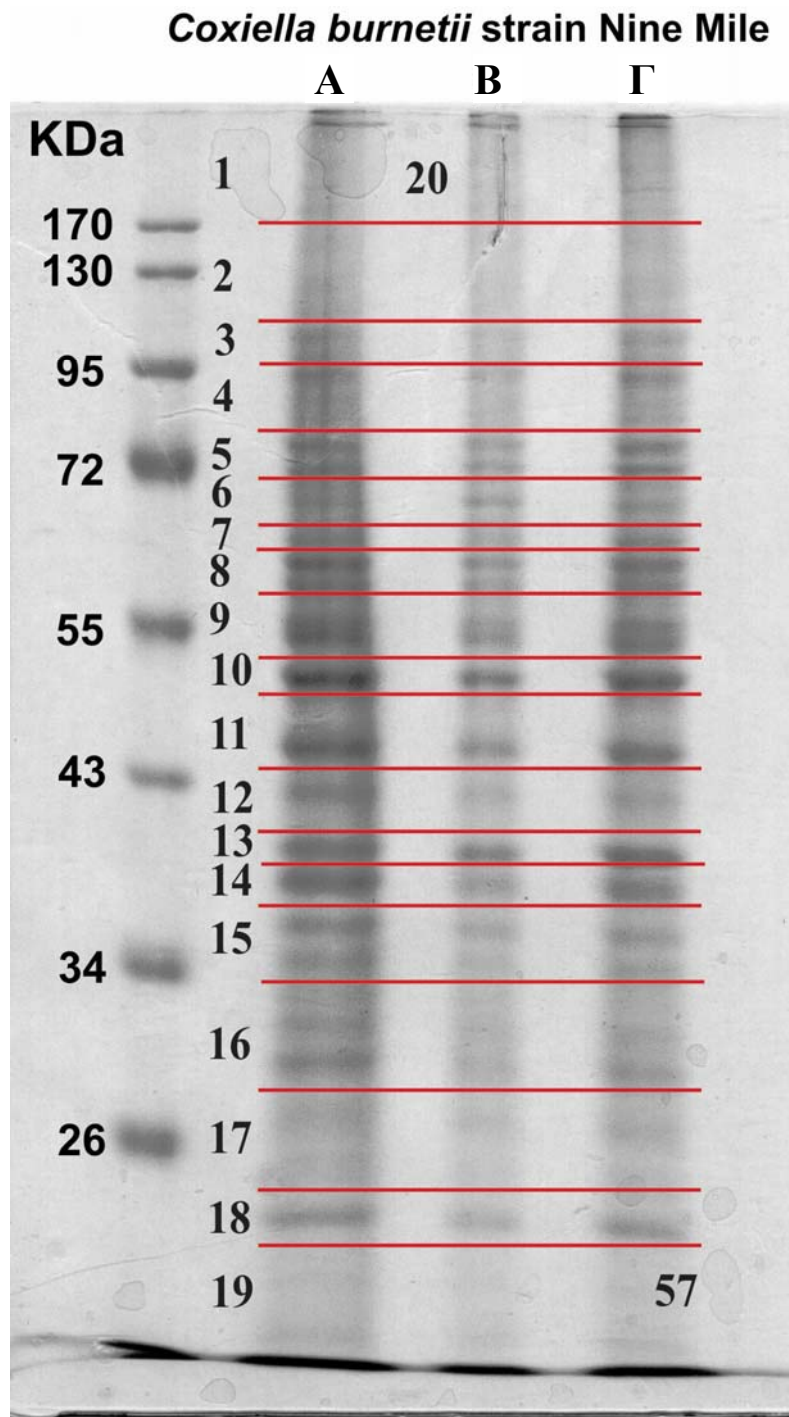
Εικόνα 3.9 Σχέδιο πειραματικής προσέγγισης για τον εντοπισμό και την ταυτοποίηση των πιθανών πρωτεϊνών effectors που εκκρίνει η *Coxiella burnetii*.

3.2.1 SDS – PAGE και ταυτοποίηση πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος κυττάρων VERO μολυσμένων με *Coxiella burnetii*

Κυτταρικές σειρές VERO μολύνθηκαν με το στέλεχος αναφοράς *Coxiella burnetii* Nine Mile φάσης II, και το κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων συλλέχθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.5. Η απομόνωση των πρωτεϊνών, η ανάλυση τους και η ταυτοποίηση τους εφαρμόστηκε σε τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα. Το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε 19 ζώνες οι οποίες αφαιρέθηκαν από την πηκτή πολυακρυλαμίδιου (Εικόνα 3.11), υπέστησαν πέψη με θρυψίνη μέσα στην πηκτή (in-gel tryptic digestion) και τελικά αναλύθηκαν με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας ESI-MS/MS. Ο διαχωρισμός του μεμβρανικού τμήματος των μολυσμένων κυττάρων από το υδατοδιαλυτό κρίθηκε ως αρκετά επιτυχής, όπως φαίνεται και επεξηγείται στην Εικόνα 3.10.



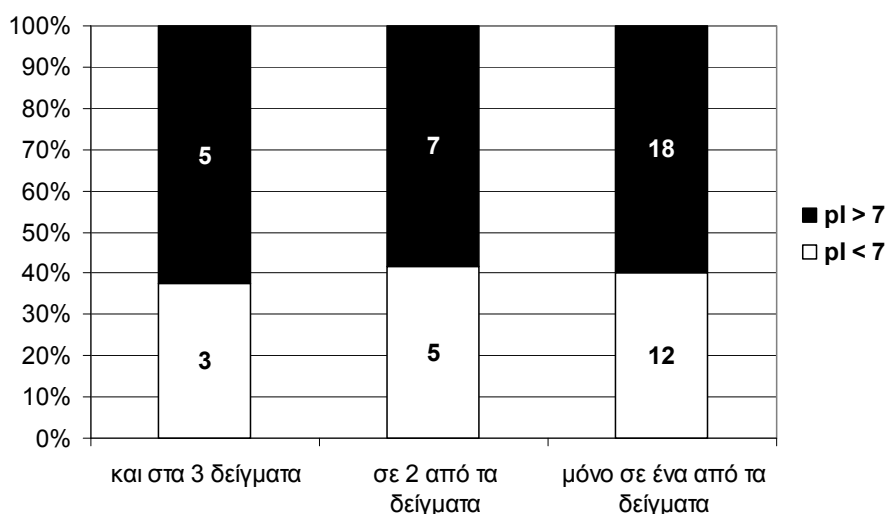
Εικόνα 3.10 Ανάλυση του κυτταροπλάσματος (A) και του μεμβρανικού τμήματος (B) κυττάρων VERO μολυσμένων με *Coxiella burnetii*. Η παρουσία λιπιδίων στο μεμβρανικό και όχι στο υδατοδιαλυτό είναι εμφανής από το κάθετο «σύρσημο» που παρουσίασε το B. Επιπλέον, οι περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες που εμφανίζονται στο A, απουσιάζουν από το B.



Εικόνα 3.11 SDS-PAGE ανάλυση τριών διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων (A, B & Γ) κυτταροπλάσματος κυττάρων VERO μολυσμένων με *Coxiella burnetii* στέλεχος Nine Mile φάσης II. Το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε 19 ζώνες, οι οποίες και αφαιρέθηκαν από την πηκτή και υποβλήθηκαν σε πρωτεόλυση μέσα στην πηκτή (in-gel tryptic digestion).

Στο σύνολο των τριών διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων που αναλύθηκαν, ταυτοποιήθηκαν 50 διαφορετικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Στη συνέχεια κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το αν ταυτοποιήθηκαν και στα τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα, ή σε δύο, ή μόνο σε ένα. Τα αποτελέσματα αυτά συγκεντρώνονται στον Παράρτημα 2. Με αυτή την κατηγοριοποίηση προέκυψαν 8 πρωτεΐνες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα, 12 πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε δύο από τα δείγματα, και οι υπόλοιπες 30 που ταυτοποιήθηκαν σε μόνο ένα από τα δείγματα. Η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων σε ένα μεγάλο βαθμό κρίθηκε από την εν λόγω κατηγοριοποίηση, με τα πιο έγκυρα να είναι αυτά που απαντήθηκαν και στα τρία δείγματα. Για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα αυτών των αποτελεσμάτων, το κάθε ταυτοποιημένο πεπτίδιο υποβλήθηκε σε αναζήτηση με το υπολογιστικό πρόγραμμα Blast (Κεφάλαιο 2.14) με σκοπό να αποκλειστεί το ενδεχόμενο τα ταυτοποιημένα πεπτίδια να ανήκουν σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και στις τρεις κατηγορίες το ποσοστό των βασικών πρωτεϊνών ($pI > 7$) ξεπέρασε το 55%, ενώ σε δυο από αυτές ξεπέρασε και το 60% (Εικόνα 3.12). Στις περισσότερες περιπτώσεις τα pI 's των βασικών πρωτεϊνών ήταν πάνω από 8,5 (Παράρτημα 2). Αξίζει να επισημανθεί εδώ ότι αυτό είναι σε αντίθεση με τα προηγούμενα ευρήματα που αφορούσαν την ανάλυση του συνολικού πρωτεώματος του βακτηρίου (Κεφάλαιο 3.1), και το εν λόγω εύρημα σχολιάζεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο της συζήτησης (4.2).

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν

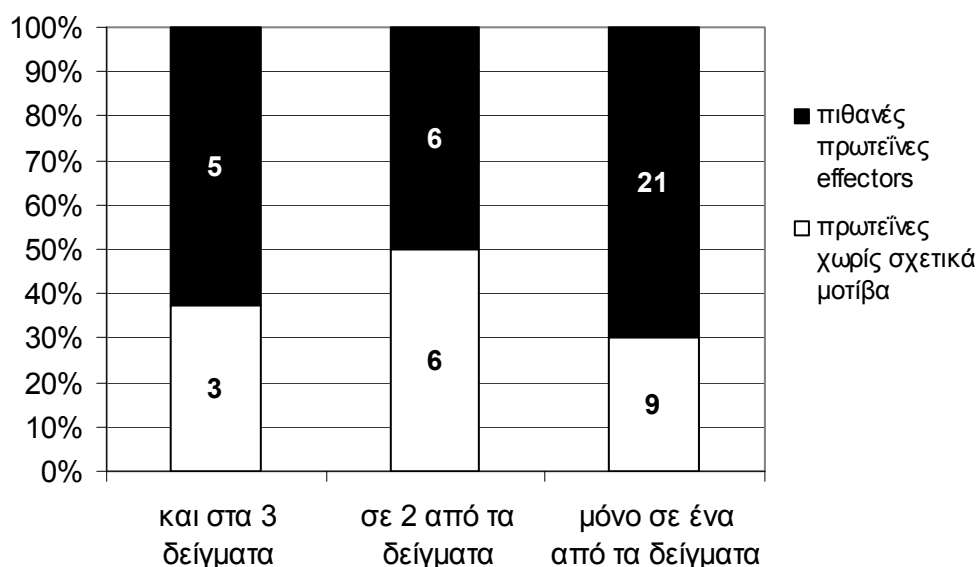


Εικόνα 3.12 Αριθμητική κατανομή των βασικών πρωτεϊνών ($pI > 7$) έναντι των όξινων ($pI < 7$), μέσα στις τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν στο κυτταρόπλασμα μολυσμένων κυττάρων VERO.

3.2.2 *In silico* ανάλυση ταυτοποιημένων πρωτεϊνών

Από την *in silico* ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή την μελέτη προέκυψαν σημαντικά στοιχεία σε σχέση με τον πιθανό ρόλο που μπορεί να έχουν αυτές οι πρωτεΐνες ως ‘effector molecules’ μέσα στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Στον Πίνακα 3.2 συνοψίζονται τα μοτίβα καθώς και άλλα χαρακτηριστικά τα οποία εντοπίστηκαν για την κάθε πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε. Τα πιο σημαντικά από αυτά τα ευρήματα θα συζητηθούν παρακάτω στο κεφάλαιο της συζήτησης (4.2). Συνοψίζοντας συνολικά τα χαρακτηριστικά των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών προέκυψε ένα πολύ σημαντικό εύρημα το οποίο και ενισχύει την αρχική μας υπόθεση σε αυτή την μελέτη. Αυτό είναι ότι και στις τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών (δηλ. σε αυτές που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα, σε δυο από αυτά ή σε ένα μόνο) παραπάνω από τις μισές πρωτεΐνες προβλέπεται να έχουν την δυνατότητα να δρουν ως ‘effector molecules’ (Πίνακας 3.2, και Εικόνα 3.13), δηλαδή φέρουν κάποιο ευκαρυωτικό μοτίβο ή γενικότερα παρουσιάζουν κάποιο(α) χαρακτηριστικό(α) το οποίο θα μπορούσε να έχει μια σημαντική επίδραση σε φυσιολογικές λειτουργίες του ξενιστή.

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν



Εικόνα 3.13 Αριθμητική κατανομή των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών μέσα στις τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών *Coxiella burnetii*, οι οποίες φέρουν χαρακτηριστικά των “effector molecules”.

Πίνακας 3.2 Χαρακτηριστικά “effector molecules” τα οποία φέρουν πρωτεΐνες του στελέχους Nine Mile της *Coxiella burnetii* της φάσης II που ταυτοποιήθηκαν στο κυτταρόπλασμα μολυσμένων κυττάρων VERO.

No.	Όνομα Πρωτεΐνης	Signal Peptide	Motifs – Domains – Repeats – Profiles
Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα:			
1	NADH dehydrogenase subunit I	+	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
2	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
3	ribonuclease R	-	- bipartite nuclear localization signal profile - S1 domain profiles - UPF0103 protein (άγνωστη λειτουργία, όμως με homologues στον άνθρωπο) - χαρακτηριστικά domains RNA-DNA αλληλεπιδράσεων
4	30S ribosomal protein S2	-	- coiled coil domain - αβέβαιο lysine-rich region profile με ιδιότητες πρόσδεσης λιπιδίων
5	alcohol dehydrogenase (NADP+)	-	- εντοπίζεται σε περιοχή του γονιδιώματος η οποία κωδικοποιεί για πρωτεΐνες του SST4
6	Orf 145, hypothetical protein QpH1_p21	-	- coiled coil domain - κωδικοποιείται από πλασμίδιο
7	DNA repair protein RecN	-	- coiled coils domains - leucine rich repeats
8	hypothetical protein CburD_01001397	+	- αβέβαια kinase sites

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε δύο από τα δείγματα:

1	drug resistance transporter, EmrB/QacA family	-	- πολλά multi-drug resistance profiles - Major Facilitator Superfamily (MFS) profile
2	putative uncharacterized protein A35_A0191	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
3	putative uncharacterized protein	-	- πιθανές ιδιότητες πρόσδεσης νουκλεϊκών οξέων
4	stress induced protein, putative	-	- protein secE/sec61-gamma signature
5	phosphoribosylamine--glycine ligase	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
6	chaperonin, 60 kDa	-	- coiled coil domain

7	phosphoglyceromutase	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
8	serine hydroxymethyltransferase	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
9	sensor protein	-	- πολλά regulatory (πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις) και signal transduction (two-component systems) profiles
10	27kDa outer membrane protein	+	- εν δυνάμει Tat signal - DSBA-like thioredoxin domain - αβέβαια ευκαρυωτικά μοτίβα
11	acyl-CoA dehydrogenase family protein, degenerate	-	- αβέβαιο basic region leucine zipper - αβέβαιο HAT (Half-A-TPR) repeats
12	Putative uncharacterized protein CBU_1209	+	- αβέβαιο prenyl group binding site (CAAX box) - αβέβαιο Pumilio RNA-binding repeat and homology domain profiles

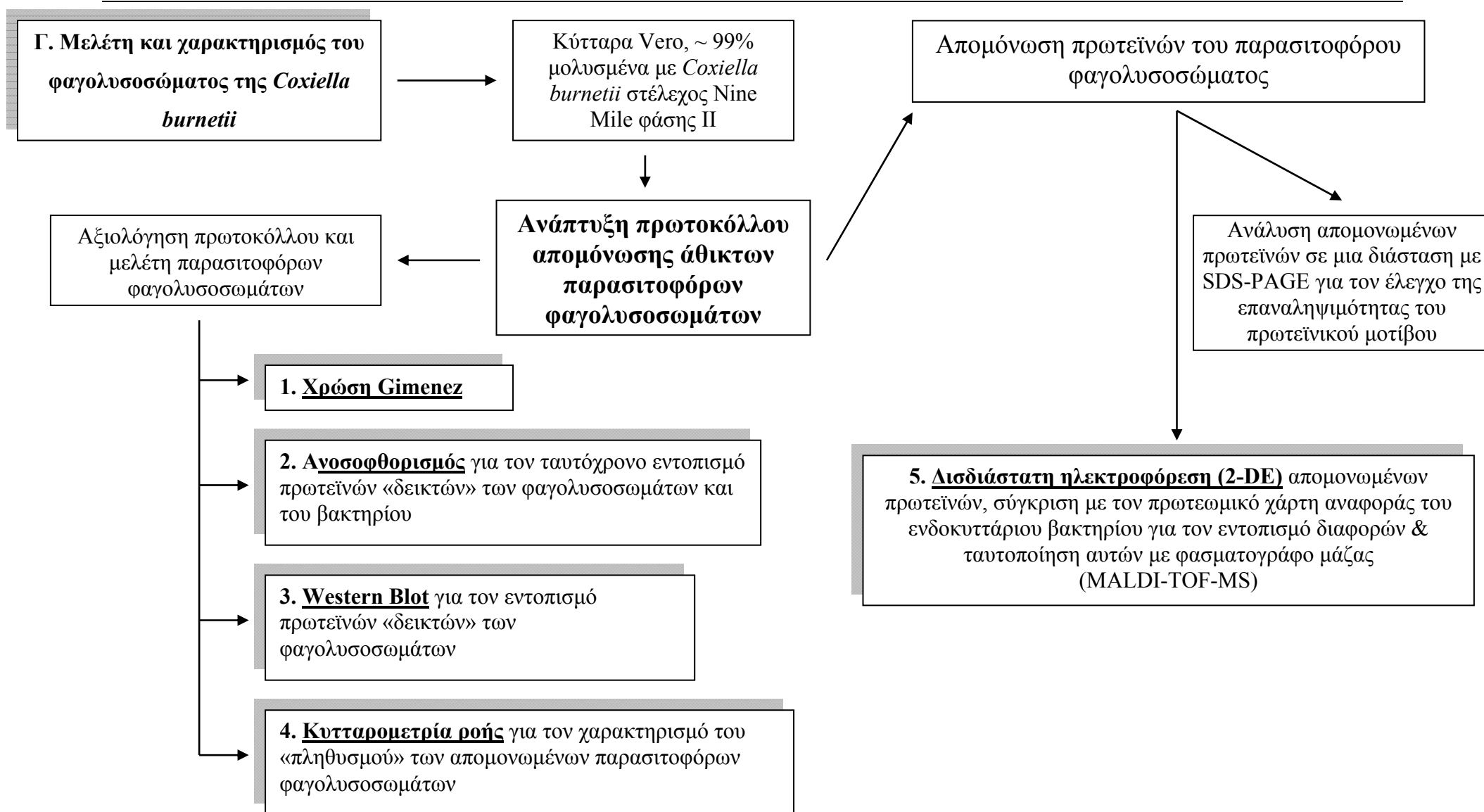
Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε ένα από τα δείγματα:

1	A/G-specific adenine glycosylase	-	- πιθανό Tat signal - helix-hairpin-helix motif (gene regulatory proteins) - αβέβαια ευκαρυωτικά μοτίβα
2	ATPase, AAA family domain protein (Uncharacterized protein CBU_1189)	-	- πιθανά regulatory domains για την αποδόμηση πρωτεϊνών
3	ferrous iron transport protein	-	- πρωτεΐνη πρόσδεσης και μεταφοράς σιδήρου
4	amino acid permease family protein	+	- πρωτεΐνη πρόσδεσης και μεταφοράς (Amino acids, peptides and amines)
5	hypothetical protein A35_A0301	-	- αβέβαιο Big-1 (bacterial Ig-like domain 1) domain profile - αβέβαιο WD-40 repeat
6	putative uncharacterized protein CBU_1508	-	- leucine repeats
7	putative uncharacterized protein CBU_1210	-	- serine-rich region με άγνωστο υπόστρωμα - αβέβαιο staphylococcus-like repeat of an extracellular protein
8	putative uncharacterized protein CBU_1823	-	- coiled coil domain
9	cell division protein FtsL	+	- involved in cell division
10	ribosomal protein L7/L12	+	- πιθανή πολλαπλή υποκυτταρική τοπολογία (cytoplasmic membrane > periplasmic = extracellular > outer membrane) - εμπλέκεται στη σύνθεση και τροποποίηση των πρωτεϊνών
11	glutathione S-transferase family protein	-	- κυτταρικός ρόλος: αποτοξίνωση

			- πιθανό Tat signal - GST_C Glutathione S-transferase, C-terminal domain
12	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat -
13	50S ribosomal protein L22	+	- πιθανή πολλαπλή υποκυτταρική τοπολογία (cytoplasmic membrane > periplasmic = extracellular > outer membrane) - εμπλέκεται στη σύνθεση και τροποποίηση των πρωτεϊνών
14	sensor protein (sensory box histidine kinase/response regulator)	-	- coiled coil domains - TPR repeat detected - signal transduction: Two-component systems
15	putative uncharacterized protein CBU_0328	-	- leucine repeat
16	putative uncharacterized protein CBU_0018	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
17	transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	-	- κυτταρικός ρόλος: παραγωγή ροξινών και ανάπτυξη ανθεκτικότητας - multi-drug αντλία
18	ABC transporter, permease protein	-	- μεταφορά άγνωστων υποστρωμάτων δια μέσου της μεμβράνης - αβέβαιο Nebulin repeat profile which binds actin
19	transposase for insertion sequence element IS1111A	-	- κινητό εξω-χρωμοσωμικό στοιχείο: Transposon functions - leucine repeat detected
20	putative uncharacterized protein CBU_1314	-	- coiled coil domains
21	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
22	linear gramicidin synthetase subunit C	-	- leucine repeat
23	putative uncharacterized protein CBU_0343	-	- αβέβαιο marR-type HTH domain - DNA binding domain of the LexA SOS regulon repressor
24	UvrABC system protein B (Protein uvrB)	-	- coiled coil domain - πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται σε SOS response
25	putative uncharacterized protein CBU_1455	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
26	putative uncharacterized protein	-	- κανένα σχετικό profile/ motif/ repeat
27	putative uncharacterized protein CBU_0012	-	- πιθανό Tat signal
28	ABC transporter, permease protein	-	- πρωτεΐνη πρόσδεσης και μεταφοράς αγνώστου υποστρώματος - αβέβαιο leucine-rich repeat variant
29	ribosomal protein S5	-	- εμπλέκεται στη σύνθεση και τροποποίηση των πρωτεϊνών
30	adenosylhomocysteinase	-	- central intermediary metabolism: One-carbon metabolism

3.3 Χαρακτηρισμός των απομονωμένων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων

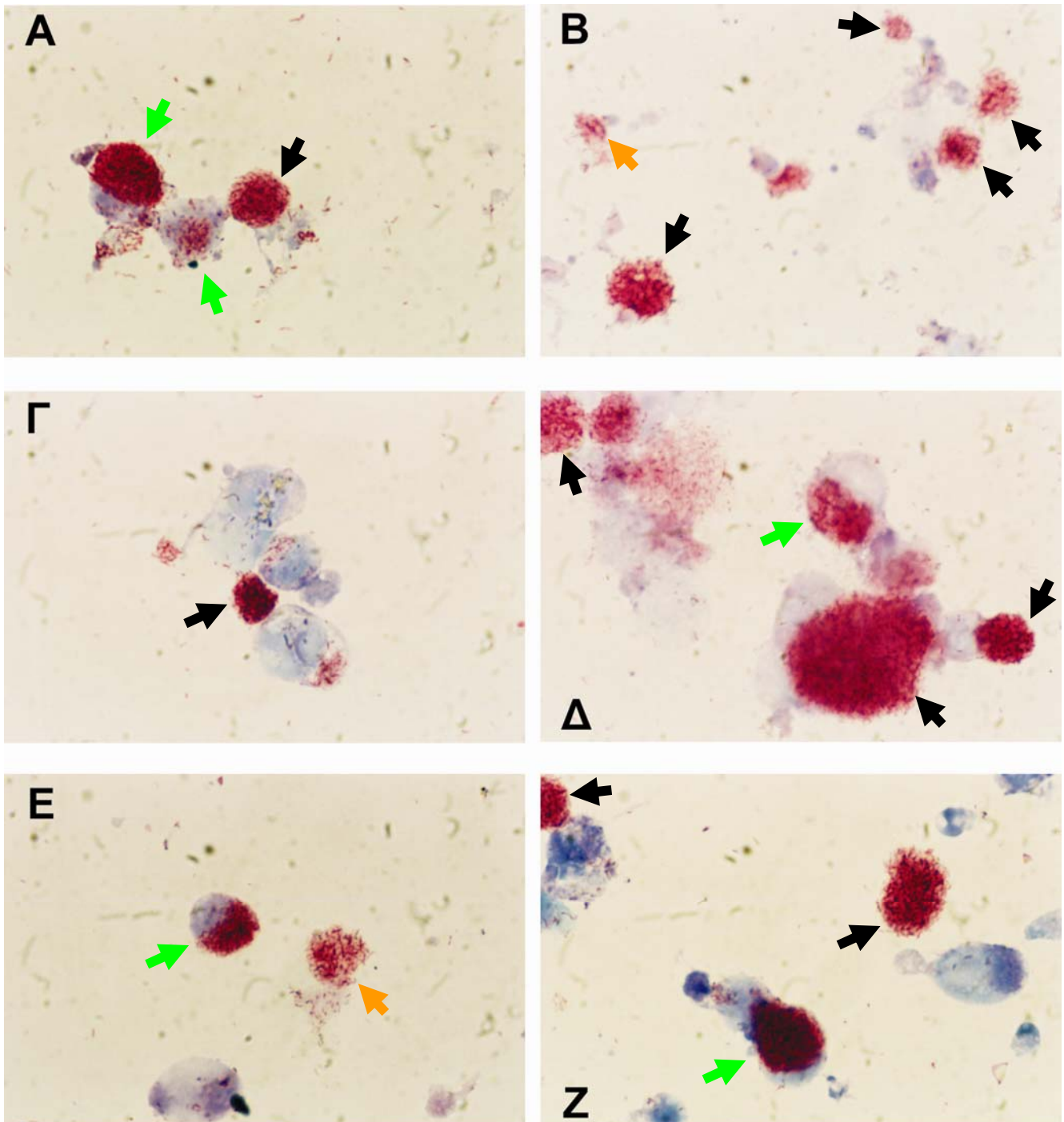
Με αυτό το τρίτο και τελευταίο σκέλος της μελέτης επιχειρήθηκε καταρχήν η απομόνωση άθικτων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων, και κατ' επέκταση ο χαρακτηρισμός τους με διάφορες μεθόδους. Ο χαρακτηρισμός των απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων αφορούσε κυρίως τον ταυτόχρονο ανοσοεντοπισμό του βακτηρίου και των διαφόρων πρωτεϊνών «δεικτών» των φαγολυσοσωμάτων (πρώιμων και ώριμων). Τεχνικές οι οποίες εφαρμόστηκαν με αυτό τον προσανατολισμό ήταν αυτή του ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με μικροσκοπική παρατήρηση (fluorescent microscope), western blot και κυτταρομετρία ροής (flow cytometry). Το πιο βασικό «εργαλείο» που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των πειραμάτων απομόνωσης άθικτων φαγολυσοσωμάτων ήταν η χρώση Gimenez. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός του πρωτεώματος της ενδοκυττάριας μορφής του βακτηρίου, δηλαδή του βακτηρίου που βρίσκεται μέσα στο φαγολυσόσωμα, ο οποίος έγινε προηγουμένως στην ίδια μελέτη (Κεφάλαιο 3.1) επέτρεψε την σύγκριση σε επίπεδο πρωτεϊνών με τα δείγματα απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων. Δηλαδή, το πρωτέωμα του ενδοκυττάριου βακτηρίου χρησιμοποιήθηκε ως control και συγκρίθηκε με το δυσδιάστατο πρωτεϊνικό προφίλ των απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων. Με αυτό τον τρόπο εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των δυο δειγμάτων, τις οποίες και επιχειρήσαμε να ταυτοποιήσουμε. Η υπόθεση εδώ ήταν ότι πιθανότατα θα μπορούσαμε να ταυτοποιήσουμε τόσο πρωτεΐνες «δείκτες» των φαγολυσοσωμάτων, όσο και πρωτεΐνες του βακτηρίου οι οποίες βρίσκονται μέσα στο φαγολυσόσωμα. Ο σχεδιασμός των εν λόγω πειραμάτων συνοψίζεται στην Εικόνα 3.13.



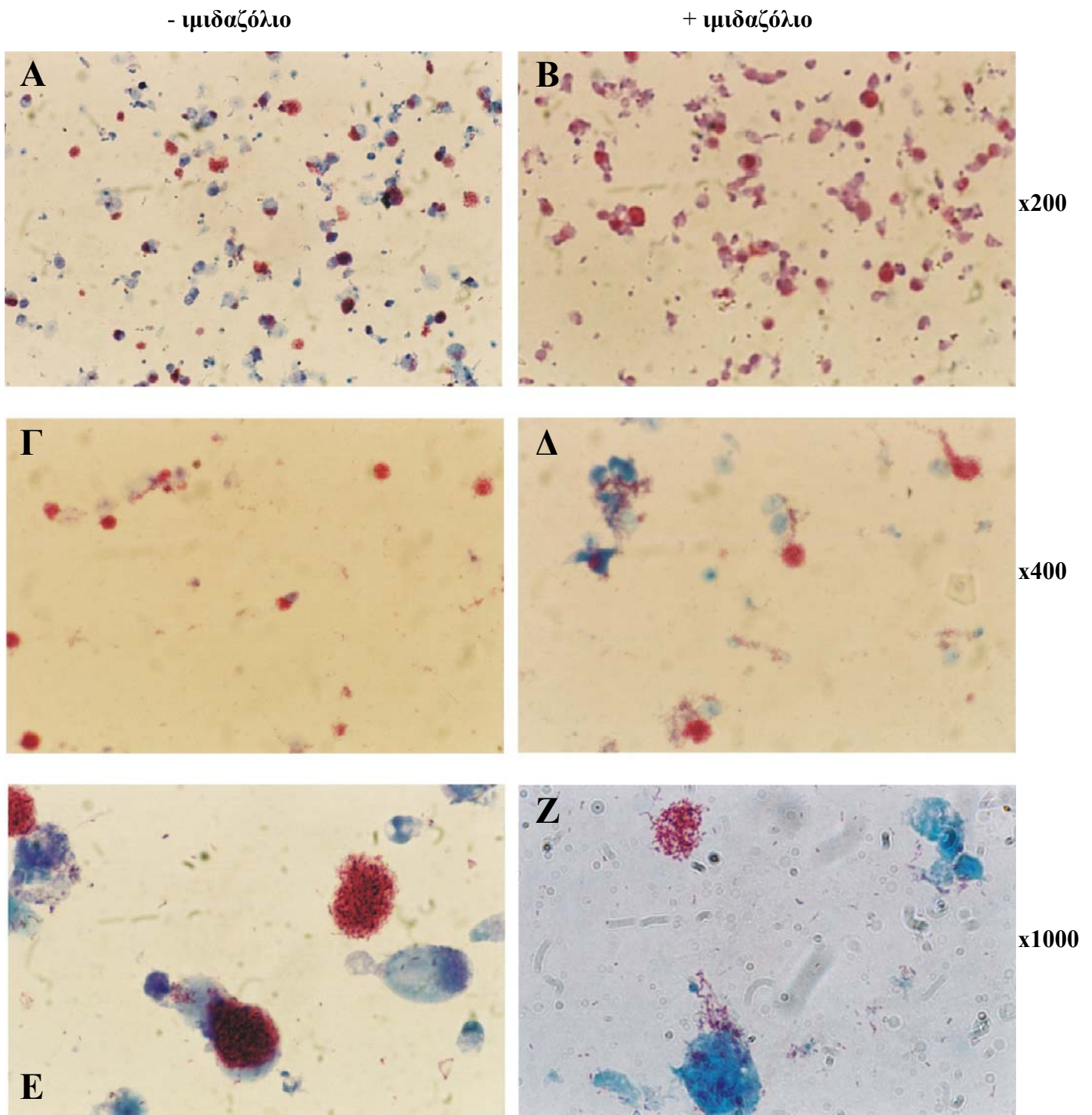
Εικόνα 3.13 Σχεδιασμός πειραματικής προσέγγισης για τον χαρακτηρισμό των παρασιτοφόρων φαγολυσωμάτων

3.3.1 Χρώση Gimenez

Η χρώση Gimenez απετέλεσε ένα από τα βασικά «εργαλεία» τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση και εκτίμηση των πειραμάτων για την απομόνωση άθικτων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων. Οι συνθήκες που απέδωσαν καλύτερα ως προς την απομόνωση άθικτων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων συνοψίζονται στο Κεφάλαιο 2.4, και τα αποτελέσματα τους αποτυπώνονται στις Εικόνες 3.14 και 3.15. Δαπανήθηκε αρκετός εργαστηριακός χρόνος στην μελέτη της επίδρασης του ιμιδαζολίου ως αντι-διαβρωτικού παράγοντα. Σύμφωνα με τις εικόνες που κατ' επανάληψη πήραμε με την χρώση Gimenez, η χρήση του ιμιδαζολίου όχι μόνο δεν συνείσφερε στο να διατηρηθούν άθικτα τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα αλλά και σε πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκαν πολύ λίγα φαγολυσοσώματα που δεν είχαν διασπαστεί (Εικόνα 3.15). Σταθερά πιο ικανοποιητικές εικόνες παρουσιάστηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο χωρίς όμως τη χρήση ιμιδαζολίου (Εικόνα 3.14). Ωστόσο, τα δείγματα μας ποσοτικά βρισκόντουσαν πάντα πολύ χαμηλά. Το ίζημα στην τελευταία φυγοκέντριση της απομόνωσης των φαγολυσοσωμάτων από μια μεγάλη φλάσκα καλλιέργειας, οπτικά ήταν μόλις ορατό. Επιπλέον μετρήσεις Bradford τις οποίες πραγματοποιήσαμε μετά την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα δείγματα επιβεβαίωσαν την χαμηλή περιεκτικότητα αυτών σε πρωτεΐνη, η οποία ήταν κατά 10^{-2} μικρότερη σε σχέση με την ολική πρωτεΐνη από τα βακτήρια μόνο.



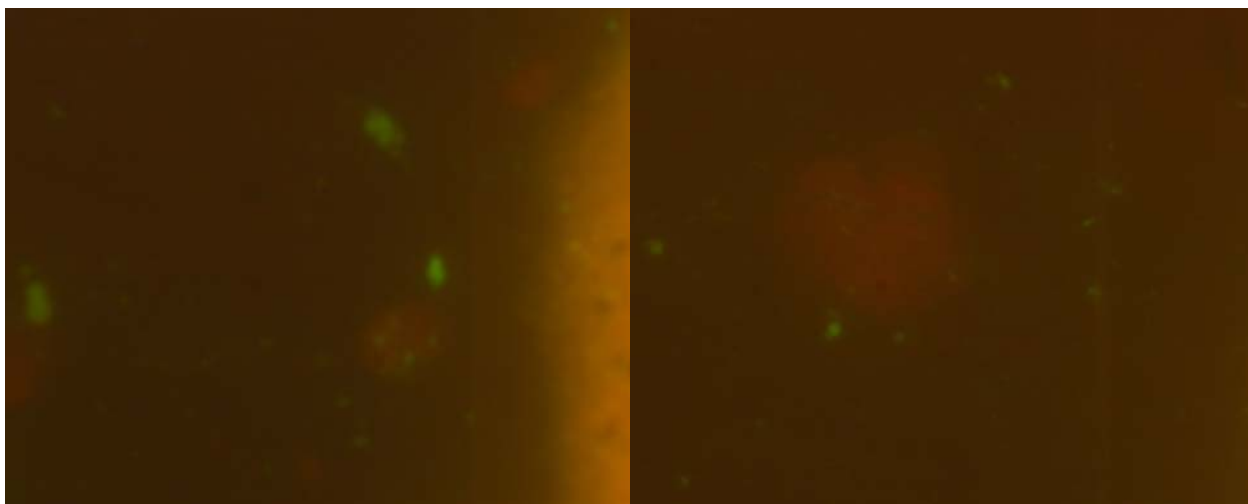
Εικόνα 3.14 Χρώση Gimenez σε δείγματα απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων (οπτικό μικροσκόπιο, x1000). Τα βακτήρια φαίνονται με το φούξια χρώμα (βασική φουξίνη), ενώ τα συστατικά του κυττάρου ξενιστή με μπλε (πράσινο του μαλαχίτη). Τα άθικτα απομονωμένα φαγολυσοσώματα σημειώνονται με τα μαύρα βέλη, ενώ φαίνονται και άθικτα μολυσμένα κύτταρα (πράσινα βέλη) καθώς και κάποια παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα τα οποία έχουν διαρρηχθεί (πορτοκαλί βέλη). Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων δε χρησιμοποιήθηκε ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 3.15 Χρώση Gimenez σε δείγματα απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων (οπτικό μικροσκόπιο). Τα βακτήρια φαίνονται με το φούξια χρώμα (βασική φουξίνη), ενώ τα συστατικά του κυττάρου ξενιστή με μπλε (πράσινο του μαλαχίτη). Στη μικρή μεγένθυση (x200) γίνεται εμφανής η χαμηλότερη συγκέντρωση άθικτων φαγολυσοσωμάτων στο δείγμα με τη χρήση ιμιδαζολίου (B έναντι A). Τα διαρρηγμένα φαγολυσοσώματα που παρατηρήθηκαν με τη χρήση ιμιδαζολίου παρουσίασαν χαρακτηριστικές «ουρές» (Δ έναντι Γ). Τα βακτήρια στα φαγολυσοσώματα εμφανίζονται με χαλαρό «πακετάρισμα» όταν χρησιμοποιείται το ιμιδαζόλιο (Z), σε αντίθεση με τα στενά «πακεταρισμένα» βακτήρια του φαγολυσοσώματος όταν δεν χρησιμοποιείται το ιμιδαζόλιο (E).

3.3.2 Ανοσοφθορισμός

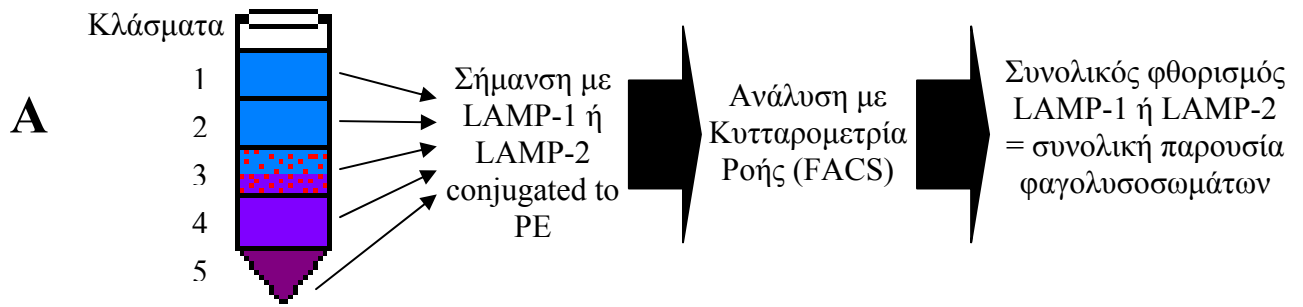
Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο διπλού ανοσοφθορισμού με σκοπό τον ταυτόχρονο εντοπισμό του βακτηρίου και του χαρακτηριστικού δείκτη των ώριμων φαγολυσοσωμάτων LAMP-1. Η μέθοδος εφαρμόστηκε στο κλάσμα των παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων από τη διαβάθμιση σακχαρόζης (Κλάσμα 3). Τα βακτήρια εντοπίστηκαν με εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια σημάνθηκαν με αντι-αντισώματα συνδεδεμένα με την φθορίζουσα χρωστική FITC. Τα φαγολυσοσώματα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της LAMP-1 συνδεδεμένα με την φθορίζουσα χρωστική φυκοερυθρίνη (PE). Δυο χαρακτηριστικές φωτογραφίες από αυτή την προσέγγιση φαίνονται παρακάτω στην Εικόνα 3.16. Αν και η συγκεκριμένη μεθοδολογία έχει περιορισμένη διακριτική ικανότητα λόγω της χρήσης απλού μικροσκοπίου φθορισμού, και ιδίως σε ένα πολύπλοκο δείγμα όπως το δικό μας, αποκτήθηκαν εικόνες που συμβαδίζουν με αυτό που αναμενόταν. Δηλαδή, εντοπίστηκε η *Coxiella burnetii* σε στενό συσχετισμό με τον χαρακτηριστικό δείκτη των ώριμων φαγολυσοσωμάτων LAMP-1. Ωστόσο, η μειωμένη διακριτική ικανότητα της μεθόδου δεν επέτρεψε την καταγραφή ξεκάθαρων φαγολυσοσωμικών δομών.



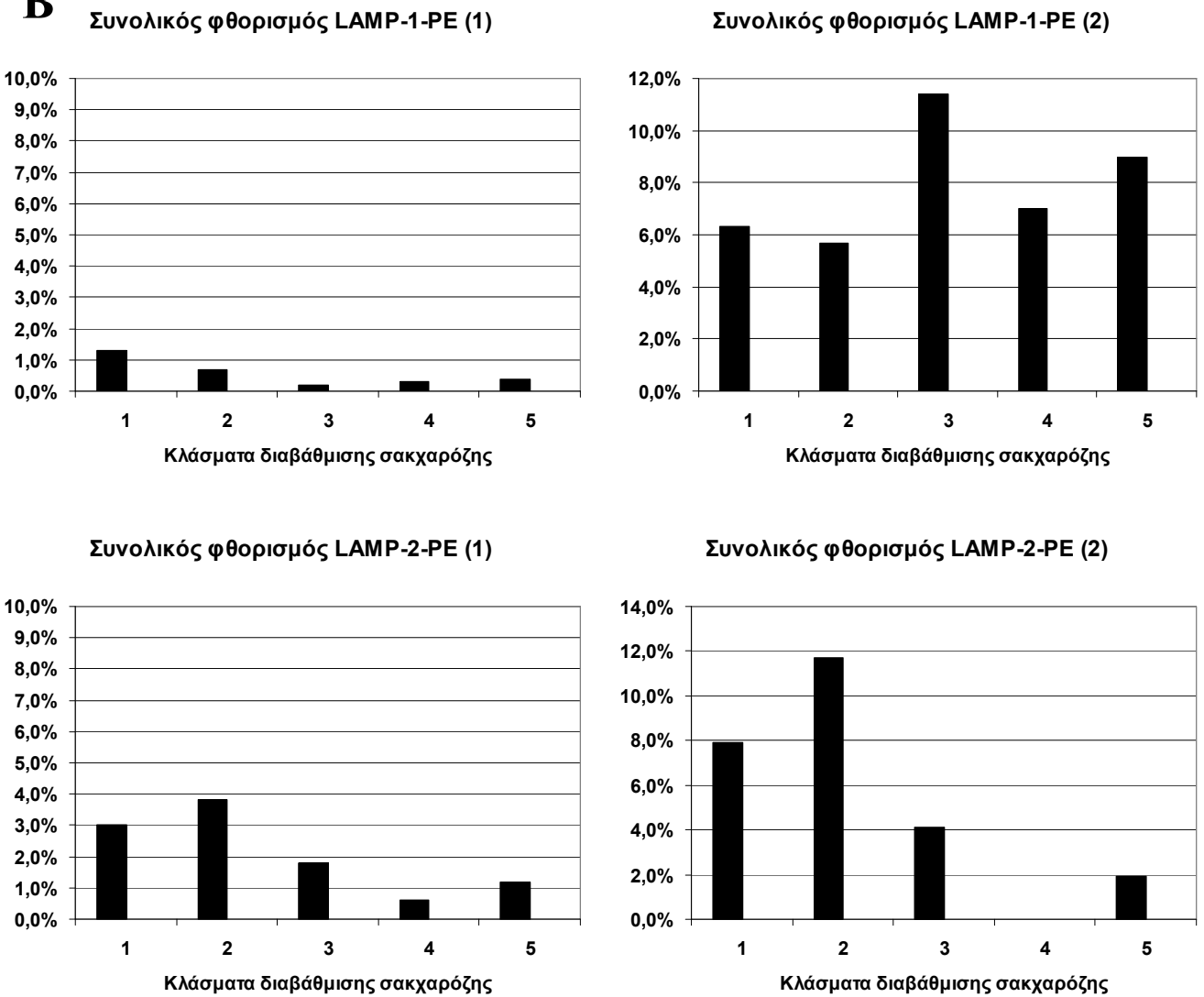
Εικόνα 3.16 Διπλός ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι στην *C. burnetii* και την LAMP-1. Το βακτήριο (πράσινος φθορισμός, FITC) εντοπίστηκε σε στενό συσχετισμό με δομές οι οποίες φέρουν τον χαρακτηριστικό φαγολυσοσωμικό δείκτη LAMP-1 (πορτοκαλί-κόκκινος φθορισμός, PE)(οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού, x1000).

3.3.3 Κυτταρομετρία ροής

Με αυτή την προσέγγιση επιχειρήσαμε καταρχήν να ποσοτικοποιήσουμε τα άθικτα ώριμα φαγολυσοσώματα μέσα στα δείγματα μας. Συγκεκριμένα, επιχειρήσαμε να σημάνουμε τα φαγολυσοσώματα και πάλι με αντισώματα για τις πρωτεΐνες «δείκτες» των ώριμων φαγολυσοσωμάτων LAMP-1 και LAMP-2, τα οποία ήταν συνδεδεμένα με την φθορίζουσα χρωστική φυκοερυθρίνη (phycoerythrin). Ο εντοπισμός των πρωτεϊνών «δεικτών» επιχειρήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε όλες τις ζώνες από την διαβάθμιση σακχαρόζης στο πρωτόκολλο απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων (Εικόνα 3.17A). Επιπλέον, αυτή η μέθοδος θα μπορούσε να μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα μεγέθη των φαγολυσοσωμάτων, αφού αυτή η δυνατότητα παρέχεται με τη κυτταρομετρία ροής. Ωστόσο, αν και οι LAMP-1 και LAMP-2 εντοπίστηκαν επιτυχία στα δείγματα μας, τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης παρουσίασαν πολύ μεγάλη διακύμανση στις περισσότερες από τις επαναλήψεις που πραγματοποιήσαμε με τις ίδιες ή διαφορετικές συνθήκες. Δυο τέτοια χαρακτηριστικά παραδείγματα παραθέτονται στην Εικόνα 3.17B. Κατά συνέπεια αυτά τα αποτελέσματα δεν θεωρήθηκαν αξιόπιστα για την εξαγωγή συγκεκριμένων συμπερασμάτων.



B

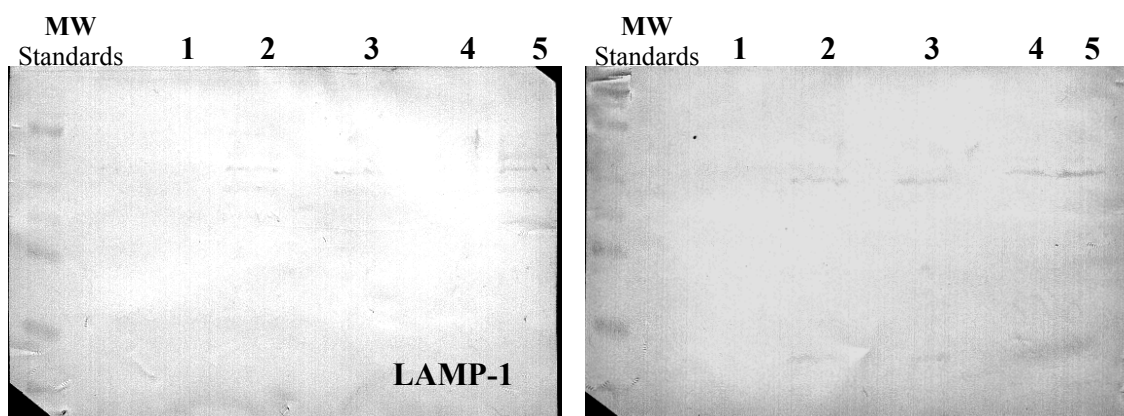


Εικόνα 3.17 **A:** Πειραματικός σχεδιασμός για την ανάλυση των κλασμάτων σακχαρόζης από το πρωτόκολλο απομόνωσης παρασιτοφόρων φαγολυσσοσωμάτων, με κυτταρομετρία ροής. **B:** Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα των αποτελεσμάτων που πήραμε με αυτή την προσέγγιση. Είναι προφανής η μεγάλη διακύμανση σε αυτά.

3.3.4 *Western blots*

Με αυτή την προσέγγιση, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.13, επιχειρήθηκε η ανοσοανίχνευση με Western Blot, χαρακτηριστικών πρωτεϊνών «δεικτών» (markers) των πρώιμων (Rab5 και EEA-1) καθώς και των ώριμων φαγολυσωμάτων (LAMP-1 και -2). Αυτή η προσέγγιση θα μπορούσε να μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με τον πληθυσμό των φαγολυσωμάτων τα οποία απομονώνονται με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε, δηλαδή αν απομονώνονται πρώιμα ή ώριμα φαγολυσώματα. Η μέθοδος εφαρμόστηκε και στις πέντε ζώνες που προκύπτουν από το πρωτόκολλο απομόνωσης των παρασιτοφόρων φαγολυσωμάτων σε διαβάθμιση σακχαρόζης, με σκοπό την αξιολόγηση του πρωτοκόλλου απομόνωσης. Τόσο η LAMP-1 όσο και η LAMP-2 εντοπίστηκαν κυρίως στις ζώνες 2, 3 και 5 (Εικόνα 3.18). Αξίζει να σημειωθεί ότι η LAMP-2 εντοπίστηκε στα δείγματα μας κατ' επανάληψη με μικρότερη ένταση απ' ότι η LAMP-1, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι η LAMP-1 είναι ο κατ' εξοχήν πρωτεϊνικός «δείκτης» αυτών των σωματιδίων. Ο δείκτης Rab5 δεν εντοπίστηκε σε κανένα από τα κλάσματα της διαβάθμισης, σε κανένα από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Το ίδιο εύρημα ισχύει για τον δείκτη EEA-1, με μοναδική εξαίρεση τον εντοπισμό της σε πολύ χαμηλή ένταση στο κλάσμα 3, δηλαδή στο κλάσμα που απομονώνονται τα φαγολυσώματα. Με βάση τα δυο τελευταία ευρήματα, συμπεραίνεται ότι με το πρωτόκολλο απομόνωσης που αναπτύχθηκε απομονώνονται κατά κύριο λόγο ώριμα φαγολυσώματα.

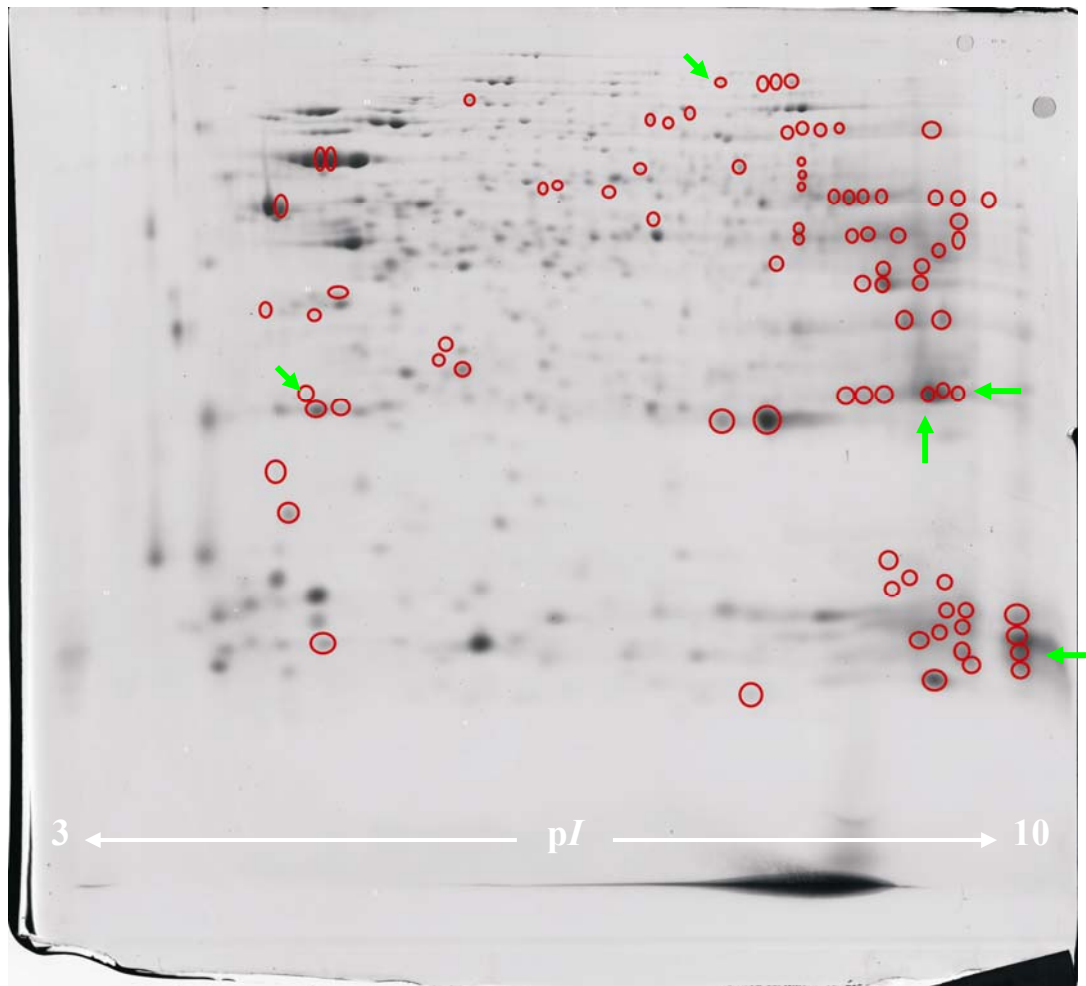
Κλάσματα διαβάθμισης σακχαρόζης



Εικόνα 3.18 Ανίχνευση των φαγολυσωμικών δεικτών LAMP-1 και -2, στα κλάσματα διαβάθμισης σακχαρόζης από το πρωτόκολλο απομόνωσης φαγολυσωμάτων.

3.3.5 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση

Τέλος, τα δείγματα απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων αναλύθηκαν με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. Επετεύχθησαν δισδιάστατες πηκτές πολυακρυλαμιδίου, με την πρώτη διάσταση σε pI 3-10, με αρκετά καλή επαναληψιμότητα. Στη συνέχεια, επιχειρήσαμε την σύγκριση αυτών των πηκτών με τον δυσδιάστατο πρωτεωμικό χάρτη αναφοράς του βακτηρίου που δημιουργήθηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο 3.1). Η σύγκριση έγινε σε μια on-off βάση, δηλαδή εντοπίσαμε πρωτεϊνικές κηλίδες οι οποίες εμφανίζονταν στις δισδιάστατες πηκτές των φαγολυσοσωμάτων αλλά όχι στον πρωτεωμικό χάρτη του βακτηρίου. Περίπου 100 πρωτεϊνικές κηλίδες εντοπίστηκαν σε αυτές τις πηκτές οι οποίες δεν εμφανίζονται στον χάρτη αναφοράς του βακτηρίου (Εικόνα 3.19). Ακολούθως, αυτές οι κηλίδες υπέστησαν πρωτεόλυση με θρυψίνη μέσα στην πηκτή (in-gel-tryptic digestion), και τα πεπτίδια που δημιουργήθηκαν αναλύθηκαν με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας MALDI-TOF/MS. Τα φάσματα τα οποία προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις βάσεις δεδομένων της *Coxiella burnetii* αλλά και με αυτές των θηλαστικών, με σκοπό την ταυτοποίηση επιπλέον πρωτεϊνών του βακτηρίου αλλά και αυτών του ξενιστή. Δυστυχώς, δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε και να ταυτοποιήσουμε καμία από τις πρωτεΐνες «δείκτες» των φαγολυσοσωμάτων (πρώιμων ή ώριμων). Ωστόσο, αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι τέσσερις από τις πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν εδώ φάνηκε να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία απ' ό τι στον δυσδιάστατο πρωτεωμικό χάρτη του ενδοκυττάριου βακτηρίου. Αυτές οι πρωτεΐνες συγκεκριμένα ήταν οι: putative outer membrane protein OmpH (Q83DT1), 27KDa outer membrane protein (Fragment)(Q9EYP0), Proline dehydrogenase/delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (Q83DR6), και τέλος η υποθετική πρωτεΐνη Q83AX3 (Εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.19 Πηκτή πολυακρυλαμιδίου διςδιάστατης ηλεκτροφόρησης δείγματος απομονωμένων παρασιτοφόρων φαγολυσοσωμάτων. Η συγκεκριμένη εικόνα συγκρίθηκε με αυτή του πρωτεώματος του στελέχους Nine Mile της *Coxiella burnetii* φάσης II (Εικόνα 3.4), και προέκυψαν λιγότερες από 100 διαφορές (κόκκινοι κύκλοι) σε μια on-off βάση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Χαρακτηρισμός του πρωτεϊνικού προφίλ της ενδοκυττάριας μορφής της *Coxiella burnetii*

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση με την πρώτη διάσταση σε ευρεία κλίμακα pI 3-10 και σε συνδυασμό με MALDI-TOF MS και PMF, εφαρμόστηκε σαν μια high-throughput προσέγγιση η οποία θα επέτρεπε την ταυτοποίηση όσο το δυνατό περισσότερων πρωτεϊνών του βακτηρίου. Πράγματι, ένας αρκετά μεγάλος αριθμός πρωτεϊνικών κηλίδων ταυτοποιήθηκε ο οποίος τελικά αντιστοιχεί σε 172 διαφορετικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Όσο αφορά την μέθοδο διαχωρισμού, η ευαισθησία της χρώσης κρίθηκε ως πολύ ικανοποιητική, αφού σε μια άλλη παρόμοια προσέγγιση όπου στο ίδιο εύρος pI χρησιμοποιήθηκε η πιο ευαίσθητη χρώση αργύρου, εμφανίστηκαν μόνο 500 πρωτεϊνικές κηλίδες [103] ενώ στη δική μας μελέτη παρουσιάστηκαν κατ' επανάληψη παραπάνω από 600. Επιπλέον, τόσο τα μοριακά βάρη, όσο και τα ισοηλεκτρικά σημεία που παρατηρήθηκαν για τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες υποδεικνύουν ένα πολύ ικανοποιητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση τις δυνατότητες της συγκεκριμένης μεθοδολογίας. Γενικά σε τέτοιου είδους προσεγγίσεις δεν αποτελεί πρόβλημα τόσο ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών αλλά η εξαγωγή από τη κάθε πρωτεΐνη ικανού αριθμού πεπτιδίων προς ταυτοποίηση. Δηλαδή ενώ φαίνονται παραπάνω από 600 πρωτεϊνικά spots στις δισδιάστατες πηκτές μόνο το ένα τρίτο αυτών ταυτοποιείται και άρα το πρόβλημα έγκειται στη φασματομετρία μάζας κυρίως λόγω της αδυναμίας παραγωγής τρυπτικών πεπτιδίων από μικρές σε μέγεθος πρωτεΐνες. Επίσης, μικρός παρέμεινε ο αριθμός των βασικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την 2-DE. Η 2-DE τεχνική δεν είναι τόσο αποδοτική όσο αφορά τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (λόγω του ότι οι μεμβρανικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα κατά την ισοηλεκτρική εστίαση τα οποία αποτυγχάνουν να περάσουν στη δεύτερη διάσταση), και επιπλέον η διαχωριστική της ικανότητα μειώνεται δραματικά στην πολύ όξινη περιοχή ($pI > 10$). Ιδιαίτερα το δεύτερο στοιχείο στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι πολύ σημαντικό, καθώς σύμφωνα με το γονιδίωμα της *Coxiella burnetii* παραπάνω από το 60% του θεωρητικού της πρωτεώματος προβλέπεται να έχει τιμές pI πάνω από το 7. Συνεπώς, εφαρμόσαμε μια

εναλλακτική μεθοδολογία, την doubled-SDS-Tricine PAGE σε συνδυασμό με MALDI-TOF MS και PMF, η οποία στοχεύει συγκεκριμένα αυτές τις κατηγορίες πρωτεϊνών, δηλαδή μεμβρανικές και αλκαλικές.

Πρόκειται και πάλι για μια δισδιάστατη gel-based τεχνική, όπου στην πρώτη διάσταση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου παρουσία ουρίας και στη δεύτερη διάσταση σε μια πηκτή SDS-Tricine-πολυακρυλαμιδίου απουσία ουρίας. Με αυτή την τεχνική προκύπτει μια διαγώνιος πρωτεϊνικών κηλίδων, όπου λόγω της παρουσίας της ουρίας στην πρώτη ηλεκτροφόρηση αλλά όχι στη δεύτερη οι πιο υδρόφοβες πρωτεΐνες αποκλίνουν της διαγώνιου εκατέρωθεν. Επιπλέον, λόγω του ότι σε αυτή τη μεθοδολογία δεν εμπλέκεται η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένο εύρος pI δεν προκύπτουν ανάλογα προβλήματα με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω για την 2-DE σε σχέση με τις μεμβρανικές και τις πολύ βασικές πρωτεΐνες. Πράγματι, αν και με την doubled-SDS-Tricine PAGE ταυτοποιήθηκαν σχεδόν πέντε φορές λιγότερες πρωτεΐνες απ' ό,τι με την 2-DE (38 έναντι 172), ήταν η μέθοδος στην οποία ταυτοποιήθηκαν οι περισσότερες βασικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες του βακτηρίου. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των αλκαλικών πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με αυτή την μέθοδο ήταν παραπάνω από το διπλάσιο του αντίστοιχου ποσοστού στην δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (36,8% έναντι 14,5%, Εικόνα 3.1B). Επιπρόσθετα, σε αυτή την προσέγγιση σημειώθηκαν και οι υψηλότερες τιμές pI με αρκετές από αυτές να βρίσκονται πάνω από το 10, και μια στο εντυπωσιακό 11,89. Γενικά, εξετάζοντας συνολικά τόσο τα θεωρητικά ισοηλεκτρικά σημεία των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν όσο και τα μοριακά τους βάρη, γίνεται εμφανές ότι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών ήταν αρκετά ικανοποιητικός. Σχετικά με την υποκυτταρική τοπολογία των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν με την doubled-SDS-Tricine PAGE, ταυτοποιήθηκαν σχεδόν τρεις φορές περισσότερες πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται σε μεμβρανικά τμήματα (μεμβρανικές ή εν δυνάμει μεμβρανικές πρωτεΐνες), απ' ό,τι με την δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 3.7 B & C). Επιπλέον, σε αυτή την προσέγγιση, το ποσοστό εκείνων των πρωτεϊνών οι οποίες προβλέπεται να φέρουν τουλάχιστον μια διαμεμβρανική έλικα ήταν σχεδόν διπλάσιο. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω ευρήματα γίνεται εμφανές ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία ήταν όντως αποδοτική και χρήσιμη για την ταυτοποίηση πρωτεϊνών με ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. πολύ βασικές ή μεμβρανικές).

Λαμβάνοντας ως δεδομένο ότι το θεωρητικό πρωτέομα της *Coxiella burnetii* προβλέπεται να είναι κατά τουλάχιστον 60% αλκαλικό ($pI > 7$) [4], μια εύλογη προσέγγιση για την ανάλυση του θα ήταν να στοχεύσει κανείς αυτές τις βασικές πρωτεΐνες. Συνεπώς, επιχειρήθηκε η ανάλυση ολικής πρωτεΐνης του βακτηρίου με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε όξινες συνθήκες αλλά και με δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικό εύρος pI (6-11), με σκοπό να βελτιωθεί η ανάλυση των πρωτεϊνών στην βασική περιοχή. Δυστυχώς, αυτή η μεθοδολογία όχι μόνο δεν βελτίωσε τον διαχωρισμό των βασικών πρωτεϊνών, αλλά μας έδωσε κατ' επανάληψη φτωχά αποτελέσματα (εικόνα 3.5). Όπως φαίνεται και στη Εικόνα 3.4, η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε εύρος pI 6-11 παρουσίασε εκτεταμένο οριζόντιο «σύρσιμο» των πρωτεϊνών. Ένα τέτοιο πρωτεϊνικό μοτίβο στην δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση υποδηλώνει ένα προβληματικό και ελλιπή διαχωρισμό κατά την πρώτη διάσταση, δηλαδή κατά την ισοηλεκτρική εστίαση. Αυτό συμβαίνει διότι κάποιες πρωτεΐνες λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων (π.χ. υδρόφοβες ή πολύ αλκαλικές) σχηματίζουν συσσωματώματα κατά την ισοηλεκτρική εστίαση, τα οποία κατά συνέπεια είτε αποτυγχάνουν εντελώς να εισέλθουν στη δεύτερη διάσταση (SDS-PAGE) είτε εισέρχονται χωρίς όμως να έχουν εστιαστεί στο ισοηλεκτρικό τους σημείο. Στη δεύτερη περίπτωση οι μη εστιασμένες πρωτεΐνες εκκινούνται κατά μήκος ενός μεγάλου τμήματος του IPG strip της ισοηλεκτρικής εστίασης, και εισχωρούν στην δεύτερη διάσταση όπου εμφανίζονται ως ένα οριζόντιο «σύρσιμο». Αξίζει να σημειωθεί ότι το εν λόγω πρόβλημα αποτελεί ένα από τα μειονεκτήματα αυτής της μεθοδολογίας γενικότερα, και πολλά εργαστήρια πρωτεομικής έχουν αφιερώσει αρκετές προσπάθειες στο να ξεπεραστεί [104].

Παρατηρώντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών στο σύνολο τους προέκυψαν και κάποιοι προβληματισμοί. Όπως έχει αναφερθεί αρκετές φορές ήδη, το θεωρητικό πρωτέομα της *Coxiella burnetii* προβλέπεται να είναι αλκαλικό σε ένα ποσοστό παραπάνω από το 60%. Ωστόσο, αυτό δεν αντανακλάστηκε στα αποτελέσματα μας, σε καμία από τις δυο μεθοδολογίες που ακολουθήθηκαν. Τα ποσοστά των αλκαλικών πρωτεϊνών και στις δυο μεθόδους ήταν κατά πολύ μικρότερα από το 60%. Επίσης, συνολικά στην μελέτη μας μόνο το 10% των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν και με τις δύο μεθόδους ήταν υδρόφοβες (GRAVY score > 0). Η ταυτοποίηση υδρόφοβών πρωτεϊνών με μεγαλύτερη

αποδοτικότητα σε “high-throughput” ή και άλλες προσεγγίσεις παραμένει μια πρόκληση στο χώρο της Πρωτεομικής.

Προβλεπόμενη λειτουργία των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών

Στις σελίδες που ακολουθούν θα συζητηθούν συγκεκριμένες λειτουργικές κατηγορίες πρωτεϊνών, καθώς και οι πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν εδώ και περιλαμβάνονται σε αυτές. Έμφαση δόθηκε σε εκείνες τις κατηγορίες πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να δώσουν απαντήσεις στα ερωτήματα τα οποία τέθηκαν αρχικά σε αυτή την μελέτη, όπως: πώς επιβιώνει η *Coxiella burnetii* στο αφιλόξενο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος; Πώς προστατεύεται το βακτήριο από τις αποδιατακτικές συνθήκες του ευκαρυωτικού φαγολυσοσώματος; Ποιοι είναι οι μηχανισμοί παθογένειας τους οποίους έχει αναπτύξει το βακτήριο, και ποιες οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή την διαδικασία; Συγκεκριμένα αυτές οι κατηγορίες είναι: αποτοξίνωση (Detoxification), ανταπόκριση στο stress και προσαρμογή σε ασυνήθιστες συνθήκες, παθογένεια, παραγωγή τοξινών και ανάπτυξη ανθεκτικότητας, και τέλος πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τον κυτταρικό φάκελο.

Αποτοξίνωση (Detoxification) Είναι προφανής η ανάγκη για αυτό το παθογόνο να εκφράζει πρωτεΐνες με την ικανότητα να το προστατεύουν από την πρωτεόλυση την οποία μπορεί να υποστεί μέσα στο όξινο φαγολυσόσωμα [68, 105, 106]. Αρκετές από τις πρωτεΐνες του βακτηρίου που ταυτοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη φαίνεται να έχουν την ικανότητα να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διεργασία, που είναι ζωτικής σημασίας για την *Coxiella burnetii*, και η οποία εν μέρει ευθύνεται για την ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει μέσα στο ακραίο φαγολυσοσωμικό περιβάλλον. Μια από τις «αποτοξινωτικές» πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν είναι η superoxide dismutase (P19685), ένα ένζυμο με καλά καταγεγραμμένη προστασία έναντι σε υπεροξειδία σε πολλά βακτήρια [107] και στην *Coxiella* [108]. Η antioxidant Ahpc/Tsa family protein (Q83B14) και η bacterioferritin comigratory protein (Q83CY8) που ταυτοποιήθηκαν στις 2D-πηκτές ανήκουν και οι δύο στις peroxyredoxins [109-113]. Δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι η bacterioferritin comigratory protein έχει ταυτοποιηθεί επίσης και στην Φάση I του ίδιου βακτηρίου [103], αλλά και σε ένα άλλο οξινό-φίλο βακτήριο, το *Helicobacter pylori* όπου και

δρα ως αποτοξινωτικός παράγοντας έναντι σε οργανικά υπεροξειδία [114]. Γενικά η Q83CY8 φαίνεται να έχει σημαίνοντα ρόλο, αφού σε μια πρόσφατη δημοσίευση αναφέρθηκε ως SCV-ειδική πρωτεΐνη και SCV-ειδικό αντιγόνο σε ορούς ασθενών που είχαν αναρρώσει από οξύ πυρετό Q [83]. Πρέπει να αναφερθεί ότι και οι τρεις αποτοξινωτικές πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν ήταν high-abundant πρωτεΐνες. Όσον αφορά την chlorohydrolase family protein (Q83E15) που ταυτοποιήθηκε, παρόλο που λίγα είναι γνωστά, προβλέπεται να συμμετέχει σε κάποια διαδικασία αποτοξίνωσης.

Ανταπόκριση στο stress και προσαρμογή σε ασυνήθιστες συνθήκες: Η ικανότητα της *Coxiella burnetii* για προσαρμογή σε ασυνήθιστες ή/ και στρεσογόνες συνθήκες, όπως αυτές που επικρατούν μέσα στο φαγολυσοσωμικό μικρο-περιβάλλον, είναι δεδομένης σημασίας για την επιβίωση της. Στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες με ήδη γνωστό ρόλο σε αυτή την διαδικασία. Αυτές περιλαμβάνουν την Strigent starvation protein A (Q83AY0), η οποία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ευρέως διαδεδομένος (highly conserved) ανάμεσα στα Gram αρνητικά βακτήρια και απαραίτητος για την αντοχή σε χαμηλό pH (acid tolerance) [115, 116]. Ταυτοποιήθηκαν επίσης δυο πρωτεΐνες (Q83AC1 και P45680) οι οποίες ανήκουν στην universal stress protein A υπεροικογένεια, και εκφράζονται κάτω από πολλές διαφορετικές συνθήκες στρες συμπεριλαμβανομένων της έλλειψης θρεπτικών υλικών (nutrient starvation) και την έκθεση σε οξειδωτικούς παράγοντες [117, 118]. Η πρωτεΐνη PhoH family like protein (Q83DX4) συναντάται επίσης σε πολλά βακτήρια εκφράζεται κατά την έλλειψη φωσφόρου [119, 120]. Με εξαίρεση την Q83AC1, όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί και στην φάση I του βακτηρίου [103].

Παθογένεια: Η εισχώρηση των ενδοκυττάρων αλλά και άλλων παθογόνων μέσα στο κύτταρο ξενιστή είναι το πρώτο βήμα και μια πραγματικά πολύ σημαντική διαδικασία. Στη παρούσα μελέτη, ταυτοποιήθηκαν οι enhanced entry proteins B και C (Q83CH8 και Q83CH9, αντίστοιχα). Πολλά *Legionella pneumophila* mutants, ίσως το πιο κοντινό στην *C. burnetii* ενδοκυττάριο παθογόνο, εκφράζουν τις enhanced entry proteins (Enh) και φαίνεται εξαιτίας αυτού του γεγονότος να μπορούν να εισέρχονται στα κύτταρα στόχους με υψηλότερους ρυθμούς απ' ό,τι τα wild-type βακτήρια [121]. Το εύρημα της δικής μας μελέτης αποτελεί μια ένδειξη για το ότι η στέλεχος Nine Mile φάσης II πιθανότατα έχει την ικανότητα να εισέρχεται στο ξενιστή με υψηλότερους ρυθμούς εξαιτίας, ή εν μέρει εξαιτίας, των enhanced entry

πρωτεϊνών. Οι ιογενείς αυτοί παράγοντες θα μπορούσαν να είναι ιδιαίτερος σημαντικόι για αυτό το συγκεκριμένο στέλεχος, και επιπλέον δεν έχει υπάρξει καμία βιβλιογραφική αναφορά για την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών στη φάση I του βακτηρίου [103]. Ο συνδυασμός αυτών των ευρημάτων θα μπορούσε να παρέχει και μια συμπληρωματική εξήγηση για την υψηλότερη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν τα στελέχη της φάσης II του βακτηρίου, σε σχέση με αυτά της φάσης I, σε κυτταρικές καλλιέργειες στο εργαστήριο. Ένας άλλος ιογενής παράγοντας που ταυτοποιήθηκε είναι ο peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Mip precursor (P51752). Αυτή η πρωτεΐνη, που έχει βρεθεί και στη φάση I του βακτηρίου [103], παρουσιάζει ενεργότητα PPIase και έχει συσχετιστεί με την ικανότητα μόλυνσης των μακροφάγων (δηλαδή τον φυσικό ξενιστή της *C. burnetii*), και επομένως θα μπορούσε να αποτελεί άλλον έναν απαραίτητο ιογενή παράγοντα για την *C. burnetii* [122]. Ένα ιδιαίτερος σημαντικό όμως εύρημα, ήταν η ταυτοποίηση της DotB πρωτεΐνης (Q83B70), που ουσιαστικά είναι η ATPάση που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την λειτουργία του συστήματος έκκρισης τύπου 4 [Secretion System Type 4 (SST4)][70, 87, 88, 123-128]. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρθηκε η ταυτοποίηση μιας πρωτεΐνης του SST4 σε αυτόν τον οργανισμό, στο επίπεδο πρωτεΐνης [129]. Επιπλέον το συγκεκριμένο εύρημα βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, γονιδιωματικές και στο επίπεδο έκφρασης, στις οποίες υποστηρίζεται ότι η *C. burnetii* κατέχει πρωτεΐνες του SST4 παρόμοιες με αυτές του Dot/Icm συστήματος της *Legionella pneumophila* [4, 91, 130, 131]. Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι δεν έχουν υπάρξει αναφορές για τη έκφραση αυτής της πρωτεΐνης στη φάση I του βακτηρίου. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να υποστηρίξει κανείς ότι η *C. burnetii* όχι μόνο εκφράζει πρωτεΐνες του SST4 αλλά και ότι διαθέτει λειτουργικό SST4 σύστημα, αλλιώς γιατί να εκφράζει την ATPάση (δηλ. την DotB) που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για τη λειτουργία του συστήματος; Επιπλέον, ταυτοποιήθηκε και μια πρωτεΐνη του SST2 (Secretion System Type 2), η protein-export protein SecB (Q83B19) [132-134]. Αυτό αποτελεί και τη πρώτη αναφορά για την έκφραση της SecB στη *C. burnetii* βακτήριο, και υποδεικνύει ότι το βακτήριο μπορεί να κατέχει κι ένα επίσης λειτουργικό σύστημα έκκρισης 2 (SST2), το οποίο και να σχετίζεται με τις διαφορετικές ιογενείς δράσεις και παθογονικότητες που παρουσιάζουν οι διάφορες απομονώσεις του βακτηρίου [135-137]. Τέλος, ταυτοποιήθηκε και μια υποθετική πρωτεΐνη (Q83DY0) η οποία φαίνεται να ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που συναντώνται σε παθογόνα στελέχη της γ-

υποκατηγορίας των πρωτεοβακτηρίων –όπου και ανήκει η *C. burnetii*-. Παρόλο που η ακριβής λειτουργία των πρωτεΐνων αυτής της οικογένειας είναι άγνωστη εικάζεται ότι σχετίζονται με την παθογένεια. Καμία από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες δεν έχει ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα στη φάση I, κάτι το οποίο θα μπορούσε να παραπέμψει σε διαφορετική έκφραση των συστημάτων έκκρισης μεταξύ των δύο φάσεων του βακτηρίου.

Παραγωγή τοξινών και ανθεκτικότητα: Μια άλλη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε και η οποία σχετίζεται με την παθογένεια στα πλαίσια της παραγωγής τοξινών και ανάπτυξη ανθεκτικότητας, είναι η *tolB precursor* (Q83F59). Τα γονίδια *tol-pal* είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην παθογένεια των βακτηρίων και σε ζώα αλλά και σε φυτά, όπου και σε ορισμένες περιπτώσεις σχετίζονται άμεσα και με τοξίνες [138-143]. Η πρωτεΐνη *N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase* (Q83EE5) που ταυτοποιήθηκε, είναι μια autolysin [144]. Αυτές οι πρωτεΐνες εικάζεται ότι εμπλέκονται στην παθογένεια του βακτηρίου *Streptococcus pneumoniae* και άλλων πνευμονιόκοκκων, με το να απελευθερώνουν ιογενείς παράγοντες από το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου καθώς και συστατικά-τμήματα από το κυτταρικό τοίχος [145-149]. Καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν έχουν αναφερθεί στην φάση I [103].

Πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τον κυτταρικό φάκελο: Η φάση I της *C. burnetii*, στον λιποπολυσακχαρίτη της (LPS I) περιέχει δυο πολύ ασυνήθιστα σάκχαρα, την virenose και τη dihydroxyhydrdoxystreptose [64]. Οι πρωτεΐνες NDP-hexose 3-C-methyltransferase TylCIII (Q83DL9) και Methyltransferase (FkbM family) (Q83DM10) είναι υπεύθυνες για τη σύνθεση της virenose και της dihydroxyhydrdoxystreptose αντιστοίχως [150]. Στην παρούσα μελέτη, δεν ταυτοποιήθηκε καμία από τις δυο, σε αντίθεση με μια πρωτεομική μελέτη που έγινε στη φάση I [103], κάτι το οποίο επαναβεβαιώνει ότι αυτά τα δυο σάκχαρα απουσιάζουν από την φάση II. Γενικά εικάζεται ότι οι διακυμάνσεις που παρουσιάζονται μεταξύ των δυο φάσεων του βακτηρίου εν μέρει οφείλονται στις διαφοροποιήσεις του λιποπολυσακχαρίτη τους [93, 151]. Τέλος, ταυτοποιήθηκαν και κάποιες πολύ αλκαλικές πρωτεΐνες (με τιμές pI κοντά ή και παραπάνω από 9) putative λιποπρωτεΐνες και πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (Q83AY6, Q83FA1, Q83ED0, και Q83DT1).

Σύγκριση με προηγούμενες πρωτεομικές μελέτες που έχουν γίνει στην *Coxiella burnetii*

Σε μια πρόσφατη μελέτη του πρωτεώματος της φάσης I του στελέχους Nine Mile της *Coxiella burnetii* ταυτοποιήθηκαν 197 πρωτεΐνες [103]. Περίπου 100 από τις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στη δική μας μελέτη, δεν ταυτοποιήθηκαν στην αντίστοιχη της φάσης I. Συνεπώς, αυτές οι πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια αρχική λίστα για μελλοντικές μελέτες με σκοπό την ανάδειξη πρωτεϊνών οι οποίες είναι μοναδικές ή χαρακτηριστικές για κάθε μια από τις φάσεις του βακτηρίου. Για παράδειγμα, πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με την παθογένεια και εκφράζονται στη φάση II του βακτηρίου αλλά όχι στη φάση I, θα μπορούσαν να ευθύνονται για την κατά πολύ υψηλότερη μολυσματικότητα που παρουσιάζουν οι οργανισμοί της φάσης II έναντι αυτών της φάσης I σε κυτταροκαλλιέργειες. Ωστόσο, αυτό είναι κάτι το οποίο χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Σε μια ακόμη πιο πρόσφατη εργασία, ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* οι οποίες υπερ-εκφράζονται συγκεκριμένα σε μια από τις δυο μορφές του βακτηρίου [large-cell (LCV) και small-cell (SCV) variants], δηλαδή είναι χαρακτηριστικές για κάθε μορφή [83]. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* οι οποίες είναι ανοσογόνες. Στην δική μας μελέτη ταυτοποιήθηκαν 14 από τις 15 LCV-συγκεκριμένες πρωτεΐνες, και 1 από τις 4 SCV-συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Όσο αφορά τις ανοσογόνες πρωτεΐνες, στην παρούσα μελέτη ταυτοποιήθηκαν 8 από τις 10 που αναφέρουν οι Coleman *et al.* (2007). Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την άποψη τόσο για την μεγάλη αφθονία (high-abundance) όσο και για την σημαντικότητα αυτών των πρωτεϊνών.

Πιθανές πρωτεΐνες “effectors” της *Coxiella burnetii*

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 3.2, με αυτή την σειρά πειραμάτων επιχειρήθηκε η μελέτη των πρωτεϊνών που πιθανώς εκκρίνονται από το βακτήριο στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Οι σκέψεις που οδήγησαν στον σχεδιασμό αυτής της προσέγγισης ήταν οι εξής: η *Coxiella burnetii* διαθέτει λειτουργικά εκκριτικά συστήματα, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται τόσο από τη δική μας μελέτη, όσο κι από αυτές άλλων εργαστηρίων. Κατά συνέπεια, το βακτήριο αναμένεται να

εκφράζει και να εκκρίνει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή κάποιες πρωτεΐνες “effectors” με την ικανότητα να αναδιοργανώνουν και να κατευθύνουν τα διάφορα συστήματα του ξενιστή προς όφελος του παράσιτου. Οι πρωτεΐνες “effectors” φέρουν κάποια χαρακτηριστικά μοτίβα και domains τα οποία τους επιτρέπουν συνήθως να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες και/ ή σύμπλοκα πρωτεϊνών ενός ευκαρυωτικού κυττάρου, δηλαδή του κυττάρου ξενιστή. Η ταυτοποίηση ωστόσο πρωτεϊνών ως μόρια “effectors” και δη ως υποστρώματα κάποιου συστήματος έκκρισης, απαιτούν εκτεταμένες μελέτες πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων οι οποίες είναι ιδιαίτερες εξειδικευμένες, χρονοβόρες και σε πολλές περιπτώσεις δαπανηρές. Όμως, οι πρωτεΐνες αυτές είναι δυνατό να εντοπιστούν και να ταυτοποιηθούν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή με σχετικά απλή και αξιόπιστη μεθοδολογία. Η ταυτοποίηση λοιπόν των πρωτεϊνών του βακτηρίου οι οποίες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, σε συνδυασμό με την ανάλυση των αμινοξικών τους αλληλουχιών με υπολογιστικά προγράμματα –*in silico* ανάλυση- για την ανάδειξη μοτίβων μορίων “effectors”, μπορεί να μας παρέχει μια λίστα πιθανών πρωτεϊνών “effectors” της *Coxiella burnetii*. Η *in silico* ανάλυση της κάθε ταυτοποιημένης πρωτεΐνης ξεχωριστά μπορεί να αναδείξει συγκεκριμένους μηχανισμούς παθογένειας και επιβίωσης τους οποίους επιστρατεύει αυτό το παράσιτο, και άρα να δώσει ουσιαστικές απαντήσεις στα ερωτήματα τα οποία τέθηκαν στην παρούσα μελέτη. Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι, εφόσον ο ενδοκυττάριος κύκλος ζωής της *Coxiella burnetii* παρουσιάζει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλα υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα, είναι αναμενόμενο το βακτήριο αυτό να εκφράζει και να εκκρίνει πρωτεΐνες “effectors” οι οποίες «πειρατεύουν» τα συστήματα του ξενιστή με διαφορετικό τρόπο. Για παράδειγμα, τα ενδοκυττάρια παράσιτα των γενών *Legionella* και *Brucella* εκφράζουν και εκκρίνουν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή τους πρωτεΐνες “effectors” οι οποίες αποτρέπουν την σύμπτυξη των φαγοσωμάτων με τα λυσοσώματα, έτσι ώστε να αποφύγουν την αποδιάταξη τους. Είναι σχεδόν δεδομένο ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεν εκφράζονται στην *Coxiella*, όπου η δημιουργία ενός ώριμου και πλήρως σχηματισμένου φαγολυσωσώματος είναι απαραίτητη για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό της.

Σχετικά με την μεθοδολογία η οποία αναπτύχθηκε, αυτή είχε τους εξής στόχους: (α) να διαχωριστούν τα ενδοκυττάρια βακτήρια από το κύτταρο ξενιστή και να απομονωθούν μόνο οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος του με όσο

το δυνατό πιο ήπιο τρόπο απομόνωσης έτσι ώστε να μη διασπαστούν και τα ενδοκυττάρια βακτήρια, (β) οι πρωτεΐνες που θα απομονωθούν να διαχωριστούν με μια μέθοδο η οποία δε θα είναι περιοριστική για κάποιες πρωτεΐνες, και (γ) να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μια πολύ ισχυρή από άποψη εγκυρότητας προσέγγιση. Σχετικά με το πρώτο σκέλος, μετά από μια σειρά πειραμάτων επετεύχθει ένα πρωτόκολλο απομόνωσης των πρωτεϊνών αρκετά αξιόπιστο και επαναλήψιμο. Η μεθοδολογία η οποία αναπτύχθηκε ήταν ήπια αρκετά έτσι ώστε να μη διαρρυγνείονται οι ενδοκυττάριοι οργανισμοί, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα μας, αφού δεν ταυτοποιήθηκε σχεδόν καμία δομική πρωτεΐνη του βακτηρίου (Παράρτημα 2). Εξαίρεση αποτελούν κάποιες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες σε πολλές περιπτώσεις είναι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου και άρα είναι επόμενο κάποια θραύσματα τους να εντοπίζονται εκτός του βακτηρίου. Η μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών έγινε με την πλέον απλή προσέγγιση της SDS-PAGE, η οποία και παρουσίασε ένα σταθερό πρωτεϊνικό μοτίβο. Αν και αυτή η προσέγγιση έχει σαφώς περιορισμένη διαχωριστική ικανότητα (οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο σε μια διάσταση με βάση το μοριακό τους βάρος), δεν είναι περιοριστική για πρωτεΐνες με ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως είναι για παράδειγμα η κλασσική δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση για τις πολύ όξινες ή πολύ βασικές πρωτεΐνες ή για τις υδρόφοβες πρωτεΐνες. Στην περίπτωση της *Coxiella* αυτό είναι ιδιαίτερος σημαντικό καθότι αναμένεται να εκφράζει πολλές πρωτεΐνες με τέτοια χαρακτηριστικά. Τέλος, για να εξασφαλιστεί η υψηλή αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας αναλύθηκαν τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα (Εικόνα 3.8), και το πείραμα επιπλέον έγινε εις διπλούν. Με αυτό τον τρόπο προέκυψαν τρεις κατηγορίες ταυτοποιημένων πρωτεϊνών: αυτές που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα, αυτές που ταυτοποιήθηκαν σε δυο, και αυτές που ταυτοποιήθηκαν μόνο σε ένα. Η συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση των αποτελεσμάτων μας απετέλεσε και ένα από τα βασικά κριτήρια αξιολόγησης της εγκυρότητας τους. Δηλαδή, οι πρωτεΐνες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα θεωρήθηκαν ως τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, εδώ χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος μάζας τεχνολογίας ESI-MS/MS, ο οποίος μπορεί να μην είναι high-throughput αλλά παρέχει πολύ πιο αξιόπιστα αποτελέσματα απ' ό,τι η τεχνολογία MALDI-TOF MS με PMF. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο Παράρτημα 2 πολλά από τα scores ταυτοποίησης είναι αρκετά χαμηλά. Αυτό οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις στο γεγονός ότι για κάθε πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε ένα ή

και δυο μικρά πεπτίδια, τα οποία καλύπτουν ένα μικρό μόνο μέρος της συνολικής αμινοξικής αλληλουχίας της κάθε πρωτεΐνης. Για να εξασφαλιστεί ότι πρόκειται για έγκυρα αποτελέσματα και όχι ψευδώς θετικά, το κάθε ταυτοποιημένο πεπτίδιο υποβλήθηκε σε εκτεταμένη αναζήτηση Blast (Blast search). Από αυτή την προσέγγιση φάνηκε όντως ότι όλα τα ταυτοποιημένα πεπτίδια ανήκουν σε πρωτεΐνες του βακτηρίου και πιο σημαντικά ότι δεν ανήκουν σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή. Μια άλλη εξήγηση για τα χαμηλά scores ταυτοποίησης θα μπορούσε να είναι η χαμηλή συγκέντρωση αυτών των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, κάτι το οποίο είναι δεδομένο. Τέλος, το γεγονός ότι από ένα αρκετά πολύπλοκο δείγμα –όπως το δικό μας– ταυτοποιήθηκε ένας μικρός αριθμός πρωτεϊνών του βακτηρίου (50 στο σύνολο τους), είναι ενθαρρυντικό καθώς ο αριθμός των πρωτεϊνών “effectors” γενικά και σε άλλα παράσιτα αναμένεται να είναι αρκετά μικρός.

Η *in silico* ανάλυση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών ανέδειξε δυο πολύ σημαντικά και ενδιαφέροντα ευρήματα. Το πρώτο είναι ότι και στις τρεις κατηγορίες ταυτοποιημένων πρωτεϊνών, τα ποσοστά αυτών που φέρουν κάποιο μοτίβο χαρακτηριστικό των μορίων “effectors” ή έχουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με ευκαρυωτικές πρωτεΐνες ή γενικά εμπλέκονται με κάποιο τρόπο σε μηχανισμούς παθογένειας και επιβίωσης, ξεπερνούν το 55% (Εικόνα 3.10). Συγκεκριμένα, και στις τρεις κατηγορίες σχεδόν το 1/3 των πρωτεϊνών φαίνεται να φέρουν κάποια από τα πιο χαρακτηριστικά μοτίβα των μορίων “effectors”, δηλαδή τα coiled-coil domains, τις leucine repeats, και σηματοδοτικά πεπτίδια έκκρισης Tat (Πίνακας 3.2). Το εν λόγω εύρημα ενισχύει κατά πολύ, και ουσιαστικά επιβεβαιώνει την αρχική μας υπόθεση, ότι δηλαδή οι πρωτεΐνες “effectors” που εκφράζονται και εκκρίνονται από την *Coxiella burnetii* μπορούν να ταυτοποιηθούν στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Το δεύτερο πολύ ενδιαφέρον εύρημα είναι ότι και στις τρεις κατηγορίες ταυτοποιημένων πρωτεϊνών τα ποσοστά των αλκαλικών πρωτεϊνών ξεπερνούν το 55%, και μάλιστα σε δυο από αυτές και το 60% (Εικόνα 3.9). Στο σύνολο των 50 πρωτεϊνών, το 58% είχαν θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI) πάνω από 8 (Παράρτημα 2). Στη δημοσίευση του ολοκληρωμένου γονιδιώματος της *Coxiella burnetii* [4], η ομάδα προτείνει ότι το ιδιαίτερα αλκαλικό θεωρητικό πρωτόμα του βακτηρίου είναι πιθανώς ένας τρόπος τον οποίο ανέπτυξε το παράσιτο με την πάροδο του χρόνου για να αντισταθμίσει το έντονα όξινο περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσεται, δηλαδή στο ευκαρυωτικό

φαγολυσόσωμα. Η υπόθεση τους αυτή ενισχύεται επιπλέον από την παρατήρηση ότι κάτι ανάλογο συμβαίνει και με το θεωρητικό πρωτέομα ενός άλλου οξεόφιλου (acidophyle) βακτηρίου, του *Helicobacter pylori*, το οποίο αναπτύσσεται στο πολύ όξινο περιβάλλον του ανθρώπινου στομάχου. Ωστόσο, από τις μελέτες μας προέκυψε ότι ενώ τουλάχιστον τα 2/3 των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή έχουν πολύ βασικό pI, στο συνολικό πρωτέομα του βακτηρίου το οποίο ταυτοποιήσαμε (Κεφάλαια 3.1 και 4.1) μόλις το 1/5 των πρωτεϊνών είχαν βασικό pI. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή την αντίθεση θα μπορούσε να είναι ότι οι πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή έρχονται αρχικά σε άμεση επαφή με το όξινο μικροπεριβάλλον του φαγολυσοσώματος, και άρα υπάρχει η ανάγκη αντιστάθμισης αυτού του παράγοντα από την πλευρά των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Από την άλλη πλευρά, πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίζονται εσωτερικά του βακτηρίου, είτε ως δομικές είτε ως λειτουργικές μονάδες, δεν αντιμετωπίζουν την πρόκληση ενός πολύ όξινου περιβάλλοντος. Τόσο στη δική μας μελέτη, όσο και σε αυτές άλλων εργαστηρίων που μελετούν πρωτεωμικά την *Coxiella* είναι η πρώτη φορά που αντανάκλαται με αρκετή ακρίβεια η προβλεπόμενη αλκαλική φύση αυτού του πρωτεώματος.

Στη συνέχεια θα συζητηθούν κάποιες από τις πιθανές πρωτεΐνες “effectors” που ταυτοποιήθηκαν, με ιδιαίτερη έμφαση να δίνεται σε αυτές που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία διαφορετικά βιολογικά δείγματα. Η **NADH dehydrogenase subunit I (Q83BR3)** ήταν πιο high-abundant πρωτεΐνη σε όλα τα δείγματα που δοκιμάστηκαν. Πράγματι, πεπτίδια της πρωτεΐνης ταυτοποιήθηκαν σχεδόν σε όλο το μήκος των πηκτών πολυακρυλαμιδίου και των τριών διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων. Φέρει σηματοδοτικό πεπτίδιο και μια περιοχή πρόσδεσης σιδήρου-θείου μέσω του οποίου μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADH σε quinines στην αναπνευστική αλυσίδα. Η πρωτεΐνη αυτή βρίσκεται στην μεμβράνη του βακτηρίου (στην έσω σύμφωνα με το EXPASY) μεταφέροντας ιόντα υδρογόνου από το εσωτερικό του βακτηρίου προς τον εξωκυττάριο χώρο, διατηρώντας το pH στο εσωτερικό του βακτηρίου σε φυσιολογικά επίπεδα.

Η **Ribonuclease R (Q83CM3)** ταυτοποιήθηκε και στα τρία δείγματα από μία φορά στην ίδια ακριβώς ζώνη ακρυλαμιδίου. Η ανάλυση της αμινοξικής της αλληλουχίας αποκάλυψε πολλά ενδιαφέροντα μοτίβα. Καταρχήν φέρει ένα “bipartite

nuclear localization signal” το οποίο προσδίδει την ικανότητα σε αυτή την πρωτεΐνη να μεταφέρεται στον πυρήνα του ξενιστή. Κατά δεύτερον, έχει διάφορα προφίλ και περιοχές (domains) που παραπέμπουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και RNA. Η περιοχή S1 της πρωτεΐνης παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα τον cold-shock domain (CSD). Πρόκειται για ένα domain πρόσδεσης RNA, το οποίο στα βακτήρια λειτουργεί ως RNA-σαπερόνη και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς εμπλέκεται στην ρύθμιση της μετάφρασης. Άρα, με την ταυτόχρονη ύπαρξη του bipartite nuclear localization signal και του CSD μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι αυτή η πρωτεΐνη καταλήγει στον πυρήνα του ξενιστή όπου και ρυθμίζει την μετάφραση των πρωτεϊνών του ευεργετικά προς το βακτήριο (είτε μπλοκάροντας τη σηματοδότηση για απόπτωση, είτε κάποιον άλλο μηχανισμό άμυνας του ξενιστή), στο επίπεδο του mRNA. Τέλος, βρέθηκε ένα άλλο domain (UPF0103) αγνώστου λειτουργίας το οποίο όμως βρίσκεται και σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *VacB* το οποίο στη *Legionella* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη VacB που είναι γνωστό υπόστρωμα του Secretion System 4 αυτού του βακτηρίου [152].

Η **30S ribosomal protein S2 (Q9X5U8)** ταυτοποιήθηκε κι αυτή σε μόνο μία ζώνη, η οποία ήταν η ίδια και στα τρία δείγματα. Εντοπίστηκε ένα coiled-coil domain, χαρακτηριστικό μοτίβο των πρωτεϊνών “effector”. Με αρκετά χαμηλότερο βαθμό αξιοπιστίας (below confidence levels) εντοπίστηκε και μια περιοχή πλούσια σε λυσίνη η οποία θα μπορούσε να προσδίδει στην πρωτεΐνη την ικανότητα πρόσδεσης με λιπίδια. Πολύ σημαντικό είναι ότι η πρωτεΐνη είναι κατά 58% και 42% ταυτόσημη αντίστοιχα με τις 30S ribosomal protein S2 της *Legionella* (A5ICL0) και της *Orientia tsutsugamushi* (A5CE04)(strain *Boryong*, *Rickettsia tsutsugamushi*), οι οποίες και έχουν αναφερθεί ως υποστρώματα του SS4 [152, 153].

Στη **DNA repair protein RecN (Q83C37)** εντοπίστηκαν, Δύο coiled-coil domains και δύο leucine-rich repeats, ίσως τα πιο χαρακτηριστικά μοτίβα των πρωτεϊνών “effector”. Επιπρόσθετο στοιχείο είναι τα υψηλά scores που σημειώθηκαν για τη ύπαρξη ευκαρυωτικών ακολουθιών όπως LRR και PFTA στο πρόγραμμα *Rep*.

Ταυτοποιήθηκε επίσης μια υποθετική πρωτεΐνη [**Orf 145, hypothetical protein QpH1_p21(Putative uncharacterized protein)(Q45942)**] η οποία φαίνεται να

κωδικοποιείται από πλασμίδιο και στην οποία εντοπίστηκε ένα coiled-coil domain. Δεν βρέθηκε κανένα άλλο γνωστό μοτίβο ή προφίλ που να παραπέμπει σε κάποια πιο συγκεκριμένη λειτουργία.

Η υποθετική πρωτεΐνη **CburD_01001397** ταυτοποιήθηκε με σχετικά υψηλό score (76) σε μόνο μία ζώνη, η οποία ήταν η ίδια και στα τρία δείγματα. Φέρει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, καθώς και διάφορα μοτίβα κινασών.

Αν και στην **alcohol dehydrogenase** που ταυτοποιήθηκε δεν εντοπίστηκαν ευκαρυωτικά μοτίβα, το ενδιαφέρον με αυτή την πρωτεΐνη είναι ότι κωδικοποιείται από μια περιοχή του γονιδιώματος στην οποία γειτνιάζει με γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του *Icm* συστήματος καθώς και για πρωτεΐνες με ακολουθίες ankyrin. Οι ακολουθίες ankyrin είναι και αυτές από τις χαρακτηριστικές ακολουθίες που απαντώνται στις πρωτεΐνες “effectors”, και εμπλέκονται σε μια αρκετά μεγάλη γκάμα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στο ευκαρυωτικό κύτταρο.

Παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα

Η απομόνωση άθικτων φαγολυσοσωμάτων τα οποία φέρουν *Coxiella burnetii* ήταν αυτή καθαυτή μια πρόκληση, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν έχει επιτευχθεί. Η σημαντικότητα αυτού του εγχειρήματος έγκειται στο ότι θα μπορούσαν να αντληθούν πολύ σημαντικές πληροφορίες για το ιδιότυπο φαγολυσοσώμα της *Coxiella burnetii*. Ωστόσο, η μελέτη τους αποδείχτηκε αρκετά προβληματική, και κυρίως όσο αφορά την απομόνωση τους. Υπάρχουν αρκετές εξηγήσεις για αυτό το γεγονός. Καταρχήν, ήταν αναμενόμενο ότι τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα θα ήταν ευαίσθητες δομές, αφού ουσιαστικά προέρχονται από «μπαλώματα» μεμβρανικών τμημάτων του κυττάρου ξενιστή και συγκεκριμένα από λυσοσώματα, ενδοσώματα-φαγοςώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi, ακόμη και από αυτοφαγικά κυστίδια [1, 86, 154]. Πρόκειται δηλαδή, για σωματίδια τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν υφίστανται στο ευκαρυωτικό κύτταρο αλλά δημιουργούνται με την παρέμβαση του ενδοκυττάρου παράσιτου. Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι παρά το γεγονός ότι εφαρμόστηκε όσο πιο ήπια μεθοδολογία γινόταν, κάθε επιπλέον βήμα απομόνωσης και καθαρισμού των φαγολυσοσωμάτων

κατέληξε σε επιπλέον απώλειες. Ένα άλλο στοιχείο είναι ότι δεν είναι δυνατό να συγχρονιστεί μια μολυσμένη καλλιέργεια, έτσι ώστε όλα τα παρασιτοφόρα φαγολυσοσώματα να βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ωρίμανσης. Κατά συνέπεια, στα δείγματα απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων υπήρχε ανομοιογένεια στον πληθυσμό, όσο αφορά τα μεγέθη τους. Αυτό φάνηκε τόσο στην χρώση Gimenez όσο και στα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τα Western Blots υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός των απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων δεν περιείχε –τουλάχιστον σε ανιχνεύσιμες ποσότητες- πρώιμα φαγολυσοσώματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δυο άλλες μεθοδολογίες που θα μπορούσαν να μας δώσουν μια εικόνα σχετικά με τα απομονωμένα φαγολυσοσώματα είναι αυτή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και του συνεστιακού μικροσκοπίου (confocal microscopy). Ωστόσο, καμία από αυτές τις δυο μεθοδολογίες δεν ήταν δυνατό να πραγματοποιηθεί για διαφορετικούς λόγους η κάθε μια. Για την ηλεκτρονική μικροσκοπία χρειαζόταν μια σχετικά πολύ μεγάλη ποσότητα δείγματος. Όπως προαναφέρθηκε η ποσότητα απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων από κάθε φλάσκα μολυσμένων κυττάρων ήταν ιδιαίτερα χαμηλή, και άρα μια τέτοια προσέγγιση θα είχε και μεγάλο κόστος αλλά και θα απαιτούσε πολύ χρόνο. Στη δεύτερη περίπτωση όπου τα δείγματα ουσιαστικά καλλιεργούνται πάνω σε πλάκες μικροσκοπίας και μετά παρατηρούνται στο όργανο, προέκυψε θέμα ασφάλειας αφού δεν επιτρέπεται να μεταφερθούν μη απενεργοποιημένοι μικροοργανισμοί από το εργαστήριο αρνητικής πίεσης (BSL-3). Δηλαδή θα έπρεπε να βρίσκεται το συνεστιακό μικροσκόπιο μέσα σε εργαστήριο αρνητικής πίεσης για να πραγματοποιηθεί μια τέτοια προσέγγιση.

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων απομονωμένων φαγολυσοσωμάτων, και η επακόλουθη σύγκριση τους με τον δυσδιάστατο χάρτη αναφοράς του ενδοκυττάριου βακτηρίου δεν απέδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, και κυρίως όσο αφορά τον εντοπισμό των πρωτεϊνών «δεικτών» των φαγολυσοσωμάτων. Μια πιθανή αιτιολογία για τον μη εντοπισμό αυτών των δεικτών θα μπορούσε να είναι ότι επειδή οι εν λόγω δείκτες είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες σχημάτισαν συσσωματώματα κατά την ισοηλεκτρική εστίαση και έτσι δεν κατάφεραν να περάσουν στην δεύτερη διάσταση και άρα να ταυτοποιηθούν. Ωστόσο,

εντοπίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν κάποιες πρωτεΐνες του βακτηρίου οι οποίες παρουσίασαν διαφορετική έκφραση.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Δημιουργήθηκε ο πρωτεομικός «χάρτης» του στελέχους αναφοράς *Coxiella burnetii*, Nine Mile, Φάσης II

Η πληροφορία που αντλήθηκε συνολικά από την ανάλυση του πρωτεώματος είναι από μόνη της πολύ σημαντική για την καταγραφή και μόνο των πρωτεϊνών που όντως εκφράζονται από αυτό τον οργανισμό, δεδομένης της μεγάλης «πλαστικότητας» του γονιδιώματος του. Αυτό συμπεριλαμβάνει την ταυτοποίηση υποθετικών πρωτεϊνών, καθώς και την καταγραφή των high-abundant πρωτεϊνών. Ο πρωτεομικός χάρτης του βακτηρίου αποτελεί επιπλέον το θεμελιώδες βήμα για μια πληθώρα μελετών που μπορούν να βασιστούν σε αυτό. Συγκεκριμένα ανοίγει ο δρόμος για:

- (i) συγκριτικές πρωτεομικές μελέτες με τη Φάση I του βακτηρίου, με σκοπό την ανάδειξη εκείνων των παραγόντων που καθιστούν τη μια φάση τόσο πιο μολυσματική στη φύση από την άλλη. Ήδη στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκε μια λίστα 100 περίπου πρωτεϊνών η οποίες ταυτοποιήθηκαν εδώ, αλλά όχι σε μια άλλη πρωτεομική μελέτη της φάσης I.
- (ii) γενικότερα συγκριτικές πρωτεομικές μελέτες μεταξύ στελεχών που παρουσιάζουν διαφορές σε οποιοδήποτε επίπεδο, με σκοπό την ανάδειξη των πρωτεϊνικών παραγόντων που καθορίζουν αυτές τις διαφορές.
- (iii) τον ανοσοεντοπισμό πρωτεϊνών «δεικτών» στο δυσδιάστατο πρωτεομικό χάρτη του βακτηρίου που δημιουργήθηκε, με τη χρήση ορών αίματος ασθενών που έχουν προσβληθεί από πυρετό “Q”. Με αυτή την προσέγγιση μπορούν να αναδειχθούν βελτιωμένοι διαγνωστικοί στόχοι, ή ακόμη πιο σημαντικά προγνωστικοί δείκτες για την εξέλιξη της νόσου.
- (iv) τη δημιουργία βελτιωμένων, πιο ευαίσθητων μοριακών διαγνωστικών προσεγγίσεων με βάση τις high-abundant πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, αφού λόγω του υψηλού επιπέδου έκφρασης τους θα υπάρχουν μεγαλύτερες πιθανότητες για τον εντοπισμό τους.

2. Ταυτοποιήθηκαν πρωτεΐνες «κλειδιά» για τους μηχανισμούς παθογένειας και επιβίωσης που χρησιμοποιεί το βακτήριο μέσα στο κύτταρο ξενιστή

Η ανάδειξη συγκεκριμένων μηχανισμών παθογένειας και επιβίωσης τους οποίους χρησιμοποιεί η *Coxiella burnetii* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, δεδομένου του ιδιότυπου ενδοκυττάρου κύκλου ζωής της. Καλύφθηκε ένα μεγάλο μέρος της απάντησης στο ερώτημα που τέθηκε αρχικά σε αυτή την μελέτη, δηλαδή το πώς επιβιώνει το βακτήριο μέσα στο ευκαρυωτικό φαγολυσόσωμα. Αυτές οι πρωτεΐνες «κλειδιά» μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικούς θεραπευτικούς στόχους, αφού η δέσμευση/ απενεργοποίηση μιας από αυτές θα μπορούσε να οδηγήσει στην κατάρρευση της στρατηγικής παρασιτισμού του βακτηρίου, και άρα στο θάνατο του.

3. Επιβεβαιώθηκε για πρώτη φορά σε επίπεδο πρωτεϊνών η ύπαρξη ενός λειτουργικού συστήματος έκκρισης τύπου 4

Η μελέτη του συστήματος έκκρισης τύπου 4 ως σύστημα παθογένειας των ενδοκυττάρων βακτηρίων, αν και βρίσκεται στα πρώτα στάδια ακόμη έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον διεθνώς. Μας παρέχει πληροφορίες τόσο για τους τρόπους με τους οποίους τα βακτήρια γίνονται «πειρατές» των ευκαρυωτικών κυττάρων, όσο και για την εξέλιξη τους και την συν-εξέλιξη με τους ξενιστές τους. Λίγα είναι γνωστά σχετικά με το σύστημα έκκρισης 4 της *Coxiella*, πέρα από το ότι εκφράζει παρόμοιους παράγοντες με αυτούς του SST4 της *Legionella*. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε η λειτουργικότητα αυτού του συστήματος με την ταυτοποίηση της ATPάσης DotB η οποία παρέχει στο σύστημα την ενέργεια που απαιτείται.

4. Δημιουργήθηκε μια λίστα με πιθανές πρωτεΐνες “effectors” του βακτηρίου

Αυτό το σκέλος της μελέτης παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς παθογένειας του βακτηρίου. Επιπλέον, ανοίγει το δρόμο για την ουσιαστική μελέτη του ρόλου του συστήματος έκκρισης τύπου 4 στην *C. burnetii*, ο οποίος αναμένεται να είναι αρκετά διαφορετικός απ’ ότι είναι σε άλλα βακτήρια. Το τελευταίο προκύπτει από το γεγονός ότι η *Coxiella* αποτελεί το μοναδικό γνωστό βακτήριο που επιβιώνει και αναπτύσσεται μέσα σε ένα πλήρες σχηματισμένο, όξινο φαγολυσόσωμα. Επομένως, ο ρόλος των effectors του SST4 θα προσανατολίζεται

στην ενίσχυση της δημιουργίας ενός μεγάλου φαγολυσοσώματος και όχι στην παύση της ωρίμανσης του, όπως συμβαίνει στις περισσότερες των άλλων περιπτώσεων ενδοκυττάριου παρασιτισμού.

5. Αναδείχθηκε για πρώτη φορά σε επίπεδο πρωτεϊνών η αναμενόμενη αλκαλική φύση του πρωτεώματος της *Coxiella burnetii*

Αυτό αφορά στις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά μόρια effectors του βακτηρίου. Πρωτεΐνες δηλαδή, οι οποίες πιθανότατα έρχονται σε απευθείας επαφή με το πολύ όξινο περιβάλλον του φαγολυσοσώματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Σύνολο πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν με 2-DE και dSDS-PAGE

Spot No.	Method of analysis		UniProt KB/Swiss-Prot entry	Gene Locus Name	FUNCTIONAL CLASSIFICATION PROTEIN NAME	ID SCORE	Difference	Coverage	Theoretical Mr	Theoretical pI	GRAVY Score
	2-DE	Doubled-SDS PAGE									
CELL ENVELOPE (LPS/ PEPTIDOGLYCAN/ PHOSPHOLIPID BIOSYNTHESIS-DEGRADATION)											
1	+	-	Q83BY7	CBU_1350	Phosphoglucosamine mutase	130	96	41	48158.5	6.44	-0.002
2	+	-	Q83F27	CBU_0124	UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide--D-alanyl-D-alanine ligase	125	68	32	47695.6	6.88	0.039
3	+	-	Q83E52	CBU_0479	3-deoxy-D-manno-octulosonate cytidyltransferase	200	149	76	28024.7	5.01	-0.255
4	+	+	Q83BN2	CBU_1471	Rod shape-determining protein MreB	228/80	154/ 22	63/ 36	37665.5	5.42	0.077
5	+	-	Q83BJ0	CBU_1518	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+]	167	127	62	36067.4	6.52	-0.085
6	+	-	Q83B43	CBU_1675	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	138	88	47	30507.3	6.01	0.015
7	+	-	Q83F20	CBU_0131	UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase	64	28	21	48773.0	6.77	-0.144
8	+	-	Q83C68	CBU_1261	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	114	63	41	46368.3	9.36	-0.192

9	-	+	Q83AY6	CBU_1741	Lipoprotein, putative	75	30	32	44289.7	9.76	-0.203
10	-	+	Q83FA1	CBU_0045	Lipoprotein, putative	133	95	58	21150.6	10.87	-0.138
11	-	+	Q83ED0	CBU_0395	Lipoprotein, putative	79	35	40	24494.1	8.91	-0.094
12	+	-	Q83DT1	CBU_0612	Outer membrane protein OmpH, putative	73	29	43	18823.8	9.71	-0.461

CELL DIVISION

13	+	-	Q83F12	CBU_0141	Cell division protein FtsZ	110	60	37	40746.2	4.62	-0.017
14	+	-	Q83CP9	CBU_1060	Segregation and condensation protein B	78	34	49	23718.0	4.76	-0.313

DNA – MEDIATED TRANSFORMATION (COMPETENCE)

15	-	+	Q83DH4	CBU_0758	Competence lipoprotein ComL, putative	81	40	33	28992.4	9.76	-0.216
-----------	---	---	--------	----------	---------------------------------------	----	----	----	---------	------	--------

DNA METABOLISM (REPLICATION, RECOMBINATION, REPAIR)

16	+	-	Q83D72	CBU_0868	Replicative DNA helicase	166	118	37	67806.6	6.28	-0.241
17	+	-	Q83FD7	CBU_0002	DNA polymerase III, beta subunit	150	109	43	41763.1	5.74	-0.161
18	+	-	Q83BE0	CBU_1570	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase ruvB	234	184	65	39151.1	5.74	-0.122

19	+	-	Q83CQ4	CBU_1054	Protein recA (Recombinase A)	181	144	60	37127.7	5.86	-0.121
20	+	+	Q83CJ2	CBU_1123	Curved DNA-binding protein	138/ 80	92/ 53	58/ 42	34935.4	6.94	-0.710
21	+	+	Q83EP4	CBU_0271	Single-stranded DNA-binding protein (SSB)	128/ 83	93/ 52	58/ 49	17437.1	5.61	-0.804
22	+	-	Q83C16	CBU_1320	Integration host factor, alpha subunit	72	8	48	11617.3	9.69	-0.712
23	-	+	Q83AX7	CBU_1750	DNA-binding protein HU, putative	70	13	29	16718.9	11.89	-0.900

TRANSCRIPTION

24	+	+	Q83EQ2	CBU_0263	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	269/ 83	233/ 52	73/ 37	35555.7	5.61	-0.182
25	+	-	O87903	CBU_0231	DNA-directed RNA polymerase beta chain	233	191	28	153656.4	5.82	-0.372
26	+	-	Q83ET0	CBU_0232	DNA-directed RNA polymerase beta' chain	198	116	28	157103.5	7.62	-0.284
27	+	-	Q83EL6	CBU_0302	DNA-directed RNA polymerase omega chain	106	69	80	10759.1	4.73	-0.487
28	+	-	Q83D87	CBU_0852	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	134	84	27	76331.2	5.39	-0.204
29	+	-	Q83BS0	CBU_1433	N utilization substance protein A	99	43	21	56274.8	4.59	-0.320
30	+	-	Q83A25	CBU_2086	Transcription termination factor Rho	276	219	63	46813.9	6.25	-0.291
31	+	-	Q83ET5	CBU_0225	Transcription antitermination protein NusG	146	95	68	20045.0	6.35	-0.407
32	+	-	Q83C93	CBU_1235	Oligoribonuclease	78	41	44	21011.8	5.67	-0.302

TRANSLATION – PROTEIN BIOSYNTHESIS

33	+	–	Q83ES7	CBU_0235	Elongation factor G (EF-G)	174	137	43	77733.2	5.07	-0.373
34	+	+	Q9X5U9	CBU_1385	Elongation factor Ts (EF-Ts)	198/ 64	160/ 25	71/ 44	31819.5	5.85	-0.169
35	+	–	Q83AR4	CBU_1816	Elongation factor P (EF-P)	67	24	20	21044.9	5.74	-0.452
36	+	+	Q83ES6	CBU_0236	Translation elongation factor Tu	314/ 185	13/ 20	64/ 67	43525.8	5.32	-0.250
37	+	–	Q9X5U8	CBU_1386	30S ribosomal protein S2	105	76	38	35317.6	8.88	-0.625
38	+	–	Q83D76	CBU_0864	30S ribosomal protein S6	64	33	57	14577.6	7.03	-0.599
39	+	–	Q83D73	CBU_0867	50S ribosomal protein L9	80	29	51	16580.0	6.18	-0.332
40	+	–	Q83AP1	CBU_1840	50S ribosomal protein L25	88	47	40	26538.9	5.00	-0.366
41	+	–	Q83BL6	CBU_1488	Glutamyl-tRNA synthetase 2	195	156	45	52631.6	5.83	-0.471
42	+	–	Q83EX7	CBU_0181	Tyrosyl-tRNA synthetase	229	174	56	45829.6	6.22	-0.374
43	+	–	Q83A61	CBU_2049	Tryptophanyl-tRNA synthetase	92	51	33	40661.4	6.21	-0.440
44	+	–	Q83F67	CBU_0081	Prolyl-tRNA synthetase	144	101	35	63589.1	5.75	-0.212
45	+	–	P39919	CBU_1188	Seryl-tRNA synthetase	178	140	37	48134.5	5.79	-0.530
46	+	+	Q83E09	CBU_0528	Ribosomal protein S1.	354/ 116	303/ 69	61/ 38	62120.5	5.28	-0.484

47	+	-	Q83BM8	CBU_1475	Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	227	179	44	53453.7	5.44	-0.376
48	+	+	Q83BV4	CBU_1383	Ribosome recycling factor (RRF)	69/ 71	32/ 28	46/ 58	20945.1	6.36	-0.529

AMINO - ACID BIOSYNTHESIS

49	+	-	Q83D66	CBU_0875	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	133	84	50	37294.5	5.47	0.002
50	+	-	Q83E19	CBU_0517	Aspartate aminotransferase	140	97	50	42862.1	5.70	-0.041
51	+	-	Q83E31	CBU_0503	Glutamine synthetase	115	70	25	39615.6	5.33	-0.397
52	+	-	Q83DN1	CBU_0667	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	102	67	42	29848.0	7.02	-0.226
53	+	-	Q83AD4	CBU_1970	Diaminopimelate epimerase	151	111	54	30071.4	6.13	-0.049
54	+	-	Q83E12	CBU_0525	Phosphoserine aminotransferase	71	32	36	40689.4	5.77	-0.177

MULTI – BIOSYNTHETIC PATHWAYS

55	+	-	Q83BT3	CBU_1419	Serine hydroxymethyltransferase	222	179	44	45800.8	6.16	-0.252
56	+	-	Q83BL1	CBU_1494	Pyridoxal phosphate biosynthetic protein pdxJ	141	98	41	26012.7	5.54	-0.131
57	+	-	Q820B5	CBU_0350	3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	79	47	32	26485.4	5.84	-0.219
58	+	+	Q83D18	CBU_0928	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	190/ 64	156/ 30	75/ 42	23635.6	6.33	-0.821

59	+	-	Q83DQ0	CBU_0646	Riboflavin synthase, alpha subunit	106	57	44	22415.6	5.88	-0.099
60	+	-	Q83DP8	CBU_0648	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	131	101	56	16601.2	6.74	0.056
61	+	-	Q83EM7	CBU_0288	Phosphopantetheine adenylyltransferase	87	50	40	17966.8	6.20	-0.021
62	+	-	Q83CV4	CBU_0998	Adenylosuccinate synthetase	59	20	12	47989.0	6.11	-0.183
63	-	+	Q83A31	CBU_2080	Uroporphyrin-III C-methyltransferase, putative	95	40	37	35297.4	6.80	-0.193

FATTY - ACID AND PHOSPHOLIPID METABOLISM

64	+	-	Q83CX6	CBU_0975	Acyl CoA biotin-dependant carboxyltransferase	263	219	43	58724.0	6.93	-0.229
65	+	-	Q83AZ9	CBU_1726	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase	198	116	53	49272.7	6.39	-0.190
66	+	-	Q83E37	CBU_0497	3-oxoacyl-acyl carrier protein synthase II	244	192	62	44075.1	5.49	-0.095
67	+	-	Q83CX7	CBU_0974	Acetyl-CoA C-acyltransferase	146	94	44	42243.0	7.66	0.018
68	+	-	Q83CX8	CBU_0973	Acyl-CoA dehydrogenase	169	122	57	42372.4	5.79	-0.129
69	+	+	Q83BJ8	CBU_1510	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	74/ 86	24/ 36	32/ 45	35377.4	6.22	-0.329

NUCLEOTIDE AND NUCLEOSIDE METABOLISM

70	+	-	Q83E75	CBU_0454	Adenylate kinase	130	56	55	25865.7	6.33	-0.415
-----------	---	---	--------	----------	------------------	-----	----	----	---------	------	--------

71	+	-	Q83FC4	CBU_0016	Xanthosine phosphorylase	139	93	49	30159.8	6.36	-0.003
72	+	-	Q83E35	CBU_0499	Thymidylate kinase	119	86	38	25160.1	6.45	-0.143
73	+	-	Q83C71	CBU_1258	Nucleoside diphosphate kinase	62	5	48	15854.2	6.30	-0.166

ENERGY METABOLISM - ELECTRON TRANSPORT

74	+	-	Q83BR1	CBU_1442	NADH dehydrogenase I, G subunit	226	177	37	87696.9	5.50	-0.296
75	+	-	P51054	CBU_1401	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	238	198	47	65438.4	6.69	-0.413
76	+	-	Q83D93	CBU_0845	UDP-glucose/ GDP-mannose dehydrogenase family	92	29	20	47659.3	5.41	-0.123
77	+	+	Q83B05	CBU_1720	Aconitate hydratase 1	266/ 71	215/ 21	42/ 21	98397.7	5.66	-0.282
78	+	-	Q83BH2	CBU_1536	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	67	26	10	57510.2	5.60	-0.310
79	+	-	Q83AP5	CBU_1836	NAD(P)-dependent oxidoreductase, putative	108	64	31	46545.2	6.28	-0.211
80	+	-	Q83AF7	CBU_1943	ATP synthase subunit alpha	309	261	54	56844.1	5.80	-0.148
81	+	-	Q83A19	CBU_2092	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	151	109	38	56807.4	5.83	-0.187
82	+	+	Q83AV0	CBU_1778	Fructose-bisphosphate aldolase	254/ 121	202/ 66	53/ 48	39532.6	5.41	-0.304
83	+	-	Q83CC3	CBU_1204	Aldehyde dehydrogenase family protein	160	86	43	49712.7	6.50	-0.245
84	+	-	Q83F40	CBU_0111	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	101	61	31	43333.7	5.84	-0.124

85	+	-	Q83AF5	CBU_1945	ATP synthase subunit beta	313	252	70	50434.6	5.01	-0.149
86	+	-	Q83CL8	CBU_1096	Fumarate hydratase class II	185	152	40	49850.2	6.24	-0.098
87	+	-	P53591	CBU_1396	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	150	117	55	30667.1	5.38	0.094
88	+	-	Q83CJ9	CBU_1116	Alanine dehydrogenase	173	133	50	39471.5	6.07	0.079
89	+	-	P53592	CBU_1397	Succinyl-CoA synthetase beta chain	214	120	63	42332.8	5.50	0.001
90	+	-	Q83AU6	CBU_1782	Phosphoglycerate kinase	159	122	55	42362.7	6.20	-0.061
91	+	-	Q83AU5	CBU_1783	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, type I	166	118	44	36263.3	5.93	-0.097
92	+	-	Q93N50	CBU_0693	Pyruvate dehydrogenase alpha subunit	95	44	48	38626.0	6.24	-0.329
93	+	-	Q83B06	CBU_1716	Aminomethyltransferase	94	56	36	40294.1	6.21	-0.213
94	+	-	Q83C87	CBU_1241	Malate dehydrogenase	153	120	61	35469.4	5.07	-0.015
95	+	-	Q83CJ8	CBU_1117	Electron transfer flavoprotein, alpha subunit	80	31	34	34125.0	5.16	0.043
96	+	-	Q83C53	CBU_1278	Hypothetical protein	97	48	62	20762.6	5.11	-0.437
97	+	-	Q83FB4	CBU_0026	Ribose-5-phosphate isomerase A	62	13	29	23848.4	6.07	0.070
98	+	-	Q83BQ3	CBU_1450	Triosephosphate isomerase	114	85	29	28172.0	6.19	-0.278
99	+	-	Q83A24	CBU_2087	Thioredoxin	116	65	58	12613.3	4.86	-0.170
100	+	-	Q83DM4	CBU_0675	Transaldolase, putative	170	106	70	27483.3	5.47	-0.114

101	+	-	Q83CN4	CBU_1077	Beta-N-acetylhexosaminidase	96	50	48	35035.0	5.88	-0.178
102	+	-	Q9RG62	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase	168	0	32	46650.8	5.91	-0.079
103	+	-	Q9RG63	<i>icd</i>	Isocitrate dehydrogenase	118	0	35	46622.7	5.91	-0.085
104	+	-	Q83EP5	CBU_0270	Putative reductase CBU_0270	101	72	36	44875.1	5.79	-0.211
105	+	-	Q83B44	CBU_1674	Enolase	117	85	35	46626.4	4.69	-0.249
106	+	-	Q83E67	CBU_0463	Dihydrolipoamide dehydrogenase	210	160	40	51184.5	7.12	-0.069
107	+	-	Q83DR6	CBU_0629	Proline dehydrogenase/delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	230	187	27	116422.6	6.30	-0.196

INTERMEDIARY METABOLISM AND OTHER METABOLIC PATHWAYS

108	+	-	Q83A78	CBU_2030	S-adenosylmethionine synthetase	98	55	33	42777.4	5.55	-0.220
109	+	-	Q83DQ8	CBU_0638	Dehydrogenase, E2 component, acyltransferase	190	143	51	40845.9	5.16	-0.132
110	+	-	Q83DQ7	CBU_0639	Dehydrogenase, E1 component, beta subunit, putative	77	23	30	35477.2	6.02	0.120
111	+	-	Q83AQ1	CBU_1830	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	94	56	40	35221.3	5.80	-0.062
112	+	-	Q93N62	-	UDP-glucose-4-epimerase	165	0	55	33548.2	5.55	-0.193
113	+	-	Q83E32	CBU_0502	Hydrolase, putative	199	138	56	25324.0	6.21	-0.241
114	+	-	Q83C55	CBU_1276	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	110	67	38	26078.6	5.87	-0.222

115	+	-	Q83CG6	CBU_1151	Hydrolase, haloacid dehalogenase-like family	80	28	35	24819.1	5.26	-0.432
116	+	-	Q83AC9	CBU_1975	Carboxylesterase/phospholipase family protein	85	39	48	22308.5	5.67	-0.112
117	+	-	Q83DV5	CBU_0587	Thiosulfate sulfurtransferase glpE	60	10	52	12361.9	5.75	-0.593

PROTEIN FATE (PROCESSING)

118	+	+	Q83F55	CBU_0094	Chaperone clpB	283/ 68	235/ 38	51/ 27	96768.7	5.51	-0.433
119	+	+	O87712	CBU_1290	Chaperone protein dnaK	320/ 248	282/ 214	48/ 49	70755.0	5.14	-0.415
120	+	+	Q83EL0	CBU_0309	Chaperone protein htpG	192/ 154	151/ 116	48/ 44	72773.8	5.20	-0.482
121	+	+	P19421	CBU_1718	60 kDa chaperonin	345/ 221	304/ 184	72/ 57	58284.0	5.14	-0.063
122	+	+	P19422	CBU_1719	10 kDa chaperonin	135/ 71	100/ 37	94/ 64	10503.0	5.18	-0.315
123	+	+	Q83CE9	CBU_1169	Heat shock protein, Hsp20 family	147/ 81	105/ 38	64/ 47	17206.5	5.66	-0.683
124	-	+	Q83DZ2	CBU_0546	Heat shock protein HtpX	75	34	24	39359.9	9.25	0.182
125	+	-	Q83F75	CBU_0073	Peptidase, M24 family protein	74	27	18	66985.9	5.49	-0.272
126	+	-	Q83F46	CBU_0103	Peptidase, M20/M25/M40 family	206	161	54	52895.9	5.35	-0.112
127	+	-	Q83AI4	CBU_1902	Peptidase, M16 family	105	53	37	51957.5	6.28	-0.256
128	+	-	Q83BT6	CBU_1416	Peptidase, family S24	154	101	43	24285.8	6.85	-0.309

129	-	+	Q83AB8	CBU_1986	Peptidase, U7 family	119	82	41	35110.1	7.88	-0.200
130	+	-	Q83DJ3	CBU_0737	Trigger factor	143	104	52	50246.8	5.30	-0.526
131	+	+	Q83A94	CBU_2012	ATP-dependent hsl protease ATP-binding subunit hslU	347/ 105	304/ 70	70/ 41	50181.6	5.59	-0.366
132	+	+	Q83DX0	CBU_0572	Cytosol aminopeptidase family protein	219/ 125	177/ 82	47/ 34	50888.5	5.56	-0.129
133	+	-	Q83BH0	CBU_1538	Carboxyl-terminal protease family protein	195	146	54	49666.4	8.80	-0.125
134	+	-	P59650	CBU_0721	Deoxyhypusine synthase-like protein	192	159	53	39569.9	5.49	-0.279
135	+	-	Q83AC4	CBU_1980	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SurA, putative	94	49	28	33213.2	9.75	-0.419

PROTEIN AND PEPTIDE SECRETION AND TRAFFICKING

136	+	-	Q83BI9	CBU_1519	Protein-export protein secB	73	40	37	18376.6	4.54	-0.463
137	-	+	P39917	CBU_1190	Outer-membrane lipoprotein carrier protein precursor	77	39	46	23800.4	10.04	-0.163

TRANSPORT AND BINDING

138	+	-	Q83F44	CBU_0107	ABC transporter, ATP-binding protein	76	9	38	39353.8	9.28	-0.042
139	+	-	Q83F57	CBU_0092	Hypothetical protein	76	2	24	32087.5	5.49	-0.874
140	+	-	Q83DX3	CBU_0569	Hypothetical protein	131	84	22	49148.4	6.29	-0.243

REGULATORY FUNCTIONS

141	+	-	Q93N46	CBU_0697	Membrane sensor protein (Pleiotropic regulatory protein)	77	35	17	43554.6	6.49	-0.309
142	+	-	Q93N47	CBU_0696	Membrane sensor protein (Pleiotropic regulatory protein)	76	28	28	43147.4	6.06	-0.135
143	+	-	Q83CQ8	CBU_1050	Carbon storage regulator homolog 2	70	39	77	7965.0	4.81	-0.503

DETOXIFICATION

144	+	-	Q83E15	CBU_0521	Chlorohydrolase family protein	155	109	37	49559.8	5.56	-0.042
145	+	-	Q83B14	CBU_1706	Antioxidant, AhpC/Tsa family	147	82	66	21849.9	5.07	0.034
146	+	-	P19685	CBU_1708	Superoxide dismutase [Fe]	166	118	61	22274.0	6.19	-0.684
147	+	-	Q83F83	CBU_0065	Rhodanese domain protein	168	124	85	14114.1	5.42	-0.455
148	+	-	Q83D04	CBU_0943	Rhodanese-like domain protein	108	51	71	13981.1	7.73	-0.563
149	+	-	Q83CY8	CBU_0963	Bacterioferritin comigratory protein	169	110	60	16850.4	7.65	-0.264

TOXIN PRODUCTION AND RESISTANCE

150	+	-	Q83F59	CBU_0090	Protein tolB precursor	73	42	23	47792.4	8.48	-0.165
------------	---	---	--------	----------	------------------------	----	----	----	---------	------	--------

151	+	-	Q83EE5	CBU_0379	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	178	133	54	30153.3	6.02	-0.569
PATHOGENESIS											
152	+	-	Q83B70	CBU_1645	DotB protein	220	174	42	41336.1	6.05	-0.235
153	+	+	P51752	CBU_0630	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Mip precursor	122/ 69	78/ 43	45/ 45	25517.5	9.80	-0.451
154	+	-	Q83CH8	CBU_1137	Enhanced entry protein EnhB, putative	77	30	41	20909.2	9.12	-0.148
155	+	-	Q83CH9	CBU_1136	Enhanced entry protein EnhC	106	53	25	117740.3	9.34	-0.471
156	+	-	O07646	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein	146	14	62	27584.5	9.21	-0.285
157	-	+	Q9EYN0	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein (Fragment)	77	0	49	26723.5	9.23	-0.236
158	+	-	Q9EYP0	<i>com1</i>	27kDa outer membrane protein (Fragment)	118	0	53	26755.6	9.23	-0.231
159	-	+	Q83DY0	CBU_0560	Hypothetical protein CBU_0560	76	16	35	46425.4	6.57	-0.140
ADAPTATIONS TO ATYPICAL CONDITIONS – RESPONSE TO STARVATION											
160	+	-	Q83AY0	CBU_1747	Stringent starvation protein A	119	75	50	24415.2	5.55	-0.231
161	+	-	Q83AC1	CBU_1983	Universal stress protein A	98	52	59	15746.1	5.96	0.098
162	+	-	Q83DX4	CBU_0568	PhoH family protein	190	144	53	36704.9	6.13	-0.414

163	+	-	P45680	CBU_1916	Hypothetical protein CBU_1916	84	51	41	15779.2	6.58	0.017
UNKNOWN FUNCTION											
164	+	-	Q83CM5	CBU_1088	Hypothetical protein	142	88	43	51699.4	5.70	0.097
165	+	+	Q83D09	CBU_0937	Hypothetical protein	82/ 112	38/ 66	26/ 44	51384.7	8.99	-0.338
166	+	-	Q83AX5	CBU_1752	Hypothetical protein	133	81	50	46700.1	5.87	-0.462
167	+	-	Q83B63	CBU_1652	Hypothetical protein	137	94	35	41351.9	6.02	-0.306
168	+	-	Q83AU0	CBU_1789	Hypothetical protein	87	38	41	32014.4	4.95	-0.266
169	+	-	Q83CX9	CBU_0972	Hypothetical protein	69	21	26	26654.3	5.46	-0.313
170	+	+	Q83F03	CBU_0150	Hypothetical UPF0289 protein CBU_0150	161/ 67	125/ 31	43/ 41	29717.3	8.21	-0.295
171	+	-	Q83FC5	CBU_0015	Hypothetical protein	81	44	29	26057.3	6.66	-0.146
172	+	-	Q83E24	CBU_0510	Hypothetical protein	93	43	79	11274.6	5.49	-1.071
173	+	-	Q83CP5	CBU_1064	Hypothetical protein	87	37	58	11043.5	8.71	-0.619
174	+	+	Q83DR4	CBU_0632	Hypothetical protein	86/ 105	35/ 73	73/ 69	11885.1	4.69	-0.917
175	+	-	Q83DN9	CBU_0658	Hypothetical protein	136	90	74	15981.9	4.81	-0.622
176	+	+	Q83F37	CBU_0114	Hypothetical UPF0234 protein CBU_0114	96/ 84	61/ 48	59/ 45	18183.8	7.89	-0.538

177	+	-	Q83B41	CBU_1677	Hypothetical protein	106	62	67	17326.9	6.20	-0.967
178	+	-	Q83F81	CBU_0067	Hypothetical protein	97	52	71	12534.2	5.37	-0.615
179	+	-	Q83DG3	CBU_0773	Hypothetical protein	96	43	50	17382.6	5.97	-0.638
180	-	+	Q83D52	CBU_0891	Hypothetical protein	79	42	34	34369.6	5.29	-0.562
181	+	-	Q83AX3	CBU_1754	Hypothetical protein	113	64	45	22382.1	4.97	-0.610
182	+	-	Q83F36	CBU_0115	Protein mraZ	140	103	77	17338.9	5.29	-0.349
183	+	-	Q83DM5	CBU_0674	Sugar isomerase family protein	102	60	52	21564.3	6.65	-0.288
184	+	-	Q83AV6	CBU_1772	Small GTP-binding protein domain protein, putative	91	44	46	23073.4	7.80	-0.358
185	-	+	Q83DZ3	CBU_0545	LemA protein	92	42	58	22195.7	9.06	-0.219

Όλες οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη σημειώθηκαν με τον αντίστοιχο αριθμό τους από το Παράρτημα 1 και τον Πίνακα 3.1, πάνω στις φωτογραφίες των πηκτών στις οποίες ταυτοποιήθηκαν (Εικόνες 3.4 & 3.6). Πρωτεΐνες οι οποίες ταυτοποιήθηκαν και στις δυο τεχνικές, σημειώνονται με τον ίδιο αριθμό (από το Παράρτημα 1 και τον Πίνακα 3.1) και στις δυο εικόνες. Η λειτουργική κατηγοριοποίηση των ταυτοποιημένων πρωτεϊνών βασίστηκε στην κυτταρική διεργασία (cellular process) στην οποία η κάθε πρωτεΐνη εμπλέκεται ή πιθανώς εμπλέκεται. Για τα μεγέθη ID Score, Difference, και Coverage, όπου αναφέρονται δυο τιμές (π.χ. χ/ ψ) αυτές αντιστοιχούν στις τιμές λήφθηκαν από την κάθε μέθοδο, με πρώτη την 2-DE και δεύτερη την doubled-SDS PAGE.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Σύνολο πρωτεϊνών της *Coxiella burnetii* που ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά μόρια effector

No.	Όνομα Πρωτεΐνης	ExPasy Accession No.	Gene locus	Καλύτερο Score Ταυτοποίησης	Πεπτίδιο(α) που Ταυτοποιήθηκε(αν)	Θεωρητικό MW	Θεωρητικό pI
-----	-----------------	----------------------	------------	-----------------------------	-----------------------------------	--------------	--------------

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν και στα τρία δείγματα:

1	NADH dehydrogenase subunit I	Q83BR3	CBU_1440	36	RYEEQIARDRA	18997,1	8,84
2	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase family protein	Q83F82	CBU_0066	35	KSELTKNRF	22741,3	9,12
3	ribonuclease R	Q83CM3	CBU_1091	45	RLIAMERD + Oxidation (M)	85118,0	9,18
4	30S ribosomal protein S2	Q9X5U8	CBU_1386	37	KEKLSANLAGIKN	35317,6	8,88
5	alcohol dehydrogenase (NADP+)	A1EV61	A35_A1708	55	RFPLLGLGTWKS	12607,4	5,88
6	Orf 145, hypothetical protein QpH1_p21	Q45942	CBUA0015	36	KIHRFEEENKR	16921,5	5,36
7	DNA repair protein RecN	Q83C37	CBU_1297	45	RLSLLYDLARKH	63084,8	6,05
8	hypothetical protein CburD_01001397			76	KIDNDIHYLRE	14261,7	9,74

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε δύο από τα δείγματα:

1	drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Q83DE1	CBU_0797	35	RYSVIKLIKIFKDRN + Phospho (STY)	58689,2	9,20
2	putative uncharacterized	A1EY59	A35_A0191	35	RLLSKTGIVGRR	54232,7	9,44

	protein A35_A0191						
3	putative uncharacterized protein	A1EVJ1	A35_A0276	45	KILNEMRT KILNEMRT + Oxidation (M)	34239,6	8,66
4	stress induced protein, putative	Q83EL8	CBU_0300	37	RYLEITLRL	33032,2	5,98
5	phosphoribosylamine--glycine ligase	Q83EJ4	CBU_0326	48	KSEGILYRG	46192,9	6,23
6	chaperonin, 60 kDa	P19421	CBU_1718	309	RGVEVLNAVVKV KVGAAATEVEMKE + Oxidation (M) KAIAQVGTISANSKDS RELIPLLENVAKS KSGIDIIAEAMEKV KAMLQDIAVLTGGKV KAMLQDIAVLTGGKV + Oxidation (M) KDDTTIIDGSGDAGDIKN RAAVEEGVVPGGGVALIRV	58284,0	5,14
7	phosphoglyceromutase	Q83BH2	CBU_1536	34	RNLITLK	57510,2	5,6
8	serine hydroxymethyltransferase	Q83BT3	CBU_1419	38	RANITVKNKNTVPGETRS + 2 Phospho (STY)	45800,8	6,16
9	sensor protein	Q83AW7	CBU_1761	51	KKASQNRYSLIFMDIGLPGI DGYEAAARIRA + Oxidation (M); Phospho (STY)	74505,8	8,97

					KQLSKNLILAGKQ KELPIFGGQSQYAAKV KAMNSVIQAIQKQKN KAMNSVIQAIQKQ + Oxidation (M)		
10	27kDa outer membrane protein	O07648	com1	109		27556,4	9,21
11	acyl-CoA dehydrogenase family protein, degenerate	A1EZA6	A35_A0748	33	MAELFLYPSRV + N-Formyl (Protein); 2 Phospho (STY)	13380,2	8,03
12	Putative uncharacterized protein CBU_1209	Q83CB8	CBU_1209	38	K.ARGINR.I K.SDKKYIPLSSK.Q	55315,8	8,36

Πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν σε ένα από τα δείγματα:

1	A/G-specific adenine glycosylase	Q83D07	CBU_0940	38	K.KAKTARAQK.A + Phospho (STY) K.TARAQKAAYLLLLR.N + Phospho (STY)	40562,3	9,67
2	ATPase, AAA family domain protein (Uncharacterized protein CBU_1189)	P39918	CBU_1189	36	K.ALEIPEPLRR.R	49135,0	6,31
3	ferrous iron transport protein	Q83AW2	CBU_1766	33	K.QRGLVLDLK.Q	89986,6	9,59
4	amino acid permease family protein	Q83AT4	CBU_1796	27	R.SLYGMSK.S + Oxidation (M); Phospho (STY)	58994,0	9,03
5	hypothetical protein A35_A0301			33	K.TDMGATIR.I + Oxidation (M)	37619,2	5,49
6	putative uncharacterized protein CBU_1508	Q83BK0	CBU_1508	30	K.KSISRAYVITK.S	62782,6	8,98

7	putative uncharacterized protein CBU_1210	Q83CB7	CBU_1210	48	K.VEAITK.N K.AVDILRRNSK.A + Phospho (STY)	37243,2	5,66
8	putative uncharacterized protein CBU_1823	Q83AQ7	CBU_1823	34	-.MPKLSNRDLQNL.R.D + N-Formyl (Protein); Oxidation (M); Phospho (STY)	40312,5	9,06
9	cell division protein FtsL	Q83F34	CBU_0117	33	R.TFQITK.Q	13192,4	9,89
10	ribosomal protein L7/L12	O87902	CBU_0229	31	K.EEAELKLRK.S	13248,2	4,71
11	glutathione S-transferase family protein	Q83DB9	CBU_0819	43	K.IFLERVIKPK.V	25408,3	8,89
12	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Q83CT0	CBU_1023	37	R.VIEVAK.G	34164,5	8,13
13	50S ribosomal protein L22	O85387	CBU_0243	33	M.EVAAKLK.Y	12582,4	9,77
14	sensor protein (sensory box histidine kinase/response regulator)	Q83DE9	CBU_0789	48	K.YSLSR.F M.SLDAIISNK.F	90621,3	5,59
15	putative uncharacterized protein CBU_0328	A1EYE6	A35_A0239	34	R.VPKSIIAQK.E + Phospho (STY)	80044,5	4,9
16	putative uncharacterized protein CBU_0018	Q83FC2	CBU_0018	41	R.LKKLPQK.L K.KSIIRNSINDEM.K.A + Oxidation (M); Phospho (STY)	17565,3	9,96
17	transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Q83DH8	CBU_0753	34	K.EGLAMREALLK.A + Oxidation (M)	110991,3	7,63
18	ABC transporter, permease protein	A1EZ41	A35_B0136	32	K.EADTLLAK.G	42643,4	9,56
19	transposase for insertion sequence element IS1111A	Q45968		40	K.ILGVDIAK.D	38004,3	9,86
20	putative uncharacterized protein CBU_1314	Q83C21	CBU_1314	33	R.IEALEEK.G	23477,4	10,49
21	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Q83DK9	CBU_0716	30	-.MPIER.V	33978,0	6,37

22	linear gramicidin synthetase subunit C	A1EX07	A35_A0501	35	R.IELGEIENVLTK.H	130994,0	6,26
23	putative uncharacterized protein CBU_0343	Q83EH7	CBU_0343	33	R.QKEIISVLR.S	34150,3	9,17
24	UvrABC system protein B (Protein uvrB)	Q83E18	CBU_0518	39	R.KGLLEVK.E	77336,2	5,55
25	putative uncharacterized protein CBU_1455	Q83BP8	CBU_1455	36	-.MRTLNELEVEEK.K + Oxidation (M)	33808,5	5,39
26	putative uncharacterized protein	A1ETP6	A35_A1893	33	K.CVVSSSSSVLK.D + 2 Phospho (STY)	46011,6	8,61
27	putative uncharacterized protein CBU_0012	Q83FC8	CBU_0012	34	K.DAVNER.S	13493,2	5,38
28	ABC transporter, permease protein	Q83AS2	CBU_1808	33	K.IQIDKGR.F	44347,1	9,7
29	ribosomal protein S5	Q83EQ9	CBU_0255	34	-.MQEAGIGTTTDDGIQEK.L + Oxidation (M)	17486,3	9,81
30	adenosylhomocysteinase	Q83A77	CBU_2031	37	R.ESLIDSIK.R	47844,8	5,75

1. Voth, D.E. and R.A. Heinzen, *Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of Coxiella burnetii*. Cellular Microbiology, 2007. **9**(4): p. 829-840.
2. Raoult, D., T.J. Marrie, and J.L. Mege, *Natural history and pathophysiology of Q fever*. The Lancet Infectious Diseases, 2005. **5**(4): p. 219-226.
3. Maurin, M. and D. Raoult, *Q fever*. Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12**(4): p. 518-553.
4. Seshadri, R., I.T. Paulsen, J.A. Eisen, T.D. Read, K.E. Nelson, W.C. Nelson, N.L. Ward, H. Tettelin, T.M. Davidsen, M.J. Beanan, R.T. Deboy, S.C. Daugherty, L.M. Brinkac, R. Madupu, R.J. Dodson, H.M. Khouri, K.H. Lee, H.A. Carty, D. Scanlan, R.A. Heinzen, H.A. Thompson, J.E. Samuel, C.M. Fraser, and J.F. Heidelberg, *Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(9): p. 5455-5460.
5. Vavrekova, M., F. Ciampor, and M. Lukacova, *Electron-microscopic study of the effect of various extractants on the morphology of Coxiella burnetii*. Folia Microbiologica (Praha), 1992. **37**(2): p. 87-92.
6. Derrick, E.H., *"Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation*. Medical Journal of Australia, 1937. **2**: p. 281-299.
7. Burnet, F.M. and M. Freeman, *Experimental studies on the virus of "Q" fever*. Medical Journal of Australia, 1937. **2**: p. 299-305.
8. McDade, J.E., *Historical aspects of Q fever*. In: Marrie TJ, ed. *Q fever: the disease. Vol 1. Boca Raton, Florida: 1990: 5-21*.
9. Philip, C.B., *Comments on the name of the Q fever organism*. Public Health Rep 1948; **63**:58.
10. Hilbink, F., M. Penrose, E. Kovacova, and J. Kazar, *Q fever is absent from New Zealand*. International Journal of Epidemiology, 1993. **22**: p. 945-949.
11. Parker, N.R., J.H. Barralet, and A.M. Bell, *Q fever*. The Lancet, 2006. **367**(9511): p. 679-688.
12. Arricau-Bouvery, N. and A. Rodolakis, *Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?* Veterinary Research, 2005. **36**(3): p. 327-349.
13. Woldehiwet, Z., *Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis*. Research in Veterinary Sciences, 2004. **77**(2): p. 93-100.
14. Babudieri, B., *Q fever: a zoonosis*. Advances in Veterinary Sciences, 1959. **5**: p. 81.
15. Alexiou-Daniil, S., A. Antiniadis, K. Pappas, J. Doutsos, N. Malisiovas, and I. Papapanagiotou, *Incidence of Coxiella burnetii infections in Greece*. Hellenike Iatrike, 1990. **56**: p. 251-255.
16. Tselentis, Y., A. Gikas, D. Kofteridis, E. Kyriakakis, N. Lydataki, D. Bouros, and N. Tsaparas, *Q fever in the Greek Island of Crete: epidemiologic, clinical, and therapeutic data from 98 cases*. Clinical and Infectious Diseases, 1995. **20**(5): p. 1311-1316.
17. Aitken, I.D., K. Bogel, E. Cracea, and e. al., *Q fever in Europe: current aspects of aetiology, epidemiology, human infection, diagnosis and therapy*. Infection, 1987. **15**: p. 323-327.
18. Sawyer, L.A., D.B. Fishbein, and J.E. McDade, *Q fever: current concepts*. Review of Infectious Diseases, 1987. **9**: p. 935-46.
19. Marrie, T.J., *Epidemiology of Q fever*, In T. J. Marrie (ed.), *Q fever, vol. 1, p. 49-70. The disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. 1990*.

20. Marrie, T.J., H. Durant, J.C. Williams, E. Mintz, and D.M. Waag, *Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in maritime Canada*. Journal of Infectious Diseases, 1988. **158**: p. 101-108.
21. Waldhalm, D.G., H.G. Stoenner, R.E. Simmons, and L.A. Thomas, *Abortion associated with Coxiella burnetii infection in dairy goats*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1978. **173**(12): p. 1580-1581.
22. Hellenbrand, W., T. Breuer, and L. Petersen, *Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999*. Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**(5): p. 789-796.
23. Tissot-Dupont, H., D. Raoult, P. Brouqui, F. Janbon, D. Peyramond, P.J. Weiller, C. Chicheportiche, M. Nezri, and R. Poirier, *Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases*. American Journal of Medicine, 1992. **93**(4): p. 427-434
24. Raoult, D. and A. Stein, *Q fever during pregnancy--a risk for women, fetuses, and obstetricians*. New England Journal of Medicine, 1994. **330**(5): p. 371.
25. Rehacek, J. and I.V. Tarasevich, *Bratislava: Veda, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences* 1988: p. 204-343.
26. Raoult, D., H. Tissot-Dupont, C. Foucault, J. Gouvernet, P.E. Fournier, E. Bernit, A. Stein, M. Nesri, J.R. Harle, and P.J. Weiller, *Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections*. Medicine (Baltimore), 2000. **79**(2): p. 109-123.
27. Marrie, T.J., *Coxiella burnetii pneumonia*. The European Respiratory Journal : Official Journal of the European Society For Clinical Respiratory Physiology, 2003. **21**(4): p. 713-719.
28. Scott, G.H. and J.C. Williams, *Susceptibility of Coxiella burnetii to chemical disinfectants*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **590**: p. 291-296.
29. Madariaga, M.G., K. Rezai, G.M. Trenholme, and R.A. Weinstein, *Q fever: a biological weapon in your backyard*. Lancet Infectious Diseases, 2003. **3**(11): p. 709-721.
30. Hackstadt, T., *Biosafety concerns and Coxiella burnetii*. Trends in Microbiology, 1996. **4**(9): p. 341-342.
31. Frazier, M.E., L.P. Mallavia, J.E. Samuel, and O.G. Baca, *DNA probes for the identification of Coxiella burnetii strains*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **590**: p. 445-458.
32. Frazier, M.E., R.A. Heinzen, L.P. Mallavia, and O.G. Baca, *DNA probes for detecting Coxiella burnetii strains*. Acta Virologica. English Ed, 1992. **36**(1): p. 83-89.
33. Mallavia, L.P., L.L. Whiting, M.F. Minnick, R. Heinzen, D. Reschke, M. Foreman, O.G. Baca, and M.E. Frazier, *Strategy for detection and differentiation of Coxiella burnetii strains using the polymerase chain reaction*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **590**: p. 572-581.
34. Willems, H., D. Thiele, and H. Krauss, *Plasmid based differentiation and detection of Coxiella burnetii in clinical samples*. European Journal of Epidemiology, 1993. **9**(4): p. 411-418.
35. Stein, A. and D. Raoult, *Detection of Coxiella burnetii by DNA amplification using polymerase chain reaction*. Journal of Clinical Microbiology, 1992. **30**(9): p. 2462-2466.

36. Willems, H., D. Thiele, R. Frolich-Ritter, and H. Krauss, *Detection of Coxiella burnetii in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR)*. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B, 1994. **41**(9): p. 580-587.
37. Musso, D. and D. Raoult, *Coxiella burnetii blood cultures from acute and chronic Q-fever patients*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(12): p. 3129-3132.
38. Stein, A. and D. Raoult, *A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues*. Nucleic Acids Research, 1992. **20**(19): p. 5237-5238.
39. Fritz, E., D. Thiele, H. Willems, and M.M. Wittenbrink, *Quantification of Coxiella burnetii by polymerase chain reaction (PCR) and a colorimetric microtiter plate hybridization assay (CMHA)*. European Journal of Epidemiology, 1995. **11**(5): p. 549-557.
40. Finidori, J.P., D. Raoult, N. Bornstein, and J. Fleurette, *Study of cross-reaction between Coxiella burnetii and Legionella pneumophila using indirect immunofluorescence assay and immunoblotting*. Acta Virologica. English Ed, 1992. **36**(5): p. 459-465.
41. Péter, O., G. Dupuis, W. Burgdorfer, and M. Peacock, *Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever*. European Journal of Clinical Microbiology, 1985. **4**(4): p. 394-396.
42. Uhaa, I.J., D.B. Fishbein, J.G. Olson, C.C. Rives, D.M. Waag, and J.C. Williams, *Evaluation of specificity of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human Q fever*. Journal of Clinical Microbiology, 1994. **32**(6): p. 1560-1565.
43. Waag, D., J. Chulay, T. Marrie, M. England, and J. Williams, *Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 1995. **14**(5): p. 421-427.
44. Kováčová, E., J. Gallo, S. Schramek, J. Kazár, and R. Brezina, *Coxiella burnetii antigens for detection of Q fever antibodies by ELISA in human sera*. Acta Virologica, 1987. **31**(3): p. 254-259.
45. Péter, O., G. Dupuis, D. Bee, R. Lüthy, J. Nicolet, and W. Burgdorfer, *Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of chronic Q fever*. Journal of Clinical Microbiology, 1988. **26**(10): p. 1978-1982.
46. Williams, J.C., L.A. Thomas, and M.G. Peacock, *Identification of phase-specific antigenic fractions of Coxiella burnetii by enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of Clinical Microbiology, 1986. **24**(6): p. 929-934.
47. Herr, S., H.F. Huchzermeyer, L.A. Te Brugge, C.C. Williamson, J.A. Roos, and G.J. Schiele, *The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmiasis and Q fever serology*. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 1985. **52**(4): p. 279-282.
48. Murphy, A.M. and P.R. Field, *The persistence of complement-fixing antibodies to Q-fever (Coxiella burnetii) after infection*. Medical Journal of Australia, 1970. **1**(23): p. 1148-1150.
49. Nguyen, S.V., H. Otsuka, G.Q. Zhang, H. To, T. Yamaguchi, H. Fukushi, A. Noma, and K. Hirai, *Rapid method for detection of Coxiella burnetii*

- antibodies using high-density particle agglutination*. Journal of Clinical Microbiology, 1996. **34**(12): p. 2947-2951.
50. Fiset, P., R.A. Ormsbee, R. Silberman, M. Peacock, and S.H. Spielman, *A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies*. Acta Virologica, 1969. **13**(1): p. 60-66.
 51. Kazár, J., R. Brezina, S. Schramek, A. Palanová, and B. Tvrda, *Suitability of the microagglutination test for detection of post-infection and post-vaccination Q fever antibodies in human sera*. Acta Virologica, 1981. **25**(4): p. 235-240.
 52. Dupont, H.T., X. Thirion, and D. Raoult, *Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1994. **1**(2): p. 189-196.
 53. Peacock, M.G., R.N. Philip, J.C. Williams, and R.S. Faulkner, *Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis*. Infection and Immunity, 1983. **41**(3): p. 1089-1098.
 54. Raoult, D., *Treatment of Q fever*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1993. **37**: p. 1733-1736.
 55. Powell, O.W., K.P. Kennedy, M. McIver, and H. Silverstone, *Tetracycline in the treatment of "Q" fever*. Australasian Annals of Medicine, 1962. **11**: p. 184-188.
 56. Williams, J.C., T.A. Hoover, D.M. Waag, N. Banerjee_Bhatnagar, C.R. Bolt, and G.H. Scott, *Antigenic structure of Coxiella burnetii. A comparison of lipopolysaccharide and protein antigens as vaccines against Q fever*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **590**: p. 370-80.
 57. Williams, J.C., M.G. Peacock, D.M. Waag, G. Kent, M.J. England, G. Nelson, and E.H. Stephenson, *Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform:methanol residue subunit of phase I Coxiella burnetii for the immunization of animals*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1992. **653**: p. 88-111.
 58. Williams, J.C., M.G. Peacock, and R.E.R.D.e.E.d.M.V.D.P.T. Race, 1993. **46**(1-2): p. 87-94., *Immunization of dogs with Q fever vaccines: comparison of phase I, II and phase I CMR Coxiella burnetii vaccines*. Revue D'elevage Et de Medecine Veterinaire Des Pays Tropicaux, 1993. **46**(1-2): p. 87-94.
 59. Stein, A., N.A. Saunders, A.G. Taylor, and D. Raoult, *Phylogenetic homogeneity of Coxiella burnetii strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing*. Fems Microbiology Letters, 1993. **113**(3): p. 339-344.
 60. Gimenez, D.F., *Staining rickettsiae in yolk-sac cultures*. Stain Technology, 1964. **39**: p. 135-140.
 61. Hackstadt, T., M.G. Peacock, P.J. Hitchcock, and R.L. Cole, *Lipopolysaccharide variation in Coxiella burnetii: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity*. Infection and Immunity, 1985. **48**(2): p. 359-365.
 62. Hackstadt, T., *Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of Coxiella burnetii isolates*. Infection and Immunity, 1986. **52**(1): p. 337-340.
 63. Hackstadt, T., *Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of Coxiella burnetii by phase I lipopolysaccharide*. Infection and Immunity, 1988. **56**(4): p. 802-807.
 64. Toman, R., L. Skultety, P. Ftacek, and M. Hricovini, *NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from Coxiella burnetii phase I lipopolysaccharide*. Carbohydrate Research, 1998. **306**(1-2): p. 291-296.

65. Samuel, J.E., M.E. Frazier, and L.P. Mallavia, *Comparison of Coxiella burnetii plasmids to homologous sequences present in a plasmidless endocarditis causing isolate*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **590**: p. 33-38.
66. Tomb, J.F., O. White, A.R. Kerlavage, R.A. Clayton, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, H.P. Klenk, S. Gill, B.A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E.F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L.M. Fitzgerald, N. Lee, M.D. Adams, E.K. Hickey, D.E. Berg, J.D. Gocayne, T.R. Utterback, J.D. Peterson, J.M. Kelley, M.D. Cotton, J.M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W.S. Hayes, M. Borodovsky, P.D. Karp, H.O. Smith, C.M. Fraser, and J.C. Venter, *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 539-47.
67. Seshadri, R. and J.E. Samuel, *Characterization of a stress-induced alternate sigma factor, RpoS, of Coxiella burnetii and its expression during the development cycle*. Infection and Immunity, 2001. **69**(8): p. 4874-4883.
68. Scott, C.C., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: a few bugs in the system*. The Journal of Membrane Biology, 2003. **193**(3): p. 137-152.
69. Desjardins, M., L.A. Huber, R.G. Parton, and G. Griffiths, *Biogenesis of phagolysosomes preceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus*. The Journal of Cell Biology, 1994. **124**: p. 677-688.
70. Meresse, S., O. Steele-Mortimer, E. Moreno, M. Desjardins, B. Finlay, and J.P. Gorvel, *Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death*. Nature Cell Biology 1999. **1**(7): p. E183-188.
71. Hackstadt, T., *Redirection of host vesicle trafficking pathways by intracellular parasites*. Traffic, 2000. **1**(2): p. 93-99.
72. Kahn, R.A., H. Fu, and C.R. Roy, *Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection*. Trends in Biochemical Sciences, 2002. **27**(6): p. 308-314.
73. Roy, C.R., *Exploitation of the endoplasmic reticulum by bacterial pathogens*. Trends in Microbiology, 2002. **10**(9): p. 418-424.
74. Maurin, M., A.M. Benoliel, P. Bongrand, and D. Raoult, *Phagolysosomes of Coxiella burnetii-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection*. Infection and Immunity, 1992. **60**(12): p. 5013-5016.
75. Baca, O.G., Y.P. Li, and H. Kumar, *Survival of the Q fever agent Coxiella burnetii in the phagolysosome*. Trends in Microbiology, 1994. **2**(12): p. 476-480.
76. Hackstadt, T. and J.C. Williams, *Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1981. **78**: p. 3240-3244.
77. Akporiaye, E.T., J.D. Rowatt, A.A. Aragon, and O.G. Baca, *Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with Coxiella burnetii*. Infection and Immunity, 1983. **40**(3): p. 1155-62.
78. Antoine, J.C., E. Prina, C. Jouanne, and P. Bongrand, *Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH*. Infection and Immunity, 1990. **58**(3): p. 779-87.
79. Heinzen, R.A., T. Hackstadt, and J.E. Samuel, *Developmental biology of Coxiella burnetii*. Trends in Microbiology, 1999. **7**(4): p. 149-154.

80. McCaul, T.F. and J.C. Williams, *Developmental cycle of Coxiella burnetii: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations*. Journal of Bacteriology 1981. **147**(3): p. 1063-1076.
81. Samuel, J.E., K. Kiss, and S. Varghees, *Molecular pathogenesis of Coxiella burnetii in a genomics era*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2003. **990**: p. 653-663.
82. Coleman, S.A., E.R. Fischer, D. Howe, D.J. Mead, and R.A. Heinzen, *Temporal analysis of Coxiella burnetii morphological differentiation*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(21): p. 7344-7352.
83. Coleman, S.A., E.R. Fischer, D.C. Cockrell, D.E. Voth, D. Howe, D.J. Mead, J.E. Samuel, and R.A. Heinzen, *Proteome and antigen profiling of Coxiella burnetii developmental forms*. Infection and Immunity, 2007. **75**(1): p. 290-298.
84. Meconi, S., C. Capo, M. Remacle_Bonnet, G. Pommier, D. Raoult, and J.L. Mege, *Activation of protein tyrosine kinases by Coxiella burnetii: role in actin cytoskeleton reorganization and bacterial phagocytosis*. Infection and Immunity, 2001. **69**(4): p. 2520-2526.
85. Meconi, S., V. Jacomo, P. Boquet, D. Raoult, J.L. Mege, and C. Capo, *Coxiella burnetii induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes*. Infection and Immunity, 1998. **66**(11): p. 5527-5533.
86. Gutierrez, M.G., C.L. Vázquez, D.B. Munafó, F.C. Zoppino, W. Berón, M. Rabinovitch, and M.I. Colombo, *Autophagy induction favours the generation and maturation of the Coxiella-replicative vacuoles*. Cellular Microbiology, 2005. **7**(7): p. 981-93.
87. Backert, S. and T.F. Meyer, *Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis*. Current Opinion in Microbiology, 2006. **9**(2): p. 207-217.
88. Yeo, H.J. and G. Waksman, *Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(7): p. 1919-1926.
89. Roy, C.R., *The Dot/Icm transporter of Legionella pneumophila: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts*. International Journal of Medical Microbiology, 2002. **291**(6-7): p. 463-467.
90. Ninio, S. and C.R. Roy, *Effector proteins translocated by Legionella pneumophila: strength in numbers*. Trends in Microbiology, 2007. **15**(8): p. 372-380.
91. Zamboni, D.S., S. McGrath, M. Rabinovitch, and C.R. Roy, *Coxiella burnetii express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the Legionella pneumophila Dot/Icm system*. Molecular Microbiology, 2003. **49**(4): p. 965-976.
92. Armstrong, P.M., L.R. Brunet, A. Spielman, and S.R. Telford, *Risk of Lyme disease: perceptions of residents of a Lone Star tick-infested community*. Bulletin of the World Health Organization, 2001. **79**(10): p. 916-925.
93. Williams, J.C., M.G. Peacock, and T.F. McCaul, *Immunological and biological characterization of Coxiella burnetii, phases I and II, separated from host components*. Infection and Immunity 1981. **32**(2): p. 840-851.
94. Kovárová, H., P. Halada, P. Man, I. Golovliov, Z. Krocová, J. Spacek, S. Porkertová, and R. Necasová, *Proteome study of Francisella tularensis live vaccine strain-containing phagosome in Bcg/Nramp1 congenic macrophages:*

- resistant allele contributes to permissive environment and susceptibility to infection.* Proteomics, 2002. **2**(1): p. 85-93.
95. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
96. Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt, *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.* Electrophoresis, 1988. **9**(6): p. 255-262.
97. Schägger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.* Annals of Biochemistry, 1987. **166**(2): p. 368-379.
98. Schägger, H., *Tricine-SDS-PAGE.* Nature Protocols, 2006. **1**(1): p. 16-22.
99. Rais, I., M. Karas, and H. Schagger, *Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification.* Proteomics, 2004. **4**(9): p. 2567-2571.
100. Gevaert, K., J. Van Damme, M. Goethals, G.R. Thomas, B. Hoorelbeke, H. Demol, L. Martens, M. Puype, A. Staes, and J. Vandekerckhove, *Chromatographic isolation of methionine-containing peptides for gel-free proteome analysis-Identification of more than 800 Escherichia coli proteins.* Molecular and Cellular Proteomics, 2002. **1**(11): p. 896-903.
101. Klein, C., C. Garcia-Rizo, B. Bisle, B. Scheffer, H. Zischka, F. Pfeiffer, F. Siedler, and D. Oesterhelt, *The membrane proteome of Halobacterium salinarum.* Proteomics, 2005. **5**(1): p. 180-197.
102. Yi, E.C., M. Marelli, H. Lee, S.O. Purvine, R. Aebersold, J.D. Aitchison, and D.R. Goodlett, *Approaching complete peroxisome characterization by gas-phase fractionation.* Electrophoresis, 2002. **23**(18): p. 3205-3216.
103. Skultety, L., L. Hernychova, R. Toman, M. Hubalek, K. Slaba, J. Zechovska, V. Stofanikova, J. Lenco, J. Stulik, and A. Macela, *Coxiella burnetii whole cell lysate protein identification by mass spectrometry and tandem mass spectrometry.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2005 **1063**: p. 115-122.
104. Bunai, K. and K. Yamane, *Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives.* Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **815**(1-2): p. 227-236.
105. Stuart, L.M. and R.A. Ezekowitz, *Phagocytosis: elegant complexity.* Immunity 2005. **22**(5): p. 539-550.
106. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully.* The Biochemical Journal, 2002. **366**(3): p. 689-704.
107. Niviere, V. and M. Fontecave, *Discovery of superoxide reductase: an historical perspective.* Journal of Biological Inorganic Chemistry 2004. **9**(2): p. 119-123.
108. Heinzen, R.A., M.E. Frazier, and L.P. Mallavia, *Coxiella burnetii superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in Escherichia coli.* Infection and Immunity, 1992. **60**(9): p. 3814-3823.
109. Wood, Z.A., E. Schroder, J. Robin Harris, and L.B. Poole, *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins.* Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(1): p. 32-40.
110. Rhee, S.G., S.W. Kang, L.E. Netto, M.S. Seo, and E.R. Stadtman, *A family of novel peroxidases, peroxiredoxins.* Biofactors, 1999. **10**(2-3): p. 207-209.

111. Seaver, L.C. and J.A. Imlay, *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(24): p. 7173-7181.
112. Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe, *Peroxiredoxins*. Biological Chemistry 2002. **383**(3-4): p. 347-364.
113. Jeong, W., M.K. Cha, and I.H. Kim, *Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family*. The Journal of Biological Chemistry 2000. **275**(4): p. 2924-2930.
114. Wang, G., P. Alamuri, and R.J. Maier, *The diverse antioxidant systems of Helicobacter pylori*. Molecular Microbiology 2006. **61**(4): p. 847-860.
115. Hansen, A.M., Y. Gu, M. Li, M. Andrykovitch, D.S. Waugh, D.J. Jin, and X. Ji, *Structural basis for the function of stringent starvation protein a as a transcription factor*. The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(17): p. 17380-17391.
116. Hansen, A.M., Y. Qiu, N. Yeh, F.R. Blattner, T. Durfee, and D.J. Jin, *SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in Escherichia coli*. Molecular Microbiology, 2005. **56**(3): p. 719-734.
117. Kvint, K., L. Nachin, A. Diez, and T. Nystrom, *The bacterial universal stress protein: function and regulation*. Current Opinion in Microbiology, 2003. **6**(2): p. 140-145.
118. VanBogelen, R.A., M.E. Hutton, and F.C. Neidhardt, *Gene-protein database of Escherichia coli K-12: edition 3*. Electrophoresis, 1990. **11**(12): p. 1131-1166.
119. Kazakov, A.E., O. Vassieva, M.S. Gelfand, A. Osterman, and R. Overbeek, *Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs*. In Silico Biology, 2003. **3**(1-2): p. 3-15.
120. Kim, S.K., K. Makino, M. Amemura, H. Shinagawa, and A. Nakata, *Molecular analysis of the phoH gene, belonging to the phosphate regulon in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1993. **175**(5): p. 1316-1324.
121. Cirillo, S.L., J. Lum, and J.D. Cirillo, *Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila*. Microbiology, 2000. **146**(6): p. 1345-1359.
122. Mo, Y.Y., N.P. Cianciotto, and L.P. Mallavia, *Molecular cloning of a Coxiella burnetii gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue*. Microbiology, 1995. **141**(11): p. 2861-2871.
123. Schroder, G. and C. Dehio, *Virulence-associated type IV secretion systems of Bartonella*. Trends in Microbiology, 2005. **13**(7): p. 336-342.
124. Remaut, H. and G. Waksman, *Structural biology of bacterial pathogenesis*. Current Opinion in Structural Biology, 2004. **14**(2): p. 161-170.
125. Christie, P.J. and J.P. Vogel, *Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells*. Trends in Microbiology, 2000. **8**(8): p. 354-360.
126. Behnia, R. and S. Munro, *Organelle identity and the signposts for membrane traffic*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 597-604.
127. Salcedo, S.P. and D.W. Holden, *Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway*. Current Opinion in Microbiology, 2005. **8**(1): p. 92-98.
128. Pizarro-Cerda, J. and P. Cossart, *Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens*. Nature Cell Biology, 2004. **6**(11): p. 1026-1033.

129. Samoilis, G., A. Psaroulaki, K. Vougas, Y. Tselentis, and G. Tsiotis, *Analysis of Whole Cell Lysate from the Intercellular Bacterium Coxiella burnetii Using Two Gel-Based Protein Separation Techniques*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(8): p. 3032-3041.
130. Segal, G. and H.A. Shuman, *Possible origin of the Legionella pneumophila virulence genes and their relation to Coxiella burnetii*. Molecular Microbiology, 1999. **33**(3): p. 669-670.
131. Zusman, T., G. Yerushalmi, and G. Segal, *Functional similarities between the icm/dot pathogenesis systems of Coxiella burnetii and Legionella pneumophila*. Infection and Immunity, 2003. **71**(7): p. 3714-3723.
132. Zhou, J. and Z. Xu, *The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function*. Molecular Microbiology, 2005. **58**(2): p. 349-357.
133. Baars, L., A.J. Ytterberg, D. Drew, S. Wagner, C. Thilo, K.J. van Wijk, and J.W. de Gier, *Defining the role of the Escherichia coli chaperone SecB using comparative proteomics*. The Journal of Biological Chemistry 2006. **281**(15): p. 10024-10034.
134. Randall, L.L. and S.J. Hardy, *SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2002. **59**(10): p. 1617-1623.
135. Johnson, T.L., J. Abendroth, W.G. Hol, and M. Sandkvist, *Type II secretion: from structure to function*. FEMS Microbiology Letters, 2006. **255**(2): p. 175-186.
136. Cianciotto, N.P., *Type II secretion: a protein secretion system for all seasons*. Trends in Microbiology, 2005. **13**(12): p. 581-588.
137. Burrows, L.L., *Weapons of mass retraction*. Molecular Microbiology, 2005. **57**(4): p. 878-888.
138. Lazzaroni, J.C., P. Germon, M.C. Ray, and A. Vianney, *The Tol proteins of Escherichia coli and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability*. FEMS Microbiology Letters, 1999. **177**(2): p. 191-197.
139. Hellman, J., J.D.J. Roberts, M.M. Tehan, J.E. Allaire, and H.S. Warren, *Bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein is released into the bloodstream in gram-negative sepsis and causes inflammation and death in mice*. The Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(16): p. 14274-14280.
140. Fortney, K.R., R.S. Young, M.E. Bauer, B.P. Katz, A.F. Hood, R.S.J. Munson, and S.M. Spinola, *Expression of peptidoglycan-associated lipoprotein is required for virulence in the human model of Haemophilus ducreyi infection*. Infection and Immunity, 2000. **68**(11): p. 6441-6448.
141. Bowe, F., C.J. Lipps, R.M. Tsohis, E. Groisman, F. Heffron, and J.G. Kusters, *At least four percent of the Salmonella typhimurium genome is required for fatal infection of mice*. Infection and Immunity, 1998. **66**(7): p. 3372-3377.
142. Heilpern, A.J. and M.K. Waldor, *CTXphi infection of Vibrio cholerae requires the tolQRA gene products*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(6): p. 1739-1747.
143. Dubuisson, J.F., A. Vianney, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and J.C. Lazzaroni, *Tol-Pal proteins are critical cell envelope components of Erwinia chrysanthemi affecting cell morphology and virulence*. Microbiology, 2005. **151**(10): p. 3337-3347.
144. Rogers, H.J., H.R. Perkins, and J.B. Ward, *Microbial cell wall and membranes*. 1980: Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.

145. Jedrzejewski, M.J., *Pneumococcal virulence factors: structure and function*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2001. **65**(2): p. 187-207.
146. Lopez, R., J.L. Garcia, E. Garcia, C. Ronda, and P. Garcia, *Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of Streptococcus pneumoniae and its bacteriophage*. FEMS Microbiology Letters 1992. **79**(1-3): p. 439-447.
147. Ronda, C., J.L. Garcia, E. Garcia, J.M. Sanchez-Puelles, and R. Lopez, *Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the lytA gene in Streptococcus pneumoniae*. European Journal of Biochemistry, 1987. **164**(3): p. 621-624.
148. Tuomanen, E., *Molecular and cellular biology of pneumococcal infection*. Current Opinion in Microbiology, 1999. **2**(1): p. 35-39.
149. Mitchell, T.J., J.E. Alexander, P.J. Morgan, and P.W. Andrew, *Molecular analysis of virulence factors of Streptococcus pneumoniae*. Society for Applied Bacteriology Symposium Series, 1997. **26**: p. 62S-71S.
150. Hoover, T.A., D.W. Culp, M.H. Vodkin, J.C. Williams, and H.A. Thompson, *Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the Coxiella burnetii nine mile strain*. Infection and Immunity, 2002. **70**(12): p. 6726-6733.
151. Moos, A. and T. Hackstadt, *Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of Coxiella burnetii in the guinea pig model*. Infection and Immunity, 1987. **55**(5): p. 1144-1150.
152. Glöckner, G., C. Albert-Weissenberger, E. Weinmann, S. Jacobi, E. Schunder, M. Steinert, J. Hacker, and K. Heuner, *Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of Legionella pneumophila Corby localized on two mobile genomic islands*. International Journal of Medical Microbiology, 2007. **Sep 19** [Epub ahead of print].
153. Cho, N.H., H.R. Kim, J.H. Lee, S.Y. Kim, J. Kim, S. Cha, S.Y. Kim, A.C. Darby, H.H. Fuxelius, J. Yin, J.H. Kim, J. Kim, S.J. Lee, Y.S. Koh, W.J. Jang, K.H. Park, S.G. Andersson, M.S. Choi, and I.S. Kim, *The Orientia tsutsugamushi genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(19): p. 7981-1986.
154. Beron, W., M.G. Gutierrez, M. Rabinovitch, and M.I. Colombo, *Coxiella burnetii localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics*. Infection and Immunity, 2002. **70**(10): p. 5816-5821.