

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΕΚΚΡΙΣΗΣ
ΤΥΠΟΥ ΙΙΙ ΣΤΟ ΕΝΤΕΡΟΠΑΘΟΓΟΝΟ *E. coli***

ΜΠΑΛΑΜΠΑΝΙΔΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ

Επιβλέπων καθηγητής : Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
(ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή
 - 1.1 Εκκριτικά συστήματα πρωτεϊνών
 - 1.1.1 Ευκαρυωτικά κύτταρα
 - 1.1.2 Βακτήρια
 - 1.2 Το σύστημα έκκρισης τύπου III
 - 1.2.1 Εξελικτική ομοιότητα με το μαστίγιο
 - 1.2.2 Δομή του συριγγίου
 - 1.2.3 Δομή του βασικού σωματίου
 - 1.2.4 Η βελόνη, το ινίδιο και το τριχίδιο
 - 1.2.5 Ο πόρος μετατόπισης
 - 1.2.6 Οι T3S σαπερόνες
 - 1.3 Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC)
 - 1.3.1 Κλινικά συμπτώματα και παθολογία
 - 1.3.2 Ο γενετικός τόπος της εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE)
 - 1.3.3 Εντοπισμένη προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα
 - 1.3.4 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες του EPEC (Espς)
 - 1.3.5 Στενή προσκόλληση και ο ρόλος της Tir πρωτεΐνης
 - 1.3.6 Δομή της A/E κάκωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2. ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΑΠΕΡΟΝΗΣ CesAB
 - 2.1 CesAB και παράγωγες DNA κατασκευές
 - 2.2 Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης CesAB και των μεταλλαγμένων παραγώγων της

- 2.3 Συνέκφραση και συγκαθαρισμός της πρωτεΐνης CesAB (αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων) και του μεταθέτη EspA
- 2.4 Η CesAB είναι μία φυσικά αποδιαταγμένη και διμερής πρωτεΐνη
- 2.5 Τα δομικά χαρακτηριστικά της CesAB είναι διατηρημένα σε αυτή την τάξη των σαπερονών
- 2.6 Η δομή της σαπερόνης CesAB παρουσιάζει σταθεροποιητή των α -ελίκων
- 2.7 Η CesAB(E20L) πρωτεΐνη είναι ένα σταθεροποιημένο ομοδιμερές

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3. Πολλαπλοί ρόλοι της σαπερόνης CesAB κατά την σταθεροποίηση, την στόχευση στην μεμβράνη και την μετατόπιση εκκρινόμενων πρωτεϊνών μέσω του T3S.
 - 3.1 Η CesAB σαπερόνη αποτελείται από δύο διακριτές υποπεριοχές
 - 3.2 Η αμινο-τελική (N) περιοχή της CesAB μπορεί να προσδέσει είτε EspA είτε EspB
 - 3.3 Σημειακές μεταλλαγές στην N-περιοχή επηρεάζουν *in vivo* την έκκριση της EspA αλλά όχι της EspB
 - 3.4 Η έλλειψη της ακραίας καρβοξυ-τελικής περιοχής μειώνει δραματικά τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης CesAB
 - 3.5 Μελέτη της παθογένεσης EPEC στελεχών με τη βοήθεια κυτταρικών μοντέλων
 - 3.6 Η καρβοξυ-τελική περιοχή είναι αναγκαία για τη στόχευση στη μεμβράνη των μεταθετών EspA και EspB
 - 3.7 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA με εγγενή ηλεκτροφόρηση
 - 3.8 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA με φασματομετρία μάζας (Mass spectroscopy)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 4. Χαρακτηρισμός της EscN ATPάσης
 - 4.1 EscN και παράγωγες DNA κατασκευές
 - 4.2 Έκφραση και απομόνωση του μονομερούς της EscN πρωτεΐνης

- 4.3 Έκφραση και απομόνωση του εξαμερούς της GFP-EscN πρωτεΐνης
- 4.4 Μόνο η εξαμερής GFP-EscN έχει δραστικότητα ΑΤΡάσης
- 4.5 Μέτρηση συγγένειας μεταξύ του εξαμερούς GFP-EscN και της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης CesAB με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης
- 4.6 Η EscN πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη στόχευση και των δύο μεταθετών EspA και EspB στη μεμβράνη

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 – ΣΥΖΥΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 : Φαίνονται όλα τα συστήματα-εξόδου, συστήματα-έκκρισης και συστήματα- ενσωμάτωσης στη μεμβράνη, που είναι γνωστά.

Σχήμα 1.2 : Δομή του μαστιγίου και των συριγγίων.

Σχήμα 1.3 : Ηλεκτρονικές μικρογραφίες μετά από αρνητική χρώση συμπλόκων βελόνης από τη *Shigella* και το EPEC.

Σχήμα 1.4 : Δομή του συριγγίου.

Σχήμα 1.5 : Διάγραμμα ενός βακτηριακού T3S.

Σχήμα 1.6 : Τρισδιάστατη αναπαράσταση και μοντελοποίηση της ATPάσης HrcN από την *P. syringae*.

Σχήμα 1.7 : Μοντέλο σχηματισμού του εξαμερούς της EscN.

Σχήμα 1.8 : Κρυσταλλική δομή του MxiH μονομερούς και σύγκρισή του με σχετικές πρωτεΐνες.

Σχήμα 1.9 : Τρισδιάστατη εικόνα ενός μονού πόρου.

Σχήμα 1.10 : Δομή από τάξης I σαπερόνες σε σύμπλοκο με τα υποστρώματά τους.

Σχήμα 1.11 : Κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ της CesAB σαπερόνης (μπλε) και του υποστρώματός της EspA (κόκκινο).

Σχήμα 1.12 : Η μετατόπιση των Esps γίνεται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III, το οποίο σχηματίζει έναν πόρο που διαπερνά τις βακτηριακές μεμβράνες.

Σχήμα 1.13 : Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης οι οποίες δείχνουν την πρωταρχική προσκόλληση EPEC στελεχών σε HEL επιθηλιακά κύτταρα.

Σχήμα 1.14 : Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, όπου ένα βακτήριο προσβάλλει σειρές επιθηλιακών κυττάρων και το ψευδοπόδιο έχει σχηματιστεί.

Σχήμα 1.15 : Η δομή μιας προεκβολής κατά την μόλυνση με EPEC

Σχήμα 2.1 : Χάρτης της πρωτεΐνης CesAB και των μεταλλαγμένων παραγώγων της.

Σχήμα 2.2 : Έκφραση της πρωτεΐνης CesAB σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακό στέλεχος.

Σχήμα 2.3 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CesAB με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 2.4 : Το pET Duet-1 σύστημα για τη συνέκφραση δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε με τρόπο ώστε το *cesAB* γονίδιο να κλωνοποιηθεί στην πρώτη θέση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 1 (T7p1), ενώ το *espA* γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη δεύτερη θέση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 2 (T7p2).

Σχήμα 2.5 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CesAB και EspA με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 2.6 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesAB με πειράματα MALLS.

Σχήμα 2.7 : Μέτρηση της μάζας του συμπλόκου CesAB/EspA με πειράματα MALLS.

Σχήμα 2.8 : Εκλουσμένα δείγματα από ρητίνη Ni²⁺-NTA.

Σχήμα 2.9 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesAB με ανάλυση MALLS παρουσία TFE.

Σχήμα 2.10 : Περιορισμένη τρυψινόλυση παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων TFE.

Σχήμα 2.11 : Αναπαράσταση ελικωτής ρόδας της α1 και αII έλικας από την CesAB και EspA πρωτεΐνη αντίστοιχα.

Σχήμα 2.12 : Σχηματισμός διαμοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του Glu20 της α1-έλικας της CesAB (μπλε χρώμα) και της Arg174 της αII-έλικας της EspA πρωτεΐνης (κόκκινο χρώμα).

Σχήμα 2.13 : Καθορισμός της μάζας της πρωτεΐνης CesAB και CesAB(E20L) στο διάλυμα παρουσία ουρίας.

Σχήμα 2.14 : Συνέκφραση και συγκαθαρισμός *ex vivo* είτε της αγρίου τύπου πρωτεΐνης CesAB, είτε του μεταλλάγματος CesAB(E20L), με το μεταθέτη EspA.

Σχήμα 3.1 : Αριστερά, περιορισμένη τρυψινόλυση της CesAB μόνη της ή σε σύμπλοκο με EspA. Δεξιά, αμινοτελική αλληλούχιση των πεπτιδίων p9 και p12.

Σχήμα 3.2 : Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της CesAB, όπου α₁₋₃ είναι οι τρεις αμινοτελικές έλικες και η C-ουρά (C-tail) είναι το άλυτο κρυσταλλογραφικά καρβοξυ-τελικό άκρο (αα 86-95).

Σχήμα 3.3 : Το pET Duet-1 σύστημα για συνέκφραση δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση αυτήν.

Σχήμα 3.4 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesABΔC μόνη της (A) ή σε σύμπλοκο με EspA (B).

Σχήμα 3.5 : *Ex vivo* συνέκφραση και συγκαθαρισμός είτε της CesAB, είτε της CesABΔC ή της CesAB(E20L/E30L) με το μεταθέτη EspA και EspB.

Σχήμα 3.6 : Έκκριση *in vivo* του EspA και του EspB από EPECΔCesAB βακτήρια που περιέχουν pASK-IBA7 plus πλασμιδιακούς φορείς και μπορούν να εκφράζουν είτε την CesAB είτε την CesAB(E20L/E30L), κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου υποκινητή από τετρακυκλίνη .

Σχήμα 3.7 : Ολόκληρα κύτταρα από EPECΔCesAB βακτήρια, τα οποία εκφράζουν ή όχι CesAB, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αCesAB, αEspA, αEspB και αCesF αντισώματα, για την ύπαρξη των αντίστοιχων πρωτεϊνών.

Σχήμα 3.8 : Έκκριση *in vivo* του EspA και του EspB από EPECΔCesAB βακτήρια που περιέχουν pASK-IBA7 plus πλασμιδιακούς φορείς και μπορούν να εκφράζουν είτε την CesAB είτε την CesABΔC, μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη.

Σχήμα 3.9 : Ενδοκυτταρικά επίπεδα της CesAB, EspA και EspB από EPECΔCesAB βακτήρια, τα οποία εκφράζουν είτε CesAB είτε CesABΔC, μετά την επαγωγή τους με τετρακυκλίνη.

Σχήμα 3.10 : Επιμόλυνση ερυθροκυττάρων από στελέχη EPEC.

Σχήμα 3.11 : Επιμόλυνση κυττάρων HeLa από στελέχη EPEC.

Σχήμα 3.12 : Υπο-κυτταρική διαμερισματοποίηση για εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo*.

Σχήμα 3.13 : Ήπια λύση των κυττάρων.

Σχήμα 3.14 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση.

Σχήμα 3.15 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση.

Σχήμα 3.16 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση.

Σχήμα 4.1 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (πρώτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 4.2 : Πρωτεόλυση της His-TEV-EscN από την His-TEV πρωτεάση.

Σχήμα 4.3 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (τρίτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 4.4 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (τέταρτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 4.5 : Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Superdex 200 HR 10/30 FPLC κολώνα (Amersham), προεξισορροπημένη με 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 50 mM NaCl και με ταχύτητα ροής 0.4 ml/min.

Σχήμα 4.6 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης GFP-EscN με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 4.7 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης GFP-EscN με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Σχήμα 4.8 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης GFP-EscN.

Σχήμα 4.9 : Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Superdex 200 HR 10/30 FPLC κολώνα (Amersham), προεξισορροπημένη με 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 50 mM NaCl και με ταχύτητα ροής 0.4 ml/min.

Σχήμα 4.10 : Μέτρηση συγγένειας της GFP-EscN για την καρβοξυ-περιοχή της CesAB με ITC.

Σχήμα 4.11 : Υπο-κυτταρική διαμερισματοποίηση για εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo*.

Σχήμα 5.1 : Μοντέλο της αλληλεπίδρασης του EPEC με επιθηλιακά κύτταρα

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	Adenosine diphosphate
A/E	Attaching/Effacing
ATP	Adenosine triphosphate
a.u.	arbitrary units
BFP	Bundle Forming Pilus
C-tail	Carboxyterminal-tail
DTT	Dithiothreitol
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogenic E. coli
Fla	Flagellum
GFP	Green Fluorescent Protein
HM	Host cell Membrane
IM	Inner Membrane
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LOL	Lipoprotein outer-membrane localization
MALLS	Multi-angle Laser Light Scattering
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTA	Nitrilotriacetic acid
OM	Outer Membrane
Omp	Outer membrane protein
OD	Optical Density
P ring	Peptidoglycan ring
PCR	Polymerase Chain Reaction
Per	Periplasm
PMSF	Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride
PG	Peptidoglycan

SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC	Size Exclusion Chromatography
Sort	Sortase
T2S	Type II secretion
T3S	Type III secretion
T4P	Type IV pilus
T4S	Type IV secretion
T5S	Type V secretion
T6S	Type VI secretion
TM	Transmembrane
Tir	Translocated intimin receptor
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το συρίγγιο τύπου III είναι μια περίπλοκη νανομηχανή, η οποία επιτρέπει στα βακτήρια να μεταφέρουν τις τοξικές πρωτεΐνες τους διαμέσω των ευκαρυωτικών κυτταρικών μεμβρανών. Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος ως προς την μελέτη της δομής του, της διαδικασίας της συναρμολόγησής του, αλλά κυρίως του τρόπου δράσης του. Με βάση την παρούσα γνώση, το συρίγγιο τύπου III αποτελείται από το βασικό σωματίο, το οποίο διαπερνά τις βακτηριακές μεμβράνες και την πεπτιδογλυκάνη και συνεχίζει εξωκυτταρικά στη βελόνη και το ινίδιο. Όλη αυτή η δομή πιστεύεται πως δρα σαν ένας κενός δίαυλος διαμέσω του οποίου θα μεταναστεύσουν οι μολυσματικές πρωτεΐνες του βακτηρίου έως το κυτταρόπλασμα του ξενιστή τους. Κεντρικό ρόλο στη διαδικασία έκκρισης φαίνεται να παίζει επίσης και μια σειρά από εξειδικευμένες σαπερόνες του συστήματος III. Παρά τις πρόσφατες μελέτες, ο ακριβής ρόλος τους στην εκκριτική διαδικασία παραμένει αινιγματικός.

Σε αυτή τη μελέτη στοχεύουμε στη διερεύνηση του ρόλου της σαπερόνης CesAB από το εντεροποθογόνο *E. coli* (EPEC) κατά την έκκριση των υποστρωμάτων της EspA και EspB από το βακτηριακό κύτταρο. Παράλληλα χαρακτηρίζουμε την ATPάση του συστήματος EscN ως πιθανό τελικό αποδέκτη του συμπλόκου σαπερόνης-υπόστρωμα.

Έτσι, αρχικά χαρακτηρίζουμε δομικά την πρωτεΐνη και αποκαλύπτουμε έναν νέο μηχανισμό αλληλεπίδρασης, όπου τόσο η CesAB όσο και το υπόστρωμά της, EspA, μεταπίπτουν από την φυσική τους μη-αναδιπλωμένη κατάσταση σε μια πλήρως αναδιπλωμένη κατά την διάρκεια και μόνο της αλληλεπίδρασης τους (mutual folding).

Παράλληλα με βιοχημικά πειράματα δείχνουμε πως η σαπερόνη αποτελείται από δύο διακριτές λειτουργικά αλλά και δομικά περιοχές, την αμινο-τελική περιοχή (N-περιοχή) και την καρβοξυ-τελική ουρά (C-ουρά). Με τη δημιουργία σημειακών μεταλλαγών στην N-περιοχή αρχικά, δείχνουμε πως η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για τη δράση της ως σαπερόνη στο υπόστρωμα EspA, αλλά όχι και στο EspB. Εν συνεχεία, αποκαλύπτουμε πως η C-ουρά είναι ζωτικής σημασίας για την έκκριση και των δύο υποστρωμάτων, καθώς όταν αυτή απουσιάζει όχι μόνο δε θα εκκριθούν αποτελεσματικά από το κύτταρο, αλλά και τα δύο υποστρώματα δε θα στοχευτούν στη μεμβράνη, τη

φυσική τους θέση πριν από την έκκριση. Εξετάζοντας επιπλέον τον ρόλο της C-ουράς βρίσκουμε πως συμμετέχει στο σχηματισμό ενός υπερ-μοριακού εκκριτικού ενδιάμεσου.

Η φυσιολογική σημασία των δύο υπο-περιοχών της C_{esAB} ελέγχεται επίσης με τη χρήση κυτταρικών μοντέλων, εμπλέκοντας έμμεσα τις περιοχές αυτές στην παθογονικότητα του EPEC. Τέλος, εξετάζοντας και την σπουδαιότητα της ATPάσης του συστήματος κατά την έκκριση των υποστρωμάτων, προσδιορίζουμε την ενεργή της μορφή και μετρούμε τη συγγένειά της με την C-ουρά. Τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής στοιχειοθετούν ένα σημαντικό πλαίσιο για την περαιτέρω διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού έκκρισης των δύο μεταθετών EspA και EspB από το EPEC.

SUMMARY

The type III secretion injectisome is a complex nanomachine, that allows bacteria to deliver protein effectors across eukaryotic cellular membranes. In recent years, significant progress has been made in our understanding of its structure, assembly and mode of operation. In the present stage of knowledge, it consists of a basal structure that traverses the bacterial envelope and the peptidoglycan, surmounted by a needle and a filament. The whole structure can act as a hollow conduit, through which all the virulence proteins will be delivered to the cytosol of the host. A key element in the secretion system is a set of chaperones in the bacterial cytosol, the dedicated type III chaperones. Their exact role in the secretion process remains enigmatic.

The main goal of this study is the investigation of the molecular role of the CesAB chaperone from the Enteropathogenic *coli* (EPEC) during secretion of its substrates, EspA and EspB. In parallel we are characterizing the EscN ATPase of the system, as a final acceptor of the soluble complexes between chaperones-substrates.

Firstly, we are characterizing structurally the chaperone alone or in complex with its substrate and we reveal a novel mechanism of recognition, the mutual folding during binding of a substrate to its chaperone.

In parallel with biochemical experiments, we are demonstrating that the CesAB chaperone consists of two distinct, functionally and structurally, domains, the N-terminal domain (N-domain) and the C-terminal tail (C-tail). Through mutagenesis to the N-domain of the protein, we are clearly showing that this domain is responsible for the chaperone-like function of CesAB, only for EspA and not EspB substrate. Then we are demonstrating that the C-tail is absolutely essential for the effective secretion of both substrates, not only because in the absence of the C-tail the substrates cannot be secreted, but also because they cannot be localized to the membrane fraction of the cell, their natural place before secretion. In addition, we are showing that the C-tail is involved in the formation of a super-molecular complex intracellularly in the secretion pathway.

The physiological significance of these two domains of the CesAB chaperone is tested using cell models, and their importance for the pathogenicity is revealed. Finally we are managing to isolate the stable active form of the EscN ATPase of the system and measure affinity for the C-tail of the CesAB chaperone. The results of this study reveal

very important key points for the secretion process of the two translocators, EspA and EspB, through the type III secretion system of EPEC.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε όλα τα κύτταρα, ένα σημαντικό ποσοστό, των συντιθέμενων από κυτταροπλασματικά ριβοσώματα πρωτεϊνών, πρέπει να μετατοπιστεί διαμέσω ή να ενσωματωθεί σε μεμβράνες. Οι μεμβράνες αποτελούν εξ' ορισμού το διαχωριστικό μεταξύ δύο υδατικών διαμερισμάτων. Έτσι η μετατόπιση μακρομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, από την μια μεριά της μεμβράνης στην άλλη γεννά βασικά ερωτήματα : Πώς μετατοπίζονται πρωτεΐνες διαμέσω ή πως εισέρχονται σε μεμβρανικά περιβάλλοντα που είναι προορισμένα να εμποδίζουν αυτές τις διαδικασίες; Πώς διατηρείται το φράγμα διαπερατότητας της μεμβράνης όταν ένα μακρομόριο ή τμήμα του την διαπερνά; Από πού προέχεται η απαραίτητη ενέργεια για την μετατόπιση των πρωτεϊνών; Πώς αναγνωρίζονται τα διαμεμβρανικά τμήματα των ενσωματωμένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών και πώς εξασφαλίζεται ο σωστός προσανατολισμός τους στην μεμβρανική διπλοστοιβάδα; κ.α...

Αυτά τα ερωτήματα άρχισαν να απαντώνται σιγά σιγά με την ανακάλυψη των συστημάτων μεταφοράς, που εξασφαλίζουν στο κύτταρο, ευκαρυωτικό ή προκαρυωτικό, το σωστό εντοπισμό των πρωτεϊνών. Ένα σύνολο διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων χρησιμοποιήθηκε τις τελευταίες δεκαετίες για την ανακάλυψη και την μελέτη των συστημάτων αυτών. Με το συνδυασμό μελετών από διαφορετικά εργαστήρια έγινε γνωστό ότι οι οργανισμοί ανέπτυξαν πολύπλοκες μοριακές μηχανές για να ικανοποιήσουν την ανάγκη τους για την ταξιθέτηση των πρωτεϊνών στα διάφορα διαμερίσματα.

1.1 Εκκριτικά συστήματα πρωτεϊνών

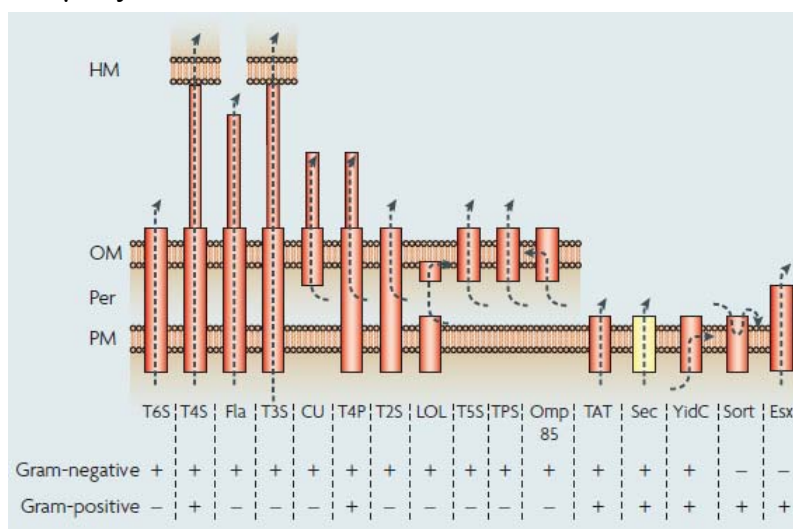
1.1.1 Ευκαρυωτικά κύτταρα

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα για παράδειγμα, υπάρχουν αρκετά διαμερίσματα τα οποία περιβάλλονται από μεμβράνες και συνεπώς τα κύτταρα αυτά διαθέτουν μια μεγάλη ποικιλία συστημάτων μεταφοράς. Έτσι, διακρίνουμε την πυρηνοπλάσματική μεταφορά πρωτεϊνών μέσω των κυτταρικών πόρων¹, τη συμμεταφραστική μετατόπιση πρωτεϊνών μέσω της SecYp μεταθετάσης στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου², καθώς και τον περαιτέρω διαμοιρασμό τους από την κοιλότητα του ER στο Golgi και από εκεί στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος κυστιδιακής μεταφοράς³. Επίσης, οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια διαθέτουν συστήματα έκκρισης πρωτεϊνών στην εσωτερική τους μεμβράνη που αποτελούν εξελικτικό υπόλειμμα της βακτηριακής τους προέλευσης^{4, 5}.

1.1.2 Βακτήρια

Η εξέλιξη έχει αποδώσει έναν αξιοσημείωτο αριθμό μηχανισμών που εκκρίνουν πρωτεΐνες. Δεκαέξι τέτοια συστήματα, τα οποία ελέγχουν την πρωτεϊνική έκκριση, τη διάκριση και την ένθεση στην μεμβράνη, βρίσκονται στα βακτήρια και μόνο (σχήμα 1.1). Από αυτά, μόνο το μονοπάτι Sec είναι ευρέως διαδεδομένο και είναι απαραίτητο για τη ζωή σε όλους τους οργανισμούς.

Σχήμα 1.1 : Φαίνονται όλα τα συστήματα-εξόδου, συστήματα-έκκρισης και συστήματα- ενσωμάτωσης στη μεμβράνη, που είναι γνωστά.

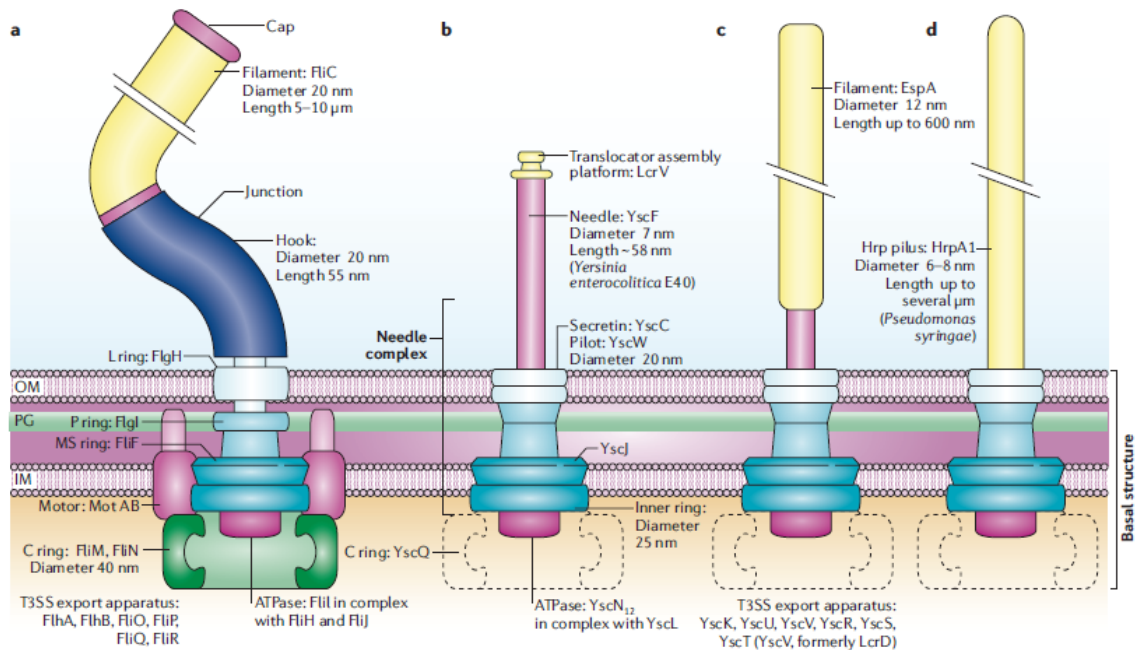


1.2 Το σύστημα έκκρισης τύπου III

Η πανώλη, ο τυφοειδής πυρετός, η βακτηριακή δυσεντερία και πολλές βακτηριακές ακόμη δυσεντερίες προκαλούνται από βακτηριακά παθογόνα, τα οποία χρησιμοποιούν ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύστημα έκκρισης, το λεγόμενο σύστημα έκκρισης τύπου III (T3S)⁶. Αυτό το σύστημα έχει καταπληκτική ικανότητα να εισάγει βακτηριακές μολυσματικές πρωτεΐνες κατευθείαν στο κύτταρο του ξενιστή, γεγονός που επιτρέπει σε αυτές τις πρωτεΐνες να ελέγχουν βιοχημικές λειτουργίες του ξενιστή, οι οποίες κυμαίνονται από τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων έως την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού. Το κεντρικό συστατικό του T3S είναι ένα υπερ-μοριακό οργανίδιο, το σύμπλοκο της βελόνης (needle complex), το οποίο διαπερνά τον βακτηριακό φάκελο και μοιάζει με μια μοριακή σύριγγα με βελόνα⁷. Πιστεύεται ότι αυτή η δομή λειτουργεί ως ένας κενός αγωγός, ο οποίος επιτρέπει στις μολυσματικές πρωτεΐνες να διασχίσουν το βακτηριακό φάκελο. Η τελική παράδοση των πρωτεϊνών αυτών απαιτεί μια οικογένεια βακτηριακών πρωτεϊνών, τους μεταθέτες (translocators), οι οποίοι κατά την έκκρισή τους από το σύμπλοκο της βελόνης, συνδέονται με τη μεμβράνη του ξενιστή σχηματίζοντας πόρους, ώστε να μεσολαβήσουν για την τελική παράδοση των μολυσματικών παραγόντων στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή⁸. Το σύμπλοκο της βελόνης μαζί με τους μεταθέτες αποτελούν το συρίγγιο (injectisome). Στα κεφάλαια που ακολουθούν γίνεται λεπτομερειακή αναφορά για το σύστημα έκκρισης τύπου III στα βακτήρια.

1.2.1 Εξελικτική ομοιότητα με το μαστίγιο

Πρόσφατες γενετικές μελέτες έχουν δείξει πως ένας πυρήνας 8 πρωτεϊνών από το συρίγγιο έχει εκπληκτική ομοιότητα με το μαστίγιο (σχήμα 1. 2)^{9, 10, 11}. Το μαστίγιο περιέχει ένα ενσωματωμένο σύστημα εξόδου των συστατικών του γάντζου (hook) και του ινιδίου¹².



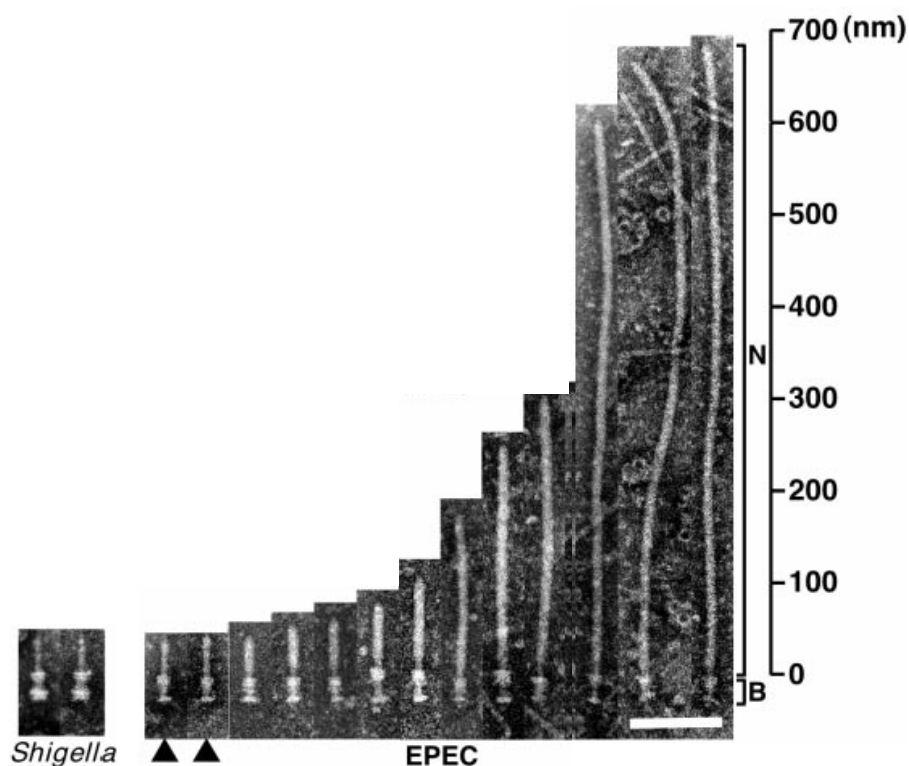
Σχήμα 1.2. Δομή του μαστιγίου και των συριγγίων. Σχηματική αναπαράσταση του μαστιγίου (a), Ysc συριγγίου (b), του συριγγίου από το EPEC (c) και το συρίγγιο από τα παθογόνα φυτών (d). Για τα συρίγγια, ο δακτύλιος C παρουσιάζεται με διακεκομμένες γραμμές καθώς τα δεδομένα γι' αυτό το συστατικό είναι ακόμη ανεπαρκή. IM : Εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, OM : εξωτερική μεμβράνη και PG : πεπτιδογλυκάνη.

Η κοινή εξελικτική προέλευση του συριγγίου και του μαστιγίου έγινε ακόμη πιο εμφανής όταν το σύμπλοκο της βελόνης, το οποίο κωδικοποιείται από το νησίδιο παθογένεσης 1 της *Salmonella* (pathogenicity island 1, SPI-1), απομονώθηκε από την *Salmonella typhimurium*, και παρατηρήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία⁷. Παρά το γεγονός, ότι πολύ συχνά θεωρείται πως το συρίγγιο έχει προέλθει από το μαστίγιο, κάποιες φυλογενετικές μελέτες δεν ενισχύουν την άποψη αυτή, καθώς υποστηρίζουν πως το συρίγγιο είναι τόσο αρχέγονο όσο και το μαστίγιο και ότι τελικά και τα δύο προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο¹³.

Συμπερασματικά, το T3S είναι ένα πρωτεϊνικό μονοπάτι εξόδου, το οποίο χρησιμοποιείται από δύο νανομηχανές, παρ' αυτά, στην πράξη, ο όρος T3S αναφέρεται κυρίως στο σύστημα έκκρισης ή μετατόπισης των μολυσματικών πρωτεϊνών, κατά την αλληλεπίδραση βακτηρίου-ξενιστή.

1.2. 2 Δομή του συριγγίου

Η ανασύσταση με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) του συμπλόκου της βελόνης από τη *Salmonella typhimurium* ήταν μια επιτυχία ορόσημο για το πεδίο⁷. Από τότε, το σύμπλοκο βελόνης από το EPEC¹⁴ και την *S. flexeni*^{15, 16} έχουν επίσης ανασυσταθεί με τη χρήση TEM (σχήμα 1.3 και σχήμα 1.4). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα σύμπλοκα βελόνης από την *S. typhimurium* και την *S. flexeni* ήταν πολύ όμοια μεταξύ τους. Αλλά και το σύμπλοκο βελόνης από το EPEC ήταν επίσης πολύ όμοιο, αν και μικρότερο, παρά το γεγονός πως αυτό το παράδειγμα ανήκει σε διαφορετική οικογένεια¹⁴. Αυτά τα ευρήματα συνηγορούν στο ότι η συνολική αρχιτεκτονική των συμπλόκων της βελόνης διατηρείται μεταξύ των διαφορετικών συριγγίων.



Σχήμα 1.3 : Ηλεκτρονικές μικρογραφίες μετά από αρνητική χρώση συμπλόκων βελόνης από τη *Shigella* και το EPEC. Ευθυγράμμιση των συμπλόκων από τα δύο είδη συγκριτικά. N αντιστοιχεί στην βελόνη (needle) και το B στο βασικό σωματίο (basal body) του EPEC.



Σχήμα 1.4 : Δομή του συριγγίου. Τρισδιάστατη δομή συριγγίων απομονωμένων από *Shigella* (πάνω) και *Salmonella* (κάτω) ανακατασκευασμένες από τον μέσο όρο εικόνων μικρογραφίας κρυο-ηλεκτρονίων (cryo-electron micrograph).

Το σύμπλοκο της βελόνης αποτελείται από : Α) μια κυλινδρική κατασκευή, όμοια με το βασικό σωματίο (basal body) του μαστιγίου (σχήμα 1.3), η οποία απαρτίζεται από δύο ζεύγη δακτυλίων που διαπερνούν την εσωτερική και την εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, ενωμένα μεταξύ τους με το ραβδί (rod), και Β) από τη βελόνη, η οποία προεξέχει από την εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου και λειτουργεί ως ακροφύσιο για την έκκριση των τοξινών στο κύτταρο-ξενιστή¹⁷. Η ανακάλυψη αυτής της μορφολογίας ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες παρατηρήσεις, σύμφωνα με τις οποίες η έξοδος των μολυσματικών πρωτεϊνών από τις βακτηριακές μεμβράνες και η μετατόπισή τους διαμέσω της ευκαρυωτικής μεμβράνης γίνεται σε ένα βήμα. Παρά το γεγονός πως η υπερμοριακή δομή του EPEC συμπλόκου της βελόνης είναι ίδια με αυτήν των *Shigella* και *Salmonella*, μία μοναδική εξωκυτταρική προεξοχή (μεγέθους μέχρι και 600 nm) στην οποία καταλήγει η βελόνη των EPEC συμπλόκων της βελόνης έχει παρατηρηθεί¹⁴. Η προεξοχή αυτή ή διαφορετικά ινίδιο αποτελείται από την

πολυμερισμένη πρωτεΐνη EspA¹⁸, η οποία φαίνεται να σχηματίζει μια φυσική γέφυρα του βακτηρίου με τον ξενιστή.

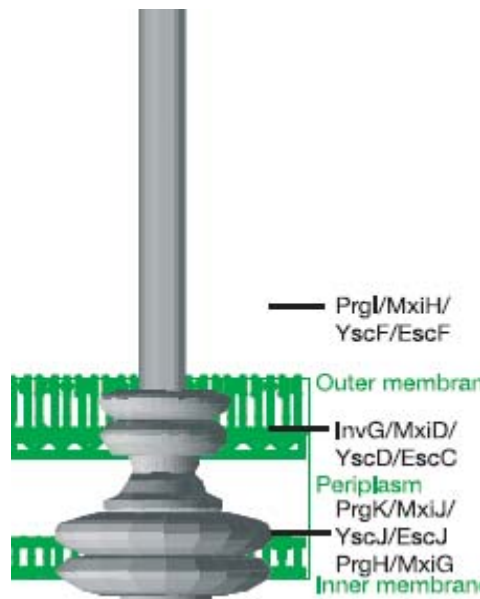
Ανάλυση μοναδιαίου σωματιδίου (single particle), χρησιμοποιώντας μικροσκοπία κρυο-ηλεκτρονίου (cryo-electron microscopy, cryo-EM) επέτρεψε τον καθορισμό της δομής συμπλόκων της βελόνης από την *S. flexeni* σε υψηλή ανάλυση (σχήμα 1.4)^{19, 20}. Αυτή η δομή αποκάλυψε για πρώτη φορά, ένα κεντρικό κανάλι περίπου 2-3 nm, το οποίο εκτείνεται από τη βάση των ζευγών των δακτυλίων έως την κορυφή της εξωκυττάριας βελόνης. Πρέπει να σημειωθεί πως αυτό το μέγεθος του καναλιού είναι πολύ μικρό για να επιτρέπει σε αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να διαπεράσουν τον κυλινδρικό αυτό σωλήνα, παρατήρηση που συμφωνεί με πειραματικά δεδομένα που στηρίζουν την υπόθεση πως οι πρωτεΐνες πρέπει να αποδιπλώνονται για να εκκριθούν²¹.

Τέλος, όπως φαίνεται από τις cryo-EM φωτογραφίες, τα σύμπλοκα της βελόνης δεν περιέχουν τον C-δακτύλιο, ο οποίος πιθανότατα προσδένεται ασθενώς με το υπόλοιπο βασικό σωματίο και έτσι μπορεί να αποσυνδέεται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού των συμπλόκων από τη μεμβράνη. Επίσης τα απομονωμένα αυτά σύμπλοκα δεν περιέχουν και την συντηρημένη ATPάση (Ysc οικογένεια), η οποία όμως είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συριγγίου¹¹. Φαίνεται λοιπόν πως επιπρόσθετα συστατικά του συριγγίου μπορεί να χάνονται κατά τη διάρκεια του καθαρισμού τους.

1.2.3 Δομή του βασικού σωματίου

Πρόσφατες γενετικές και βιοχημικές μελέτες του *S. typhimurium* SPI-1 TTSS έχουν αποκαλύψει πως η συναρμολόγηση αυτού του μακρομοριακού συμπλόκου ξεκινά με μία φάση εξαρτώμενη από το σύστημα έκκρισης sec, κατά την οποία τοποθετούνται και ολιγομερίζονται στις βακτηριακές μεμβράνες 3 πρωτεΐνες : Οι InvG, PrgK και PrgH^{22, 23}. Η InvG ανήκει στην καλά χαρακτηρισμένη υπερ-οικογένεια των εκκριτινών (secretins), οι οποίες επίσης εμπλέκονται στην έκκριση τύπου II, στη συναρμολόγηση του ινώδους φάγου και στη μορφογένεση των ινιδίων τύπου IV. Όπως και οι υπόλοιπες εκκριτίνες, η InvG σχηματίζει ένα μεγάλο δακτυλιοειδή σύμπλοκο στην εξωτερική μεμβράνη, το οποίο πιθανότατα μεσολαβεί το πέρασμα των πρωτεϊνικών

υποστρωμάτων²⁴. Αντίθετα, οι PrgK και PrgH πιστεύεται πως αλληλεπιδρούν με την εσωτερική μεμβράνη και σχηματίζουν τη βάση του συμπλόκου της βελόνης²². Αν και λίγα είναι γνωστά για την PrgH πρωτεΐνη, καθώς και ότι ορθόλογα αυτής της πρωτεΐνης δεν έχουν βρεθεί ακόμη σε όλα τα είδη, η PrgK ανήκει στη συντηρημένη YscJ/PrgK οικογένεια πρωτεϊνών και σύμφωνα με προβλέψεις, η πρωτεΐνη αυτή είναι περιπλασμική και συνδεδεμένη με τη βακτηριακή μεμβράνη μέσω του αμινο-τελικού της λιπιδίου και πιθανότατα μέσω της υδρόφοβης διαμεμβρανικής περιοχής της στο καρβοξυ-τελικό άκρο¹⁹ (σχήμα 1.5)



Σχήμα 1.5 : Διάγραμμα ενός βακτηριακού T3S. Τα τρία συστατικά του βασικού σωματίου και της βελόνης από 4 αντιπροσωπευτικά είδη σημειώνονται με βάση τον πιθανό εντοπισμό τους στο βακτηριακό φάκελο με την ακόλουθη σειρά : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* και EPEC.

Η δομή ενός αντιπροσωπευτικού μέλους της οικογένειας αυτής (της EscJ πρωτεΐνης από το στέλεχος EPEC) έχει λυθεί πρόσφατα κρυσταλλογραφικά και ένα μοντέλο δακτυλίου 24 υπομονάδων έχει προταθεί²⁵. Αυτός ο δακτύλιος είναι πιθανότατα το λειτουργικό ομόλογο του MS δακτυλίου (σχήμα 1.2) από το μαστίγιο, ο οποίος αποτελείται από την FliF πρωτεΐνη.

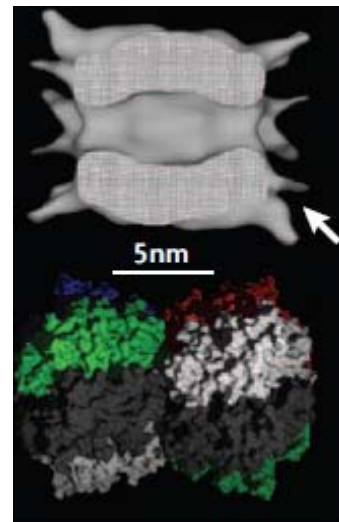
Στη *S. typhimurium*, πολλές έμμεσες βιοχημικές και δομικές μελέτες δείχνουν πως το εσωτερικό ραβδίο (rod) αποτελείται από την πρωτεΐνη PrgJ^{26, 27, 28}. Καθώς δεν υπάρχει ξεκάθαρο ορθόλογο της πρωτεΐνης PrgJ στις υπόλοιπες οικογένειες, το συστατικό του ραβδίου σε αυτές τις νανομηχανές παραμένει άγνωστο.

Στο βασικό σωματίο του μαστιγίου, κάτω από τον MS δακτύλιο, βρίσκεται ο δακτύλιος C, ο οποίος αποτελείται από τις πρωτεΐνες FliM και FliN. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν υπάρχει εικόνα cryo-EM, η οποία να υποστηρίζει την ύπαρξη του C δακτυλίου και στο συρίγγιο. Παρόλ' αυτά πρωτεΐνες της YscQ/EscQ οικογένειας - μία από τις συντηρημένες οικογένειες πρωτεϊνών στο συρίγγιο - έχουν καταπληκτική ομοιότητα με τις πρωτεΐνες FliM και FliN. Επιπρόσθετα, στο συρίγγιο της *Pseudomonas syringae*, υπάρχουν δύο ομόλογα του YscQ, τα ονομαζόμενα HrcQ_A και HrcQ_B, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η συνολική δομή από τη HrcQ_B είναι παρόμοια με αυτήν της FliN²⁹, υποδεικνύοντας ότι πρωτεΐνες από την YscQ/EscQ οικογένεια σχηματίζουν ένα πολυμερές δακτύλιο στη βάση του συριγγίου. Σύμφωνη με αυτό τον ισχυρισμό είναι και η ανακάλυψη πως η Spa33 πρωτεΐνη από την *S. flexeni*, ορθόλογο της YscQ, εντοπίζεται στο κατώτερο τμήμα του συριγγίου μέσω αλληλεπιδράσεων με τα ορθόλογα των PrgK και PrgH, τα οποία σχηματίζουν τον MS δακτύλιο³⁰. Επιπρόσθετα, έχει δειχτεί πως η Spa33 αλληλεπιδρά με πολυάριθμες πρωτεΐνες του συριγγίου, όπως και με την ATPάση του συστήματος¹⁶. Συμπερασματικά, αυτά τα δεδομένα συνηγορούν στη διαπίστωση πως οι πρωτεΐνες της YscQ/EscQ οικογένειας σχηματίζουν μία πλατφόρμα μεταξύ της εσωτερικής πλευράς της εσωτερικής μεμβράνης και του κυτταροπλάσματος του βακτηρίου για την στρατολόγηση και άλλων πρωτεϊνών, ακόμη και της ATPάσης. Αντίστοιχα στο μαστίγιο, η FliN υπομονάδα του C δακτυλίου, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο FliH (ρυθμιστής της υδρολυτικής ικανότητας της ATPάσης)-FliI (ATPάση)³¹. Είναι λοιπόν πολύ πιθανό η YscQ/EscQ πλατφόρμα να παίρνει το σχήμα ενός C-δακτυλίου, αλλά χρειάζεται επιβεβαίωση από δομικές μελέτες (για παράδειγμα ανάλυση με cryo-EM).

Μία από τις συντηρημένες πρωτεΐνες του συριγγίου είναι και η ATPάση (YscN/EscN οικογένεια), η παρουσία της οποίας είναι αναγκαία για το T3S¹¹. Πιο συγκεκριμένα, η HrcN ATPάση, από την *Pseudomonas syringae*, σχηματίζει εξαμερή και δωδεκαμερή, τα οποία ενεργοποιούνται με τον ολιγομερισμό τους, ενώ η πρωτεΐνη

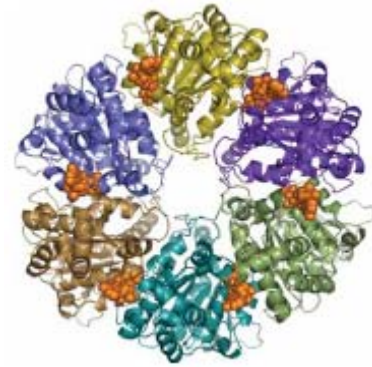
εντοπίζεται συνδεδεμένη με την κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης³². Η δομή του δωδεκαμερούς της HrcN έχει πρόσφατα προσδιοριστεί με ανάλυση στα 1.6-nm με cryo-EM. Η HrcN₁₂ εμφανίζεται στη δομή αυτή ως δύο εξαμερή δακτυλίδια, στοιβαγμένα μεταξύ τους πρόσωπο με πρόσωπο³³. Η δομή έχει διάμετρο 11.5 ± 1.0 nm, ενώ το πλάτος του εσωτερικού καναλιού είναι 2.5-3.8 nm (σχήμα 1.6). Η δομή αυτή είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη της ATPάσης από το μαστίγιο (FliI), η οποία επίσης έχει δείχτει να σχηματίζει δακτυλίους με εξαπλή συμμετρία, με εξωτερική διάμετρο της τάξης των 10 nm και μία κεντρική κοιλότητα των 2.5-3.0 nm.

Σχήμα 1.6 : Τρισδιάστατη αναπαράσταση και μοντελοποίηση της ATPάσης HrcN από την *P. syringae*. Δύο εξαμερείς δακτύλιοι ενώνονται πρόσωπο-με-πρόσωπο από τα καρβοξυ-τελικά τους άκρα.



Πολύ πρόσφατα επίσης έχει λυθεί κρυσταλλογραφικά και η δομή της καταλυτικής περιοχής της EscN ATPάσης από το EPEC με ανάλυση στα 1.8 Å. Οι συγγραφείς του άρθρου αυτού πέρα από τη δομή του μονομερούς της πρωτεΐνης, παρουσιάζουν και το μοντέλο σχηματισμού ενός εξαμερούς δακτυλίου με βάση την ομολογία της με την F1 υπομονάδα της F₁F₀ ATPάσης (σχήμα 1.7)³⁴. Και στην περίπτωση αυτή ο ολιγομερισμός της EscN φαίνεται να ρυθμίζει θετικά την ικανότητα της πρωτεΐνης αυτής να υδρολύει ATP.

Σχήμα 1.7 : Μοντέλο σχηματισμού του εξαμερούς της EscN. Σε αυτό το μοντέλο κάθε μονομερές της EscN έχει χρωματιστεί διαφορετικά και οι θέσεις πρόσδεσης του ATP φαίνονται σε χρυσό με αναπαράσταση Van der Waals.



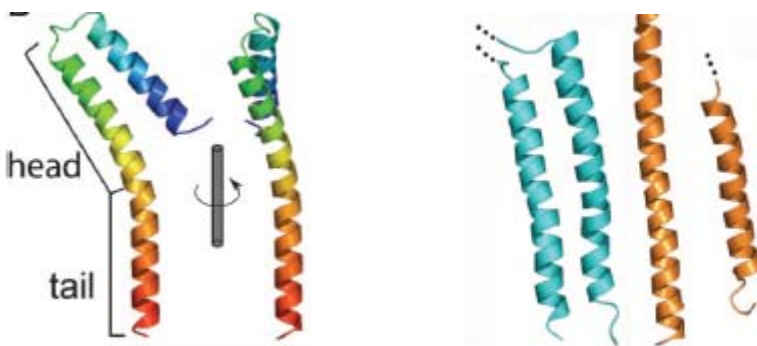
Η κύρια λειτουργία των ATPασών φαίνεται να είναι στο να παρέχουν ενέργεια τα μόρια αυτά στο υπόλοιπο T3S. Επιπρόσθετα ένας νέος ρόλος των μορίων αυτών έχει προκύψει από τον χαρακτηρισμό της InvC ATPάσης της *S. typhimurium*, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στην αποσύνδεση κάποιων T3S εκκρινόμενων υποστρωμάτων από τις κυτταροπλασματικές τους σαπερόνες, λίγο πριν την έκκρισή τους. Στην ίδια εργασία, η InvC έχει δειχτεί να αποδιπλώνει τις εκκριτικές πρωτεΐνες, με ένα τρόπο εξαρτώμενο από το ATP³⁵.

Χρησιμοποιώντας ανάλυση των δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (yeast two-hybrid), η YscN βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την YscQ, YscK και YscL³⁶, ενώ αλληλεπιδράσεις μεταξύ YscN και YscL ή YscN και YscQ έχουν μελετηθεί και στην *Yersinia enterocolitica*³⁷. Όλες αυτές οι πρόσφατες παρατηρήσεις συμφωνούν με προηγούμενα δεδομένα, σύμφωνα με τα οποία η FliI ATPάση αλληλεπιδρά με την FliH πρωτεΐνη του μαστιγίου, το ορθόλογο του YscL/EscL³⁸. Υπολογίζοντας πως η YscL επίσης αλληλεπιδρά και με τη YscQ, συστατικό του πιθανού C δακτυλίου, είναι πολύ πιθανό η YscL να είναι αυτή που συγκρατεί την ATPάση στο στόμιο του καναλιού^{37,38}.

Μέχρι σήμερα, η στοιχειομετρία και η ακριβής θέση των υπόλοιπων μεμβρανικών υπομονάδων του βασικού σωματίου (YscR/EscR, YscS/EscS, YscT/EscT, YscU/EscU και YscV/EscV) δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί.

1.2.4 Η βελόνη, το ινίδιο και το τριχίδιο

Η βελόνη του συριγγίου είναι ένας ευθύγραμμος, κενός σωλήνας, περίπου 60 nm σε μήκος, με εσωτερική διάμετρο περίπου 25 Å. Σχηματίζεται κατά τον σπειροειδή πολυμερισμό 100-150 υπομονάδων της YscF οικογένειας πρωτεϊνών. Παρά το γεγονός πως αυτές οι υπομονάδες είναι πολύ μικρότερες από αυτές που σχηματίζουν το άγκιστρο (hook) και το ινίδιο (η φλατζελίνη είναι περίπου 45KDa) του μαστιγίου, οι παράμετροι της έλικας είναι οι ίδιες (5.6 μονάδες ανά στροφή, 24 Å βήμα της έλικας)³⁹. Η κρυσταλλική δομή του MxiH, της υπομονάδας της βελόνης από τη *Shigella spp.*, λύθηκε πολύ πρόσφατα και φαίνεται να αποτελείται από δύο αντι-παράλληλες α-έλικες ενωμένες με μία μικρή στροφή⁴⁰. Αυτή η δομή είναι όμοια με τη δομή της DO περιοχής της φλατζελίνης (flagellin)⁴¹, καθώς και με τη δομή της EspA, της υπομονάδας η οποία σχηματίζει το ινίδιο στην κορυφή της βελόνης του EPEC, όταν αυτή είναι σε σύμπλοκο με την σαπερόνη της⁴². Φαίνεται λοιπόν πως ενώ δεν υπάρχει ομολογία στο επίπεδο της αλληλουχίας τους, η αρχιτεκτονική αυτή να είναι σημαντική καθώς είναι συντηρημένη. Η δομή του MxiH, σε συνδιασμό με δεδομένα από EM, έχουν επιτρέψει την κατασκευή του πρώτου ατομικού μοντέλου της βελόνης ενός συριγγίου⁴⁰ (σχήμα 1.8) και τελικά επιτρέπουν την δημιουργία ενός μοντέλου για τη μετάδοση του σήματος από την πρώτη επαφή βακτηρίου ξενιστή στη βάση του συριγγίου μέσω της βελόνης.



Σχήμα 1. 8 : Κρυσταλλική δομή του MxiH μονομερούς και σύγκρισή του με σχετικές πρωτεΐνες. Δεξιά: Διάγραμμα ταινίας όπου χρωματίζονται το N (μπλε) έως το C (κόκκινο) άκρο. Αριστερά : Διάγραμμα ταινίας της DO περιοχής του μαστιγίου (ανοικτό μπλε) και της περιοχής της EspA που είναι προσδεσμένη με τη σαπερόνη της (πορτοκαλί).

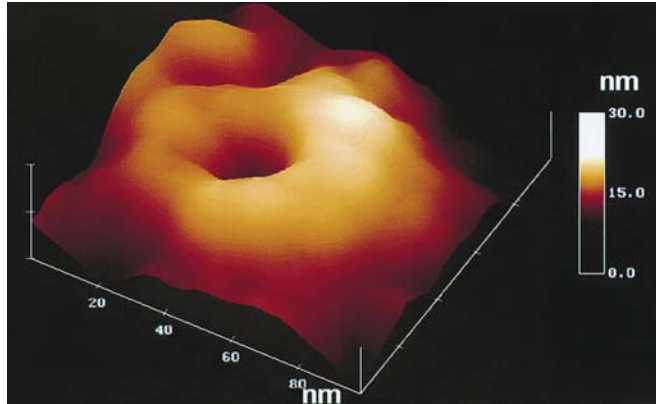
Στο συρίγγιο του EPEC, μία εκτενής ευκίνητη δομή, το EspA ινίδιο, εκτείνεται πάνω από τη βελόνη¹⁴. Στα συρίγγια των παθογόνων των φυτών, μία μακριά και λεπτή δομή, το Hcp τριχίδιο, αντικαθιστά την βελόνη⁴³. Ο πιο προφανής λόγος, για τον οποίο υπάρχουν όλες αυτές οι διαφορετικές κατασκευές, είναι πως τα διάφορα βακτήρια έχουν να αντιμετωπίσουν και διαφορετικούς λειτουργικούς περιορισμούς ανάλογα με τον ξενιστή, τον οποίο προσβάλλουν. Έτσι στο έντερο για παράδειγμα, τα κύτταρα του EPEC διαχωρίζονται από τον στόχο τους, τα εντεροκύτταρα δηλαδή, από την στοιβάδα της βλέννας, ενώ τα παθογόνα των φυτών πρέπει να παραδώσουν τις τοξίνες μέσα από ένα παχύ φυτικό κυτταρικό τοίχωμα.

1.2.5 Ο πόρος μετατόπισης

Ένα ενεργό συρίγγιο, κατά την επαφή του με το κύτταρο του ξενιστή, καταλήγει στον πόρο μετατόπισης, ο οποίος ενσωματώνεται στη μεμβράνη του ξενιστή. Ο σχηματισμός αυτού του πόρου απαιτεί την παρουσία ενός εξειδικευμένου συνόλου πρωτεϊνών, τους μεταθέτες (translocators)^{8, 44-46}. Γενικά, υπάρχουν τρεις μεταθέτες σε κάθε T3S (YopB, YopD και LcrV στα *Yersinia spp.*, IpaB, IpaC και IpaD στα *Shigella spp.*, EspA, EspB και EspD στο *EPEC*), ενώ και οι τρεις πρωτεΐνες έχει δειχτεί να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους^{47, 48}.

Ο καθορισμός της δομής και της σύστασης ενός πόρου μετατόπισης, ενσωματωμένου σε μεμβράνες ξενιστών από ζωντανά βακτήρια παραμένει ένα από τα κύρια ερωτήματα στο πεδίο του T3S. Πειράματα προστασίας από την όσμωση που έχουν γίνει σε ερυθροκύτταρα τα οποία είχαν προσβληθεί από διαφορετικά βακτήρια οδήγησαν στην εκτίμηση ενός πόρου με διάμετρο γύρω στα 2.3 nm^{44, 49, 50}. Πρόσφατα, με την βοήθεια του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM), για πρώτη φορά λύθηκε η δομή ενός πόρου από μεμβράνες ερυθροκυττάρων που είχαν επιμολυνθεί με EPEC. Ο πόρος αυτός είχε μια εξωτερική διάμετρο της τάξης των 55-65 nm και έφτανε σε ύψος μέχρι 20 nm από το επίπεδο της μεμβράνης. Η εσωτερική διάμετρος μετρήθηκε κοντά στα 8 nm, σε αντίθεση με 3-5 nm που είχε υπολογιστεί με βάση τα πειράματα οσμωπροστασίας. Αυτή η διαφορά μπορεί απλά να εξηγηθεί με το άνοιγμα το οποίο φαίνεται να κάνει ο πόρος καθώς προβάλλει από την εσωτερική μεμβράνη (σχήμα 1.9).

Σχήμα 1. 9 : Τρισδιάστατη εικόνα ενός μονού πόρου.



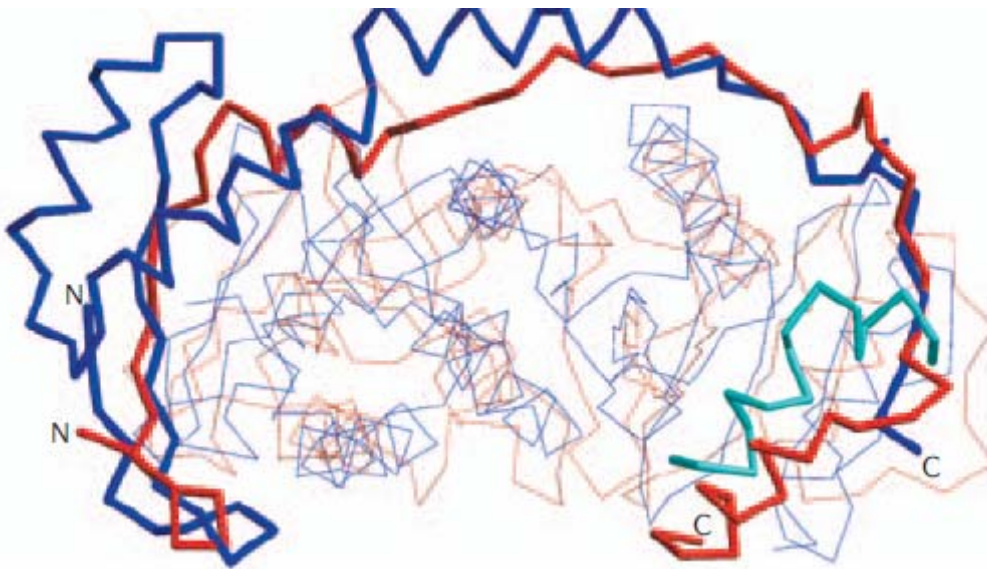
Στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων έχουν ταυτοποιηθεί οι EspB και EspD μεταθέτες, ενώ ο σχηματισμός του πόρου φαίνεται να εξαρτάται και από τις τρεις πρωτεΐνες, EspA, EspB και EspD⁵¹. Μέχρι τώρα δεν ήταν δυνατή η χρήση της μικροσκοπίας ηλεκτρονίου, προκειμένου να έχουμε την εικόνα ενός φυσιολογικά εντεθειμένου πόρου από το συρίγγιο (τα ερυθροκύτταρα που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν αποτελούν το φυσικό στόχο για T3S). Επιπρόσθετα, η δομή και η στοιχειομετρία ενός φυσικά σχηματισμένου πόρου μετατόπισης είναι άγνωστη.

1.2.6 Οι T3S σαπερόνες

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

Τάξη I. Πολλές μολυσματικές πρωτεΐνες έχουν εξειδικευμένες σαπερόνες, ενώ υπάρχει ένα σημαντικό κομμάτι της βιβλιογραφίας το οποίο περιγράφει την δομή τους και τον τρόπο με τον οποίο αυτές αναγνωρίζουν το υπόστρωμά τους⁵²⁻⁵⁶. Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις σαπερόνες αυτής της τάξης βρίσκονται σχεδόν πάντα δίπλα στο γονίδιο που κωδικοποιεί για το υπόστρωμά τους. Όλες τους είναι όξινης (pI 4-5), μικρές

και διμερείς πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδένονται στα 100 πρώτα αμινοξέα των υποστρωμάτων τους, στην περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης, αμέσως μετά από το μικρό πεπτίδιο σινιάλο-εξόδου, το οποίο βρίσκεται στο αμινο-τελικό τους άκρο. Σημαντική επίσης είναι η παρατήρηση ότι, παρά το γεγονός πως οι σαπερόνες αυτές δεν έχουν μεταξύ τους σημαντική ομοιότητα στο επίπεδο της πρωτοταγούς τους αλληλουχίας, φαίνεται να έχουν μια συντηρημένη τρισδιάστατη δομή⁵⁷. Πιο συγκεκριμένα, όλες έχουν την ίδια περίπου αναδίπλωση, που αποτελείται από 5 β-πτυχωτές επιφάνειες και τρεις α-έλικες⁵⁸⁻⁶⁵. Η περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης των τοξινών τυλίγεται κατά κάποιο τρόπο γύρω από το ομοδιμερές της σαπερόνης με μια εκτεταμένη διαμόρφωση που μοιάζει με το πέταλο του αλόγου, διατηρώντας παράλληλα κάποια δευτεροταγή δομικά χαρακτηριστικά των α-ελίκων^{58, 59, 63} (σχήμα 1.10). Από την άλλη μεριά, η παρουσία υδρόφοβων επιφανειών στα ομοδιμερή των σαπερονών είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποστρώματος^{56, 58, 66}.



Σχήμα 1.10 : Δομή από τάξης I σαπερόνες σε σύμπλοκο με τα υποστρώματά τους. Η περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης από τις μολυσματικές πρωτεΐνες YopE και SptP, οι οποίες περικυκλώνουν τα ομοδιμερή των SycE και SicP, αντίστοιχα.

Παρά το γεγονός πως πολλές σαπερόνες αυτής της τάξης με τα υποστρώματά τους έχουν ενδελεχώς μελετηθεί και χαρακτηριστεί, εντούτοις ο πραγματικός τους ρόλος

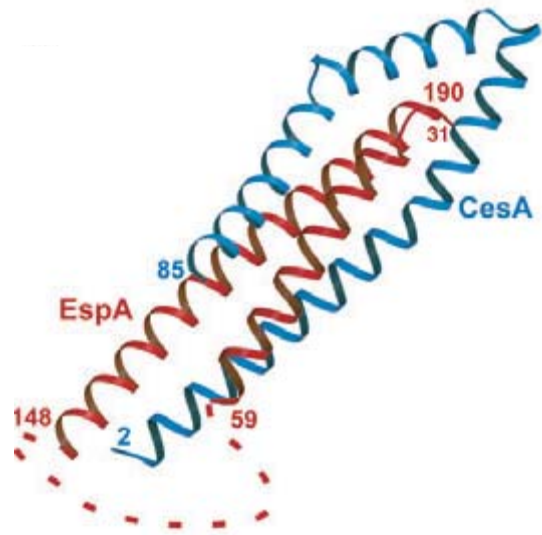
στη διαδικασία της έκκρισης παραμένει υπό αμφισβήτηση. Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι σαπερόνες θα μπορούσαν να είναι τρισδιάστατοι παράγοντες στόχευσης ή ότι έχουν κάποιο ρόλο στην επιβολή μιας προσωρινής ιεραρχίας στην έξοδο των υποστρωμάτων από το κύτταρο^{58, 67}. Άλλες παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα πως οι σαπερόνες χρειάζονται για να διατηρούν τα υποστρώματά τους σε μια κατάσταση συμβατή με την έκκριση, πριν ακριβώς από την έκκρισή τους⁶⁸, αλλά την ίδια στιγμή η πρόσδεση με τη σαπερόνη δεν αποτρέπει την αναδίπλωση του υπόλοιπου σώματος της μολυσματικής πρωτεΐνης^{69, 70}. Πρόσφατα έχειδειχτεί πως η περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης στις YopE, YopO και YopT τοξίνες συμπίπτει με την περιοχή ένθεσης στη μεμβράνη του ξενιστή. Η περιοχή αυτή έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει την αδιαλυτότητα των πρωτεϊνών Yop, αλλά ενδοκυτταρικά η πρόσδεση της περιοχής αυτής στην σαπερόνη αποτρέπει το φαινόμενο αυτό. Έτσι λοιπόν οι SycE, SycO και SycT σαπερόνες καλύπτουν την υδρόφοβη αυτή περιοχή που οδηγεί στη σωστή στόχευση των υποστρωμάτων τους στη μεμβράνη του ξενιστή. Η κάλυψη λοιπόν μιας περιοχής στόχευσης μπορεί να είναι μια σημαντική λειτουργία των σαπερονών^{70, 71} και αν αυτή η περιοχή στόχευσης ήταν απλώς μια υδρόφοβη περιοχή, τότε οι σαπερόνες της τάξης I θα μπορούσαν να αναγνωρίζουν περισσότερα από ένα υποστρώματα. Όπως και να έχει, τα ευρήματα αυτά προτείνουν πως η περιοχή στόχευσης της μολυσματικής πρωτεΐνης δεν είναι μια υδρόφοβη περιοχή μόνο. Η πρόταση πως οι σαπερόνες κρύβουν τις περιοχές για την κυτταρική στόχευση δεν αποκλείει την πιθανότητα αυτές να διευκολύνουν και την έξοδο των υποστρωμάτων τους από το κύτταρο. Πράγματι, σαπερόνες σε σύμπλοκο με τα υποστρώματά τους θα μπορούσαν να δρουν σαν τρισδιάστατα σινιάλα για την έκκριση, όπως ακριβώς προτάθηκε για τη SycE ή ακόμη θα μπορούσαν να διευκολύνουν την έκθεση σινιάλων εξόδου, τα οποία βρίσκονται αμέσως μετά την περιοχή πρόσδεσης της σαπερόνης⁷².

Τάξη II. Οι υδρόφοβοι μεταθέτες είναι τοξικοί για το βακτηριακό κύτταρο⁷³, και η τοξικότητα αυτή εξουδετερώνεται από τις σαπερόνες τάξης II⁵⁵. Λίγα είναι γνωστά για τον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζουν το υπόστρωμα, αλλά γενικά φαίνεται μια σαπερόνη (SycD στην *Yersinia* spp., IpgC στην *Shigella* spp. και SicA *S. typhimurium* SPI-1) να εξυπηρετεί και τους δύο μεταθέτες μέσα στο κύτταρο. Επιπλέον, η SicA, έχειδειχτεί να παίζει ένα σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη σύνθεση των τοξινών⁷⁴. Αυτή η

παρατήρηση έχει νόημα με την έννοια ότι η ελεύθερη σαπερόνη μπορεί να δρα ως προειδοποιητικό σήμα μέσα στο κύτταρο, το οποίο θα ενημερώνει πως ο πόρος είναι έτοιμος και το συρίγγιο λειτουργικό⁵⁷.

Τάξη III. Τα εξωκυττάρια, σπειροειδή συστατικά δομών όπως η βελόνη ή το ινίδιο του συριγγίου πρέπει να αποτρέπονται από τον πρόωρο πολυμερισμό τους μέσα στο βακτήριο. Αυτό επιτυγχάνεται από τις σαπερόνες τάξης III, οι οποίες αναγνωρίζουν και προσδένονται στα υποστρώματά τους, καλύπτοντας τις περιοχές εκείνες που ελέγχουν τον πολυμερισμό τους. Στο μαστίγιο, η FlgN δρα ως σαπερόνη για την FlgK και την FlgL, τις δύο πρωτεΐνες που συνδέονται με το άγκιστρο (hook). FliT είναι η σαπερόνη της πρωτεΐνης της καλύπτρας (cap) FliD και η FliS λειτουργεί ως σαπερόνη για τη φλατζελίνη (FliC). Τα σπειροειδή συστατικά του συριγγίου επίσης χρησιμοποιούν εξειδικευμένες κυτταροπλασματικές σαπερόνες, οι οποίες διατηρούν τα συστατικά αυτά σε μονομερή κατάσταση, αποτρέποντας έτσι την πρόωρη αλληλεπίδραση με τον ίδιο τους τον εαυτό, ίσως βοηθώντας παράλληλα την παράδοσή τους στην υπόλοιπη εκκριτική μηχανή. Για παράδειγμα στο εντεροπαθογόνο *E.coli* η πρωτεΐνη CesAB δρα ως σαπερόνη και αντι-πολυμεριστικός παράγοντας της πρωτεΐνης EspA του ινιδίου, καθώς η προσφάτως κρυσταλλογραφικά λυμένη δόμη τους ετεροδιμερούς συμπλόκου δείχνει τη σαπερόνη να σταθεροποιεί ενδοκυτταρικά το υπόστρωμα κρατώντας το στη μονομερή του μορφή (βλ. σχήμα 1.11). Στην πραγματικότητα όμως, η CesAB είναι μια ξεχωριστή σαπερόνη, γιατί πέρα από τις διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες του μορίου, είναι απαραίτητη για την έκκριση και του μεταθέτη EspB⁴². Ίσως λοιπόν να πρόκειται για μια ξεχωριστή περίπτωση και ο τρόπος με τον οποίο αναγνωρίζει τα δύο υποστρώματα ή ο ακριβής της ρόλος στην εκκριτική διαδικασία πρέπει να διερευνηθεί.

Σχήμα 1.11 : Κρυσταλλική δομή του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ της CesAB σαπερόνης (μπλε) και του υποστρώματός της EspA (κόκκινο).



1.3 Το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* (EPEC)

Η μελέτη της βακτηριακής παθογένεσης είναι τεράστιου ενδιαφέροντος, κυρίως γιατί, για παράδειγμα, στις μέρες μας επανεμφανίζονται παλιές ασθένειες, όπως η φυματίωση. Επίσης, εμφανίζονται νέες βακτηριακές λοιμώξεις, αλλά ενδιαφέρον παρουσιάζεται και λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από πολλά βακτηριακά στελέχη. Μεγάλο μέρος της δουλειάς αυτής έχει εστιαστεί στην κατανόηση του μοριακού και κυτταρικού μηχανισμού της εκδήλωσης της ασθένειας από τα μικρόβια και οι μελέτες αυτές έχουν οδηγήσει σε νέες εκτιμήσεις για τον τρόπο με τον οποίο τα μικρόβια προκαλούν μια ασθένεια. Ένα μεγάλο θέμα τείνει να είναι η διερεύνηση της ικανότητας πολλών μικροβίων να εκμεταλλεύονται τα μονοπάτια μετάδοσης σήματος των ευκαρυωτικών οργανισμών που προσβάλουν προς όφελός τους, όπως και άλλα κυτταροσκελετικά και μεμβρανικά συστατικά του κυττάρου-ξενιστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα βακτήρια που ακολουθούν αυτή την οδό είναι ενδοκυτταρικά, όπως η *Listeria*, η *Shigella* και η *Salmonella*. Σε αντίθεση το εντεροπαθογόνο *Escherichia coli* είναι εξωκυττάριο παθογόνο, το οποίο προκαλεί ασθένεια μέσω της πρόσδεσής του στη μεμβράνη του ξενιστή και την άμεση προώθηση των μολυσματικών πρωτεϊνών- τοξινών που παράγει στο ευκαρυωτικό κύτταρο. Η διαδικασία αυτή της έκκρισης τοξινών και της μετατόπισής τους απ' ευθείας στο κύτταρο του ξενιστή γίνεται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3S)⁷⁵.

1.3.1 Κλινικά συμπτώματα και παθολογία

Ως παθογόνο που προσβάλλει τον άνθρωπο, η περιγραφή των συμπτωμάτων και της παθολογίας που σχετίζεται με την μόλυνση από EPEC παρέχει το πλαίσιο στην πρόσφατη πρόοδο σχετικά με τον προσδιορισμό της μοριακής βάσης της ασθένειας. Μία από τις πολλές κατηγορίες των *E. coli* που προκαλούν διάρροια, το EPEC είναι μια πολύ συνηθισμένη αιτία της ανθρώπινης διάρροιας, κυρίως σε νεαρά παιδιά. Παρόλο που οι εξάρσεις στις αναπτυγμένες χώρες ήταν συχνές μέχρι την δεκαετία του 1940 και 1950⁷⁶, η συχνότητα της μόλυνσης από το EPEC έχει από τότε μειωθεί σημαντικά στις χώρες αυτές. Παρόλ' αυτά το EPEC είναι ακόμη υπεύθυνο για ξεσπάσματα σε κέντρα πρόνοιας και στους παιδιατρικούς θαλάμους νοσοκομείων⁷⁷. Το EPEC όμως παραμένει μια σημαντική αιτία της παιδικής θνησιμότητας στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου τα πολύ πρόσφατα ξεσπάσματα αναφέρουν ρυθμό θνησιμότητας περίπου 30%⁷⁸. Έτσι, η μόλυνση από το EPEC υπολογίζεται πως προκαλεί θάνατο σε πολλές εκατοντάδες χιλιάδες παιδιά το χρόνο⁷⁹. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της προσβολής από το EPEC είναι η A/E ιστοπαθολογία (Attaching/Effacing, Προσκόλληση/Εξάλειψη ή Καταστροφή), η οποία συχνά εμφανίζεται σε δείγματα βιοψίας του λεπτού εντέρου από μολυσμένους ασθενείς και επίσης παρατηρείται μετά από επιμόλυνση επιθηλιακών κυττάρων σε κυτταρικές καλλιέργειες^{79, 80}. Η μόλυνση συνήθως προκαλεί οξεία διάρροια, αλλά σε βαριές περιπτώσεις μπορεί να προκληθεί παρατεταμένη ασθένεια⁸⁰. Εκτός από τη διάρροια, ο εμετός και η ανάπτυξη πυρετού είναι κοινά συμπτώματα⁸⁰. Στηριζόμενοι στην θνησιμότητα που προκαλεί το μικρόβιο αυτό, το EPEC παραμένει μία από τις πιο σημαντικές απειλές της υγείας των παιδιών παγκοσμίως.

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

Σε αντίθεση με τα μη παθογόνα στελέχη *E. coli*, τα οποία βρίσκονται μέσα στο ανθρώπινο έντερο, το EPEC, όπως και άλλα παθογόνα στελέχη *E. coli* περιέχουν στο γένωμά τους νησίδια υπεύθυνα για την παθογένεση. Έτσι, όλα τα αναγκαία γονίδια (ή σχεδόν όλα) για τον σχηματισμό της A/E κάκωσης (A/E lesion) και της χαρακτηριστικής προεκβολής (pedestal), η οποία μοιάζει με ένα άκρο που ξεπροβάλλει από την επιφάνεια του προσβαλλόμενου κυττάρου, περιέχονται σε ένα νησίδιο 35 Kbp, το οποίο ονομάζεται

γενετικός τύπος της εξάλειψης των εντεροκυττάρων (LEE)^{79, 81}. Το περιεχόμενο σε G+C νουκλεϊκών οξέων του LEE είναι 38.4%, σημαντικά μικρότερο κατά 50% από το χρωμόσωμα του μη παθογόνου *E. coli* K-12. Αυτή η διαφορά μπορεί να σημαίνει πως το LEE αποκτήθηκε αρχικά από κάποια άλλη ξένη πηγή και στη συνέχεια ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα του *E. coli*. Η θέση ένθεσης του LEE στο γένωμα του *E. coli* K-12, είναι στη θέση που κωδικοποιεί το t-RNA για τη σεληνο-κυστεΐνη. Ολόκληρη η περιοχή του LEE έχει αλληλουχηθεί και περιέχει ένα σύστημα έκκρισης III, καθώς και άλλα γονίδια απαραίτητα για το σχηματισμό της προεκβολής⁷⁹. Αυτά περιλαμβάνουν πολλά γονίδια που κωδικοποιούν για εκκρινόμενες πρωτεΐνες του συστήματος III, οι οποίες ονομάζονται EspS (EPEC –secreted proteins) και είναι η EspA, EspB, EspD και EspF, όπως και η προσκολλητίνη (adhesin), η ιντιμίνη (intimin) και ο εκκρινόμενος υποδοχέας της, Tir. Μεταλλάξεις σε οποιονδήποτε από τους παραπάνω βακτηριακούς παράγοντες, με την εξαίρεση του EspF⁸², παρεμποδίζουν το σχηματισμό της A/E κάκωσης σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές⁸⁰. Όπως και με τα υπόλοιπα συστήματα τύπου III, έτσι και με αυτό, κυτταροπλασματικές σαπερόνες είναι αναγκαίες για την έκκριση πολλών μολυσματικών παραγόντων, καθώς και συστατικών του ίδιου του συστήματος. Μέχρι τώρα, ως σαπερόνες έχουν χαρακτηριστεί τα μόρια, CesT για Tir⁸³, CesD για EspB και EspD⁸⁴, CesF για EspF⁸⁵, CesD₂, δεύτερη σαπερόνη για EspD⁸⁶ και η CesAB για EspA και EspB⁸⁷. Αλληλουχίες DNA με μεγάλο βαθμό ομοιότητας με το EPEC LEE έχουν βρεθεί και σε άλλα βακτήρια που προκαλούν την A/E κάκωση, συμπεριλαμβανομένου του EHEC, όπως και του παθογόνου των ποντικών *C. rodentium*, υποδεικνύοντας πως υπάρχει ένα κοινό εξελικτικό μονοπάτι που οδήγησε στο σχηματισμό της A/E κάκωσης⁷⁹.

1.3.3 Εντοπισμένη προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του EPEC και του ξενιστή περιλαμβάνει γενικά πολλά βήματα, αλλά έχει κλασικά πια θεωρηθεί σαν μια διαδικασία τριών βημάτων. Το πρώτο στάδιο στη μολυσματικότητα από το EPEC είναι η πρωταρχική προσκόλληση του βακτηρίου στη μεμβράνη του εντερικού επιθηλίου. Σε αυτό το στάδιο, το EPEC σχηματίζει πυκνές μικρο-αποικίες στην επιφάνεια των κυττάρων από κυτταρικές σειρές με ένα συγκεκριμένο πρότυπο γνωστό ως εντοπισμένη προσκόλληση⁸⁰. Το βακτήριο

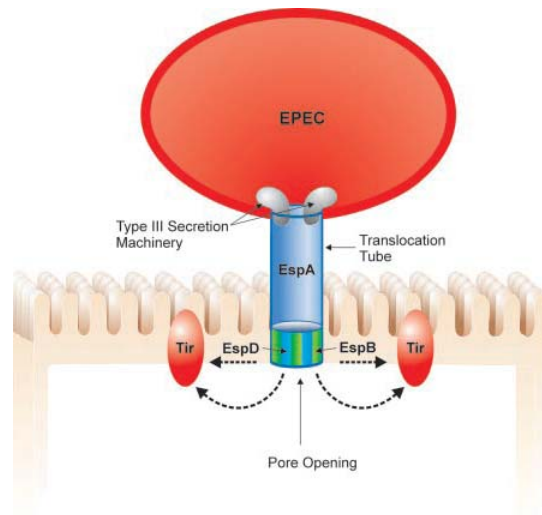
πιστεύεται πως αρχικά προσκολλάται στο κύτταρο-ξενιστή μέσω του τριγιδίου σχηματισμού του δεματίου (BFP, bundle forming pilus), το οποίο κωδικοποιείται από ένα επίσωμα (plasmid). Παρόλ' αυτά, μεταλλάγματα τα οποία δεν έχουν το επίσωμα αυτό, μπορούν ακόμη να προσκολληθούν στο κύτταρο του ξενιστή, αλλά δεν μπορούν να σχηματίσουν μικρο-αποικίες και παράγουν λιγότερες A/E κακώσεις σε σχέση με το αγρίο τύπου στέλεχος^{81, 88}. Παρόλ' αυτά, το BFP παραμένει ένας σημαντικός μολυσματικός παράγοντας καθώς στελέχη που δεν φέρουν το επίσωμα αυτό δείχνουν σαφώς μειωμένη ικανότητα να προκαλούν διάρροια σε εθελοντές ανθρώπους⁸⁹. Αυτή η μείωση της μολυσματικής ικανότητας πιθανόν να σημαίνει πως και τα δύο, η πρωταρχική προσκόλληση όσο και ο σχηματισμός των μικρο-αποικιών είναι ιδιαίτερα σημαντικά και καθορίζουν την επιτυχία με την οποία ένα στέλεχος θα προσβάλει τον ξενιστή του. Αξιοπεριέργα, οι μεσολαβητές της πρωταρχικής προσκόλλησης φαίνεται να ποικίλουν μέσα στην οικογένεια των A/E παθογόνων. Το συγγενικό στέλεχος του EHEC, δεν έχει BFP, και σε αντίθεση με το EPEC, προσβάλει το ανθρώπινο κόλον και όχι τον ειλέο⁸⁰. Έτσι λοιπόν, εάν η βακτηριακή αποίκιση γίνει στο λεπτό ή το παχύ έντερο, αυτό μπορεί να καθοριστεί από την έκφραση ή όχι του BFP και άλλων προσκολλητινών, όπως επίσης και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να ρυθμίζουν την έκφραση και άλλων μολυσματικών παραγόντων⁹⁰.

1.3.4 Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες του EPEC (EspS)

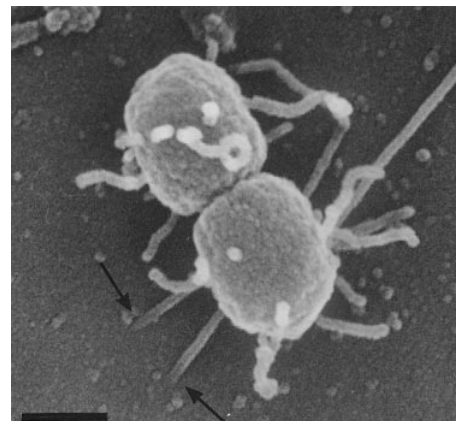
Το δεύτερο στάδιο της παθογένεσης του EPEC περιλαμβάνει την παραγωγή των βακτηριακών πρωτεϊνών, της EspA, EspB και EspD. Αυτές οι πρωτεΐνες μετατοπίζονται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (σχήμα 1.12), το οποίο επίσης κωδικοποιείται από το νησίδιο LEE. Το σύστημα έκκρισης τύπου III πιστεύεται πως δημιουργεί ένα συνεχή διάυλο, ο οποίος επιτρέπει σε αυτή την μετατόπιση να συμβεί^{79, 81}. Το σύστημα αυτό παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και από άλλα Gram (-) παθογόνα βακτήρια, όπως είναι η *Yersinia* και η *Salmonella*, επιτρέποντας στις βακτηριακές πρωτεΐνες να μετατοπιστούν σε ένα βήμα από το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, όπου

συντίθενται, απ' ευθείας στο κυτταρόπλασμα ή τη μεμβράνη του ξενιστή. Παρόλο που οι περισσότερες Esp πρωτεΐνες είναι αναγκαίες για την πρόκληση της A/E κάκωσης, ο ακριβής ρόλος τους στην παθογένεση δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος. Έτσι, η EspA πρωτεΐνη σχηματίζει ινώδεις κατασκευές που προεκτείνονται εξωτερικά του βακτηρίου και εκφράζονται περιοδικά στην επιφάνεια του βακτηρίου⁸¹. Αυτά τα ινίδια αλληλεπιδρούν με τον ξενιστή, πιθανότατα σχηματίζοντας ένα κανάλι μετατόπισης, το οποίο φτάνει μέχρι την επιφάνεια του ξενιστή (σχήμα 1. 13).

Σχήμα 1. 12 : Η μετατόπιση των Esps γίνεται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III, το οποίο σχηματίζει έναν πόρο που διαπερνά τις βακτηριακές μεμβράνες. Μόλις βρεθούν έξω από το βακτήριο, η EspA πρωτεΐνη θα πολυμεριστεί σχηματίζοντας το χαρακτηριστικό ινώδες αγωγό μετατόπισης, ενώ οι EspB και EspD, ενσωματώνονται στη μεμβράνη του ξενιστή, πιθανότατα σχηματίζοντας έναν πόρο, και επιτρέπουν έτσι το τελικό πέρασμα των τοξινών, όπως είναι η Tir πρωτεΐνη.



Σχήμα 1.13 : Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης οι οποίες δείχνουν την πρωταρχική προσκόλληση EPEC στελεχών σε HEL επιθηλιακά κύτταρα. Πριν από το σχηματισμό της A/E κάκωσης, ινώδεις επιφανειακές δομές, οι οποίες αντιστοιχούν στην EspA, σχηματίζονται στην επιφάνεια του βακτηρίου και φαίνεται να σχηματίζουν μια φυσική γέφυρα μεταξύ του βακτηρίου και της επιφάνειας του κυττάρου HEL. Τα βέλη στην εικόνα υποδεικνύουν τα EspA ινίδια, τα οποία εμφανίζονται ιδιαίτερα άκαμπτα, ενώ φαίνεται να ενσωματώνονται μέσα στη μεμβράνη του ξενιστή.



Επιβεβαιώνοντας την παραπάνω θεωρία, η EspB μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τη μεμβράνη του ξενιστή με μια διαδικασία, η οποία εξαρτάται από την EspA⁸¹. Η EspD επίσης έχει δείξει να ενσωματώνεται στις μεμβράνες του ξενιστή⁹¹. Αν και ο ρόλος τους δεν είναι απόλυτα γνωστός, η ομολογία τους με τις πρωτεΐνες YopD και YopB από τη *Yersinia*, αλλά και η ικανότητά τους να λύουν ερυθροκύτταρα⁹², αποτελούν σοβαρές ενδείξεις ότι λειτουργούν ως συστατικά της ίδιας της μηχανής μετατόπισης, πιθανότατα σχηματίζοντας έναν πόρο στη μεμβράνη του ξενιστή. Κατά συνέπεια, πρωταρχική λειτουργία των EspB και EspD είναι να παραδώσουν τις άλλες τοξίνες στο ευκαρυωτικό κύτταρο, παρά να μετατοπιστούν οι ίδιες. Παρόλ' αυτά ένθεση του EspB σε κύτταρα HeLa οδηγεί σε αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και αποδιοργάνωση των ινιδίων έντασης (stress fibers)⁹³, υποδεικνύοντας ότι η ίδια η EspB μπορεί να δρα ως κυτταροσκελετική τοξίνη.

1.3.5 Στενή προσκόλληση και ο ρόλος της Tir πρωτεΐνης

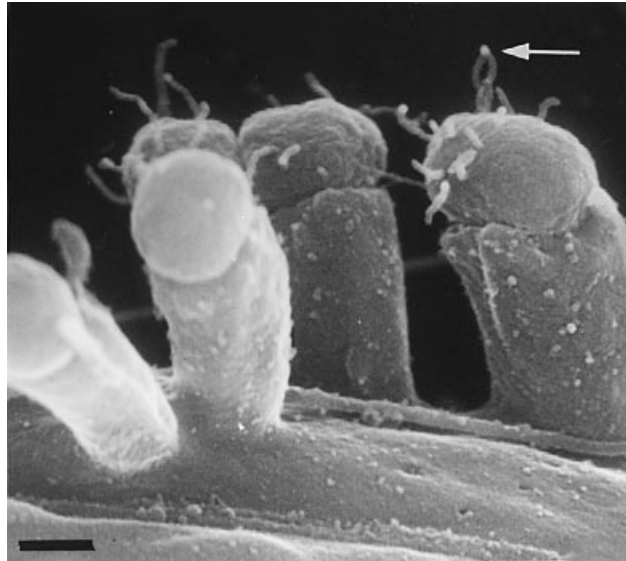
Το τρίτο στάδιο της μόλυνσης από EPEC περιλαμβάνει την εξάλειψη των εντεροκυττάρων, το σχηματισμό των προεκβολών και τη στενή βακτηριακή προσκόλληση πάνω στον ξενιστή. Η στενή προσκόλληση απαιτεί την πρωτεΐνη της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης ιντιμίνη (intimin). Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 94 KDa της εξωτερικής μεμβράνης, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *eae*, και ελέγχει τη στενή προσκόλληση μέσω της αναγνώρισης μιας 90 KDa πρωτεΐνης στην μεμβράνη του ξενιστή⁹⁴. Αυτός ο υποδοχέας, ο οποίος τώρα πια ονομάζεται Tir, στην αρχή πιστευόταν ότι είναι μια ευκαρυωτική πρωτεΐνη, τώρα όμως έχει αποδειχτεί ότι πρόκειται για μια βακτηριακή πρωτεΐνη, η οποία μετατοπίζεται στη μεμβράνη του ξενιστή μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III⁹⁰. Αμέσως μετά την μετατόπισή του στον ξενιστή, ο υποδοχέας Tir φωσφορυλιώνεται σε δύο κατάλοιπα σερίνης, μια διαδικασία που εξαρτάται από την κινάση A⁹⁵. Ο Tir φωσφορυλιώνεται και στην τυροσίνη 474, από μια άγνωστη κινάση⁹⁴. Μόλις ενσωματωθεί στη μεμβράνη, διμερίζεται και τότε μόνο λειτουργεί ως υποδοχέας της ιντιμίνης. Τα δύο μόρια Tir ενώνονται μεταξύ τους με

τέτοιο τρόπο ώστε να έρχονται σε ένα επίπεδο σχεδόν παράλληλο με το επίπεδο της μεμβράνης του βακτηρίου και του ξενιστή, αλλά και η σύνδεση αυτή επιτρέπει την πολύ κοντινή (περίπου 10 nm) απόσταση ανάμεσα στο βακτήριο και τον ξενιστή⁹⁰. Εάν η φωσφορυλλίωση του υποδοχέα προηγείται ή έπεται της ένθεσής του στη μεμβράνη δεν είναι πλήρως εξακριβωμένο, αλλά τελευταία έχει βρεθεί Tir στις μεμβράνες ερυθροκυττάρων, η οποία φυσικά δεν ήταν τροποποιημένη, ενισχύοντας το μοντέλο ότι πρώτα θα ενσωματωθεί στη μεμβράνη και μετά θα φωσφορυλλιωθεί⁹⁶.

1.3.6 Δομή της A/E κάκωσης

Το κύτταρο του ξενιστή υπόκειται σε μια σειρά από αλλαγές κατά τη διάρκεια της μόλυνσής του από EPEC, αλλά η πιο εντυπωσιακή αλλαγή είναι αυτή του σχηματισμού των προεκβολών της ακτίνης. Στην πραγματικότητα, η εντοπισμένη συσσώρευση της ακτίνης που προκαλείται, είναι τόσο χαρακτηριστική, που έχει αποτελέσει τη βάση για τη δημιουργία μιας *in vitro* διαγνωστικής δοκιμής για EPEC⁹⁷. Η διαδικασία του σχηματισμού της προεκβολής ξεκινάει μετά την προσκόλληση του EPEC στα επιθηλιακά κύτταρα *in vitro* και *in vivo*, παράλληλα με την εξάλειψη των μικρολαχνών του ξενιστή. Μέσα σε τρεις ώρες από την επιμόλυνση κυτταρικών σειρών από EPEC, οι προεκβολές αρχίζουν να σχηματίζονται ακριβώς κάτω από το προσκολλημένο βακτήριο^{79, 81}. Πιο συγκεκριμένα, η μεμβράνη του προσβαλλόμενου κυττάρου σηκώνεται κάτω από το βακτήριο για να σχηματίσει τις χαρακτηριστικές προεκβολές, οι οποίες εκτείνονται μέχρι και 10 μm μακριά από το ευκαρυωτικό κύτταρο και μοιάζουν με ψευδοπόδια⁸¹ (σχήμα 1.14). Πέρα από το να παρέχουν δυνατή προσκόλληση του EPEC στην κυτταρική επιφάνεια, πιθανότατα για να μην αποκολληθούν λόγω της διάρροιας που θα προκληθεί, ο ρόλος του σχηματισμού του ψευδοποδίου παραμένει ασαφής. Μπορεί παρόλ' αυτά να αποτελεί μια στρατηγική του βακτηρίου να παραμένει εξωκυττάριο, μαζί με την ικανότητα του EPEC να εμποδίζει τη φαγοκυττάρωσή του από τα φαγοκύτταρα⁹⁸.

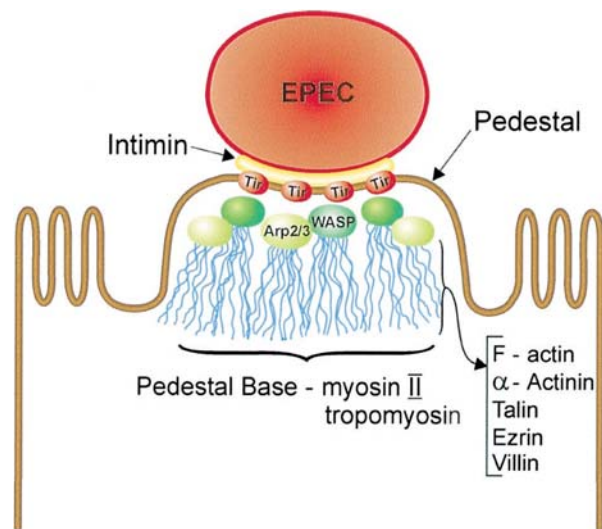
Σχήμα 1.14 : Μικρογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, όπου ένα βακτήριο προσβάλλει σειρές επιθηλιακών κυττάρων και το ψευδοπόδιο έχει σχηματιστεί.



Μελέτες ανοσοφθορισμού έχουν δείξει, ότι εκτός από την πρωτεΐνη Tir, οι προεκβολές περιέχουν κυρίως την F-ακτίνη⁹⁹. Επίσης, η α -ακτινίνη, η ταλίνη, η εξρίνη (ezrin) και η βιλλίνη (villin) συσσωρεύονται κατά μήκος της προεκβολής, καθώς όλα αυτά τα κυτταροσκελετικά συστατικά δρουν ως διασυνδέτες των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Επίσης, μυοσίνη II και τροπομυοσίνη εντοπίζονται στη βάση της προεκβολής⁹⁹. Με βάση τη θέση του στην κορυφή της προεκβολής αυτής, όπως επίσης και της δομής του, ο υποδοχέας Tir είναι ο πιο ισχυρός υποψήφιος για την σύνδεση του EPEC με τον κυτταροσκελετό, κατευθύνοντας τη συσσώρευση της ακτίνης και το σχηματισμό του ψευδοποδίου. Έτσι είναι πολύ πιθανό ο Tir να στρατολογεί γνωστούς ρυθμιστές της δυναμικής της ακτίνης για να ξεκινήσει τον πολυμερισμό της. Πράγματι, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως πρωτεΐνες της οικογένειας του συνδρόμου Wiskott-Aldrich (WASP), όπως και ένας παράγοντας πολυμερισμού της ακτίνης, το επταμερές σύμπλοκο Arg2/3, έχουν βρεθεί στις προεκβολές. Αυτοί οι παράγοντες έχει δειχτεί να στρατολογούνται στην κορυφή της προεκβολής (σχήμα 1.15) και μεταλλαγές στην περιοχή της GTPάσης του WASP εμπόδισαν τη στρατολόγηση του συμπλόκου Arg2/3

και το σχηματισμό της προεκβολής¹⁰⁰. Παρόλο που οι αναδιατάξεις των στοιχείων του κυτταροσκελετού είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό της προεκβολής, μπορεί επίσης να ευθύνονται και για την καταστροφή των μικρολαχνών του εντέρου. Αν και αυτό πρέπει να αποδειχτεί, δεν αποκλείεται η εξαφάνιση των μικρολαχνών να οφείλεται στον επαγόμενο από το βακτήριο από-πολυμερισμό της ακτίνης των μικρολαχνών, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των προεκβολών. Όμως πολλές από τις πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στην προεκβολή, δεν έχουν προέλθει από τις μικρολάχνες, γεγονός που υποδεικνύει ότι συμβαίνει μια πιο περίπλοκη διαδικασία, από το απλό ξανακτίσιμο μικρολαχνών κάτω από το προσκολλημένο βακτήριο⁷⁵.

Σχήμα 1.15 : Η δομή μιας προεκβολής κατά την μόλυνση με EPEC



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2. ΔΟΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΑΠΕΡΟΝΗΣ CesAB

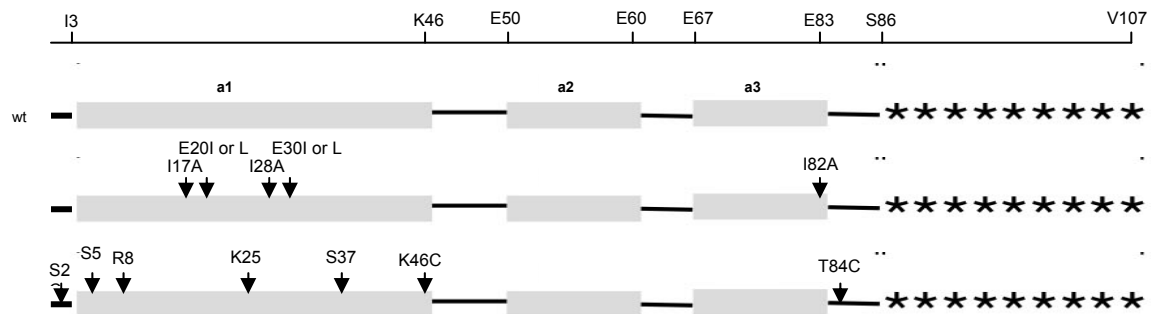
Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες από το τύπου III σύστημα, τοξίνες όσο και μεταθέτες, χρειάζονται την παρουσία κυτταροπλασματικών σαπερονών για τη σταθεροποίηση τους, την εμπόδιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μη-ώριμων πρωτεϊνών, την ιεραρχημένη έκκριση και τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων των τοξινών^{52, 54}. Η CesAB πρωτεΐνη έχει πολύ πρόσφατα χαρακτηριστεί ως σαπερόνη του μεταθέτη EspA, καθώς χρειάζεται για σταθεροποίηση αλλά και έκκριση του EspA. Επίσης η CesAB χρειάζεται για την έκκριση του μεταθέτη EspB, χωρίς όμως να παίζει ρόλο και στην ενδοκυτταρική σταθερότητα του μορίου⁸⁷. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής του ετεροδιμερούς CesAB/EspA έδειξε ότι ο μεταθέτης EspA περιέχει δύο εκτενείς α-έλικες, μία σε κάθε άκρο, οι οποίες ενέχονται σε εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις συσπειρωμένης σπείρας (coiled-coil) με την CesAB. Με βάση τη δομή αυτή, η CesAB προτάθηκε πως διευκολύνει την έκκριση του EspA, καθώς δεσμεύει τον μεταθέτη στην μονομερή μορφή του αποτρέποντας τον πολυμερισμό του στο βακτηριακό κύτταρο⁴².

Προκειμένου να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο η CesAB πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τα υποστρώματά της και το μηχανισμό με τον οποίο τα παραδίδει στο υπόλοιπο σύστημα έκκρισης, προσδιορίσαμε την δομή της σαπερόνης μόνη της ή σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα EspA, χρησιμοποιώντας πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR).

2.1 CesAB και παράγωγες DNA κατασκευές

Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκαν εκτός της αγρίου τύπου πρωτεΐνης CesAB και μεταλλαγμένα παράγωγα αυτής, προκειμένου να μελετηθούν με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Πιο αναλυτικά, κατασκευάστηκαν μια σειρά σημειακών μεταλλαγών, που είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή των παρακάτω πρωτεϊνών (βλ. σχήμα 2.1) : CesAB(I17A), (I28A), (I82A), (K25C), (S37C), (K46C),

(T84C), (E20I), (E20L), (E30I), (E30L), (S2C), (S5C), (R8C), (E20L/E30I), (E20L/E30L), (I17A/I28A), (I28A/I82A), (I17A/I82A), (I17A/I28A/I82A).



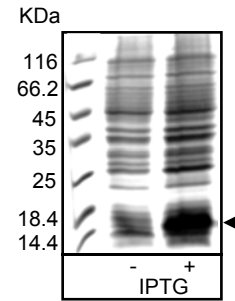
Σχήμα 2.1 : Χάρτης της πρωτεΐνης CesAB και των μεταλλαγμένων παραγώγων της. Παρουσιάζονται οι σημειακές μεταλλαγές (Βέλος : Η θέση της εκάστοτε σημειακής μεταλλαγής), καθώς και στοιχεία δευτεροταγούς δομής (■ : α- έλικες, ✦ : Περιοχή που δεν σκεδάζει στον χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας)

Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης των παραπάνω κατασκευών προσθέτουν στις πρωτεΐνες 6 ιστιδινυλικούς επιτόπους, ώστε να γίνεται εφικτός ο καθαρισμός τους με χρωματογραφία συγγένειας Ni^{2+} -NTA.

2.2 Έκφραση και καθαρισμός της πρωτεΐνης CesAB και των μεταλλαγμένων παραγώγων της

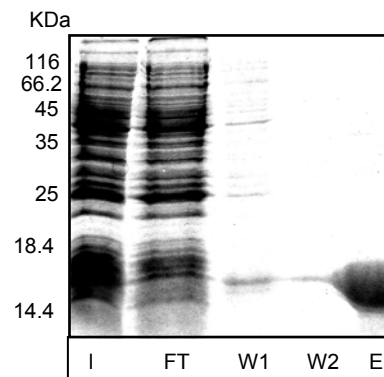
Αρχικά, πλασμιδιακοί φορείς, οι οποίοι εκφράζουν πρωτεΐνες που φέρουν τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο στην αμινο-τελική περιοχή τους, μετασχηματίστηκαν σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα. Επαγωγή της έκφρασης του κλωνοποιημένου γονιδίου έγινε με 0.2 mM IPTG, ενώ η επώαση των κυττάρων έγινε στους 30⁰ C. Συλλέχθηκαν δείγματα κυττάρων πριν και μετά την τρίωρη επαγωγή τους, τα οποία εν συνεχεία αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15% (SDS-PAGE) (Σχήμα 2.2).

Σχήμα 2.2 : Έκφραση της πρωτεΐνης CesAB σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακό στέλεχος. Η επαγωγή της έκφρασης έγινε με 0,2 mM IPTG στους 30⁰ C, ενώ τα πρωτεϊνικά δείγματα που συλλέχθηκαν πριν (-) και μετά (+) την τρίωρη επαγωγή, αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15%. Η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. Μοριακοί δείκτες της Fermentas χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες του μοριακού μεγέθους των πρωτεϊνικών ζωνών.



Εφόσον η έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης έχει εξασφαλιστεί κάθε φορά, το βακτηριακό εκχύλισμα που προκύπτει μετά από διάρρηξη του κυττάρου με ηχοβολισμό και υπερφυγοκέντρηση, αποτελεί το υλικό που φορτώνεται σε ρητίνη Ni²⁺-NTA, προεξισοροπημένη με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Οι εκτενείς εκπλύσεις (W1, W2) πάνω στη ρητίνη χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA με διαλύματα αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου εξασφαλίζουν πως η πρωτεΐνη που εκλούεται τελικά από τη ρητίνη είναι εξαιρετικά καθαρή (Σχήμα 2.3)

Σχήμα 2.3 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CesAB με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. I : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη, W1 και W2 : δείγματα από τα στάδια εκπλύσεων, EI : δείγμα από το υλικό έκλυσης



2.3 Συνέκφραση και συγκαθαρισμός της πρωτεΐνης CesAB (αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων) και του μεταθέτη EspA

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα της πρωτεΐνης CesAB (αγρίου τύπου και μεταλλαγμάτων) να σχηματίζει σύμπλοκο με το μεταθέτη EspA, οι εν λόγω πρωτεΐνες

αρχικά συνεκφράστηκαν σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα. Εν συνεχεία, η πρωτεΐνη CesAB που φέρει αμινοτελικά τον επίτοπο των έξι ιστιδινών συνεκλούστηκε με το μεταθέτη EspA ως σύμπλοκο, μετά από χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου (Ni^{2+} -NTA).

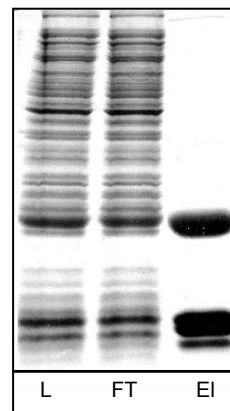
Πιο αναλυτικά, ο πλασμιδιακός φορέας pET-Duet-1, ο οποίος φέρει το *cesAB* γονίδιο στην πρώτη θέση (T7p1) και το *espA* γονίδιο στη δεύτερη θέση (T7p2) (βλ. σχήμα 2.4) μετασχηματίστηκε σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα. Επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων έγινε με 0.2 mM IPTG, ενώ η αύξηση των κυττάρων έγινε στους 30⁰ C. Όπως ακριβώς και παραπάνω (κεφ. 2.2) δείγματα κυττάρων συλλέχθηκαν πριν και μετά την τριώρη επαγωγή τους και στην συνεχεία αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 15% (SDS-PAGE).



Σχήμα 2.4 : Το pET Duet-1 σύστημα για τη συνέκφραση δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε με τρόπο ώστε το *cesAB* γονίδιο να κλωνοποιηθεί στην πρώτη θέση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 1 (T7p1), ενώ το *espA* γονίδιο κλωνοποιήθηκε στη δεύτερη θέση κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 2 (T7p2). Ως αποτέλεσμα ο παραπάνω πλασμιδιακός φορέας μπορεί να συνεκφράζει την πρωτεΐνη CesAB με τον εξάϊστιδινυλικό επίτοπο στην αμινοτελική πλευρά της μαζί με το μεταθέτη EspA.

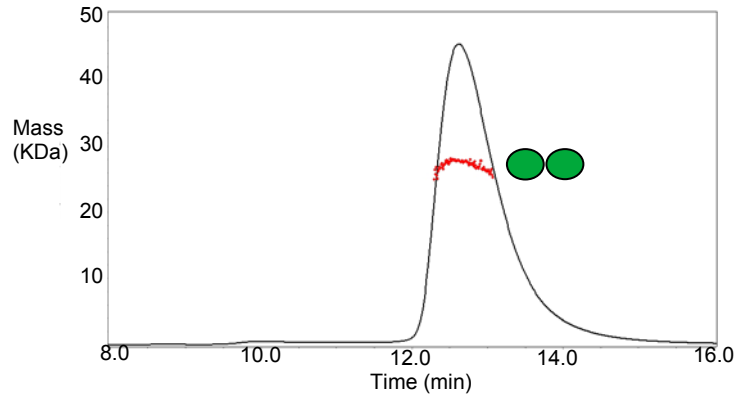
Εφόσον η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών κρίθηκε ικανοποιητική, προχωρήσαμε στην καλλιέργεια κυττάρων σε μεγάλη κλίμακα και τη συναπομόνωση των εκφρασμένων πρωτεϊνών σε καθαρή μορφή. Στο σχήμα 2.5 παρουσιάζονται τα στάδια του καθαρισμού των δύο πρωτεϊνών σε μια αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει υποστεί χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. Όπως παρατηρούμε, οι δύο πρωτεΐνες συνεκλούνται τελικά από τη ρητίνη χρωματογραφίας Ni^{2+} -NTA όχι μόνο σε καθαρή μορφή αλλά και πιθανότατα σε ισομοριακή αναλογία.

Σχήμα 2.5 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης CesAB και EspA με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. L : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε την ρητίνη, EI : δείγμα από το υλικό έκλουσης

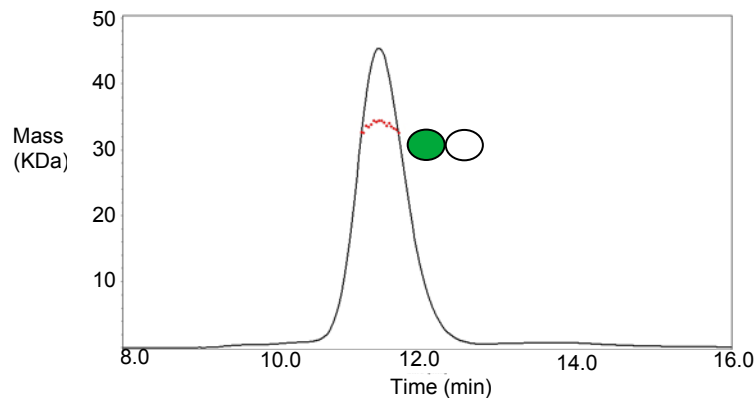


2.4 Η CesAB είναι μία φυσικά αποδιαταγμένη και διμερής πρωτεΐνη

Στην προσπάθειά μας να κατανοήσουμε βαθύτερα τη λειτουργία της πρωτεΐνης CesAB, αρχικά προσδιορίσαμε την κατάσταση ολιγομερισμού της, όταν αυτή είναι σε διαλυτή μορφή. Πειράματα σκέδασης φωτός laser πολλαπλής γωνίας (Multi-angle Laser Light Scattering, MALLS) έδειξαν πως η απομονωμένη πρωτεΐνη CesAB έχει μοριακό βάρος 27.8 kDa (σχήμα 2.6) και είναι επομένως διμερής (το προβλεπόμενο με βάση την αμινοξική αλληλουχία μοριακό βάρος της είναι 13.9 kDa). Επίσης το μοριακό βάρος της απομονωμένης πρωτεΐνης CesAB ως σύμπλοκο με την πρωτεΐνη EspA υπολογίστηκε με ανάλογα πειράματα στα 34.4 kDa (Σχήμα 2.7), το οποίο συμφωνεί με 1:1 στοιχειομετρία (το προβλεπόμενο με βάση την αμινοξική αλληλουχία μοριακό βάρος της πρωτεΐνης EspA είναι 25 kDa). Το μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής (MALLS) είναι το γεγονός πως μας επιτρέπει τον υπολογισμό των μοριακών βαρών με ακρίβεια χωρίς την παρεμβολή πρωτεϊνικών μαρτύρων γνωστού μοριακού βάρους. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν στο εργαστήριο από τον Χαράλαμπο Ποζίδη.



Σχήμα 2.6 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesAB με πειράματα MALLS. Το χρωματογραφικό ίχνος από τον ανιχνευτή του UV φαίνεται , όπως επίσης διακρίνονται και οι μετρήσεις μάζας (από τον ανιχνευτή 11 του οργάνου Dawn-EOS) από διαδοχικά τμήματα του χρωματογραφικού μέγιστου (κόκκινες τελείες) . Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που φορτώθηκε ήταν 5 mg/ml. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έγινε σε Superdex 75 HR10/30 κολώνα, προεξισορροπημένη με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 0.3 M NaCl και με ταχύτητα ροής 0.8 ml/min



Σχήμα 2.7 : Μέτρηση της μάζας του συμπλόκου CesAB/EspA με πειράματα MALLS. Ακριβώς όπως και στο σχήμα 2.6. Η συγκέντρωση του συμπλόκου που φορτώθηκε ήταν 1 mg/ml. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έγινε σε Superdex 75 HR10/30 κολώνα, προεξισορροπημένη με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 0.3 M NaCl και με ταχύτητα ροής 0.8 ml/min

Κλειδί όμως στην διαλεύκανση της λειτουργίας της πρωτεΐνης θεωρήθηκε ο προσδιορισμός της δομής της. Η ανάλυση της δομής της πρωτεΐνης CesAB έγινε με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Τα πειράματα αυτά έδειξαν πως το ομοδιμερές σταθεροποιείται κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων συσπειρωμένης σπείρας

(coiled-coil) μεταξύ των δύο μονομερών, αλλά αξιοπερίεργα το υπόλοιπο τμήμα της πρωτεΐνης βρίσκεται σε μια φυσικώς αποδιαταγμένη κατάσταση (natively unfolded state).

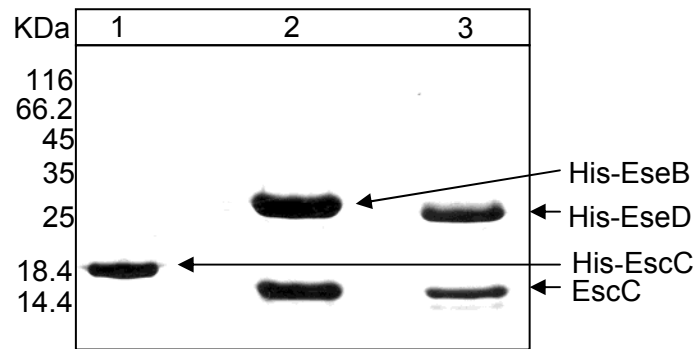
Παρομοίως και ο μεταθέτης EspA δεν έχει συμπαγή τριτοταγή δομή όταν δεν βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη σαπερόνη του CesAB, σύμφωνα και πάλι με πειράματα NMR. Μόνο μετά την πρόσδεση ενός μονομερούς CesAB σε ένα μονομερές EspA, το τελικό σύμπλοκο αποκτά εγγενή δομή. Το ετεροδιμερές CesAB/ EspA σύμπλοκο επίσης σταθεροποιείται με εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις συσπειρωμένης σπείρας (coiled-coil) μεταξύ α-ελίκων των δύο πρωτεϊνών. Τελικά από την ανάλυση των δομών διαφαίνεται με σαφήνεια πως ανάλογες αλληλεπιδράσεις συσπειρωμένης σπείρας (coiled-coil) καθορίζουν τόσο το σχηματισμό του ομοδιμερούς της CesAB, όσο και του ετεροδιμερούς συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης CesAB και του μεταθέτη EspA. Τα πειράματα του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έγιναν υπό την επίβλεψη του Δρ Χ. Καλοδήμου από τη φοιτήτρια Lucychen Li.

2.5 Τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης CesAB είναι διατηρημένα σε αυτή την τάξη των σαπερονών

Για να εξακριβώσουμε εάν τα ασυνήθιστα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης CesAB (εγγενώς αποδιπλωμένο ομοδιμερές) διατηρούνται σε ομόλογες πρωτεΐνες της στα διάφορα εκκριτικά μονοπάτια τύπου III, καθορίσαμε με πειράματα NMR τη δομή της EscC πρωτεΐνης από το στέλεχος *E.tarda*¹⁰¹ και τη δομή της SseA πρωτεΐνης από την *SalmonellaTyphimurium*¹⁰².

Η *Edwardsiella tarda* είναι ένα Gram-αρνητικό παθογόνο του εντέρου, το οποίο προσβάλλει τόσο τον άνθρωπο όσο και τα ζώα. Πολύ πρόσφατα έχει χαρακτηριστεί ένα σύστημα έκκρισης τύπου III, το οποίο φαίνεται να συνεισφέρει στην παθογένεση από την *Ed. tarda*¹⁰³. Η EscC πρωτεΐνη έχει μικρό μοριακό βάρος (13 kDa) και πολύ πρόσφατα έχει χαρακτηριστεί ως σαπερόνη των δύο πιθανών μεταθετών EseB και EseD¹⁰¹. Παρόμοια με την πρωτεΐνη CesAB, η EscC πρωτεΐνη έφερε τον επίτοπο με τις έξι

ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο και μετά από την έκφρασή της, είτε μόνη της ή μαζί με τα υποστρώματά της, απομονώθηκε σε εξαιρετικά καθαρή μορφή μετά από χρωματογραφία σε ρητίνη Ni²⁺-NTA. Στο σχήμα 2.8 που ακολουθεί φαίνονται ενδεικτικά η EscC πρωτεΐνη μόνη της ή σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη EseB ή EseD, όπως αυτές εκλούστηκαν από τη ρητίνη. Πρέπει να σημειωθεί πως η μάζα της απομονωμένης EscC πρωτεΐνης μετρήθηκε με MALLS και βρέθηκε πως, σε απόλυτη αντιστοιχία με την ομόλογη της πρωτεΐνη CesAB, είναι διμερής.



Σχήμα 2.8 : Εκλουσμένα δείγματα από ρητίνη Ni²⁺-NTA. Στήλη 1 : καθαρή His-EscC, στήλη 2 : καθαρό σύμπλοκο His-EseB/EscC και στήλη 3 : καθαρό σύμπλοκο His-EseD/EscC. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15% πηκτή πολυακρυλαμίδης και οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύτηκαν μετά από χρώση Coomassie Brilliant Blue R250.

Ανάλογα και η πρωτεΐνη SseA από τη *Salmonella Typhimurium* απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, ελέγχθηκε η ικανότητά της να δημιουργεί σύμπλοκο με τους μεταθέτες SseB και SseD και προσδιορίστηκε η κατάσταση ολιγομερισμού της σε διαλυτή μορφή (αυτά τα πειράματα δεν παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή).

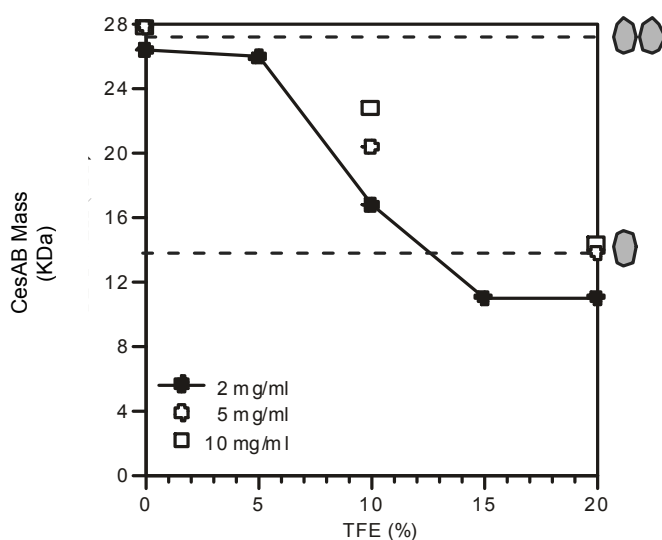
Όταν οι παραπάνω σαπερόνες αναλύθηκαν με πειράματα NMR, αποκαλύφθηκε πως και αυτές αποκτούν την διαμόρφωση ενός φυσικά αποδιαταγμένου μορίου σε διάλυμα. Είναι πολύ πιθανό η ασυνήθιστη αυτή διαμόρφωση να παίζει κεντρικό ρόλο στην επιτέλεση της λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτής της τάξης.

Τα παραπάνω πειράματα του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έγιναν επίσης υπό την επίβλεψη του Δρ X. Καλοδήμου από την φοιτήτρια Lucy Chen Li.

2.6 Η δομή της σαπερόνης CesAB παρουσία σταθεροποιητή των α-ελίκων

Σε μια προσπάθεια να σταθεροποιηθεί το εγγενώς αποδιαταγμένο διμερές της CesAB, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα NMR το 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE), ένας παράγοντας ο οποίος σταθεροποιεί τις α-έλικες στη δομή μιας πρωτεΐνης¹⁰⁴.

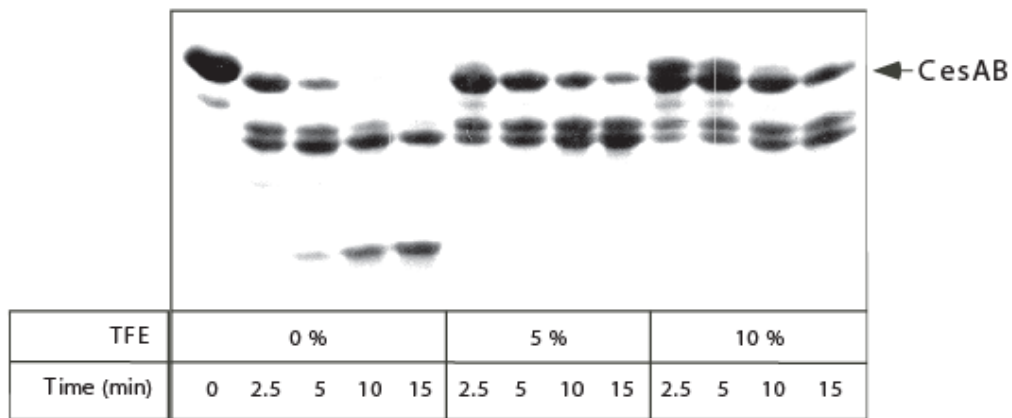
Στην παρούσα διατριβή εξετάστηκαν ενδελεχώς οι συνέπειες της χρήσης του TFE στην δομή της πρωτεΐνης και την κατάσταση ολιγομερισμού της. Αρχικά έγιναν πειράματα μέτρησης της μάζας της CesAB με την βοήθεια του MALLS. Τα πειράματα αυτά έγιναν με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0-20%) του TFE στο δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί, ενώ ενδεικτικά χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (2, 5 και 10 mg/ml). Συνοπτικά τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στο σχήμα 2.9



Σχήμα 2.9 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesAB με ανάλυση MALLS παρουσία TFE. Δείγμα καθαρής πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης (2, 5 και 10 mg/ml) ενέθηκε σε Superdex 75 HR10/30 κολώνα, προεξισορροπημένη με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 0.3 M NaCl (ταχύτητα ροής 0.8 ml/min) παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων TFE. Οι διακεκομμένες γραμμές στο σχήμα υποδεικνύουν το προβλεπόμενο μοριακό βάρος του μονομερούς και του διμερούς της πρωτεΐνης CesAB.

Επιπρόσθετα για να μελετήσουμε τις τυχόν επιπτώσεις της παρουσίας TFE στη δομική συνέχεια της πρωτεΐνης, προχωρήσαμε σε πειράματα περιορισμένης

τρυψινόλυσης. Γενικότερα, η τρυψίνη αναγνωρίζει λυσίνες και αργινίνες σε μια αμινοξική αλληλουχία και δρα. Λόγω της τρισδιάστατης διαμόρφωσης των πρωτεϊνικών μορίων στο χώρο, μόνο συγκεκριμένες λυσίνες και αργινίνες γίνονται προσιτές στην τρυψίνη. Εάν για οποιονδήποτε λόγο αυτή η διαμόρφωση αλλάξει, είναι πολύ πιθανό να αλλάξει και ο τρόπος που η τρυψίνη προσεγγίζει τις συγκεκριμένες λυσίνες και αργινίνες. Γίνεται λοιπόν η περιορισμένη τρυψινόλυση σημαντικό εργαλείο καταγραφής δομικών αλλαγών, σε επίπεδο ανάλυσης πλέον του ενός αμινοξέος.



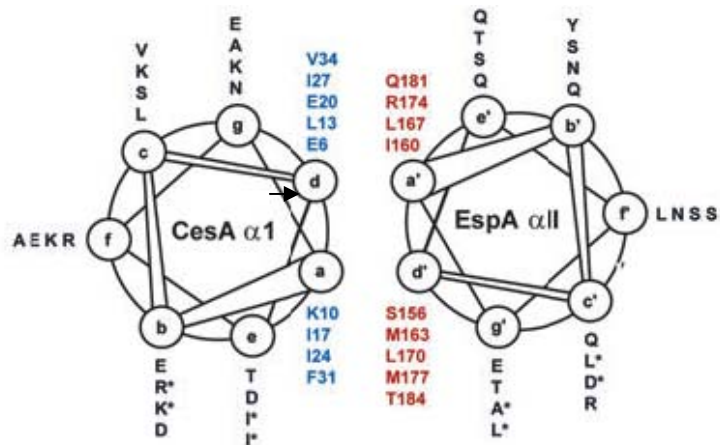
Σχήμα 2.10 : Περιορισμένη τρυψινόλυση παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων TFE. Περιορισμένη τρυψινόλυση (0.5 mg/ml τρυψίνης για τους συγκεκριμένους χρόνους επώασης) καθαρής πρωτεΐνης CesAB (1mg/ml) πραγματοποιήθηκε σε 50 mM KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM MgCl₂; 2 mM DTT. Τα πρωτεολυμμένα πολυπεπίδια αναλύθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, ενώ έγινε χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε αρχικά πως οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του TFE οδηγούν σε μονομερισμό της πρωτεΐνης CesAB. Πάνω από 15% TFE η πρωτεΐνη είναι μονομερές αποκλειστικά. Επίσης, όπως έδειξαν τα πειράματα της περιορισμένης τρυψινόλυσης, το TFE σταθεροποιεί εκτενώς την πρωτεΐνη. Από την ανάλυση του τρυπτικού προτύπου (βλ. σχήμα 2.10) είναι φανερό πως η τρυψίνη προσεγγίζει λιγότερο αποτελεσματικά την πρωτεΐνη, παρουσία ακόμη και 5% TFE.

2.7 Η CesAB(E20L) πρωτεΐνη είναι ένα σταθεροποιημένο ομοδιμερές

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα έδειξαν πως η πρόσδεση του μεταθέτη EspA στην σαπερόνη CesAB εξαρτάται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κατά μήκος των εκτεταμένων περιοχών συσπειρωμένης σπείρας⁴². Αναλύοντας πιο προσεκτικά τα δεδομένα από την επίλυση της δομής του συμπλόκου, παρατηρήσαμε πως σε κάποιες περιπτώσεις οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των επτά αμινοξέων (heptad repeats) κατά μήκος της συσπειρωμένης σπείρας, είναι μη-κανονικές. Στις περιπτώσεις αυτές τα τελικά υδρόφοβα αμινοξέα της επτάδας έχουν αντικατασταθεί από πολικά και φορτισμένα αμινοξέα (σχήμα 2.11). Το ίδιο μοτίβο επαναλαμβάνεται και στο διμερές της CesAB. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσε να υποθέσει κανείς πως το CesAB ομοδιμερές είναι λιγότερο σταθερό από το CesAB/EspA ετεροδιμερές. Αυτή η υπόθεση εργασίας θα μπορούσε να αποτελεί ένα απλό μηχανισμό, όπου η σαπερόνη προτιμά να προσδέσει τον μεταθέτη παρά να σχηματίζει ομοδιμερή. Αυτή η διαδικασία αποκτά ιδιαίτερη σημασία μέσα στο κύτταρο, καθώς κάθε νεοσυντιθέμενο μόριο EspA σταθεροποιείται μόνο όταν σχηματίσει σύμπλοκο με τη σαπερόνη του CesAB. Στο παραπάνω συμπέρασμα συνηγορεί το γεγονός πως απουσία CesAB στο κύτταρο, παρατηρείται ενδοκυτταρική αστάθεια του EspA⁸⁷.

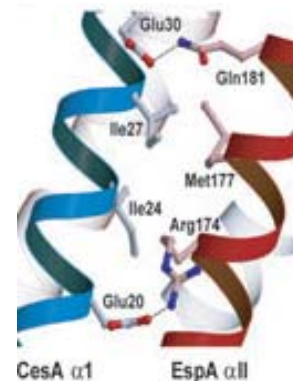
Σχήμα 2.11 : Αναπαράσταση ελικοειδούς ρόδας της α1 και αII έλικας από την CesAB και EspA πρωτεΐνη αντίστοιχα.



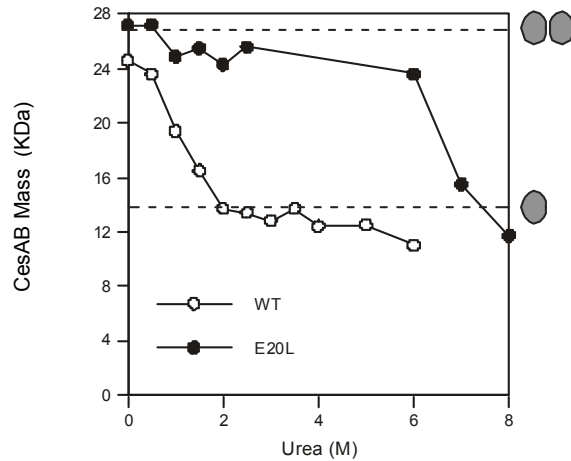
Για να εξετάσουμε λοιπόν την παραπάνω υπόθεση εργασίας μεταλλάξαμε το γλουταμικό οξύ στην θέση 20 (Glu20) της πρωτεΐνης CesAB, το οποίο ανήκει στα μη-

κανονικά αμινοξέα, σε λευκίνη (Leu). Από την κρυσταλλική δομή φαίνεται πως το αμινοξύ Glu20 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με μια αργινίνη στην θέση 174 (Arg174) του μεταθέτη EspA, όπως παρακάτω φαίνεται στην εικόνα 2.12.

Σχήμα 2.12 : Σχηματισμός διαμοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ του Glu20 της α 1-έλικας της CesAB (μπλε χρώμα) και της Arg174 της α II-έλικας της EspA πρωτεΐνης (κόκκινο χρώμα).



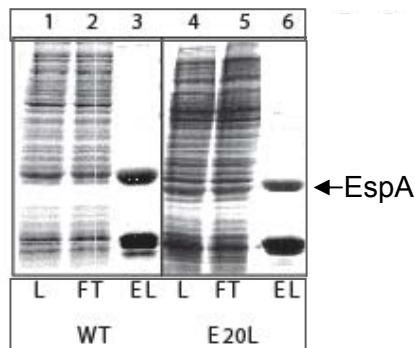
Η σταθερότητα της πρωτεΐνης CesAB(E20L) σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη ελέγχθηκε με πειράματα αποδιάταξης. Ως αποδιατακτικός παράγοντας στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε η ουρία, η οποία επώαστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με τις πρωτεΐνες. Εν συνεχεία με ανάλυση MALLS μετρήθηκε το μοριακό βάρος κάθε μιας πρωτεΐνης, πάντα παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα. Οι μετρήσεις μάζας συνολικά έδωσαν τις καμπύλες αποδιάταξης των δύο πρωτεϊνών, οι οποίες μας επέτρεψαν να προσδιορίσουμε με ακρίβεια τη συγκέντρωση της ουρίας στην οποία κάθε πρωτεΐνη μεταπίπτει από διμερές σε μονομερές. Είναι προφανές από αυτό τον τύπο ανάλυσης των δεδομένων πως η πιο σταθερή πρωτεΐνη είναι και περισσότερο ανθεκτική σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ουρίας. Όπως φαίνεται καθαρά από την εικόνα 2.13, η αγρίου τύπου πρωτεΐνη είναι μονομερής σε 2 M ουρία, την ίδια στιγμή που η CesAB(E20L) είναι κυρίως διμερής ακόμη και παρουσία 6 M ουρίας.



Σχήμα 2.13 : Καθορισμός της μάζας της πρωτεΐνης CesAB και CesAB(E20L) στο διάλυμα παρουσία ουρίας. Οι πρωτεΐνες φορτώθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/ml και οι μάζες τους μετρήθηκαν με ανάλυση MALLS, όπως ακριβώς στο σχήμα 2. 9, παρουσία των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων ουρίας. Ξανά οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την θεωρητική μάζα του CesAB μονομερούς και διμερούς αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω γίνεται ξεκάθαρο πως η πρωτεΐνη CesAB(E20L) είναι ένα υπέρ σταθεροποιημένο ομοδιμερές, το οποίο όμως διατηρεί την ικανότητά του να σχηματίζει ετεροδιμερές σύμπλοκο με το μεταθέτη (Σχήμα 2.14, στήλη 6). Είναι πολύ πιθανό, περισσότερο από ένα μη-κανονικά αμινοξέα να επηρεάζουν τη μετάβαση αυτή από το ομοδιμερές στο ετεροδιμερές, μέσω της ανταλλαγής ενός μονομερούς της CesAB με ένα μονομερές του προσδέτη EspA. Προς αυτήν την κατεύθυνση μεταλλάξαμε και ένα δεύτερο μη-κανονικό αμινοξύ, το γλουταμικό οξύ στην θέση 30, το οποίο με βάση την κρυσταλλική δομή (βλ. σχήμα 2. 12) αλληλεπιδρά με τη γλυκίνη στην θέση 181 του μεταθέτη EspA, σε λευκίνη. Ο βιοχημικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός του διπλού αυτού μεταλλάγματος της σαπερόνης, CesAB(E20L/E30L), θα αναλυθεί στο κεφάλαιο 3.3 της εργασίας αυτής.

Σχήμα 2.14 : Συνέκφραση και συγκαθαρισμός *ex vivo* είτε της αγρίου τύπου πρωτεΐνης CesAB, είτε του μεταλλάγματος CesAB(E20L), με το μεταθέτη EspA. Το σύστημα του pET Duet-1 χρησιμοποιήθηκε για την συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών, όπως και προηγουμένως (βλ. σχήμα 2.4). Ο τελικός πλασμιδιακός φορέας μπορεί να εκφράζει την πρωτεΐνη CesAB να φέρει στο αμινοτελικό της άκρο τον εξαϊστινιδυλικό επίτοπο (His-CesAB) και την πρωτεΐνη EspA. JM109(DE3)/pLysS κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τον παραπάνω πλασμιδιακό φορέα και επάχθηκαν για την έκφραση και των δύο πρωτεϊνών. Το βακτηριακό εκχύλισμα φορτώθηκε σε ρητίνη χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA και το υλικό έκλυσης ελέγχθηκε για την παρουσία και των δύο πρωτεϊνών, μετά από SDS-PAGE και χρώση με Coomassie blue. L : υλικό φορτώματος στη ρητίνη, FT : υλικό που διαπέρασε την ρητίνη και EL : υλικό έκλυσης



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

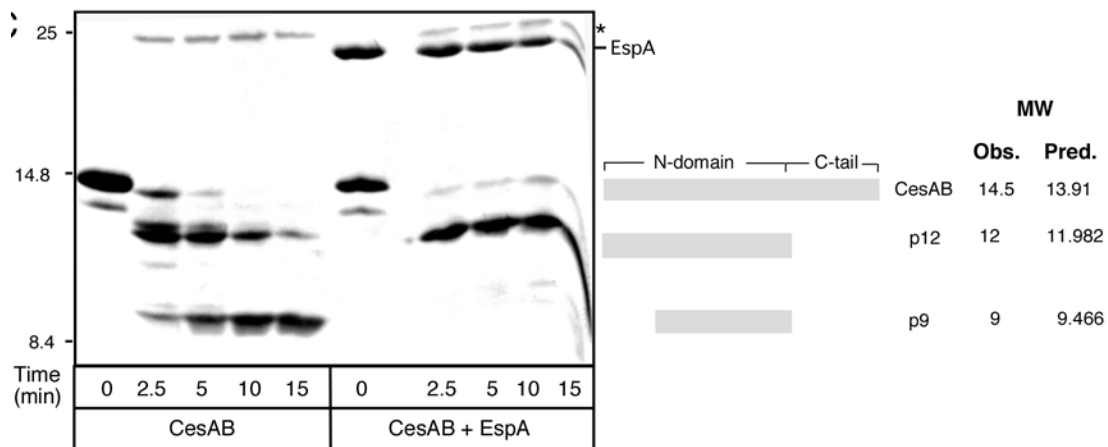
3. Πολλαπλοί ρόλοι της σαπερόνης CesAB κατά τη σταθεροποίηση, τη στόχευση στη μεμβράνη και τη μετατόπιση εκκρινόμενων πρωτεϊνών μέσω του T3S

Σε αντίθεση με την πλειονότητα των σαπερονών του συστήματος III, οι οποίες κωδικοποιούνται δίπλα ή πολύ κοντά με το υπόστρωμά τους, το γονίδιο *cesAB* εδράζει περίπου 25 κιλοβάσεις μπροστά από το γονίδιο *espA* στο πρώτο οπερόνιο της νησίδας των υπεύθυνων γονιδίων για την παθογένεση του EPEC (Locus of Enterocyte Effacement pathogenicity island). Ανάλυση επίσης της αμινοξικής αλληλουχίας δείχνει πως η πρωτεΐνη CesAB, εκτός από το γεγονός ότι είναι μικρή και κυτταροπλασματική, δεν μοιράζεται κανένα άλλο από τα κοινά χαρακτηριστικά των υπόλοιπων σαπερονών του συστήματος III^{52, 54}. Έτσι ενώ οι παραπάνω σαπερόνες γενικά είναι όξινες, η αλληλουχία της CesAB είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα με υπολογισμένο pI στο 9.5.

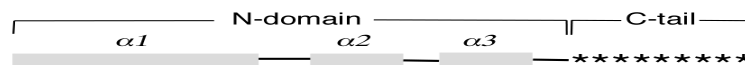
Επίσης με βάση την NMR και την κρυσταλλική δομή αλλά και τα βιοχημικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (μετρήσεις MALLS), η πρωτεΐνη CesAB προσδένει το μεταθέτη EspA σε αναλογία 1:1, ενώ όλες οι υπόλοιπες γνωστές σαπερόνες του συστήματος III προσδένονται με το συνδέτη τους σε μοριακή αναλογία 2:1. Είναι λοιπόν φανερό πως πρόκειται για μια ιδιαίτερη σαπερόνη του συστήματος III, ο ακριβής ρόλος της οποίας στη διαδικασία έκκρισης μέσω του T3S παραμένει άγνωστος. Πρέπει τέλος να σημειωθεί πως η CesAB έχει πολύ πρόσφατα χαρακτηριστεί ως η σαπερόνη και του μεταθέτη EspB⁸⁷. Επιπλέον λοιπόν πειράματα για να δειχθεί εάν η CesAB προσδένει με τον ίδιο τρόπο τους μεταθέτες EspA και EspB, αλλά κυρίως για το πώς ελέγχει η μικρή αυτή σαπερόνη την έκκριση και των δύο υποστρωμάτων της κρίθηκαν αναγκαία. Η ενότητα που ακολουθεί προσπαθεί ακριβώς να διαλευκάνει μερικά από τα παραπάνω ερωτήματα κεντρικής σημασίας για την έκκριση μέσω του συστήματος III.

3.1 Η CesAB σαπερόνη αποτελείται από δύο διακριτές υποπεριοχές

Στην προσπάθεια να κατανοήσουμε τη δομική οργάνωση και τη λειτουργική εξειδίκευση των περιοχών της πρωτεΐνης CesAB, προχωρήσαμε σε πειράματα περιορισμένης τρυψινόλυσης. Το τελικό τρυπτικό πρότυπο των πεπτιδίων αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 15 % πηκτή πολυακρυλαμίδης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1, η πρωτεΐνη CesAB μόνη της πολύ γρήγορα πρωτεολύθηκε σε ένα πεπτίδιο μοριακού βάρους 12 kDa (p12), ενώ ακολουθεί και δεύτερο κόψιμο, το οποίο οδηγεί σε ένα μικρότερο πεπτίδιο (p9). Αμινοτελική αλληλούχιση του πεπτιδίου p12 έδειξε πως αυτό περιέχει ακέραια την αμινοτελική περιοχή της CesAB (N-περιοχή) και επομένως του λείπει η καρβοξυ-τελική περιοχή (Ser86-Thr95; C-tail, C-ουρά). Το κόψιμο αυτό υπολογίστηκε να συμβαίνει είτε στην αργινίνη στη θέση 89 (Arg89) ή στη λυσίνη στην θέση 91 (Lys91). Όταν όμως ο μεταθέτης EspA ήταν σε σύμπλοκο με την CesAB, η δεύτερη αυτή θέση κοψίματος (Arg89 ή Lys91) δεν ήταν πλέον προσιτή στην πρωτεάση, όπως αποδεικνύεται από τη συσσώρευση του πεπτιδίου p12. Αυτά τα αποτελέσματα σε συνδυασμό και με τις δομικές αναλύσεις⁴², όπου η καρβοξυ-τελική περιοχή της CesAB δε διακρίνεται στον χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας (βλ. σχήμα 3.2), συνηγορούν στο ότι η καρβοξυτελική-ουρά της CesAB (C-tail) είναι ευκίνητη και η δομή της επηρεάζεται πιθανότατα από την παρουσία των υποστρωμάτων.



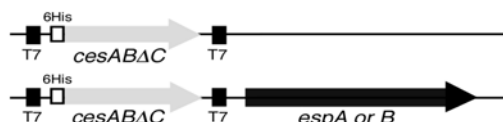
Σχήμα 3.1 : Αριστερά, περιορισμένη τρυψινόλυση της CesAB μόνη της ή σε σύμπλοκο με EspA. Περιορισμένη τρυψινόλυση (0.5 mg/ml τρυψίνης για τους αναγραφόμενους χρόνους επώασης) καθαρής CesAB και καθαρού CesAB/EspA συμπλόκου (1mg/ml) έγινε σε 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl και 2 mM DTT. Τα πρωτεολυμμένα πεπτιδία αναλύθηκαν με SDS-PAGE και με χρώση Coomassie blue. Δεξιά, αμινοτελική αλληλούχιση των πεπτιδίων p9 και p12. Καθαρή CesAB και σύμπλοκο επώαστηκαν με τρυψίνη (2.5 και 10 λεπτά για την CesAB και 12 λεπτά για το σύμπλοκο) και τα πολυπεπτιδία που προέκυψαν διαχωρίστηκαν σε SDS-PAGE, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη Problott, βάφτηκαν με διάλυμα Coomassie και τελικά αναλύθηκαν με αμινοτελική αλληλούχιση.



Σχήμα 3.2 : Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της CesAB, όπου α_{1-3} είναι οι τρεις αμινοτελικές έλικες και η C-ουρά (C-tail) είναι το άλντο κρυσταλλογραφικά καρβοξυ-τελικό άκρο (αα 86-95).

3.2 Η αμινο-τελική (N) περιοχή της CesAB μπορεί να προσδέσει είτε EspA είτε EspB

Για να μελετήσουμε το ρόλο τόσο της N-περιοχής όσο και της C-ουράς δημιουργήσαμε την CesABΔC, ένα παράγωγο της CesAB που δεν περιέχει την C-ουρά. Η CesABΔC πρωτεΐνη εκφράστηκε με ή χωρίς την EspA σε JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα (σχήμα 3.3) και η ικανότητα της να σχηματίζει τόσο το ομοδιμερές όσο και το ετεροδιμερές σύμπλοκο ελέγχθηκε πειραματικά.

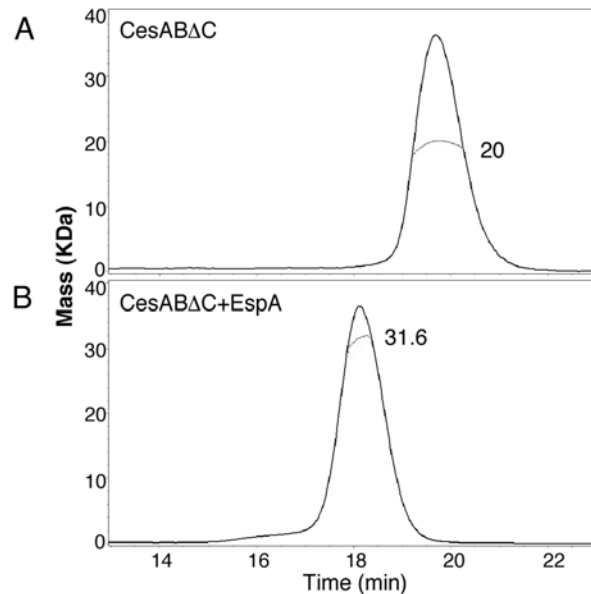


Σχήμα 3.3 : Το pET Duet-1 σύστημα για συνέκφραση δύο πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση αυτήν. Ο πλασμιδιακός φορέας μπορεί να εκφράζει τελικά είτε την CesAB μόνη της με επιπλέον 6 ιστιδίνες στο αμινοτελικό της άκρο (His-CesAB), είτε να συνεκφράζει την His-CesAB μαζί με την EspA.

Πειράματα MALLS (multi-angle laser light scattering) αποκάλυψαν πως η CesABΔC έχει μάζα 20 kDa (σχήμα 3.4, A) και είναι επομένως διμερής, όπως ακριβώς και η ολόκληρη πρωτεΐνη. Επίσης μετά από χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου, η His-CesABΔC συγκαθαρίστηκε με την EspA ως σύμπλοκο (σχήμα 2.5, πάνω, στήλη 6), η μάζα του οποίου μετρήθηκε στα 31.6 kDa (σχήμα 3.4, B). Η μάζα που μετρήθηκε ισοδυναμεί με μοριακή αναλογία σαπερόνης CesABΔC προς υπόστρωμα EspA 1:1

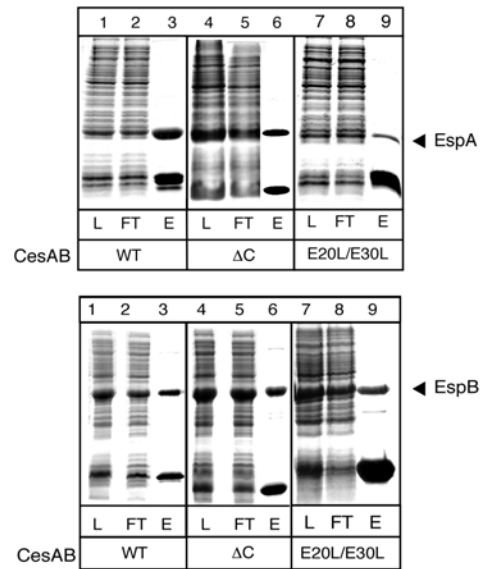
Επίσης εξετάστηκε η ικανότητα της CesAB και της CesABΔC να σχηματίζουν σύμπλοκο με το μεταθέτη EspB. Όπως προαναφέρθηκε ο μεταθέτης EspB είναι το δεύτερο υπόστρωμα της CesAB, καθώς η έκκρισή του εξαρτάται από την παρουσία της CesAB⁸⁷. Τόσο η CesAB (σχήμα 3.5, κάτω, στήλη 3), όσο και η CesABΔC (σχήμα 3.5, κάτω, στήλη 6), μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκο με τον μεταθέτη. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως η N-περιοχή της CesAB είναι αναγκαία και ικανή για την πρόσδεση τόσο με τον EspA όσο και με τον EspB μεταθέτη. Είναι ασφαλές να οδηγηθεί κανείς στο συμπέρασμα πως η N-περιοχή της CesAB είναι αυτή που λειτουργεί ως

σαπερόνη, αποφέροντας την ενδοκυτταρική σταθεροποίηση του EspA μεταθέτη, προτού αυτός εκκριθεί.



Σχήμα 3.4 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης CesABΔC μόνη της (A) ή σε σύμπλοκο με EspA (B). Φαίνεται το χρωματογραφικό ίχνος από τον ανιχνευτή του UV (συνεχής γραμμή), όπως επίσης διακρίνονται και οι μετρήσεις μάζας (από τον ανιχνευτή 11 του οργάνου Dawn-EOS) από διαδοχικά τμήματα του χρωματογραφικού μέγιστου (κόκκινες τελείες). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που φορτώθηκε ήταν 5 mg/ml. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έγινε σε Superdex 200 HR10/30 κολώνα, προεξισορροπημένη με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 0.3 M NaCl και με ταχύτητα ροής 0.8 ml/min

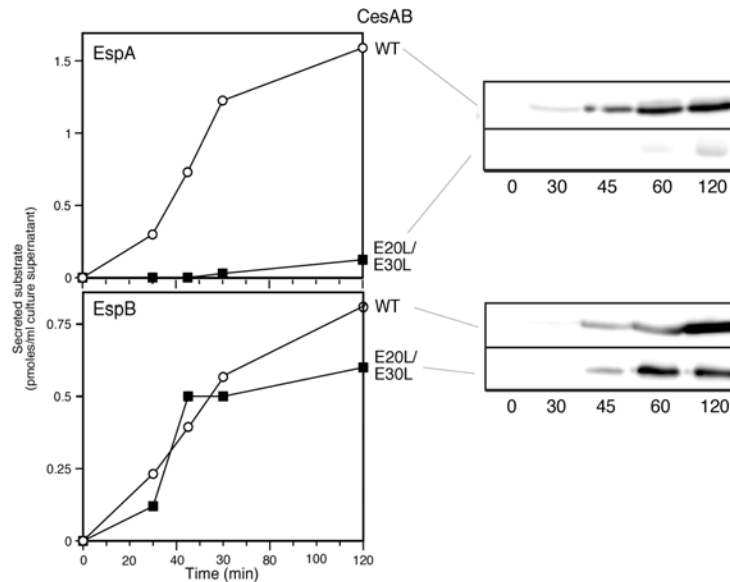
Για να αναλύσουμε περαιτέρω το ρόλο της N-περιοχής στην πρόσδεση των υποστρωμάτων EspA και EspB, δημιουργήσαμε το μεταλλαγμένο παράγωγο CesAB(E20L/E30L). Όπως αναλύθηκε εκτενώς στο κεφάλαιο 2.7, το γλουταμινικό οξύ στη θέση 20 και στη θέση 30 βρίσκονται στην N-περιοχή της CesAB, ενώ από την δομή έχει προβλεφθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και πρόσδεση του υποστρώματος. Πράγματι το μεταλλαγμένο παράγωγο CesAB(E20L/E30L) δεν μπορεί να προσδέσει ικανοποιητικά EspA (σχήμα 3.5, πάνω, στήλη 9) και EspB (σχήμα 2.19, κάτω, στήλη 9).



Σχήμα 3.5 : *Ex vivo* συνέκφραση και συγκαθαρισμός είτε της CesAB, είτε της CesABΔC ή της CesAB(E20L/E30L) με το μεταθέτη EspA και EspB. JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα μετασχηματίστηκαν με πλασμιδιακούς φορείς που έφεραν τα γονίδια *his-cesAB* (WT, ΔC ή E20L/E30L) και *espA* ή *espB*. Το βακτηριακό εκχύλισμα φορτώθηκε σε ρητίνη χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA και το υλικό έκλυσης εξετάστηκε για την παρουσία και των δύο πρωτεϊνών, μετά από SDS-PAGE και χρώση με Coomassie blue. L : υλικό φορτώματος στη ρητίνη, FT : υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη και EL : υλικό έκλυσης.

3.3 Σημειακές μεταλλάξεις στην N-περιοχή επηρεάζουν *in vivo* την έκκριση της EspA αλλά όχι της EspB

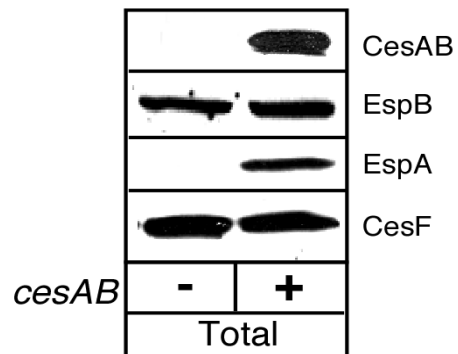
Προκειμένου να διερευνήσουμε τις λειτουργικές συνέπειες των σημειακών μεταλλάξεων στην N-περιοχή, καταγράψαμε την έκκριση *in vivo*, του EspA και του EspB, παρουσία της αγρίου τύπου CesAB ή του διπλού μεταλλάγματος (E20L/E30L). Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε ένα στέλεχος του EPEC το οποίο δεν περιέχει CesAB (EPECΔCesAB) και επομένως δεν μπορεί να εκκρίνει EspA και EspB⁸⁷, αλλά η σύνθεση της CesAB πρωτεΐνης προέρχεται *in trans* από έναν πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει είτε *cesAB* είτε *cesAB(E20L/E30L)*.



Σχήμα 3.6 : Έκκριση *in vivo* του EspA και του EspB από EPECΔCesAB βακτήρια που περιέχουν pASK-IBA7 plus πλασμιδιακούς φορείς και μπορούν να εκφράζουν είτε την CesAB είτε την CesAB(E20L/E30L), κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου υποκινητή από τετρακυκλίνη. Σε βακτηριακές καλλιέργειες με OD = 0.3 στα 550 nm, προστίθεται αρχικά άνυδρη τετρακυκλίνη (0.2 mg/l). 30 ml καλλιέργειας αφαιρούνται μετά από 30, 45, 60, 120 και/ή 180 λεπτά επαγωγής με τετρακυκλίνη. Τα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση και τα εκκρινόμενα πολυπεπίδια στο θρεπτικό μέσο κατακρημνίζονται με τριχλωρο-οξικό οξύ (TCA, 20% w/v), αναλύονται με SDS-PAGE και τελικά ανιχνεύονται με α -EspA και α -EspB αντισώματα. Σε κάθε στήλη που παρουσιάζεται στο σχήμα έχουν αναλυθεί πρωτεΐνες που προέρχονται από τον ίδιο αριθμό κυττάρων (η κανονικοποίηση ορίστηκε για OD = 0.3). Μια αντιπροσωπευτική πηκτή ακρυλαμίδης φαίνεται στα δεξιά της εικόνας, ενώ οι αντίστοιχες τιμές καταρτήθηκαν στο σχεδιάγραμμα αριστερά.

Όπως παρατηρούμε στο σχήμα 3.6, η αγρίου τύπου CesAB μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως την ενδογενή πρωτεΐνη στο EPECΔCesAB στέλεχος για την έκκριση του EspA και EspB. Αντίθετα, η ικανότητα του διπλού μεταλλάγματος (E20L/E30L) να εκκρίνει EspA μειώθηκε δραματικά, περίπου κατά 90% σε σχέση με την αντίστοιχη της αγρίου τύπου πρωτεΐνης. Με έκπληξη όμως παρατηρήσαμε, πως σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με την έκκριση του EspA, ο μεταθέτης EspB εκκρίνεται σχεδόν απρόσκοπτα ακόμα και παρουσία της CesAB(E20L/E30L). Πρέπει επίσης στο σημείο αυτό να τονιστεί πως ο μεταθέτης EspB παραμένει σταθερός στο κυτταρόπλασμα ακόμη και όταν η CesAB απουσιάζει (σχήμα 3.7), σε αντίθεση με τον EspA. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν πως ενώ η EspB προσδένεται στην CesAB, *in vivo* δεν χρησιμοποιεί την CesAB ως σαπερόνη για σταθεροποίηση. Σε αντίθεση, η N-περιοχή της CesAB είναι απόλυτα κρίσιμη για τη σταθεροποίηση της EspA ενδοκυτταρικά.

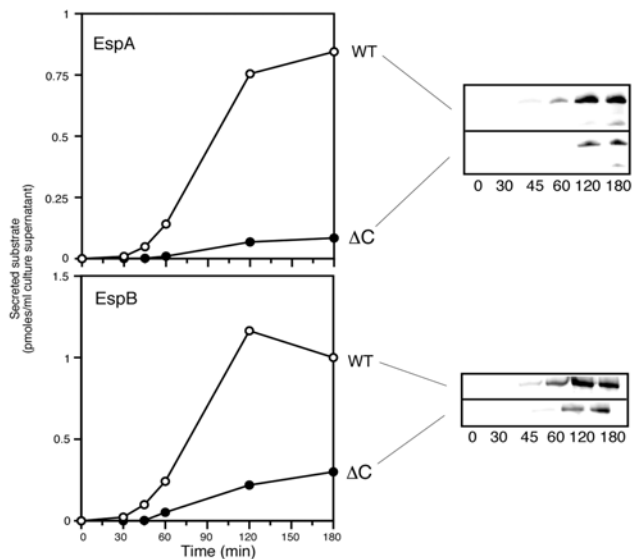
Σχήμα 3.7 : Ολόκληρα κύτταρα από EPECΔCesAB βακτήρια, τα οποία εκφράζουν ή όχι CesAB, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας α CesAB, α EspA, α EspB και α CesF αντισώματα, για την ύπαρξη των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Η CesF είναι μια ακόμη σαπερόνη του T3S



3.4 Η έλλειψη της ακραίας καρβοξυ-τελικής περιοχής μειώνει δραματικά τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης CesAB

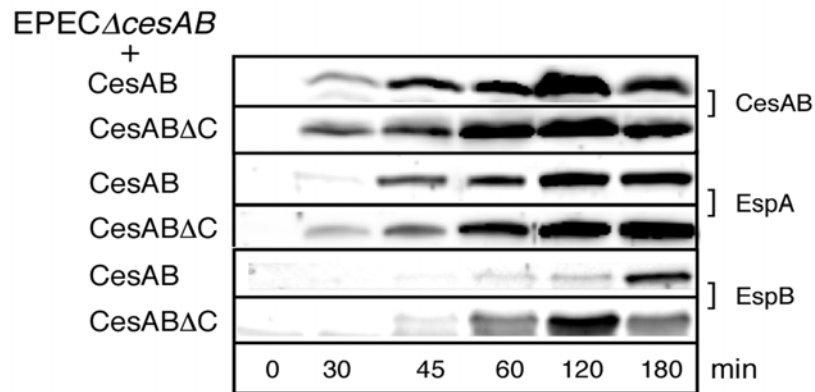
Με τα παραπάνω πειράματα διερευνήσαμε την ικανότητα της CesAB να προσδέσει EspA μέσω της N-περιοχής της. Το ερώτημα όμως που προκύπτει είναι : Μπορεί η πρόσδεση με το υπόστρωμα να διασφαλίσει και την έκκρισή του ή είναι και η C-ουρά επίσης σημαντική; Για να απαντήσουμε στο παραπάνω ερώτημα εξετάσαμε την ικανότητα της CesAB, αλλά και του ελλείματος (CesABΔC) να εκκρίνουν *in vivo* είτε EspA είτε EspB.

Σχήμα 3.8 : Έκκριση *in vivo* του EspA και του EspB από EPECΔCesAB βακτήρια που περιέχουν pASK-IBA7 plus πλασμιδιακούς φορείς και μπορούν να εκφράζουν είτε την CesAB είτε την CesABΔC, μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη . Το πείραμα αναλύεται στο σχήμα 2.20.



Ακριβώς όπως και στην προηγούμενη ενότητα (κεφ. 3.3), η CesAB αγρίου τύπου πρωτεΐνη εκφρασμένη από τον κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα, μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως την ενδογενή CesAB στο EPECΔcesAB στέλεχος. Αντίθετα, η ικανότητα της CesABΔC για έκκριση και των δύο EspA και EspB μειώνεται δραματικά (κατά 90% περίπου), όταν αυτή υποκαθιστά την ενδογενή CesAB (σχήμα 3.8). Για να αποκλειστεί η περίπτωση όπου ο φαινότυπος οφείλεται σε προβληματική έκφραση ή

αστάθεια των παραγόμενων από τα πλασμίδια πρωτεϊνών, τα επίπεδα έκφρασης των εν λόγω πρωτεϊνών ελέγχθηκαν και βρέθηκαν να είναι συγκρίσιμα (σχήμα 3.9). Στην ίδια εικόνα, ανιχνεύοντας τα επίπεδα στο κύτταρο EspA και EspB, διακρίνουμε το προβληματικό στέλεχος να συσσωρεύει ενδοκυτταρικά και τις δύο πρωτεΐνες.



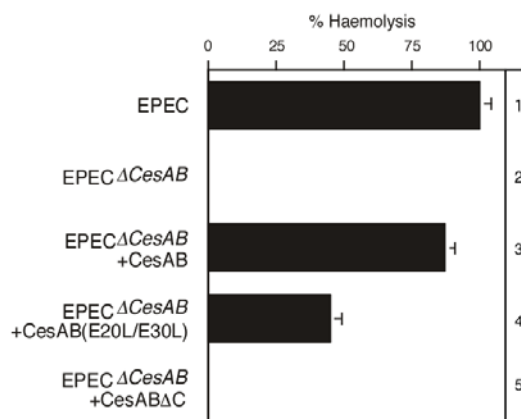
Σχήμα 3.9 : Ενδοκυτταρικά επίπεδα της CesAB, EspA και EspB από EPECΔCesAB βακτήρια, τα οποία εκφράζουν είτε CesAB είτε CesABΔC, μετά την επαγωγή τους με τετρακυκλίνη. Παράλληλα με τα εκκρινόμενα πολυπεπτίδια, καταγράψαμε και τα ενδοκυτταρικά ποσά της CesAB, EspA και EspB με SDS-PAGE και ανίχνευση με τα συγκεκριμένα αντισώματα, στους διάφορους χρόνους του πειράματος. Σε κάθε στήλη αναλύθηκαν πρωτεΐνες που προέρχονταν από τον ίδιο αριθμό κυττάρων (μετά από κανονικοποίηση σε OD = 0.3 στα 550 nm).

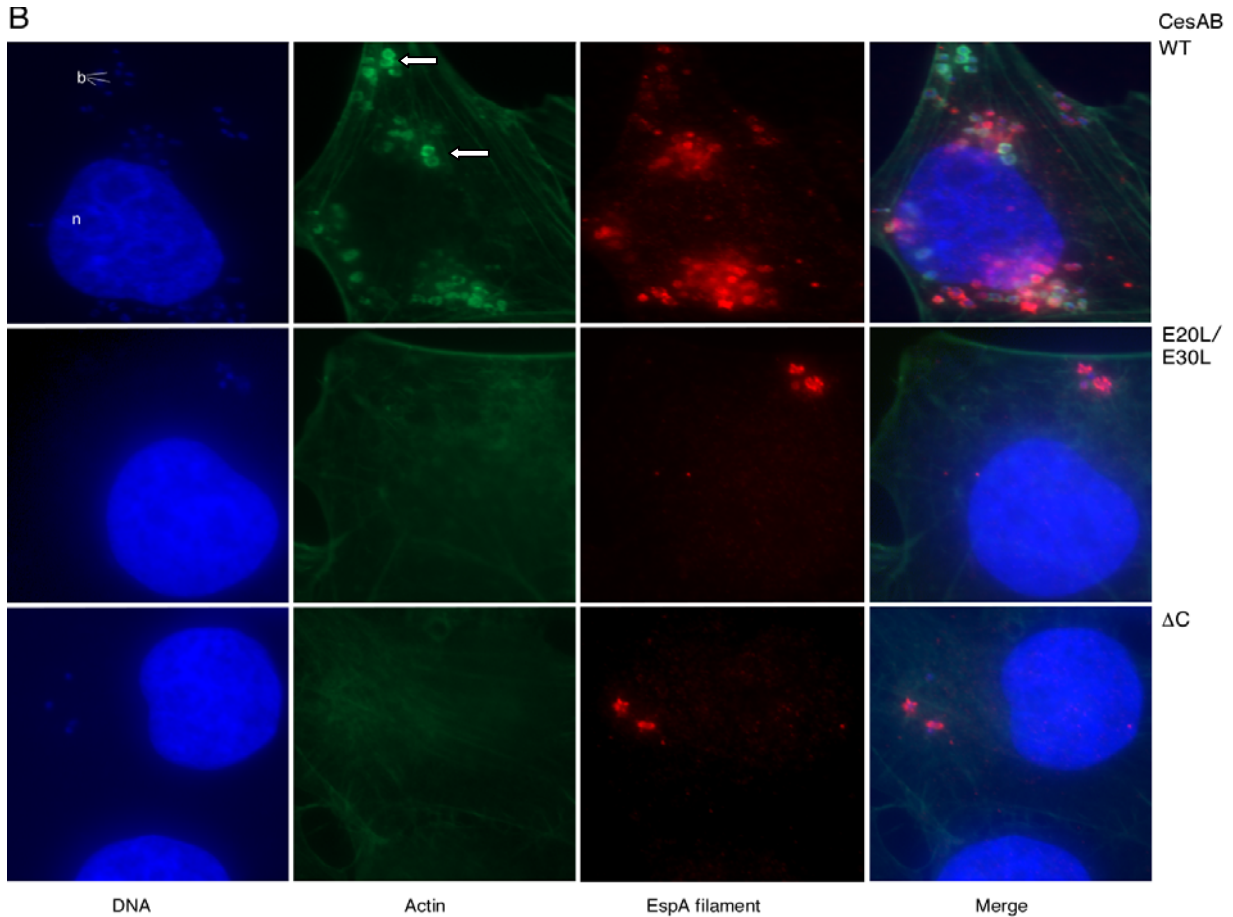
Το γεγονός πως το έλλειμμα της καρβοξυ-τελικής ουράς, οδηγεί τελικά σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη, αποτελεί σοβαρή ένδειξη πως η C-ουρά της CesAB εμπλέκεται ενεργά στην ίδια τη διαδικασία της έκκρισης και των δύο υποστρωμάτων της.

3.5 Μελέτη της παθογένεσης EPEC στελεχών με την βοήθεια κυτταρικών μοντέλων

Για να εξετάσουμε σε ένα πιο φυσιολογικό περιβάλλον το λειτουργικό ρόλο της N-περιοχής αλλά και της C-ουράς της CesAB, εξετάσαμε την παθογένεση από στελέχη EPEC χρησιμοποιώντας κυτταρικά μοντέλα *ex vivo*. Ως μοντέλα επιλέξαμε ερυθροκύτταρα και κύτταρα HeLa. Αρχικά, αγρίου τύπου EPEC και τα παράγωγά του επωάστηκαν με μονοστοιβάδες ερυθροκυτταρων για 4 ώρες στους 37⁰ C (σχήμα 3.10)⁵¹. Η αιμόλυση έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης, η οποία ανιχνεύεται φωτομετρικά (απορρόφηση στα 543nm). Σε αυτήν τη πειραματική δοκιμή, το αγρίου τύπου EPEC είναι υψηλά αιμολυτικό (στήλη 1) ενώ το ΔCesAB παράγωγό του δεν είναι (στήλη 2). Το EPECΔCesAB στέλεχος που εκφράζει CesAB από πλασμιδιακό φορέα, είναι το ίδιο αιμολυτικό με το αγρίου τύπου EPEC (στήλη 3). Στο ίδιο ακριβώς πείραμα φαίνεται πως παρουσία του διπλού μεταλλάγματος της CesAB, το βακτήριο ανακτά περίπου το 40% της αιμολυτικής δραστηριότητας του αντίστοιχου αγρίου τύπου (στήλη 4), ενώ όταν εκφράζεται το έλλειμα (CesABΔC) τότε το EPECΔCesAB στέλεχος είναι μη-αιμολυτικό (στήλη 5).

Σχήμα 3.10 : Επιμόλυνση ερυθροκυττάρων από στελέχη EPEC. Ερυθροκύτταρα επιμολύνθηκαν με EPEC αγρίου τύπου ή με EPECΔCesAB που εκφράζει CesAB, CesABΔC ή CesAB(E20L/E30L) για 4 ώρες στους 37⁰ C. Η αιμοσφαιρίνη που απελευθερώθηκε από τα λυμένα κύτταρα ανιχνεύτηκε με απορρόφηση στα 543 nm. Τα αποτελέσματα στο παραπάνω διάγραμμα είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Errors given are the standard deviations.





Σχήμα 3.11 : Επιμόλυνση κυττάρων HeLa από στελέχη EPEC. Κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με EPEC αγρίου τύπου ή με EPECΔCesAB που εκφράζει CesAB, CesABΔC ή CesAB(E20L/E30L) και με την τεχνική της φθορίζουσας ακτίνης (FAS : Fluorescent-Actin Staining) ελέγχθηκε η ικανότητα των παραπάνω στελεχών να σχηματίζουν A/E κακώσεις (lesions). Ο χαρακτηριστικός σχηματισμός από την συγκεντρωμένη ακτίνη (πράσινοι κύκλοι) ακριβώς κάτω από το βακτήριο φαίνεται με τα άσπρα βέλη. Τα ινίδια της EspA ανιχνεύτηκαν στην επιφάνεια των προσκολλημένων βακτηρίων με αντίσωμα αEspA και φθορισμό. b : βακτήρια και n : πυρήνας.

Σημαντική για τη μολυσματική ικανότητα του EPEC είναι η ικανότητά του να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο και να προκαλεί μια εντυπωσιακή κάκωση (attaching and effacing, A/E, lesion) της εντερικής μεμβράνης. Η κάκωση αυτή χαρακτηρίζεται από την τοπική καταστροφή των μικρολαχνών του εντέρου, τη στενή επαφή του βακτηρίου στην ακραία μεμβράνη των κυττάρων του εντέρου, συχνά πάνω σε μια χαρακτηριστική προεκβολή, και τον πολυμερισμό της ακτίνης, όπως και άλλων κυτταροσκελετικών ινιδίων, ακριβώς κάτω από τα προσκολλημένα βακτήρια. Η

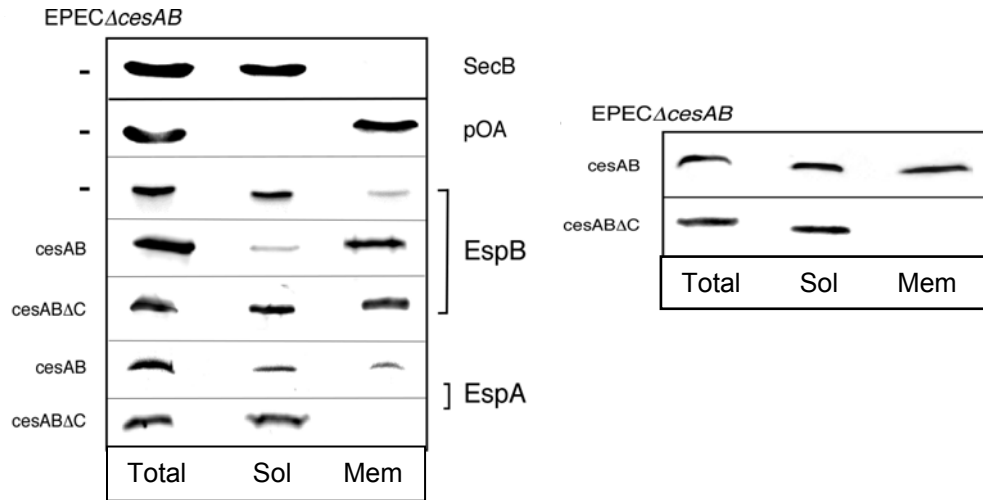
συγκέντρωση της ακτίνης τοπικά στο σημείο της A/E κάκωσης έχει αποτελέσει τη βάση μιας απλής, αλλά ιδιαίτερα ευαίσθητης, διαγνωστικής δοκιμής για EPEC (δοκιμή της φθορίζουσας ακτίνης, FAS, Fluorescent-Actin Stainig)⁹⁷, η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε διάφορες κυτταρικές σειρές¹⁰⁵. Στη δική μας περίπτωση, κύτταρα HeLa μολύνθηκαν με το αγρίου τύπου στέλεχος και η πολυμερισμένη ακτίνη ανιχνεύτηκε με φθορισμό (πράσινο χρώμα στο σχήμα 3.11), ενώ τα ινίδια της EspA ανιχνεύθηκαν με ανοσο-φθορισμό (κόκκινο χρώμα στο σχήμα 3.11). Σε αυτή την εικόνα παρατηρούμε πως τα αγρίου τύπου βακτήρια που εκφράζουν ινίδια EspA, προσκολλώνται στη μεμβράνη των HeLa και σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές μικρο-αποικίες. Τα προσκολλημένα βακτήρια επάγουν τη συσσώρευση ακτίνης τοπικά, ακριβώς από κάτω τους (άσπρα βέλη). Όταν όμως τα EPEC στελέχη εκφράζουν είτε CesAB(E20L/E30L) είτε CesABΔC, μόνο ελάχιστα βακτήρια κατορθώνουν τελικά να προσκολληθούν στη μεμβράνη των HeLa κυττάρων (περίπου 4 βακτήρια/κύτταρο HeLa). Τα βακτήρια αυτά μπορούσαν να σχηματίσουν EspA ινίδια, αλλά κανένα από αυτά δεν ήταν θετικό στη δοκιμή της φθορίζουσας ακτίνης (FAS αρνητικά στελέχη) και επομένως δεν ήταν ικανά από μόνα τους να προκαλέσουν τη χαρακτηριστική κάκωση.

3.6 Η καρβοξυ-τελική περιοχή είναι αναγκαία για τη στόχευση στη μεμβράνη των μεταθετών EspA και EspB

Από τα παραπάνω δεδομένα αποκαλύφθηκε με σαφήνεια η σπουδαιότητα της C-ουράς της CesAB για τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Στα κεφάλαια που ακολουθούν γίνεται προσπάθεια να διαλευκανθεί η αιτία, η οποία καθιστά τη λειτουργία της C-ουράς απαραίτητη για την πρωτεϊνική έκκριση.

Για να επιληφθούμε του παραπάνω προβλήματος, έγιναν πειράματα εντοπισμού σε υποκυτταρικά διαμερίσματα της EspA και EspB, αλλά και της CesAB. Σε αυτά τα πειράματα η πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης OmpA εντοπίζεται αποκλειστικά στο μεμβρανικό διαμέρισμα του κυττάρου, ενώ η κυτταροπλασματική σαπερόνη SecB βρίσκεται αποκλειστικά στο διαλυτό (εικόνα 3.12). Στα ίδια κύτταρα EPEC, παρουσία της CesAB, η πλειοψηφία της ενδοκυτταρικής EspA και EspB βρίσκονται συνδεδεμένες

με το μεμβρανικό τμήμα του κυττάρου. Σε αντίθεση, όταν απουσιάζει η CesAB, η συντριπτική πλειοψηφία της EspB μετακινείται προς το κυτταροπλασματικό διαμέρισμα. Επίσης όταν η C-ουρά απαλείφεται από την CesAB, και τα δύο υποστρώματα εντοπίζονται ξανά στο κυτταρόπλασμα.



Σχήμα 3.12 : Υπο-κυτταρική διαμερισματοποίηση για εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo*. Βακτηριακές καλλιέργειες του στελέχους EPECΔCesAB το οποίο εκφράζει είτε CesAB είτε CesABΔC, συλλέχθηκαν, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και τελικά ηχοβολήθηκαν. Μετά από υπερφυγοκέντρηση, διαχωρίστηκαν οι διαλυτές πρωτεΐνες (sol) από τις μεμβρανικές (mem, συνολικά ενσωματωμένες και περιφερικά συνδεδεμένες στην μεμβράνη), ενώ οι πρωτεΐνες SecB και OmpA χρησιμοποιήθηκαν ως διαλυτοί και μεμβρανικοί πρωτεϊνικοί μάρτυρες αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με α -CesAB, α -EspB, α -EspA, α -SecB και α -OmpA αντίσωμα.

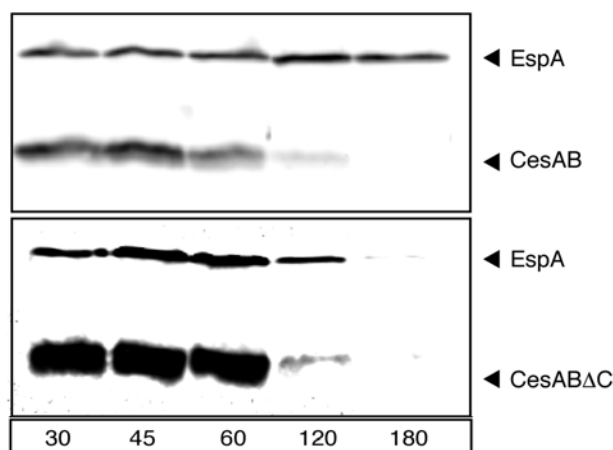
Το πείραμα υπο-κυτταρικού εντοπισμού σε EPEC αγρίου τύπου, έδειξε πως περίπου το 20% της κυτταρικής CesAB εντοπίζεται στη μεμβράνη. Η CesABΔC, στις ίδιες συνθήκες, παραμένει αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα (σχήμα 2.26).

Το γεγονός ότι παρατηρούνται τέτοιες σημαντικές διαφοροποιήσεις στον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών που εξετάστηκαν, υποδηλώνει πως η C-ουρά παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη στόχευση των υποστρωμάτων προς τη μεμβράνη για την τελική τους έκκριση διαμέσω του μεμβρανικού συστήματος III.

3.7 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA με εγγενή ηλεκτροφόρηση

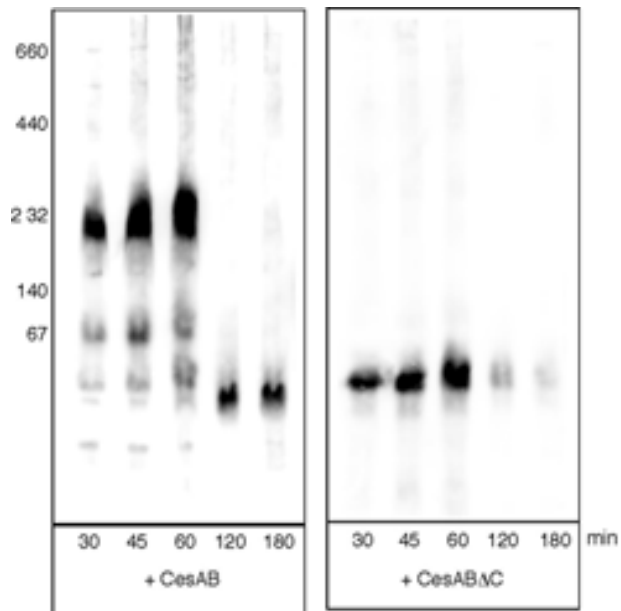
Κατά τη διάρκεια της έκκρισης μιας πρωτεΐνης μέσω του T3S, αυτή είναι δυνατόν να αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες μέχρι την τελική της έξοδο από το κύτταρο. Προκειμένου λοιπόν να παρακολουθήσουμε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του υποστρώματος EspA, ως αποτέλεσμα του χρόνου, αναπτύξαμε μια απλή, αλλά ιδιαίτερα χρήσιμη πειραματική δοκιμή, την ήπια λύση των κυττάρων. Μεγάλο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής θεωρήθηκε το γεγονός, πως ο ήπιος τρόπος διάρρηξης του βακτηριακού κυττάρου απελευθερώνει επιλεκτικά πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων είναι η CesAB και η EspA.

Στη δοκιμή αυτή, βακτήρια EPECΔCesAB, τα οποία εκφράζουν CesAB ή CesABΔC, διαρρηγνύονται ήπια με επαναλαμβανόμενους κύκλους παγώματος και ξεπαγώματος (5 κύκλοι). Μετά από υπερφυγοκέντρηση των διαρρηγμένων κυττάρων, τόσο η CesAB όσο και η EspA απελευθερώνονται επαρκώς στη διαλυτή φάση, κατά τη διάρκεια του πειράματος (σχήμα 3.13). Όπως παρατηρούμε στο σχήμα, στα πρώτα λεπτά του πειράματος (30-60), τόσο η CesAB όσο και η EspA ανιχνεύονται ικανοποιητικά. Αργότερα όμως η CesAB (η ολόκληρη και το έλλειμα), δεν ανιχνεύονται πια, χωρίς να ισχύει όμως το ίδιο και με την EspA. Πιο συγκεκριμένα, όταν εκφράζεται η ολόκληρη CesAB, η EspA ανιχνεύεται ακόμα και μετά από 180 λεπτά, όταν όμως λείπει η C-ουρά, η κατανομή της EspA ακολουθεί αυτήν της CesAB, ως αποτέλεσμα του χρόνου.



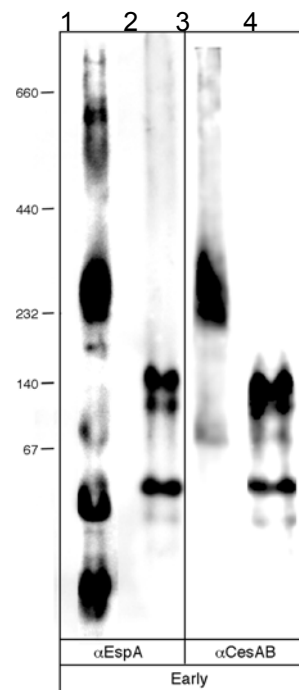
Σχήμα 3.13 : Ήπια λύση των κυττάρων. EPECΔCesAB βακτήρια, τα οποία εκφράζουν CesAB ή CesABΔC για 30, 45, 60, 120 και 180 λεπτά, συλλέχθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Μετά από τη διάρρηξη των κυττάρων με 5 κύκλους παγώματος-ξεπαγώματος και υπερφυγοκέντρηση (100.000 g/ 30 λεπτά/ 4⁰ C), η διαλυτή φάση αναλύθηκε με SDS-PAGE και ανοσοανίχνευση των ζωνών έγινε με α-CesAB και α-EspA

Επιδιώκοντας να χαρακτηρίσουμε επιπλέον το υπο-κυτταρικό αυτό κλάσμα που προέκυψε από την ήπια λύση, αναλύσαμε τα ακριβώς ανάλογα δείγματα σε συνθήκες μη αποδιακτικές, ώστε να παρακολουθήσουμε τα πιθανά εγγενή σύμπλοκα της EspA. Όπως διακρίνουμε στο σχήμα 3.14, παρουσία ολόκληρης της CesAB, η πλειονότητα της EspA εντοπίζεται σε ένα μεγαλομοριακό σύμπλοκο κοντά στα 232 KDa. Όταν όμως λείπει η C-ουρά το σύμπλοκο αυτό δεν πρόκειται ποτέ να σχηματιστεί. Το σύμπλοκο αυτό και το μικρότερό του (γύρω στα 67 kDa) περιέχουν επίσης και CesAB (σχήμα 3.15). Φαίνεται λοιπόν ότι η μικρή αυτή καρβοξυ-τελική περιοχή παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία ενός εκκριτικού ενδιάμεσου, καθώς όταν απουσιάζει, το ενδιάμεσο αυτό δε σχηματίζεται και η έκκριση δεν ολοκληρώνεται.



Σχήμα 3.14 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν όπως ακριβώς και στο σχήμα 2.26, αλλά η διαλυτή φάση αυτή τη φορά αναλύθηκε με μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 7% πηκτή πολυακρυλαμίδης και οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύτηκαν με αντίσωμα α-EspA.

Σχήμα 3.15 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση. Κύτταρα, τα οποία εκφράζουν CesAB μόνο για 30 λεπτά, λύθηκαν με διαδοχικό πάγωμα-ξεπάγωμα (βλ. παραπάνω) και η διαλυτή φάση αναλύθηκε με εγγενή ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση με α-EspA (στήλες 1 και 2) και α-CesAB (στήλες 3 και 4). Στήλη 2 και 4 : 0.5 μg καθαρού συμπλόκου His-CesAB/EspA



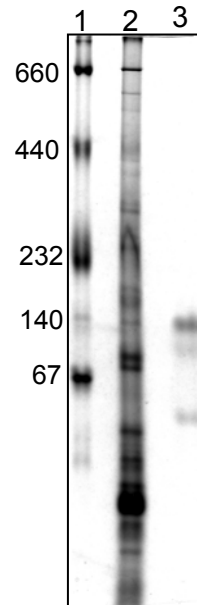
3.8 Ανάλυση των τεταρτοταγών συμπλόκων του μεταθέτη EspA με φασματομετρία μάζας (Mass spectroscopy)

Το μεγαλομοριακό σύμπλοκο των 232 KDa, με βάση τα δεδομένα της προηγούμενης ενότητας, περιέχει εκτός από EspA και CesAB, πιθανότατα και ένα ή περισσότερους παράγοντες. Αυτό συμπεραίνεται από την αλλαγή του μοριακού βάρους του His CesAB/EspA συμπλόκου (περίπου 140 KDa, το μεγαλύτερο είδος) σε σχέση με το σύμπλοκο των 232 KDa σύμπλοκο που παρατηρήσαμε στο κύτταρο. Πέρα όμως από το συγκεκριμένο 232 KDa σύμπλοκο, και οι επιπλέον μορφές της EspA, που ανιχνεύονται με το α EspA αντίσωμα, είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν ενδοκυτταρικές καταστάσεις του μορίου πριν από την έκκριση. Εναλλακτικά μπορεί να πρόκειται για διαχωρισμένα μόρια λόγω της τεχνικής.

Κρίθηκε λοιπόν αναγκαία η ανάλυση των παραπάνω συμπλόκων (ή μη) της EspA με φασματοσκοπία μάζας, ώστε να ταυτοποιηθούν πρωτεΐνες που πιθανότατα αλληλεπιδρούν με αυτήν.

Κατά την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διατριβής, δείγματα που προήλθαν από ήπια λύση των κυττάρων αναλύθηκαν με μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, ώστε να κοπούν τελικά οι πρωτεϊνικές ζώνες από την πηκτή και να σταλούν για ταυτοποίηση με φασματοσκοπία μάζας (σχήμα 3.16). Από την εικόνα αυτή επίσης παρατηρούμε πως το ομοιογενές χρωματογραφικά και σταθερό σύμπλοκο CesAB/EspA, κατά τη διάρκεια της ανάλυσής του με μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, ανιχνεύεται σε τρεις διαφορετικές ζώνες (όπως επιβεβαιώνεται με α -EspA και α -CesAB αντίσωμα, βλ. σχήμα 3.15). Και οι ζώνες αυτές αποκόπηκαν από την πηκτή και στάλθηκαν για ανάλυση με φασματοσκοπία μάζας.

Σχήμα 3.16 : Εγγενής ηλεκτροφόρηση (Native – PAGE) δειγμάτων μετά από ήπια κυτταρική λύση. Όπως ακριβώς και στο σχήμα 3 με τη διαφορά πως η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με χρώση Blue Silver. Στήλη 3 : 2.5 μg καθαρού συμπλόκου CesAB/EspA.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. Χαρακτηρισμός της EscN ATPάσης

4.1 EscN και παράγωγες DNA πλασμιδιακές κατασκευές

Στην ενότητα που ακολουθεί χρησιμοποιήθηκε η EscN πρωτεΐνη και το χιμαιρικό παράγωγο αυτής, η GFP-EscN, προκειμένου να απομονωθούν σε καθαρή μορφή και να χαρακτηριστούν βιοχημικά.

Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης των παραπάνω πρωτεϊνών προσθέτουν στις πρωτεΐνες τον επίτοπο των 6 ιστιδινών, ώστε να γίνεται εφικτός ο καθαρισμός τους με χρωματογραφία συγγένειας Ni^{2+} -NTA. Επιπρόσθετα η EscN πρωτεΐνη φέρει αμινοτελικά, μεταξύ των 6 ιστιδινών και του N-τελικού άκρου της και την αλληλουχία αναγνώρισης της TEV πρωτεάσης, ώστε να προκύπτει τελικά η His-TEV-EscN πρωτεΐνη.

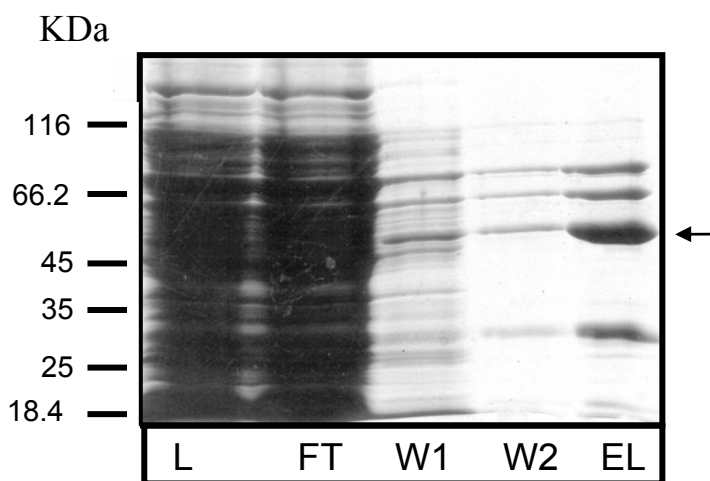
4.2 Έκφραση και απομόνωση του μονομερούς της EscN πρωτεΐνης

Πριν από την απομόνωση της EscN πρωτεΐνης, προηγείται ο μετασχηματισμός του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους με τον πλασμιδιακό φορέα, ο οποίος φέρει το εν λόγω γονίδιο. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν JM109(DE3)/pLysS βακτηριακά κύτταρα. Η αύξηση των κυττάρων έγινε στους 30⁰ C μέχρι η οπτική πυκνότητα της βακτηριακής καλλιέργειας (OD₅₅₀) να φτάσει στο 0.3, εν συνεχεία η θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων μειώθηκε στους 18⁰ C και όταν τελικά η θερμοκρασία της καλλιέργειας εξισορροπήθηκε με την θερμοκρασία περιβάλλοντος, έγινε επαγωγή της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου με 0.05 mM IPTG (για 12 ώρες συνολικά). Μόνο εφόσον χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω αυστηρές συνθήκες έκφρασης (ακραία θερμοκρασία και ελάχιστη ποσότητα του επαγωγέα), κατορθώσαμε να απομονώσουμε την EscN πρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή.

Η απομόνωση της EscN πρωτεΐνης είναι μια εκτενής διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια χρωματογραφίας :

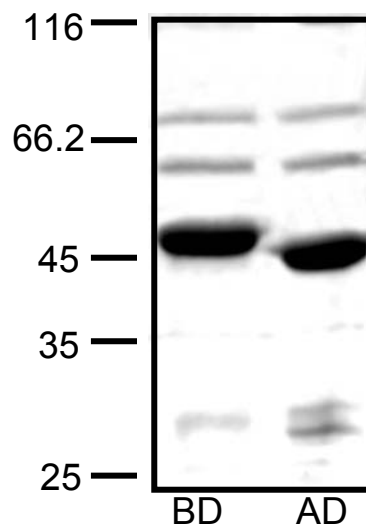
1. Χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου
2. Πρωτεόλυση της His-TEV-EscN πρωτεΐνης μετά από επώαση με τη His-TEV πρωτεάση
3. Αρνητική χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου
4. Αρνητική χρωματογραφία σε ρητίνη Q (Q Sepharose)

Πιο αναλυτικά, στο σχήμα 4.1 παρουσιάζονται τα στάδια καθαρισμού της πρωτεΐνης πάνω σε ρητίνη Ni^{2+} -NTA. Όπως παρατηρούμε, το αποτέλεσμα των διαδοχικών και εκτενών εκπλύσεων της ρητίνης με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (W1 και W2), για την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών επιμολύνσεων, δεν είχε το επιθυμητό αποτέλεσμα. Και αυτό γιατί η πρωτεΐνη συνεκλύεται τελικά από την ρητίνη με τρεις κύριες επιμολύνσεις, δύο εκ των οποίων είναι μεγαλύτερου μοριακού βάρους και μία είναι μικρότερη (περίπου 25 KDa).



Σχήμα 4.1 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (πρώτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. L : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε την ρητίνη, W1 και W2 : δείγματα από τα στάδια εκπλύσεων, EL : δείγμα από το υλικό έκλουσης (← His-TEV-EscN).

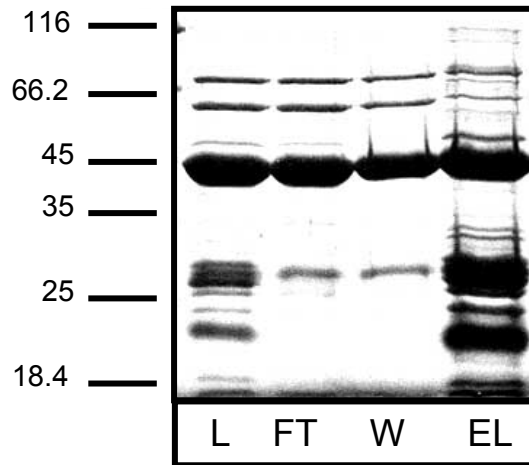
Στο δεύτερο βήμα καθαρισμού, η πρωτεΐνη, όπως εκλούστηκε από τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, επώαστηκε με τη His-TEV πρωτεάση. Η επώαση έγινε στους 4⁰ C και η δράση της πρωτεάσης ελέγχθηκε σε 10% αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης κάθε έξι ώρες. Η αναγνώριση της αλληλουχίας TEV από την πρωτεάση, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μιας πρωτεΐνης μικρότερου μοριακού βάρους, η οποία λόγω της πέψης δεν θα φέρει αμινοτελικά τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο και την αλληλουχία TEV. Φυσιολογικά, μετά από 24 ώρες, σχεδόν το 100% των πρωτεϊνικών μορίων της EscN έχουν αναγνωριστεί και πρωτεολυθεί, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 4.2 : Πρωτεόλυση της His-TEV-EscN από την His-TEV πρωτεάση. His-TEV-EscN πρωτεΐνη επώαστηκε με την πρωτεάση για 24 ώρες και ένα δείγμα τόσο πριν από την επώαση (BD : Before Digestion) όσο και μετά το τέλος της επώασης (AD : After Digestion) αναλύθηκε με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 10% πηκτή πολυακρυλαμίδης. Οι πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύτηκαν μετά από χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250.

Μετά την επιτυχή πρωτεόλυση, η πρωτεάση πρέπει να διαχωριστεί από την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Για να το πετύχουμε αυτό φορτώσαμε το παραπάνω πρωτεϊνικό μείγμα σε μια δεύτερη ρητίνη Ni²⁺-NTA. Με τη διαδικασία αυτή η πρωτεάση, η οποία φέρει αμινοτελικά τον επίτοπο των πολλαπλών ιστιδινών, θα προσδεθεί πάνω στη ρητίνη, ενώ

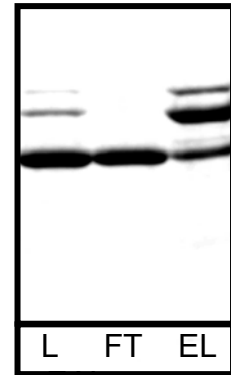
η EscN, χωρίς επίτοπο τώρα πια, θα τη διαπεράσει (βλ. σχήμα 4.3, FT) και θα συλλεχθεί για παραπέρα καθαρισμό.



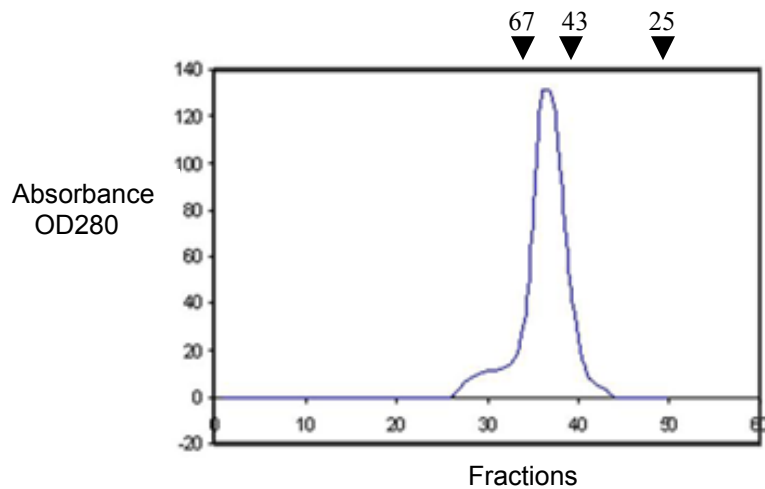
Σχήμα 4.3 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (τρίτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. L : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη, W : δείγμα από το στάδιο της έκπλυσης, EL : δείγμα από το υλικό έκλουσης

Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας καθαρισμού της EscN, η πρωτεΐνη που διαπέρασε τη ρητίνη, φορτώθηκε σε ρητίνη ανιοντοανταλλαγής (Q Sepharose). Στο σχήμα 4.4 φαίνεται καθαρά, πως η EscN διαπερνά τον ανιοντοανταλλάκτη, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεϊνικές προσμίξεις προσδένονται πάνω σε αυτόν. Αυτός ο διαχωρισμός είχε σαν αποτέλεσμα να απομονωθεί τελικά η EscN σε εξαιρετικά καθαρή μορφή, αλλά σε χαμηλή διαθεσιμότητα (10 mg καθαρής πρωτεΐνης από 15 λίτρα καλλιέργειας).

Σχήμα 4. 4 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης EscN (τέταρτο στάδιο) με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. L : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε την ρητίνη Q, EL : δείγμα από το υλικό έκλουσης



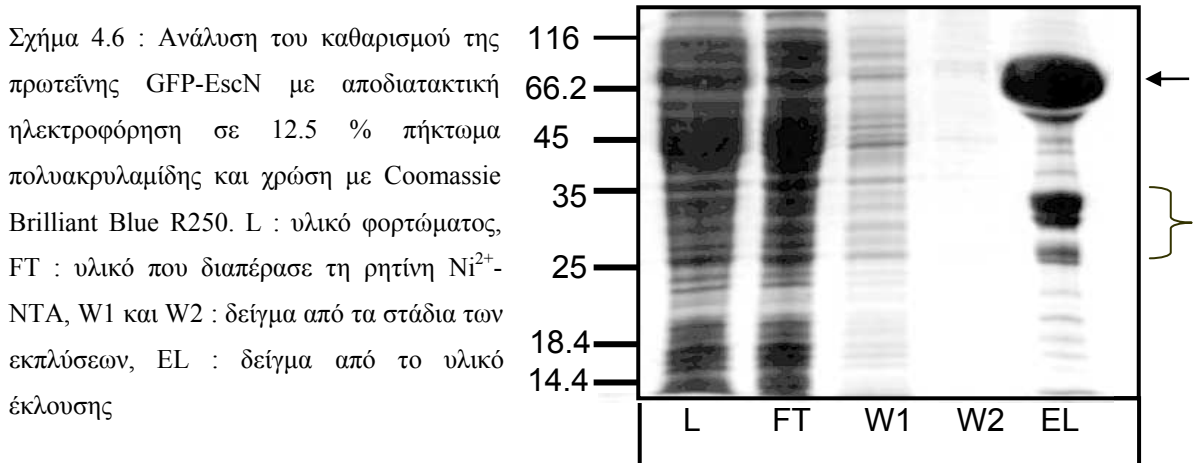
Το καθαρισμένο υλικό που διαπερνά τη ρητίνη Q ελέγχθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης και αποδείχτηκε ότι αποτελεί ένα σταθερό χρωματογραφικά και μονομερές πολυπεπίδιο (εικόνα 4.5).



Σχήμα 4. 5 : Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Superdex 200 HR 10/30 FPLC κολώνα (Amersham), προεξισοροποιημένη με 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 50 mM NaCl και με ταχύτητα ροής 0.4 ml/min. Δείκτες μοριακού βάρους : BSA (67KDa), οβαλβουμίνη (43KDa) και χυμοτρυψίνη Α (25 KDa).

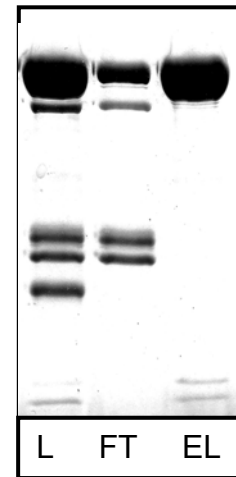
4.3 Έκφραση και απομόνωση του εξαμερούς της GFP-EscN πρωτεΐνης

Η GFP-EscN έφερε στο αμινοτελικό της άκρο τον επίτοπο με τις 6 ιστιδίνες και αρχικά έγινε προσπάθεια απομόνωσης της πρωτεΐνης μετά από χρωματογραφία σε ρητίνη Ni²⁺-NTA. Όπως όμως είναι φανερό από το σχήμα 4.6, το υλικό που εκλούστηκε από τη ρητίνη περιέχει, εκτός από την πρωτεΐνη που μας ενδιέφερε (σημειώνεται με το βέλος στο σχήμα που ακολουθεί) και μικρομοριακές προσμίξεις (πρόκειται για θραύσματα της GFP υπομονάδας που περικλείονται στην αγκύλη του σχήματος 4.6).



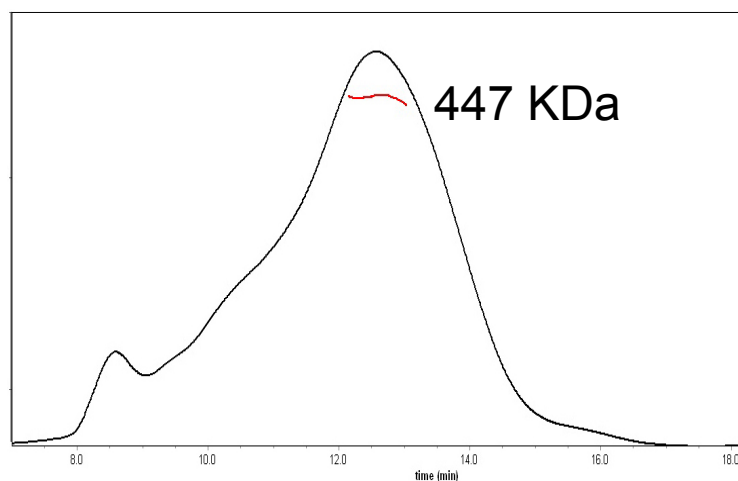
Για το λόγο αυτό, ακολούθησε και δεύτερο στάδιο καθαρισμού, κατά το οποίο το υλικό που εκλούστηκε από τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, φορτώθηκε σε ρητίνη Q αυτή τη φορά. Στο τέλος αυτού του σταδίου, από τη ρητίνη εκλούστηκε η GFP-EscN σε εξαιρετικά καθαρή μορφή και πρωτεΐνη αυτής της καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε στα μετέπειτα βιοχημικά πειράματα (βλ. σχήμα 4.7).

Σχήμα 4.7 : Ανάλυση του καθαρισμού της πρωτεΐνης GFP-EscN με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε 12.5 % πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue R250. L : υλικό φορτώματος, FT : υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη Q, EL : δείγμα από το υλικό έκλυσης



Με πειράματα MALLS, μετρήθηκε η μάζα της απομονωμένης GFP-EscN (447 KDa) (σχήμα 4. 8) και βρέθηκε να είναι επομένως εξαμερής (υπολογισμένο μοριακό βάρος του μονομερούς από την αμινοξική ακολουθία είναι 79 KDa). Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, η απομονωμένη εξαμερής GFP-EscN έχει ενεργότητα ATPάσης, οπότε θεωρήθηκε φυσιολογικό παράγωγο της αγρίου τύπου πρωτεΐνης και αυτή η μορφή χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μέτρησης συγγένειας (κεφ. 4. 5).

Σχήμα 4. 8 : Μέτρηση της μάζας της πρωτεΐνης GFP-EscN. Φαίνεται το χρωματογραφικό ίχνος από τον ανιχνευτή του UV (συνεχής γραμμή), όπως επίσης διακρίνονται και οι μετρήσεις μάζας (από τον ανιχνευτή 11 του οργάνου Dawn-EOS) από διαδοχικά τμήματα του χρωματογραφικού μεγίστου (κόκκινες τελείες). Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που φορτώθηκε ήταν 2

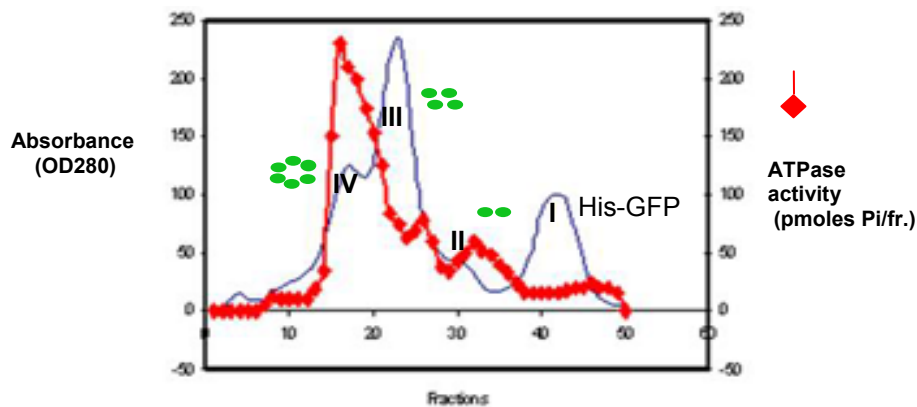


mg/ml. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης έγινε σε Superdex 200 HR10/30 κολώνα, προεξισορροπημένη με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 50 mM NaCl και με ταχύτητα ροής 0.8 ml/min. Το πείραμα αυτό έγινε από την Δρ Καραμάνου Λίλυ.

4.4 Μόνο η εξαμερής GFP-EscN έχει δραστικότητα ATPάσης

Η GFP-EscN πρωτεΐνη αποδείχτηκε ένα χρήσιμο βιοχημικό εργαλείο, γιατί μόνο αυτή απομονώθηκε ως ένα σταθερό εξαμερές πολυπεπτίδιο χρωματογραφικά. Προκειμένου όμως να αποκλείσουμε την περίπτωση ότι πρόκειται για ένα μη λειτουργικό μόριο, κυρίως λόγω της παρουσίας της GFP υπομονάδας, μετρήθηκε η υδρολυτική ικανότητα του μορίου αυτού σε διαλυτή μορφή. Ως κατάλληλο δείγμα για το πείραμα αυτό θεωρήθηκε το δείγμα που εκλούστηκε από το πρώτο στάδιο καθαρισμού, μετά από χρωματογραφία σε ρητίνη Ni²⁺-NTA.

Όταν το παραπάνω δείγμα ελέγχθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης, διαπιστώθηκε ότι περιέχει περισσότερες από μια μορφές της GFP-EscN. Οι μορφές αυτές εν συνεχεία απομονώθηκαν (χρωματογραφία σε ρητίνη Q, βλ. υλικά και μέθοδοι) και οι μάζες τους μετρήθηκαν με πειράματα MALLS. Όπως αποτυπώνεται στο σχήμα 4.9, η μορφή II έχει μάζα 158 KDa και είναι επομένως το διμερές, η μορφή III μάζα 334KDa και αντιστοιχεί στο πιθανό τετραμερές, ενώ η μορφή IV έχει μάζα 447 KDa και είναι επομένως το εξαμερές. Όταν επιχειρήσαμε να μετρήσουμε την υδρολυτική ικανότητα των πρωτεϊνών σε κάθε ένα από τα κλάσματα της χρωματογραφίας, διαπιστώσαμε πως η μόνη ενεργή καταλυτικά μορφή είναι το εξαμερές (σχήμα 4.9). Με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης αυτού του τύπου μπορέσαμε όχι μόνο να διακρίνουμε χρωματογραφικά τους διάφορους πρωτεϊνικούς υποπληθυσμούς, αλλά αποδώσαμε και καταλυτική ενεργότητα σε έναν από αυτούς. Είναι πολύ πιθανό όλες αυτές οι μορφές που απομονώθηκαν να αποτελούν ενδιάμεσα του ίδιου φυσιολογικού μονοπατιού μέσα στο κύτταρο (διμερές, τετραμερές, ενεργό εξαμερές).



Σχήμα 4.9 : Χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Superdex 200 HR 10/30 FPLC κολώνα (Amersham), προεξισορροπημένη με 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 50 mM NaCl και με ταχύτητα ροής 0.4 ml/min. Κόκκινη γραμμή : ενεργότητα ATPάσης στα διάφορα χρωματογραφικά κλάσματα

4.5 Μέτρηση συγγένειας μεταξύ του εξαμερούς GFP-EscN και της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης CesAB με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης

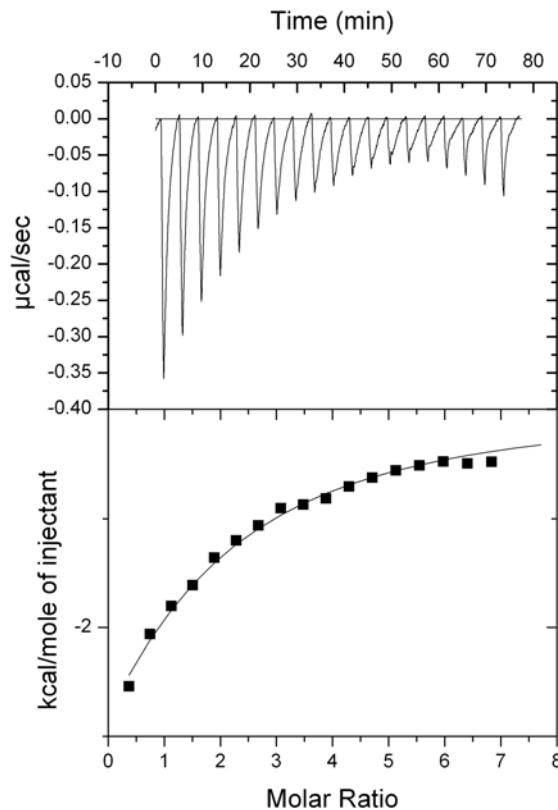
Πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει πως οι ATPάσες του συστήματος III παίζουν κεντρικό ρόλο στην αναγνώριση των συμπλόκων σαπερόνης-υποστρώματος, λειτουργώντας ως πύλη στην εσωτερική μεμβράνη του κυττάρου, ενώ δεν αποκλείεται να παρέχουν και την ενέργεια που χρειάζεται για την επακόλουθη έκκρισή τους^{11, 106, 107}. Πιο συγκεκριμένα, η InvC ATPάση από τη *Salmonella enterica* έχει δειχτεί να επάγει την απελευθέρωση της σαπερόνης και το ξεδίπλωμα του υποστρώματός της, παρουσία ATP³⁵. Επίσης και μια δεύτερη σαπερόνη, η πρωτεΐνη CesT από το EPEC βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την EscN ATPάση.

Για να διερευνήσουμε λοιπόν εάν και η σαπερόνη CesAB, είτε μόνη της είτε σε σύμπλοκο με το υπόστρωμά της, αλληλεπιδρά με την ATPάση, προχωρήσαμε σε πειράματα μέτρησης συγγένειας με θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC). Όταν μια αντίδραση μεταξύ του συνδέτη και του συνδεόμενου μορίου λαμβάνει χώρα, η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης μπορεί με ακρίβεια να υπολογίσει τις σταθερές πρόσδεσης, τη στοιχειομετρία, καθώς και τις διαφορές εντροπίας ή ενθαλπίας, αποκαλύπτοντας δηλαδή ολόκληρο το θερμοδυναμικό

πρότυπο μιας αντίδρασης, στο ίδιο πείραμα. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε πειράματα αυτού του τύπου.

Έτσι, κατά τη διάρκεια τιτλοδότησης του πεπτιδίου της καρβοξυ-περιοχής της CesAB σε διάλυμα απομονωμένου εξαμερούς της GFP-EscN, μετρήθηκε συγγένεια, της τάξης των 50-70 μM (σχήμα 4.10). Η συγγένεια αυτή, ενδεικτική της αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο μορίων, αποδεικνύει για πρώτη φορά τον ενεργό ρόλο της C-ουράς στην στόχευση των υποστρωμάτων μέσω της EscN ATPάσης του συστήματος.

Σχήμα 4.10 : Μέτρηση συγγένειας της GFP-EscN για την καρβοξυ-περιοχή της CesAB με ITC. Συνθετικά παρασκευασμένο πεπτίδιο της C-ουράς της CesAB τιτλοδοτήθηκε σε διάλυμα GFP-EscN και η θερμότητα που ελευθερώθηκε λόγω της αλληλεπίδρασης καταγράφηκε ως συνάρτηση του χρόνου. Πάνω : ακατέργαστα δεδομένα από το ITC. Κάτω : Ισόθερμη καμπύλη πρόσδεσης

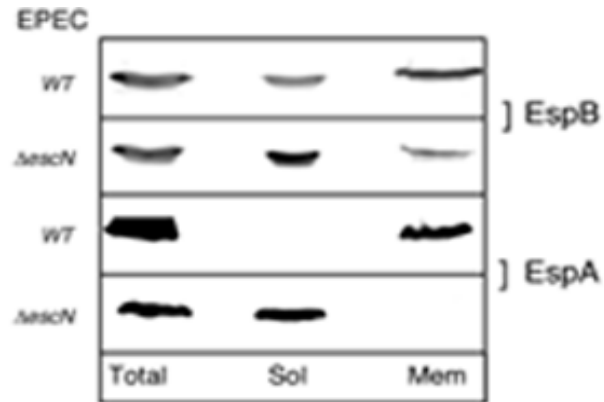


4.6 Η EscN πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για τη στόχευση των δύο μεταθετών EspA και EspB στην μεμβράνη

Στην προηγούμενη ενότητα αναλύσαμε την αλληλεπίδραση της ATPάσης με την σαπερόνη CesAB. Τι γίνεται όμως με τα δύο υποστρώματα, EspA και EspB;

Για να απαντήσουμε το ερώτημα αυτό, μελετήσαμε τον εντοπισμό των υποστρωμάτων στα δύο κύρια υποκυτταρικά κλάσματα (κυτταρόπλασμα-μεμβράνες), ως

αποτέλεσμα της παρουσίας ή όχι της EscN (βλ. ενότητα 3.6). Με βάση την εικόνα 4.11 μπορούμε να συμπεράνουμε πως στο EPECΔEscN στέλεχος, η EspA και η EspB δεν μπορούν να στοχευτούν ξανά στο μεμβρανικό τμήμα του κυττάρου, εμπλέκοντας έμμεσα την EscN ως αποδέκτη των υποστρωμάτων στη μεμβράνη.



Σχήμα 4.11 : Υπο-κυτταρική διαμερισματοποίηση για εντοπισμό πρωτεϊνών *in vivo*. Βακτηριακές καλλιέργειες του στελέχους EPEC αγρίου τύπου και του EPECΔEscN επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και τελικά διαχωρίστηκαν οι διαλυτές πρωτεΐνες (sol) από τις μεμβρανικές (mem, συνολικά ενσωματωμένες και περιφερικά συνδεδεμένες στη μεμβράνη). Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα αναλύθηκαν με SDS-PAGE και η ανίχνευση των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με α-EspB και α-EspA αντίσωμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΣΗΖΗΤΗΣΗ

Το σύστημα έκκρισης τύπου III (T3S) είναι ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό εκκριτικό μονοπάτι, το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογονικότητα πολλών Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως *Shigella*, *Salmonella*, *Bordetella*, *Pseudomonas* και παθογόνο *E. coli*, επιτρέποντας στα βακτήρια αυτά να εισάγουν τις μολυσματικές τους πρωτεΐνες (ή τοξίνες) απ' ευθείας στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή που προσβάλλουν¹⁰⁶. Πολλές από αυτές τις τοξίνες μιμούνται ευκαρυωτικούς παράγοντες με αποτέλεσμα να εκμεταλλεύονται ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου-ξενιστή προς όφελος του παθογόνου κατά τη διάρκεια της μόλυνσης^{23, 108}. Παρά το γεγονός πως πρόσφατες μελέτες έχουν επεκτείνει τις γνώσεις μας πάνω στη δομή και τη λειτουργία πολλών τοξινών, ο ακριβής μηχανισμός της πρωτεϊνικής έκκρισης και μετάθεσης μέσω του συστήματος III, παραμένει σχεδόν άγνωστος. Τα θεμελιώδη αυτά ερωτήματα προσπαθεί να απαντήσει η παρούσα διατριβή.

Ως οργανισμό-μοντέλο επιλέξαμε το εντεροπαθογόνο *E. coli* και εστιαστήκαμε στη μελέτη και τον ενδεδειγμένο βιοχημικό χαρακτηρισμό της σαπερόνης CesAB και των υποστρωμάτων της, τους μεταθέτες (translocators) EspA και EspB. Τα δομικά δεδομένα που προέκυψαν από την επίλυση της δομής της σαπερόνης μόνης της ή σε σύμπλοκο με το μεταθέτη EspA, μας αποκάλυψε έναν πολύ ενδιαφέρον μηχανισμό για το σχηματισμό αυτού του συμπλόκου ενδοκυτταρικά, ενώ παράλληλα η βιοχημική ανάλυση της CesAB οδήγησε σε συμπεράσματα για την ενεργή συμμετοχή της σαπερόνης αυτής στην διαδικασία της έκκρισης. Τέλος η μελέτη της EscN ATPάσης του συστήματος μας επέτρεψε να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για το εκκριτικό μονοπάτι τύπου III.

Πιο συγκεκριμένα στο κεφάλαιο 2 της εργασίας αυτής, αναλύονται τα δομικά χαρακτηριστικά της CesAB μόνης της και σε σύμπλοκο με το υπόστρωμα EspA.

Μετά τον προσδιορισμό της δομής της σαπερόνης, με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), βρέθηκε πως η CesAB στο διάλυμα αποκτά μια ιδιαίτερα εκτενή, μη-σφαιρική (non-globular) και μη-αναδιπλωμένη (natively unfolded) διαμόρφωση. Παρά το γεγονός όμως αυτό, από τα πειράματα NMR φαίνεται πως η πρωτεΐνη διατηρεί τη δευτεροταγή δομή της (secondary structure). Φαίνεται λοιπόν πως η CesAB ανήκει στην προσφάτως χαρακτηρισμένη ομάδα των μη-αναδιπλωμένων

πρωτεϊνών (natively unfolded proteins), οι οποίες μοιάζουν με molten globules και δεν έχουν τεταρτοταγή δομή¹⁰⁹.

Όταν όμως προσδιορίσαμε τη μάζα της με πειράματα MALLS, βρήκαμε πως στο διάλυμα βρίσκεται πιθανότατα ως ομοδιμερές, παρά το γεγονός ότι την ίδια στιγμή είναι και μη-αναδιπλωμένη. Είναι εύλογο να συμπεράνει κανείς πως οι εκτεταμένες υδρόφοβες περιοχές που είναι εκτεθειμένες στο μόριο της CesAB οδηγούν στο διμερισμό της για λόγους σταθεροποίησης.

Επιπρόσθετα με τη δομή της σαπερόνης, λύθηκε με NMR και η δομή του υποστρώματος EspA (τα πειράματα αυτά έγιναν υπο την επίβλεψη του Δρ Χ. Καλοδήμου). Από τα πρώτα δομικά δεδομένα (δεν παρουσιάζονται στην διατριβή αυτή, Li et.al., in preparation) φαίνεται πως και το υπόστρωμα αποκτά στο διάλυμα μια μη-αναδιπλωμένη (natively unfolded) διαμόρφωση. Μόνο μετά την αναγνώριση και την πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών, αυτές αποκτούν δομημένη διαμόρφωση. Πρόκειται για το χαρακτηρισμό της πρώτης περίπτωσης στη φύση, όπου μία σαπερόνη και το υπόστρωμά της μεταπίπτουν κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους, από τη μη-αναδιπλωμένη στην πλήρως αναδιπλωμένη διαμόρφωση (mutual folding).

Γενικά, οι σαπερόνες θεωρούνται ιδιαίτερα εξειδικευμένα μόρια, τα οποία βοηθούν την αναδίπλωση είτε RNA μορίων είτε άλλων πρωτεϊνών ή μπορεί ακόμη να κρατούν μία πρωτεΐνη σε διαλυτή μορφή¹¹⁰. Μέχρι πρόσφατα ήταν κοινά αποδεκτό, πως προκειμένου να επιτελέσουν τη λειτουργία τους, οι σαπερόνες αποκτούν μια πολύ καλά οργανωμένη δομή. Παρόλα αυτά, δομική αταξία (structural disorder) έχει παρατηρηθεί και σε κάποιες σαπερόνες. Πιο συγκεκριμένα, δύο προσφάτως ταυτοποιημένες πρωτεϊνικές σαπερόνες, η α -συνουκλεΐνη (α -synuclein) και η α -καζεΐνη (α -casein), είναι πλήρως μη-αναδιπλωμένες, το οποίο υποδεικνύει πως ο μοριακός μηχανισμός της λειτουργίας τους ως σαπερόνες σχετίζεται άμεσα με την άτακτη (disordered) τους φύση¹¹¹⁻¹¹³. Επίσης και άλλες σαπερόνες, όπως η α -κρυσταλλίνη (α -crystallin)¹¹⁴, GroEL¹¹⁵ και Hsp25¹¹⁶, έχει βρεθεί να περιέχουν περιοχές στη δομή τους, οι οποίες είναι μη-αναδιπλωμένες, αλλά σημαντικές για την λειτουργία τους. Για τις περισσότερες από αυτές έχει προταθεί να ισχύει ο μηχανισμός της σύζευξης της αναδίπλωσης με την αναγνώριση του αλληλεπιδρώντος μορίου, δηλαδή οι σαπερόνες αυτές καθώς

αλληλεπιδρούν με το συνδέτη τους μεταπίπτουν δομικά σε μια αναδιπλωμένη μορφή (μοντέλο της μεταφοράς εντροπίας)¹⁰⁹.

Επίσης με πειράματα MALLS δείξαμε πως η CesAB προσδένει την EspA με μοριακή αναλογία 1:1. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως όλες οι μέχρι τώρα γνωστές σαπερόνες του εκκριτικού συστήματος III προσδένουν το μονομερές τους υπόστρωμα ως διμερή, δηλαδή με μοριακή αναλογία 2:1⁵⁴. Αυτή η παρατήρηση εγείρει ερωτήματα σχετικά με το μηχανισμό σχηματισμού του ετεροδιμερούς συμπλόκου, καθώς από τη μια, η ίδια η CesAB φαίνεται να σχηματίζει ομοδιμερή, ενώ από την άλλη τα *cesAB* και *espA* γονίδια εδράζουν σε διαφορετικά οπερόνια και ούτε συ-μεταγράφονται, ούτε συνεκφράζονται. Στο παρελθόν, έχει προταθεί, μετά από πειράματα θερμικής αποδιάταξης, ότι το ομοδιμερές της CesAB μεταπίπτει στο θερμοδυναμικά σταθερότερο ετεροδιμερές CesAB/EspA, μέσω μιας διαδικασίας ανταλλαγής, όπου το μονομερές της EspA αντικαθιστά κατά κάποιο τρόπο ένα μονομερές της CesAB από το ομοδιμερές⁴². Αυτός ο μηχανισμός επιτρέπει στην CesAB να δρα αποτελεσματικά ως παράγοντας αντιπολυμερισμού της EspA, αποτρέποντας τις πρώιμες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ίδιων των μορίων της EspA ενδοκυτταρικά. Το προϋπάρχον ομοδιμερές της σαπερόνης μέσα στο κύτταρο, μπορεί να ψάχνει ανά πάσα στιγμή για κάθε νεοσυντιθέμενο μόριο EspA και να αλληλεπιδρά μαζί του, διατηρώντας το παράλληλα διαλυτό.

Για να ελέγξουμε πειραματικά το παραπάνω μοντέλο σχηματισμού του ετεροδιμερούς συμπλόκου, επιλέξαμε αμινοξέα τα οποία με βάση τη δομή ήταν πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτό το μηχανισμό ανταλλαγής. Έτσι, όταν το γλουταμικό οξύ στη θέση 20 της CesAB μεταλλάχθηκε σε αλανίνη, προέκυψε ένα υπερσταθεροποιημένο ομοδιμερές σε σχέση με το αντίστοιχο αγρίου τύπου (καμπύλη αποδιάταξης με ουρία, βλ. κεφάλαιο 2.7). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, πειράματα θερμικής αποδιάταξης (Li et.al., in preparation) του συμπλόκου CesAB(E20L)/EspA δείχνουν αποσταθεροποίηση σε σχέση με το σύμπλοκο αγρίου τύπου. Φαίνεται λοιπόν πως αυτός ο μηχανισμός της μετάπτωσης από το ασταθές ομοδιμερές σε ένα σταθερότερο θερμοδυναμικά ετεροδιμερές είναι ζωτικής σημασίας μέσα στο κύτταρο, ενώ στα πλαίσια αυτής της εργασίας καθορίσαμε και συγκεκριμένα αμινοξέα τα οποία ρυθμίζουν το μηχανισμό αυτό.

Προκειμένου να κατανοήσουμε σε βάθος τη λειτουργία της CesAB, αλλά και να προσδιορίσουμε επακριβώς το ρόλο της στο εκκριτικό μονοπάτι τύπου III, προχωρήσαμε στον αναλυτικό βιοχημικό χαρακτηρισμό της. Αρχικά με πειράματα περιορισμένης τρυψινόλυσης (κεφ. 3.1 και σχήμα 3.1) ταυτοποιήσαμε δύο διακριτές περιοχές του μορίου, την N-περιοχή και την καρβοξυ-τελική περιοχή (C-ουρά). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία και με τα δομικά δεδομένα (NMR δομή, Li et.al., in preparation και την κρυσταλλική δομή, Yip et.al.), όπου η C-ουρά δεν παρατηρείται στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας, οδηγώντας στο συμπέρασμα πως μπορεί να είναι αρκετά ευκίνητη και πιθανότατα μη-αναδιπλωμένη.

Έχοντας σαν υπόθεση εργασίας πως η δομική οργάνωση της CesAB είναι πιθανό να αντικατοπτρίζει και λειτουργική εξειδίκευση, ακολουθήσαμε δύο στρατηγικές. Από τη μια, έχοντας σαν γνώμονα τη δομή, εισάγαμε μεταλλάξεις στην N-περιοχή του μορίου, οι οποίες θα μπορούσαν να προσφέρουν εξειδίκευση στην αναγνώριση των υποστρωμάτων της, ενώ παράλληλα κατασκευάσαμε και το έλλειμμα της CesAB (CesABΔC), στο οποίο είχαμε αφαιρέσει τη C-ουρά. Τα παράγωγα αυτά της CesAB προσπαθήσαμε να τα χαρακτηρίσουμε με *in vitro*, αλλά και *in vivo* βιοχημικές μελέτες. Επίσης για να έχουμε μια πιο σφαιρική εικόνα για το ρόλο της CesAB, στις παρακάτω ενότητες μελετήθηκε και το δεύτερο υπόστρωμά της, ο μεταθέτης EspB, έχοντας σαν απώτερο σκοπό να προσδιορίσουμε εάν και τα δύο υποστρώματα θα εκκριθούν τελικά με τον ίδιο τρόπο από το κύτταρο λόγω της απαίτησής τους για την ίδια σαπερόνη ή θα ακολουθήσουν διαφορετικές οδούς.

Αρχικά λοιπόν ελέγξαμε την ικανότητα της CesAB (της μεταλλαγμένης και της ελλειμματικής μορφής) να σχηματίζει σύμπλοκο με τα υποστρώματά της. Στο σχήμα 3.5 φαίνεται πως μετά από *ex vivo* συνέκφραση και συγκαθαρισμό, η CesABΔC μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με την EspA και την EspB, όπως ακριβώς και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η μεταλλαγμένη (E20L/E30L) όμως μορφή παρουσιάζει σημαντικό πρόβλημα στην πρόσδεση και των δύο υποστρωμάτων, όπως ακριβώς είχε προβλεφθεί. Είναι λογικό να συμπεράνει κανείς πως η N-περιοχή του μορίου είναι αναγκαία και ικανή για την πρόσδεση των υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα οι διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου (βλ. σχήμα 2.14) που αναπτύσσονται ανάμεσα στα μη-κανονικά αμινοξέα γλουταμικό οξύ στη θέση 20 και στη θέση 30 της CesAB με τα αντίστοιχα αργινίνη 174 και γλυκίνη

181 της EspA οδηγούν στη σταθεροποίηση του συμπλόκου σαπερόνης-υποστρώματος. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι τόσο η CesABΔC (σχήμα 3.4, A), όσο και το μονό (E20L, σχήμα 2.9) και το διπλό μετάλλαγμα (E20L/E30L, μετρημένη μάζα από MALLS στα 24.9 KDa) διατηρούν την ικανότητά τους να σχηματίζουν ομοδιμερή στο διάλυμα.

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε *in vivo* μελέτες, για να χαρακτηρίσουμε περαιτέρω την λειτουργία της CesAB σαπερόνης. Αρχικά λοιπόν ελέγξαμε την ικανότητα του διπλού μεταλλάγματος να εκκρίνει στο μέσο ανάπτυξης βακτηριακών καλλιεργειών EspA και EspB. Όπως αναμέναμε από τα *in vitro* πειράματα, παρουσία της CesAB(E20L/E30L), το EPEC βακτήριο δεν μπορεί να εκκρίνει EspA. Με έκπληξη όμως παρατηρήσαμε πως το ίδιο βακτήριο μπορούσε να εκκρίνει το μεταθέτη EspB, σε επίπεδα συγκρίσιμα με το αγρίου τύπου βακτήριο (σχήμα 3.6). Συμπληρωματικά με τα παραπάνω, διαπιστώσαμε πως ακόμη και απουσία της CesAB, η EspB είναι σταθερή στο κυτταροπλάσμα, σε αντίθεση με την EspA, η οποία κάτω από τις ίδιες συνθήκες αποσταθεροποιείται, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.7. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η N-περιοχή της CesAB αποφέρει λειτουργική εξειδίκευση στο μόριο, καθώς αναγνωρίζει και σταθεροποιεί ενδοκυτταρικά μόνο την EspA, αλλά όχι την EspB. Η λειτουργικότητα της N-περιοχής ως σαπερόνη είναι κρίσιμη μόνο για τη σταθεροποίηση της EspA. Τον ρόλο αυτό για την EspB παίζει πιθανότατα κάποια διαφορετική, άγνωστη μέχρι τώρα, σαπερόνη.

Με ανάλογα πειράματα, ελέγχθηκε και ο ρόλος της C-ουράς *in vivo*. Στην περίπτωση αυτή η παρουσία της κρίθηκε αναγκαία για την έκκριση και των δύο υποστρωμάτων (σχήμα 3.8) και επομένως ο ρόλος της άρχισε να διερευνάται ενδελεχώς.

Στην ενότητα 3.5 μελετήσαμε τη μολυσματική ικανότητα EPEC στελεχών, τα οποία εκφράζουν τα παράγωγα της CesAB, σε κυτταρικά μοντέλα, εξετάζοντας με τον τρόπο αυτό τη φυσική σύνδεση της έκκρισης μέσω του T3S από ένα βακτήριο και της παθογονικότητας. Προς αυτή την κατεύθυνση χρησιμοποιήσαμε ως κυτταρικά μοντέλα ερυθροκύτταρα και ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μήτρας HeLa.

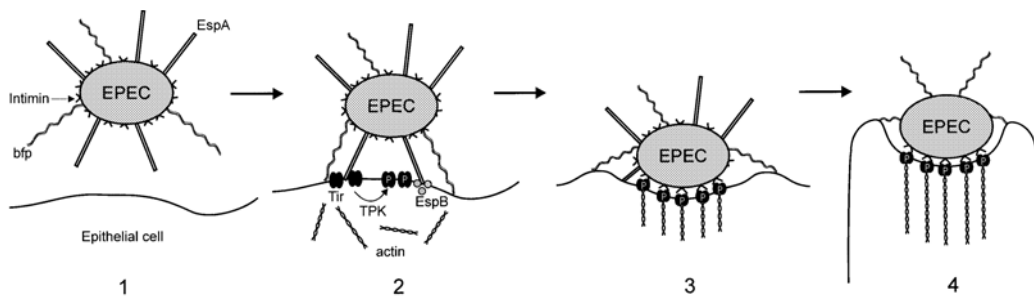
Ενώ τα ερυθροκύτταρα αποτελούν ένα απλό *in vitro* κυτταρικό μοντέλο της παθογονικότητας του EPEC γενικά, παρόλα αυτά μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για τη διερεύνηση συγκεκριμένων ερωτημάτων που αφορούν την αλληλεπίδραση EPEC-

κυττάρου ξενιστή, όπως είναι η μετατόπιση πρωτεϊνών (translocation). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχτεί αλληλεπίδραση του EPEC με μεμβράνες ερυθροκυττάρων, η οποία εξαρτάται από το σχηματισμό του EspA ινιδίου⁵¹. Επίσης έχει δειχτεί λύση των ερυθροκυττάρων με συνακόλουθη απελευθέρωση αιμοσφαιρίνης, γεγονός που αποτελεί τη βάση της βιοχημικής δοκιμής που εξετάσαμε, όπως και εντοπισμός του τρίτου μεταθέτη EspD και του μολυσματικού παράγοντα Tir σε μεμβράνες ερυθροκυττάρων^{51, 96}. Στη δική μας περίπτωση η CesAB είναι απαραίτητη για τη μετατόπιση των EspA και EspB μεταθετών του συστήματος III και για το λόγο αυτό επιλέξαμε τα ερυθροκύτταρα ως κατάλληλο κυτταρικό μοντέλο.

Από τα πειράματα αυτά είδαμε πως EPEC στελέχη, τα οποία εκφράζουν την CesAB(E20L/E30L) διατηρούν περίπου το 50% της αιμολυτικής δραστηριότητας του αγρίου τύπου στελέχους, ενώ αυτά, τα οποία περιέχουν την CesABΔC, δεν είναι αιμολυτικά. Στο ίδιο πείραμα, απουσία της CesAB, ένα EPEC στέλεχος δε μπορεί να προκαλέσει αιμόλυση, ενώ η παρουσία της υποκαθιστά πλήρως την ικανότητα αιμόλυσης των βακτηριακών κυττάρων. Η αιμολυτική δραστηριότητα σχετίζεται με το σχηματισμό πόρων στη μεμβράνη του ερυθροκυττάρου από τους μεταθέτες EspB και EspD, μια διαδικασία που εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία του EspA ινιδίου. Στο *in vitro* σύστημα που αναπτύξαμε για να παρακολουθούμε την έκκριση των πρωτεϊνών στο θρεπτικό μέσο, η CesAB(E20L/E30L) παρουσιάζει σοβαρό πρόβλημα στην έκκριση της EspA μόνο, και όχι της EspB. Φαίνεται πως η μικρή ποσότητα της EspA που θα εκκριθεί τελικά, μπορεί να επάγει τη μετατόπιση στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων των άλλων δύο μεταθετών, EspB και EspD, διαδικασία αρκετή για να οδηγήσει σε 50% περίπου αιμόλυση. Όταν υπάρχει πρόβλημα στην έκκριση και του EspB μεταθέτη, όπως στην περίπτωση της CesABΔC, η κατάσταση επιβαρύνεται ακόμα περισσότερο και τελικά προκύπτει ένα στέλεχος που δεν είναι αιμολυτικό. Τα αποτελέσματα αυτά, τα οποία συνοψίζονται στο διάγραμμα 3.10, είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της έκκρισης *in vitro*.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε ένα πιο περίπλοκο κυτταρικό σύστημα, τα κύτταρα HeLa, τα οποία είναι επιθηλιακά κύτταρα και έχουν χρησιμοποιηθεί κατεξοχήν για τη μελέτη της παθογονικότητας του EPEC. Μάλιστα έχει επικρατήσει και το παρακάτω μοντέλο για τον τρόπο αλληλεπίδρασης του EPEC με τα επιθηλιακά κύτταρα

(σχήμα 5.1) : βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο για κυτταροκαλλιέργειες, εκφράζουν μόρια προσκόλλησης (adhesins), όπως το ινίδιο τύπου IV (bundle forming pili ή bfp) και ιντιμίνη (intimine) και μπορούν να σχηματίζουν εξωκυτταρικά το EspA ινίδιο (στάδιο 1). Η αρχική προσκόλληση του EPEC μέσω του bfp και του EspA ινιδίου, οδηγεί στη μετατόπιση του EspB, Tir, αλλά και άλλων μολυσματικών παραγόντων στο κύτταρο του ξενιστή. Τελικά ενεργοποιείται στο στάδιο αυτό η κινάση της τυροσίνης, η οποία και θα φωσφορυλιώσει τον υποδοχέα της ιντιμίνης (Tir) και η ακτίνη θα αρχίσει να αναδιατάσσεται (στάδιο 2). Η ιντιμίνη προσδένεται στο φωσφορυλιωμένο υποδοχέα της (Tir) και η πολυμερισμένη ακτίνη συσσωρεύεται ακριβώς κάτω από το προσκολλημένο βακτήριο. Για να συμβεί αυτό τα EspA ινίδια, όπως και άλλες εξωκυτταρικές δομές, εξαφανίζονται από την περιοχή της στενής επαφής (στάδιο 3). Επιπλέον πολυμερισμός της ακτίνης οδηγεί στο σχηματισμό της A/E κάκωσης (στάδιο 4)¹⁸.



Σχήμα 5.1 : Μοντέλο της αλληλεπίδρασης του EPEC με επιθηλιακά κύτταρα

Αναλύοντας τα αποτελέσματα του πειράματος στο σχήμα 3.11, αρχικά παρατηρήσαμε πως κατά τη διάρκεια της μόλυνσης των επιθηλιακών κυττάρων με στελέχη EPEC, μόνο τα βακτήρια που περιείχαν την αγρίου τύπου CesAB μπόρεσαν να προσκολληθούν στη μεμβράνη των HeLa κυττάρων με επιτυχία (κατά μέσο όρο περίπου 40 βακτήρια/κύτταρο HeLa), ενώ πολύ λιγότερα βακτήρια (περίπου 4/κύτταρο HeLa) παρέμειναν προσκολλημένα, όταν έκφραζαν τα παράγωγα της CesAB. Γνωρίζοντας πως τα βακτήρια που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό μέσο των κυτταροκαλλιεργειών εκφράζουν τα διάφορα μόρια προσκόλλησης πιθανολογούμε πως απουσία του EspA ινιδίου, η πρώτη επαφή των στελεχών αυτών με το ευκαρυωτικό κύτταρο (στάδιο 1, βλ. σχήμα 5.1) μπορεί να είναι αδύναμη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μη ισχυρά προσκολλημένα

βακτήρια, αυτά δηλαδή που εκφράζουν τα παράγωγα της CesAB, να απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ξεπλύματος στο πείραμα αυτό (βλ. υλικά και μέθοδοι). Ακόμη και αυτά τα ελάχιστα βακτήρια με την προβληματική CesAB, που μπόρεσαν να εκφράσουν στην επιφάνειά τους το EspA ινίδιο, στο χρονικό περιθώριο των 4 ωρών που διαρκεί η επαφή με τα HeLa, δεν κατάφεραν ή δεν πρόλαβαν να προχωρήσουν στα επόμενα στάδια και τελικά κανένα από αυτά δεν προκάλεσε A/E κακώσεις (FAS αρνητικά βακτήρια). Στον ίδιο χρόνο, βακτήρια αγρίου τύπου εκφράζουν το EspA ινίδιο, σχηματίζουν μικρο-αποικίες και πολλά από αυτά σχημάτισαν τις A/E κακώσεις (στάδιο 4). Αξίζει να σημειωθεί πως στα βακτήρια αυτά δεν ανιχνεύτηκε εξωκυτταρικά EspA.

Στην ενότητα που ακολούθησε, προσπαθήσαμε να εστιαστούμε στον χαρακτηρισμό της CesABΔC, καθώς υπήρχαν σοβαρές ενδείξεις πως είναι η C-ουρά της CesAB αυτή που ελέγχει την έκκριση των υποστρωμάτων. Με πειράματα υποκυτταρικού εντοπισμού, διαπιστώσαμε πως η τοπολογία και των δύο υποστρωμάτων εξαρτάται από την παρουσία της ουράς. Πιο συγκεκριμένα, μόνο όταν εκφραζόταν ολόκληρη η CesAB, μπόρεσαμε να απομονώσουμε την EspA και EspB με το μεμβρανικό κλάσμα του κυττάρου (σχήμα 3.12). Διαφαίνεται λοιπόν με τα πειράματα αυτά ο σημαντικός ρόλος της ουράς στη στόχευση των υποστρωμάτων στη μεμβράνη, κατά τη διαδικασία της μετατόπισης (η CesABΔC δεν μπορεί να εκκρίνει EspA και EspB αποτελεσματικά). Ιδιαίτερη βαρύτητα, αλλά και πιθανή φυσιολογική συσχέτιση της μεμβρανικής τοπολογίας των υποστρωμάτων και της μετατόπισης, προσδίδει το γεγονός πως το υπόλοιπο T3S τμήμα, μέσω του οποίου όλα τα υποστρώματα θα περάσουν πριν εκκριθούν, βρίσκεται ενσωματωμένο στην κυτταρική μεμβράνη.

Στο εκκριτικό μονοπάτι του συστήματος III, έχουν ταυτοποιηθεί σαπερόνες με αποκλειστικό προορισμό να αναγνωρίζουν το υπόστρωμά τους και απλά να το σταθεροποιούν⁴², είτε να συμμετέχουν στη διαδικασία της έκκρισής του μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλα διαλυτά στοιχεία του T3S¹¹⁷. Στο δρόμο λοιπόν προς την έξοδο από το κύτταρο, ένα υπόστρωμα είναι πολύ πιθανό να αλληλεπιδρά και με άλλους παράγοντες, πέρα της σαπερόνης του, να σχηματίζει δηλαδή υπερ-μοριακά σύμπλοκα. Στηριζόμενοι λοιπόν σε αυτή την υπόθεση εργασίας, ξεκινήσαμε την προσπάθεια χαρακτηρισμού των πιθανών εγγενών συμπλόκων της EspA.

Πιστεύοντας πως πρόκειται για παροδικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες με τους κλασσικούς τρόπους διάρρηξης των βακτηριακών κυττάρων, όπως η ηχοβόληση, θα ήταν πιο εύκολο να διασπαστούν, αποφασίσαμε να ακολουθήσουμε μια τεχνική ήπιας λύσης τους (βλ. ενότητα 3.7) και να μελετήσουμε τα διαλυτά ενδοκυτταρικά σύμπλοκα που θα απελευθερώνονταν με τη μέθοδο αυτή ως συνάρτηση του χρόνου. Αφού εξασφαλίσαμε πως το ενδοκυτταρικό αυτό κλάσμα περιείχε καταρχήν τα μόρια του ενδιαφέροντός μας, CesAB και EspA (σχήμα 3.13), προχωρήσαμε στην ανάλυση με μη αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Στην ανάλυση αυτή, συμπεριλάβαμε και το στέλεχος του EPEC, το οποίο εκφράζει τη CesABΔC και το οποίο δεν μπορεί να εκκρίνει EspA, με το ερώτημα πώς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πιθανών πρωτεϊνών-στόχων της EspA διαφοροποιούνται όταν το εκκριτικό μονοπάτι δεν είναι λειτουργικό. Η εγγενής κατάσταση της ενδοκυτταρικής EspA αποτυπώνεται συγκριτικά στο σχήμα 3.14. Παρουσία ολόκληρης της CesAB, η EspA βρίσκεται κυρίως σε ένα σύμπλοκο κοντά στα 232 KDa μέχρι τα 60 πρώτα λεπτά της έκκρισης, όπως και σε άλλα μικρότερου μοριακού βάρους. Παρουσία της CesABΔC όμως, ανεξάρτητα από το χρόνο, εντοπίζεται μόνο σε μια μορφή, πιθανότατα παγιδευμένη σε ένα πρώιμο εκκριτικό ενδιάμεσο. Το χρονικό διάστημα ανάμεσα στα 60 και τα 120 λεπτά, το οποίο δεν αναλύθηκε στα πλαίσια αυτής της διατριβής, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και θα μπορούσε να αποκαλύψει ένα νέο μεταβατικό στάδιο από την μορφή στα 232 KDa στην μορφή χαμηλότερου μοριακού βάρους που εμφανίζεται στα 120 και 180 λεπτά.

Κατά την διάρκεια συγγραφής αυτής της εργασίας, προχωρήσαμε στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων της EspA με φασματοσκοπία μάζας και αναμένουμε τα αποτελέσματα.

Ακολουθώντας μια πιο στοχευμένη προσέγγιση, στην ενότητα που ακολουθεί προσπαθήσαμε να κατανοήσουμε το ρόλο της EscN ATPάσης του συστήματος στην εκκριτική διαδικασία. Πολύ πρόσφατες μελέτες έχουν προτείνει έναν πιθανό ρόλο για την οικογένεια των ATPασών του T3S, σύμφωνα με τον οποίο αυτές, σε ένα αρχικό στάδιο της επιλεκτικής έκκρισης, αναγνωρίζουν τα σύμπλοκα μεταξύ σαπερονών και υποστρωμάτων και παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την τελική τους έκκριση^{11, 35, 107}. Επίσης επικρατεί το μοντέλο πως ομόλογες πρωτεΐνες της EscN από το σύστημα τύπου III εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης ως

εξαμερή, όπου πιθανότατα αλληλεπιδρούν με άλλες μεμβρανο-σύνδετες πρωτεΐνες του συστήματος III, ενεργοποιώντας το^{32, 118-121}. Διερευνώντας λοιπόν το ρόλο της στην εκκριτική διαδικασία, πάντα σε σχέση με τα ήδη χαρακτηρισμένα υποστρώματα EspA και EspB και τη σαπερόνη τους, απομονώσαμε σε καθαρή μορφή το μονομερές της, το σταθερό εξαμερές της και έγινε μια πρώτη προσπάθεια βιοχημικού-λειτουργικού χαρακτηρισμού τους.

Έτσι αρχικά αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο καθαρισμού της EscN πρωτεΐνης, όπου το μόριο απομονώθηκε σε εξαιρετικά καθαρή μορφή και χωρίς την παρεμβολή ενός επιτόπου (tagless), αλλά παρά τη σταθεροποίησή του στο διάλυμα παρέμενε μονομερές, ενώ δεν μετρήθηκε ποτέ καταλυτική ενεργότητα.

Στην προσπάθεια λοιπόν να μπορέσουμε να βρούμε τρόπο να απομονώσουμε την ενεργή του μορφή, πιθανότατα ως εξαμερές, απομονώσαμε και το αμινο-τελικό GFP παράγωγο της πρωτεΐνης (His-GFP-EscN). Στο τέλος της διαδικασίας που περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 4.3 και 4.4, καταφέραμε να απομονώσουμε ένα ενεργό (σχήμα 4.9), σταθερό χρωματογραφικά, εξαμερές (σχήμα 4.8). Πιστεύουμε πως η επιτυχία της απομόνωσης σε διάλυμα του σταθερού εξαμερούς, οφείλεται στη σταθεροποίηση της N-τελικής περιοχής της EscN, τυχαία, λόγω της παρουσίας της δομημένης GFP υπομονάδας στο άκρο αυτό. Έχει προταθεί πως τα πρώτα 100 αμινοξέα της EscN και των ομόλογών της πρωτεϊνών, είναι ιδιαίτερα ευκίνητα στο διάλυμα, ενώ μπορεί και να εμπλέκονται στο σχηματισμό ολιγομερικών μορφών¹²². Επίσης, πολύ πρόσφατα, η EscN λύθηκε κρυσταλλογραφικά μόνο όμως όταν της είχαν αφαιρεθεί τα 100 πρώτα αμινοξέα³⁴. Στο κύτταρο είναι πολύ πιθανό η ασταθής N-περιοχή του μορίου να αλληλεπιδρά με άλλους πρωτεϊνικούς παράγοντες και να σταθεροποιείται¹¹⁸.

Η δράση των ATPασών για την έκκριση τύπου III, θεωρείται απαραίτητη και πολλές μελέτες γίνονται για τη διελεύκανση της λειτουργίας τους¹²³. Προς αυτή την κατεύθυνση διερευνήσαμε το ρόλο της EscN ATPάσης στον υπο-κυτταρικό εντοπισμό των υποστρωμάτων EspA και EspB. Απουσία της ATPάσης και τα δύο υποστρώματα εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική φάση του κυττάρου, δεν μπορούν να στοχευτούν σωστά δηλαδή στη μεμβράνη (σχήμα 4.11).

Ουσιώδες ρόλο στην στόχευση των υποστρωμάτων στην μεμβράνη διαδραματίζει και η C-ουρά, όπως φάνηκε από την ενότητα 3.6 της εργασίας αυτής. Δεν

αποκλείεται λοιπόν, σε συνέχεια με τα προηγούμενα, η CesAB σαπερόνη με το φορτίο της, να στοχεύεται κατευθείαν στην ΑΤΡάση μέσω της C-ουράς της. Με την απόλυτη μέθοδο μέτρησης συγγένειας μεταξύ δυο αντιδρώντων μορίων, την θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης, η συγγένεια του εξαμερούς της EscN με τη C-ουρά της CesAB υπολογίστηκε στα 50-70 μM , υποδηλώνοντας πως τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν. Είναι πιθανόν, πέρα από την C-ουρά, και το υπόλοιπο σώμα της σαπερόνης ή ακόμα και το ίδιο υπόστρωμα, το οποίο μπορεί αυτή να κουβαλά, να παίζουν ρόλο στην αναγνώριση και τελικά την πρόσδεση ΑΤΡάσης-σαπερόνης μέσα στο κύτταρο.

Ο προσδιορισμός της περιοχής πρόσδεσης (N-περιοχή) των υποστρωμάτων EspA και EspB πάνω στην πρωτεΐνη CesAB, όπως και του μηχανισμού συνεργατικής αναδίπλωσης κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης αυτής, μας έφερε ένα βήμα πιο κοντά στην κατανόηση της μοριακής βάσης της μετατόπισης των μεταθετών του συστήματος έκκρισης τύπου III. Διαπιστώθηκε ότι η CesAB μπορεί να δρα σε ένα πρώτο στάδιο ως σαπερόνη κρατώντας τον μεταθέτη EspA σε κατάσταση ικανή να εκκριθεί, ενώ σε ένα δεύτερο στάδιο ελέγχει την έκκριση και των δύο μεταθετών, μέσω της καρβοξυ-τελικής περιοχής της. Σε ένα τελικό στάδιο η ευέλικτη αυτή καρβοξυ-τελική περιοχή της CesAB μπορεί να αναγνωρίζεται από την ΑΤΡάση του συστήματος στη μεμβράνη, πριν ακριβώς από τη μετατόπιση των υποστρωμάτων. Δεν αποκλείεται σε όλη αυτή την διαδρομή από το κυτταρόπλασμα μέχρι την μεμβράνη για την τελική έξοδο, και άλλοι παράγοντες του συστήματος III να παίζουν ενεργό ρόλο και να πρέπει να διερευνηθούν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

Οι μοριακές τεχνικές εκτελέστηκαν με βάση τα εργαστηριακά εγχειρίδια : «Molecular Cloning» (J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis) και «Current Protocols in Molecular Biology» (F. Ausubel, R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith, K. Struhl). Στην παρούσα διατριβή για την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DH5α [F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ-] και διάφοροι πλασμιδιακοί φορείς από τη Novagen, NEB και Promega. Όλες οι κατασκευές DNA ελέγχθηκαν με ανάλυση περιοριστικών ενζύμων και αλληλούχιση.

6.1.1 Κλωνοποίηση των γονιδίων από το E2348/69 EPEC στέλεχος

His₆-CesAB : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη CesAB (O52124_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το κοσμίδιο pCVD462¹²⁴, χρησιμοποιώντας τον X345 (5' CGC GGA TCC G ATG ATG AGT ATT GTG AGC CAA ACA AG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *BamH* I και τον X346 (5' CCC AAG CTT TCA TAC TAT TTT TCT ATT ATT TCT ATT CCG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Hind* III. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 350 bp πέπτεται με τα *BamH* I - *Hind* III περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pETDuet-1, οπότε προκύπτει ο pIMBB585 πλασμιδιακός φορέας.

His₆-CesAB and EspA : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη EspA (Q47184_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το κοσμίδιο pCVD462¹²⁴, χρησιμοποιώντας τον X375 (5' GGC CAA TTG GGA TAC ATC AAC TAC AGC ATC AGT TG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Mun* I και τον X376 (5' GG GGT ACC TTA TTT ACC AAG GGA TAT TCC TG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια

περιοριστική θέση *Kpn* I . Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 578 bp πέπτεται με τα *Mun* I - *Kpn* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pETDuet-1, οπότε προκύπτει ο pIMBB648 πλασμιδιακός φορέας.

His₆-CesABΔC : το γονίδιο που κωδικοποιεί το έλλειμμα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης CesAB (O52124_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το κοσμίδιο pCVD462¹²⁴, χρησιμοποιώντας τον X345 (5' CGC GGA TCC G ATG ATG AGT ATT GTG AGC CAA ACA AG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Bam*H I και τον X431 (5' CCC AAG CTT TCA ACT CAG TGT CTC TAT TAG TTT TTC 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Hind* III. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 260 bp πέπτεται με τα *Bam*H I - *Hind* III περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pETDuet-1, οπότε προκύπτει ο pIMBB801 πλασμιδιακός φορέας.

His₆-CesABΔC and EspA : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη EspA (Q47184_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το κοσμίδιο pCVD462¹²⁴, χρησιμοποιώντας τον X375 (5' GGC CAA TTG GGA TAC ATC AAC TAC AGC ATC AGT TG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Mun* I και τον X376 (5' GG GGT ACC TTA TTT ACC AAG GGA TAT TCC TG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Kpn* I . Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 578 bp πέπτεται με τα *Mun* I - *Kpn* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pETDuet-1, οπότε προκύπτει ο pIMBB803 πλασμιδιακός φορέας.

CesAB: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη CesAB (O52124_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από τον πλασμιδιακό φορέα pIMBB585 (pETDuet-1 His₆-CesAB), χρησιμοποιώντας τον X453 (5' GCG CCC TA GCT AGC ATG AGT ATT GTG AGC CAA ACA AG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nhe* I και τον X346 (5' CCC AAG CTT TCA TAC TAT TTT TCT ATT ATT TCT ATT CCG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Hind* III. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 350 bp πέπτεται με τα *Nhe* I - *Hind* III περιοριστικά ένζυμα,

κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pASK-IBA7plus, οπότε προκύπτει ο pIMBB806 πλασμιδιακός φορέας.

CesABΔC: το γονίδιο που κωδικοποιεί το έλλειμμα της αγρίου τύπου πρωτεΐνης CesAB (O52124_ECOLX) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το pIMBB585 (pETDuet-1 His₆-CesAB), χρησιμοποιώντας τον X453 (5' GCG CCC TA GCT AGC ATG AGT ATT GTG AGC CAA ACA AG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nhe* I και τον X431 (5' CCC AAG CTT TCA ACT CAG TGT CTC TAT TAG TTT TTC 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Hind* III. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 260 bp πέπτεται με τα *Nhe* I - *Hind* III περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του πλασμιδιακού φορέα pASK-IBA7plus, οπότε προκύπτει ο pIMBB807 πλασμιδιακός φορέας.

His-TEV-EscN : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη EscN απομονώθηκε από το pIMBB487 (pET 16b His-EscN) μετά από πέψη με τα *Nde* I-*Bam*H I περιοριστικά ένζυμα και το κομμάτι 1.34 Kb που προέκυψε κλωνοποιήθηκε ξανά στις ίδιες θέσεις του pIMBB400 (pET 16b His-TEV), οπότε προκύπτει ο pIMBB609 πλασμιδιακός φορέας.

His-GFP-EscN : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη GFP απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το pEGFP-C1 χρησιμοποιώντας τους X170 (5'GGAATTCCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC TG3') και τον X234 (5' GGAATTCCATATGAGAGCCACCGCCAGAGCCACCGC CTCCGGA^{CTTGTACAGCTCGTCCATG} 3') εκκινητές, οι οποίοι εισάγουν από μια *Nde* I θέση περιορισμού. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 700 bp πέπτεται με το *Nde* I περιοριστικό ένζυμο, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB487, οπότε προκύπτει ο pIMBB512 πλασμιδιακός φορέας.

6.1.2 Κατασκευή των σημειακών μεταλλαγών στην CesAB πρωτεΐνη

Όλα τα μεταλλάγματα κατασκευάστηκαν με μεταλλοξογένεση σημείου (Quick-Change; Stratagene) using *PfuUltra*TM High Fidelity DNA polymerase).

His₆-CesAB(I17A): ο pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X564 (5' CTA TTA GAT AAA AAA **GCA** AGA TCA GAA ATT GAG 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X565 (5' CTC AAT TTC TGA TCT **TGC** TTT TTT ATC TAA TAG 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I17A) και ονομάστηκε pIMBB902.

His₆-CesAB(I28A): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X566 (5' GCG ATA AAA AAA ATA **GCC** GCC GAA TTT GAT GTC 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X567 (5' GAC ATC AAA TTC GGC **GGC** TAT TTT TTT TAT CGC 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I28A) και ονομάστηκε pIMBB903.

His₆-CesAB(I82A): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X568 (5' AAG ATT GAA AAA CTA **GCA** GAG ACA CTG AGT CCA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X569 (5' TGG ACT CAG TGT CTC **TGC** TAG TTT TTC AAT CTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I82A) και ονομάστηκε pIMBB904.

His₆-CesAB(K25C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X570 (5' GAA ATT GAG GCG ATA **TGC** AAA ATA ATC GCC GAA 3')) ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X571 (5' TTC GGC GAT TAT TTT **GCA** TAT CGC CTC AAT TTC 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(K25C) και ονομάστηκε pIMBB905.

His₆-CesAB(S37C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X572 (5' GAT GTC GTA AAA GAA **TGC** GTT AAT GAG TTA AGT 3')) ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X573 (5' ACT TAA CTC ATT AAC **GCA** TTC TTT TAC GAC ATC 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(S37C) και ονομάστηκε pIMBB906.

His₆-CesAB(K46C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X574 (5' TTA AGT GAA AAA GCA **TGC** ACA GAT CCT CAG GCG 3')) ήταν ο εμπρόσθιος

εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X575 (5' CGC CTG AGG ATC TGT **GCA** TGC TTT TTC ACT TAA 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(K46C) και ονομάστηκε pIMBB907.

His₆-CesAB(T84C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X576 (5' GAA AAA CTA ATA GAG **TGC** CTG AGT CCA GCA AGA 3')) ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X577 (5' TCT TGC TGG ACT CAG **GCA** CTC TAT TAG TTT TTC 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(T84C) και ονομάστηκε pIMBB908.

His₆-CesAB(E20I): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X602 (5' AAA AAA ATA AGA TCA **ATA** ATT GAG GCG ATA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X603 (5' TTT TAT CGC CTC AAT **TAT** TGA TCT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E20I) και ονομάστηκε pIMBB909.

His₆-CesAB(E20L): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X604 (5' AAA AAA ATA AGA TCA **TTA** ATT GAG GCG ATA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X605 (5' TTT TAT CGC CTC AAT **TAA** TGA TCT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E20L) και ονομάστηκε pIMBB910.

His₆-CesAB(E30I): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X695 (5' AAA AAA ATA ATC GCC **ATA** TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X701 (5' TTT TAC GAC ATC AAA **TAT** GGC GAT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E30I) και ονομάστηκε pIMBB990.

His₆-CesAB(E30L): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X702 (5' AAA AAA ATA ATC GCC **TTA** TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X703 (5' TTT TAC GAC ATC AAA **TAA** GGC GAT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E30L) και ονομάστηκε pIMBB982.

His₆-CesAB(S2C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X774 (5' AGC CAG GAT CCG ATG **TGC** ATT GTG AGC CAA ACA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X775 (5' TGT TTG GCT CAC AAT **GCA** CAT

CGG ATC CTG GCT 3' ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(S2C) και ονομάστηκε pIMBB1061.

His₆-CesAB(S5C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X776 (5' CCG ATG AGT ATT GTG TGC CAA ACA AGA AAT AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X777 (5' TTT ATT TCT TGT TTG GCA CAC AAT ACT CAT CGG 3' ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(S5C) και ονομάστηκε pIMBB1062.

His₆-CesAB(R8C): pIMBB585 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X778 (5' ATT GTG AGC CAA ACA TGC AAT AAA GAA CTA TTA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X779 (5' TAA TAG TTC TTT ATT GCA TGT TTG GCT CAC AAT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(R8C) και ονομάστηκε pIMBB1063.

His₆-CesAB(E20L/E30I): pIMBB910 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X695 (5' AAA AAA ATA ATC GCC ATA TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X701 (5' TTT TAC GAC ATC AAA TAT GGC GAT TAT TTT TTT 3' ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E20L/E30I) και ονομάστηκε pIMBB990.

His₆-CesAB(E20L/E30L): pIMBB910 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X702 (5' AAA AAA ATA ATC GCC TTA TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X703 (5' TTT TAC GAC ATC AAA TAA GGC GAT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E20L/E30L) και ονομάστηκε pIMBB1020.

CesAB(E20L/E30L): pIMBB962 (pASK-IBA7 plus CesABE20L) χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X702 (5' AAA AAA ATA ATC GCC TTA TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X703 (5' TTT TAC GAC ATC AAA TAA GGC GAT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιαδικός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την CesAB(E20L/E30L) και ονομάστηκε pIMBB1064.

His₆-CesAB(I17A/I28A): pIMBB903 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X564 (5' CTA TTA GAT AAA AAA GCA AGA TCA GAA ATT GAG 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X565 (5' CTC AAT TTC TGA TCT TGC TTT

TTT ATC TAA TAG 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I17A/I28A) και ονομάστηκε pIMBB913.

His₆-CesAB(I28A/I82A): pIMBB903 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X568 (5' AAG ATT GAA AAA CTA **GCA** GAG ACA CTG AGT CCA 3' ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X569 (5' TGG ACT CAG TGT CTC **TGC** TAG TTT TTC AAT CTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I28A/I82A) και ονομάστηκε pIMBB914.

His₆-CesAB(I17A/I82A): pIMBB903 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X568 (5' AAG ATT GAA AAA CTA **GCA** GAG ACA CTG AGT CCA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X569 (5' TGG ACT CAG TGT CTC **TGC** TAG TTT TTC AAT CTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I17A/I82A) και ονομάστηκε pIMBB927.

His₆-CesAB(I17A/I28A/I82A): pIMBB913 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X568 (5' AAG ATT GAA AAA CTA **GCA** GAG ACA CTG AGT CCA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X569 (5' TGG ACT CAG TGT CTC **TGC** TAG TTT TTC AAT CTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(I17A/I28A/I82A) και ονομάστηκε pIMBB928.

His₆-CesAB(E20L/E30L) και EspA: pIMBB912 χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, X702 (5' AAA AAA ATA ATC GCC **TTA** TTT GAT GTC GTA AAA 3') ήταν ο εμπρόσθιος εκκινητής που έφερε τη μεταλλαγή και X703 (5' TTT TAC GAC ATC AAA **TAA** GGC GAT TAT TTT TTT 3') ήταν ο αντίστροφος. Ο πλασμιδιακός φορέας που προέκυψε μπορούσε να εκφράζει την His₆-CesAB(E20L/E30L)-EspA και ονομάστηκε pIMBB980.

6.1.3 Κλωνοποίηση των γονιδίων από το στέλεχος *Salmonella typhimurium*

His₆-SseA : το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη SseA (O84944_SALTY) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το χρωμόσωμα της *Salmonella typhimurium* (SJW1103)¹²⁵, χρησιμοποιώντας τον X608 (5' CGC GGA TCC G ATG ATG ATA AAG AAA AAG GCT GCG 3') ως εμπρόσθιο

εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *BamH* I και τον X609 (5' CCC AAG CTT TTA CCT TTT TTG TTT TCC TGA CGG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Hind* III Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 327 bp πέπτεται με τα *BamH* I - *Hind* III περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pETDuet-1, οπότε προκύπτει ο pIMBB957 πλασμιδιακός φορέας.

His-TEV-SseB: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη SseB (Q7BVH7_SALTY) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το χρωμόσωμα της *Salmonella typhimurium* (SJW1103)¹²⁵, χρησιμοποιώντας τον X610 (5' GGG AAT TC CAT ATG TCT TCA GGA AAC ATC TTA TGG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nde* I και τον X611 (5' CCG CTC GAG TCA TGA GTA CGT TTT CTG CGC TAT C 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Xho* I. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 591 bp πέπτεται με τα *Nde* I - *Xho* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB400 (pET16b TEV) οπότε προκύπτει ο pIMBB937 πλασμιδιακός φορέας.

His-TEV-SseD: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη SseD (Q9R803_SALTY) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το χρωμόσωμα της *Salmonella typhimurium* (SJW1103)¹²⁵, χρησιμοποιώντας τον X612 (5' GGG AAT TC CAT ATG GAA GCG AGT AAC GTA GCA CTG G 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nde* I και τον X613 (5' CCG CTC GAG TTA CCT CGT TAA TGC CCG GAG TAT TTC 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Xho* I. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 588 bp πέπτεται με τα *Nde* I - *Xho* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB400 (pET16b TEV) οπότε προκύπτει ο pIMBB938 πλασμιδιακός φορέας.

His₆-SseA and SseB: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη SseB (Q7BVH7_SALTY) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το χρωμόσωμα της *Salmonella typhimurium* (SJW1103)¹²⁵, χρησιμοποιώντας τον X610 (5' GGG AAT TC CAT ATG TCT TCA GGA AAC ATC TTA TGG 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nde* I και τον X611 (5' CCG CTC GAG TCA TGA GTA CGT TTT CTG CGC TAT C 3') ως αντίστροφο

εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Xho* I. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 591 bp πέπτεται με τα *Nde* I - *Xho* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB957, οπότε προκύπτει ο pIMBB958 πλασμιδιακός φορέας.

His₆-SseA and SseD: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη SseD (Q9R803_SALTY) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) από το χρωμόσωμα της *Salmonella typhimurium* (SJW1103)¹²⁵, χρησιμοποιώντας τον X612 (5' GGG AAT TC CAT ATG GAA GCG AGT AAC GTA GCA CTG G 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Nde* I και τον X613 (5' CCG CTC GAG TTA CCT CGT TAA TGC CCG GAG TAT TTC 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Xho* I. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 588 bp πέπτεται με τα *Nde* I - *Xho* I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB957, οπότε προκύπτει ο pIMBB959 πλασμιδιακός φορέας.

6.1.4 Κλωνοποίηση των γονιδίων από το στέλεχος *Edwardsiella tarda*

His-TEV-EscC: το γονίδιο που κωδικοποιεί την αγρίου τύπου πρωτεΐνη EscC (Q4G4C7_EDWTA) απομονώθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) από τον πλασμιδιακό φορέα pETEscC¹⁰¹, χρησιμοποιώντας τον X614 (5' CGC GGA TCC G ATG AGC CAA CAC GCC ATC CAT CCC C 3') ως εμπρόσθιο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μία περιοριστική θέση *Bam*H I και τον X615 (5' CCC AAG CTT TTA GAT GAA GTC ATG CCC GAT CGT CG 3') ως αντίστροφο εκκινητή, ο οποίος εισάγει μια περιοριστική θέση *Xho* I. Το παραγόμενο PCR κομμάτι μεγέθους 345 bp πέπτεται με τα *Bam*H I – *Hind* III I περιοριστικά ένζυμα, κλωνοποιείται στις αντίστοιχες θέσεις του pIMBB804, οπότε προκύπτει ο pIMBB935 πλασμιδιακός φορέας.

6.2 Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή βρίσκονται συγκεντρωμένα στον πίνακα 1 που ακολουθεί :

Πίνακας 1

Βακτηριακό Στέλεχος	Περιγραφή	Αναφορά
E2348/69	Wild-type EPEC O127:H6 isolated from an outbreak in Taunton, UK	¹²⁶
DF1358	E2348/69 <i>cesAB</i>	⁸⁷
SJW1103	Wild-type Salmonella <i>typhimurium</i>	¹²⁵
CVD452	E2348/69 <i>escN</i>	Jarvis, K. G. et al, 1995
UMD872	E2348/69 <i>espA</i>	Kenny <i>et al.</i> (1996)
UMD864	E2348/69 <i>espB</i>	Donnenberg <i>et al.</i> (1993)
JM109(DE3)/pLysS	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysS(cm ^R)	Promega

6.3 Έκφραση και απομόνωση πρωτεϊνών

Για την απομόνωση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου σε κατάλληλο φορέα έκφρασης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κυρίως το pET σύστημα. Ένας pET φορέας είναι ένα βακτηριακό πλασμίδιο σχεδιασμένο να βοηθά τη γρήγορη παραγωγή μεγάλης ποσότητας οποιασδήποτε πρωτεΐνης, όταν τεθεί σε λειτουργία. Το πλασμίδιο αυτό φέρει κάποια πολύ σημαντικά χαρακτηριστικά –γονίδιο *lac I* που κωδικοποιεί για το *lac* καταστολέα, T7 υποκινητή που είναι ειδικός μόνο για την T7 RNA πολυμεράση (μη βακτηριακή), *lac*

χειριστή που μπορεί να μπλοκάρει τη μεταγραφή, έναν πολυσυνδέτη, f1 σινιάλο έναρξης της αντιγραφής, γονίδιο αντίστασης στην αμπικιλίνη και ColE1 σινιάλο έναρξης της αντιγραφής. Για να αρχίσει η διαδικασία, το υπό μελέτη γονίδιο κλωνοποιείται στον pET φορέα στην περιοχή του πολυσυνδέτη. Όταν η T7 RNA πολυμεράση είναι παρούσα και ο χειριστής δε βρίσκεται σε καταστολή, η μεταγραφή του γονιδίου προχωρά με πολύ γρήγορο ρυθμό. Επειδή ο T7 είναι ιικός υποκινητής μπορεί να μεταγράφει πολύ γρήγορα και ανεξέλεγκτα, αρκεί η T7 RNA πολυμεράση να είναι παρούσα. Η έκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης αυξάνει, όσο αυξάνει και το μεταγραφόμενο mRNA. Μέσα σε λίγες ώρες η πρωτεΐνη αυτή θα αποτελεί το κύριο συστατικό του κυττάρου. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει το μετασχηματισμό του πιο πάνω πλασμιδιακού φορέα στον κατάλληλο βακτηριακό ξενιστή που φέρει το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης του φάγου στο γένωμά του (λDE3), το οποίο επίσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο του *lac* υποκινητή και χειριστή.

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

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

6.3.1 Καθαρισμός των His-πρωτεϊνών με Ni²⁺-NTA χρωματογραφία συγγένειας

Όλες οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο. Ο επίτοπος αυτός έχει ένα τεράστιο πλεονέκτημα που αφορά την εύκολη και γρήγορη απομόνωση της πρωτεΐνης σε καθαρή μορφή με τη μέθοδο της χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA. Η ρητίνη που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, περιέχει αγαρόζη ως προσροφητικό υλικό, το οποίο συνδέεται με το νικέλιο μέσω του νιτριλο-τριοξικού οξέος (NTA) που φέρει τρία καρβονύλια. Το NTA καταλαμβάνει 4 από τις 6 θέσεις σύνδεσης υποκαταστάτη στη σφαίρα συναρμογής του ιόντος Ni²⁺, αφήνοντας δύο θέσεις ελεύθερες να αλληλεπιδράσουν με τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο των προς καθαρισμό πρωτεϊνών. Έτσι τρία ιόντα Ni²⁺ αντιστοιχούν σε κάθε πρωτεϊνικό μόριο που φέρει 6 ιστιδίνες σε ένα από τα άκρα του. Η ρητίνη χρωματογραφίας θα κρατήσει μόνο την πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο και η τυχόν μη ειδική σύνδεση των μεμονωμένων ιστιδινών από άλλες πρωτεΐνες σχεδόν εξαλείφεται με τις εκπλύσεις της ρητίνης με ιμιδαζόλιο.

Πιο συγκεκριμένα πλασμιδιακοί φορείς που εκφράζουν την CesAB και την CeABΔC από το *E.coli*, την SseA από την *Salmonella typhimurium*, την EscC και EseB-EscC από την *Edwardsiella tarda*, πάντα με τον εξαϊστιδινυλικό επίτοπο στο αμινοτελικό άκρο τους, μετασχηματίστηκαν σε JM109DE3/*plysS* βακτηριακά κύτταρα. Βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας αναπτύχθηκαν στους 30°C και η πρωτεϊνική σύνθεση ξεκίνησε με την προσθήκη IPTG (0.2mM, A₆₀₀=0.5, 3 ώρες, 30°C). Με το τέλος της τρίωρης επαγωγής τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (6.000g/10 λεπτά/4⁰ C) και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα A (50 mM Tris-HCl, pH:8.0, 1 M NaCl, 30 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v). Στο διάλυμα των κυττάρων προστίθεται ο PMSF αναστολέας των πρωτεασών σε τελική συγκέντρωση 2 mM. Ακολουθεί ρήξη των κυττάρων με ηχοβολισμό (10×3', συνολικά 30 λεπτά, 4⁰ C), κατεβάζοντας σε κάθε στάδιο τη θερμοκρασία του κυτταρικού διαλύματος με ανάδευση σε διάλυμα αιθανόλης/ξηρού πάγου. Κατόπιν απομακρύνονται τα μεγάλα θραύσματα, όπως και τα άσπαστα κύτταρα με φυγοκέντρηση (100.000g/30 λεπτά/ 4⁰ C). Συλλέγουμε το υπερκείμενο και το φορτώνουμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιέχει την ρητίνη Ni²⁺-NTA, προεξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος A, ρυθμίζοντας το

ρυθμό ροής ώστε αυτός να μην ξεπερνά το 1ml/min. Συλλέγουμε το διάλυμα που διαπερνά τη ρητίνη (Flow Through, FT) και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος A. Οι εκπλύσεις στη συνέχεια συνεχίζονται με 5 όγκους του διαλύματος B με χαμηλή περιεκτικότητα αλατιού (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM ιμιδαζόλιο, 10% γλυκερόλη v/v) και τελικά η πρωτεΐνη εκλύεται με 5 όγκους διαλύματος με 600 mM ιμιδαζόλιο. Η συλλογή των κλασμάτων έκλυσης γίνεται συνήθως σε μισό όγκο από αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί ανάλυση της καθαρότητας των δειγμάτων με SDS-PAGE, όπου τελικά τα δείγματα έκλυσης με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ενώνονται. Τα ενωμένα κλάσματα υπόκεινται πρώτα σε 12ωρη διαπίδυση ενάντια στο κατάλληλο διάλυμα (50 mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% γλυκερόλη v/v) και στην συνέχεια αποθηκεύονται σε διάλυμα 50mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50% γλυκερόλη v/v. His-CesAB(E20L), His-CesAB(E20L/E30L), His-CesAB (αγρίου τύπου, το έλλειμμα CeABAC ή τα μεταλλάγματα E20L, E20L/E30L) σε σύμπλοκο με την EspA ή την EspB, όπως και η *Salmonella* SseA σε σύμπλοκο με την SseB απομονώθηκαν όπως παραπάνω με τις ακόλουθες τροποποιήσεις : Το διάλυμα A περιείχε 5 mM ιμιδαζόλιο, το διάλυμα B περιείχε 10 mM ιμιδαζόλιο και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν με 150 mM ιμιδαζόλιο.

6.3.2 Καθαρισμός της His-TEV-EscN

Το βακτηριακό στέλεχος JM109DE3/*plysS*/ pET16b His TEV EscN αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.3-0.4 (OD₅₅₀) στους 30⁰ C. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώθηκε στους 18⁰ C και όταν τα κύτταρα έφτασαν σε οπτική πυκνότητα 0.6-0.7 (OD₅₅₀), η έκφραση της πρωτεΐνης επάχθηκε με 0.05 mM IPTG για 12 ώρες στους 18⁰ C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα Γ (50 mM Tris pH8.0, 0.5 M NaCl, 20% γλυκερόλη v/v, 10 mM β-

μερκαπτοαιθανόλη, 2 mM PMSF, 5 mM ιμιδαζόλιο). Ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με ηχοβολισμό και υπερφυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος. Συλλέξαμε το υπερκείμενο που προέκυψε από αυτή την φυγοκέντρηση και το φορτώσαμε στην κολώνα χρωματογραφίας που περιείχε τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, προεξισορροπημένη με 10 όγκους διαλύματος Γ, ρυθμίζοντας το ρυθμό ροής ώστε αυτός να μην ξεπερνά το 1ml/min. Συλλέξαμε το διάλυμα που διαπέρασε τη ρητίνη (Flow Through, FT) και ακολούθησε έκπλυση της ρητίνης με 25 όγκους διαλύματος Γ. Οι εκπλύσεις στη συνέχεια συνεχίστηκαν με 15 όγκους του διαλύματος Δ με χαμηλή περιεκτικότητα αλατιού (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 5 mM ιμιδαζόλιο, 20% γλυκερόλη v/v), 5 όγκους του διαλύματος Ε (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 25 mM ιμιδαζόλιο, 20% γλυκερόλη v/v) και τελικά η πρωτεΐνη εκλούστηκε με 5 όγκους διαλύματος με 400 mM ιμιδαζόλιο. Η συλλογή των κλασμάτων έκλυσης γινόταν συνήθως σε μισό όγκο από αυτόν της ρητίνης και ακολουθεί ανάλυση της καθαρότητας των δειγμάτων με SDS-PAGE, όπου τελικά τα πιο συγκεντρωμένα δείγματα ενώνονται και υπόκεινται σε 12ώρη διαπίδυση σε διάλυμα 20% γλυκερόλη, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT.

Μετά τη διαπίδυση το δείγμα ποσοτικοποιήθηκε με την μέθοδο Bradford και χρησιμοποιήθηκε η HisTEV πρωτεάση με αναλογία μάζας 1/6 (για παράδειγμα για κάθε 24 mg His-TEV-EscN χρησιμοποιήσαμε 4 mg HisTEV πρωτεάση). Ακολούθησε επώαση της His-TEV-EscN με την πρωτεάση στους 4⁰ C και σε ενδιάμεσα χρονικά διαστήματα (κάθε 6 ώρες) ελέγξαμε την αποτελεσματικότητα της δράσης της πρωτεάσης σε 10% SDS-PAGE. Η αναγνώριση και το κόσμιμο της TEV αλληλουχίας από την πρωτεάση οδηγεί σε μείωση της μάζας της πρωτεΐνης (κατά 5 KDa περίπου) και επομένως διαφορετική κινητικότητα της πρωτεολυμένης σε σχέση με την άθικτη πρωτεΐνη. Φυσιολογικά μετά από 24 ώρες καταλήγουμε με περίπου 100% μορίων που έχουν πρωτεολυθεί.

Στο επόμενο βήμα η EscN πρωτεΐνη, χωρίς τον His-επίτοπο, αφού προσθέσουμε στο δείγμα 5 mM MgCl₂ και 1 mM DTT, φορτώθηκε σε ρητίνη χρωματογραφίας Ni²⁺-NTA ξανά (χρησιμοποιήσαμε περίπου 1 ml ρητίνης για κάθε 5 mg HisTEV πρωτεάσης). Συλλέξαμε το υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη, γιατί στην

περίπτωση αυτή περιείχε την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Ακολούθησε έκπλυση της ρητίνης με 2 όγκους κολώνας του διαλύματος 20% γλυκερόλη, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT και τελικά έγινε έκλυση των πρωτεϊνών που παρέμειναν πάνω στη ρητίνη με το προηγούμενο διάλυμα που περιείχε 400 mM ιμιδαζόλιο.

Στο τελικό στάδιο ακολούθησε αρνητική χρωματογραφία σε ρητίνη Q. Έτσι το υλικό που διαπέρασε τη ρητίνη στο προηγούμενο στάδιο συλλέχθηκε και αφού επώαστηκε για 10 λεπτά με 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε 20 mM MgCl₂ φορτώθηκε σε στήλη που περιείχε την ρητίνη Q. Η EscN πρωτεΐνη διαπέρασε την κολώνα και συλλέχθηκε σε εξαιρετικά καθαρή μορφή. Μπορεί να γίνει έκπλυση της κολώνας και τελική έκλυση με διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι για να ολοκληρωθεί η εικόνα του καθαρισμού αυτού.

6.3.3 Καθαρισμός της His-GFP-EscN

Το βακτηριακό στέλεχος JM109DE3/*plysS*/ pET16b His GFP EscN αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.3-0.4 (OD₅₅₀) στους 30^o C. Ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, όπως ακριβώς και στην παραπάνω ενότητα (0.05 mM IPTG, 18^o C, 12ώρες) και συλλογή του κυτταρικού ιζήματος. Αυτό επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα Z (50 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 10% γλυκερόλη v/v, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 5 mM ιμιδαζόλιο) συν 4 mM PMSF και 1 mM EDTA (1 ml/1gr κυττάρων), τα κύτταρα διαρρήγηθηκαν με την πρέσα French λόγω πίεσης και υπερφυγοκεντρήθηκαν (100.000 g/30 λεπτά/ 4^o C). Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αυτής αραιώθηκε δύο φορές με διάλυμα Z και τελικά φορτώθηκε σε ρητίνη Ni²⁺-NTA, η οποία έχει προεξισορροπηθεί με 10 όγκους διαλύματος Z. Συλλέξαμε το διάλυμα που διαπέρασε τη ρητίνη (Flow Through, FT) και ακολούθησε έκπλυση της ρητίνης με 10 όγκους διαλύματος Z. Οι εκπλύσεις συνεχίστηκαν με 5 όγκους διαλύματος χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι (100 mM αντί για 1 M) και τελικά η πρωτεΐνη εκλούστηκε με 500 mM ιμιδαζόλιο.

Η πρωτεΐνη που εκλούστηκε στο προηγούμενο βήμα, φορτώθηκε εκ νέου σε ρητίνη Q, η οποία έχει εξισορροπηθεί με διάλυμα 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl,

10% γλυκερόλη v/v. Αφού συλλέξαμε το FT, έγινε εκτενής έκπλυση της κολώνας με 30 όγκους του διαλύματος εξισορρόπησης και τελικά η His-GFP-EscN εκλούστηκε με διάλυμα υψηλής περιεκτικότητας αλατιού όχι μόνο σε καθαρή μορφή, αλλά και ως σταθερό εξαμερές.

Όλα τα στάδια του καθαρισμού πάνω στη ρητίνη Q μπορούν να κρατηθούν και να χαρακτηριστούν με χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε Superdex 200 HR 10/30. Η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης των διαφόρων ολιγομερών της His-GFP-EscN (διμερές, τετραμερές, εξαμερές) για τον ανιοντοανταλλάκτη Q μας έδωσε τη δυνατότητα ενός καλού διαχωρισμού των μορφών αυτών απλά και μόνο με τη χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων αλατιού.

6.4 Παραγωγή και καθαρισμός αντισωμάτων έναντι σε διαλυτές πρωτεΐνες του T3S

Οι πρωτεΐνες CesAB, EspA και EspB απομονώθηκαν σε εξαιρετικά καθαρή μορφή (καθαρότητα>95%) και χρησιμοποιήθηκαν ως αντιγόνα για την ανοσοποίηση κουνελιών (Davids Biotechnology, Germany). Μετά από τη διαδικασία παραγωγής των πολυκλωνικών αντισωμάτων, ο τίτλος του κάθε ορού ελέγχθηκε με διαδοχικές αραιώσεις σε 0.1 μg καθαρής πρωτεΐνης. Σε όλες τις περιπτώσεις ο τίτλος του αντισώματος κρίθηκε ικανοποιητικός (>1/100000), όχι όμως και απόλυτα ειδικός. Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε μια επιπλέον διαδικασία ανοσοπροσρόφησης των μη-ειδικών αντισωμάτων που περιείχε ο κάθε ορός και μόνο ο καθαρισμένος ορός χρησιμοποιήθηκε για όλες τις περιπτώσεις ανοσοανίχνευσης στη διατριβή αυτή. Η διαδικασία της αρνητικής ανοσοπροσρόφησης, όπως ονομάστηκε, περιελάμβανε την απομόνωση του μεμβρανικού τμήματος κυττάρων EPEC που δεν περιείχαν CesAB, EspA ή EspB και επώαση των μεμβρανών αυτών με τους αντίστοιχους ορούς. Η μεμβράνες ανανεώνονταν κάθε 4-6 ώρες και η διαδικασία της απορρόφησης διαρκεί 3 μέρες στους 4⁰ C.

6.5 Μελέτη καθαρότητας, μεγέθους και ολιγομερικής μορφής μιας πρωτεΐνης και προσδιορισμός της αμινοξικής της αλληλουχίας

6.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά με βάση το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πρωτεϊνικό μίγμα αρχικά επεξεργάζεται με ένα διάλυμα SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), ένα ανιονικό απορρυπαντικό το οποίο σπάει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και οι πρωτεΐνες του μίγματος αποδιατάσσονται. Επίσης β-μερκαπτοαιθανόλη ή και DTT προστίθενται στο μίγμα ώστε να διασπαστούν και οι τυχόν δισουλφιδικοί δεσμοί. Περίπου ένα μόριο SDS αντιστοιχεί σε κάθε δύο αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεϊνικής αλυσίδας, οπότε τελικά καταλήγουμε σε ένα σύμπλοκο SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης με μεγάλο αρνητικό φορτίο, το οποίο κατά προσέγγιση είναι αναλογικό του μοριακού βάρους της κάθε πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται με βάση τα πρωτόκολλα της BIORAD.

6.5.2 Ανίχνευση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό ή μη πήκτωμα ακρυλαμίδης

6.5.2.1 Χρώση Coomassie Blue

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

6.5.2.2 Χρώση Blue Silver

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

6.5.2.3 Ανίχνευση πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης από αντισώματα (western blot)

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της BIORAD. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυκλωνικά αντισώματα που παράγονται από κουνέλια και καθαρίστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 6.4. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι α-rabbit IgGs και είναι συζευγμένα με το ένζυμο της HRP (Horseradish peroxidase) το οποίο οξειδώνει το peracid salt (παρουσία λουμινόλης), γεγονός που οδηγεί σε μια ανώτερη οξειδωτική κατάσταση της ομάδας αίμης του HRP ενζύμου. Καθώς το μόριο επιστρέφει στην κατώτερη ενεργειακά κατάσταση παράγονται ρίζες λουμινόλης, εκλύεται φως (χημειοφωταύγεια), η μεμβράνη μαυρίζει και ανιχνεύονται έτσι μόνο οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζονται από το πρώτο αντίσωμα. Στην διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο του ECL (Enhanced Chemiluminescence) από την Pierce.

6.5.3 Αμινοτελική αλληλούχιση των p9 και p12 πεπτιδίων της CesAB

Περιορισμένη τρυψινόλυση των καθαρών His-CesAB και His-CesAB/EspA πραγματοποιήθηκε, όπως ακριβώς αναλύεται στην ενότητα 6.6.1 και τα δείγματα απενεργοποιήθηκαν μετά από 2.5 και 10 λεπτά για την His-CesAB και 12 λεπτά για την His-CesAB/EspA, έτσι ώστε, το p12 και p9 πεπτίδιο για την CesAB μόνη της και το p9 πεπτίδιο για το σύμπλοκο αντίστοιχα να είναι οι πιο εμπλουτισμένες ζώνες. Τα δείγματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με 5.5 M ουρία- 18% SDS-PAGE και εν συνεχεία οι πρωτεϊνικές ζώνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη ProBlott, ειδική για αλληλούχιση (Applied Biosystems, USA). Το διάλυμα της μεταφοράς είναι 10 mM CAPS, pH 11 σε 10% μεθανόλη. Οι πρωτεϊνικές ζώνες, οι οποίες μεταφέρθηκαν στη μεμβράνη ProBlott ανιχνεύτηκαν με χρώση 0.1 % Coomassie brilliant Blue R-250 σε 40% μεθανόλη/1 % οξικού οξέος. Τα πεπτίδια του ενδιαφέροντος σημειώθηκαν πάνω στη μεμβράνη και στάλθηκαν για N-τελική αλληλούχιση στην εταιρεία Alta Bioscience (University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, UK).

6.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης (εγγενής ηλεκτροφόρηση, NATIVE-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών απουσία SDS, τόσο από το διάλυμα φορτώματος, όσο και από το διάλυμα τρεξίματος, καλείται μη αποδιατακτική ή εγγενής ηλεκτροφόρηση. Στην περίπτωση αυτή οι πρωτεΐνες μετακινούνται με βάση το υδροδυναμικό τους μέγεθος, αλλά και το φορτίο τους, σε αντίθεση με την SDS-ηλεκτροφόρηση, όπου η κινητικότητα μιας πρωτεΐνης είναι καθαρό αποτέλεσμα μόνο της μοριακής της μάζας. Η κινητήρια δύναμη στην περίπτωση της εγγενούς ηλεκτροφόρησης είναι το ενδογενές φορτίο της πρωτεΐνης στο pH του διαλύματος τρεξίματος. Το φορτίο αυτό θα εξαρτάται προφανώς τόσο από το αμινοξικό περιεχόμενο όσο και από τις τυχόν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης, για παράδειγμα την προσθήκη σιαλικών οξέων. Εφόσον η πρωτεΐνη διατηρεί τη φυσιολογική της διαμόρφωση, το υδροδυναμικό της μέγεθος και επομένως η κινητικότητά της μέσα στο πήκτωμα θα ποικίλλει ανάλογα με τη διαμόρφωση αυτή (π.χ. αυξημένη κινητικότητα για τις πιο συμπαγείς μορφές και ελαττωμένη για τις μεγαλύτερες δομές). Εφόσον λοιπόν η ηλεκτροφόρηση αυτού του τύπου διεξαχθεί κοντά σε ουδέτερο pH για την αποφυγή αλκαλικής ή όξινης αποδιάταξης, τότε δύναται η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της διαμόρφωσης, ολιγομερισμού, συσσωμάτωσης ή και αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες.

6.5.5 Σκέδαση φωτός laser πολλαπλής γωνίας (Multi-angle Laser Light Scattering, MALLS)

Καθαρισμένες πρωτεΐνες (5 mg/ml, 200 μ l φόρτωμα) χρωματογραφήθηκαν σε μία Superdex 200 HR 10/30 πακεταρισμένη κολώνα μοριακής διήθησης (GE Healthcare), η οποία είχε εξισορροπηθεί με διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 0.3 M KCl και ο ρυθμός ροής ήταν 0.8 ml/min. Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε συνδέεται σε ένα σύστημα HPLC (LCD-10AD VP; Shimadzu), το οποίο τρέχει το CLASS-VP software (version : 6.14 SP 2A) και είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (Shimadzu, SPD-M10A VP), ο οποίος μετράει στα 280 nm, ένα ανιχνευτή του δείκτη διάθλασης (Shimadzu, RID-10A), ενώ συνδέεται σε σειρά με ανίχνευση μάζας από έναν ανιχνευτή σκέδασης του φωτός laser από 18 γωνίες (Dawn-EOS; Wyatt). Τα δεδομένα

αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Astra (ASTRA 5.3.2.1.5), ενώ όλες οι μετρήσεις έγιναν στους 25⁰ C.

6. 6 Μελέτη δομικής σταθερότητας πρωτεϊνών στο διάλυμα

6.6.1 Περιορισμένη τρυψινόλυση

Η τρυψινόλυση χρησιμοποιείται στη διατριβή αυτή ως μέθοδος για την ταυτοποίηση δομικών υπο-περιοχών της CesAB σαπερόνης, αλλά και για τη μελέτη των περιοχών της πρωτεΐνης που επηρεάζονται παρουσία του υποστρώματος EspA. Η ειδικότητα της τρυψίνης να προσβάλλει μόνο λυσίνες ή αργινίνες και η χρήση κατάλληλων συνθηκών στις οποίες επιλέγεται να δρα η πρωτεάση, μας επιτρέπει να εστιάσουμε σε πρωτεολυτικά κομμάτια που δημιουργούνται ή εξαφανίζονται παρουσία του υποστρώματος και να βγάλουμε συμπεράσματα για το ποιες περιοχές επηρεάζονται έμμεσα ή άμεσα. Το πρωτεολυτικό πρότυπο της CesAB μόνης της ή σε σύμπλοκο με την EspA κατά την τρυψινόλυσή της αποτελεί ένα είδος ταυτότητας καθώς οι ζώνες πεπτιδίων είναι πάντα οι ίδιες κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Πιο συγκεκριμένα η αντίδραση περιείχε 1 mg/ml His-CesAB ή His-CesAB/EspA σε 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl, 2 mM DTT στους 4⁰ C. Η περιορισμένη τρυψινόλυση ξεκίνησε με την προσθήκη 0.5 mg/ml τρυψίνης (Pierce) και σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία (2.5, 5, 10 και 15 λεπτά) ένα δείγμα αφαιρούνταν, το οποίο απενεργοποιήθηκε με την προσθήκη 50 mM Pefabloc (Pierce) στους 4⁰ C. Σε κάθε απενεργοποιημένο δείγμα προστέθηκε 0.17 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) γλυκερόλη, 0.02 % (w/v) bromophenol blue και 3.5% (w/v) SDS. Τελικά τα δείγματα αναλύθηκαν σε 5.5 M urea-18% SDS-PAGE και τα πεπτίδια ανιχνεύτηκαν με Coomassie blue.

6.7 Βιοχημικές διαδικασίες

6.7.1 Μέτρηση της δραστικότητας ATPάσης της His-GFP-EscN

Η οικογένεια των EscN πρωτεϊνών περιλαμβάνει την EscN (EPEC και EHEC), την YscN (*Yersinia spp.*, 50% ομοιότητα με την EscN), την HrcN (*Pseudomonas syringae*, 50% ομοιότητα με την EscN), PscN (*Pseudomonas aeruginosa*, 50% ομοιότητα με την EscN), BscN (*Bordetella bronchiseptica*, 48% ομοιότητα με την EscN) και InvC (*Salmonella spp.*, 45 % ομοιότητα EscN). Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν στην πρωτοταγή τους ακολουθία το μοτίβο του Walker box, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των ενζύμων με δραστικότητα ATPάσης. Επίσης οι ATPάσες του συστήματος III παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με τη FliI, την ATPάση από το μαστίγιο, ενώ σε μικρότερο βαθμό έχουν ομολογία με τη β καταλυτική υπομονάδα των F₀F₁ ATPασών, οι οποίες σχηματίζουν ένα ετερογενές σύμπλοκο υπεύθυνο για την ενεργειακή μετατροπή των μεμβρανών (proton motive force). Όλα τα τύπου III ομόλογα της EscN, πιστεύεται πως εντοπίζονται στην εσωτερική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου ως εξαμερή, όπου πολύ πιθανόν να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά του τύπου III συστήματος έκκρισης, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια μέσω της υδρόλυσης του ATP για την έκκριση³⁴.

Συγκεκριμένα για την EscN έχει μετρηθεί δραστικότητα ATPάσης (k_{cat} 0.35 s⁻¹), ενώ η δραστικότητα αυτή φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση της πρωτεΐνης, υποδεικνύοντας πως η ειδική δραστικότητα ATPάσης (specific activity) εξαρτάται από την κατάσταση ολιγομερισμού της πρωτεΐνης¹²⁷. Δεν έχει όμως ακόμη και τώρα συσχετιστεί άμεσα από καμία μελέτη, η ικανότητα υδρόλυσης του ATP με το εξαμερές της EscN (ή και των ομόλογών της πρωτεϊνών). Έχοντας σαν μέθοδο διαχωρισμού των ολιγομερικών μορφών την χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Superdex 200 HR 10/30), μετρήσαμε την υδρόλυση του ATP σε κάθε ένα από τα κλάσματα της χρωματογραφίας αυτής, έχοντας ως πλεονέκτημα την άμεση απόδοση της μέτρησης με τη συγκεκριμένη μορφή του μορίου. Ο φωσφόρος που απελευθερώνεται κατά την υδρόλυση του ATP προσδιορίζεται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο (απορρόφηση στα 660 nm) της χρωστικής πράσινο του μαλαχίτη (Malachite Green Reagent) (Lanzetta et al., 1979).

Αφού φορτώθηκαν σε Superdex 200 HR 10/30 2 mg His-GFP-EscN, όπως ακριβώς αυτή εκλούστηκε από τη ρητίνη Ni²⁺-NTA, συλλέχθηκαν τα κλάσματα της χρωματογραφίας, στα οποία μετρήθηκε η δραστικότητα ΑΤΡάσης. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο 100μl σε διάλυμα 50 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl, 1 mM DTT, παρουσία 1 mg/ml BSA, 1 mM ATP και 80 μl από κάθε κλάσμα χρωματογραφικό ή αντίστοιχη σε όγκο ποσότητα από το διαλυμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (για να αποκλειστεί η τυχόν περίπτωση αυτοϋδρόλυσης του ATP). Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους 37⁰C και η αντίδραση σταμάτησε με την επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 5 λεπτά και την προσθήκη του αντιδραστηρίου για την ανίχνευση του ανόργανου φωσφόρου που απελευθερώθηκε κατά την αντίδραση (Lill et al., 1990).

6.7.2 Υπο-κυτταρική κλασμάτωση

Για να διαχωριστούν οι συνολικές μεμβρανικές πρωτεΐνες του κυττάρου από τις υδατοδιαλυτές, βακτήρια EPEC αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κατάλληλες για έκκριση, και το κυτταρικό ίζημά τους συλλέχθηκε μόνο ύστερα από 3 ώρες επώασης με την τετρακυκλίνη. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και τα κύτταρα λύθηκαν ύστερα από ηχοβολισμό στον πάγο. Με φυγοκέντρηση στα 6.000g για 10 λεπτά απομακρύνθηκαν όλα τα άρρηκτα κύτταρα ως ίζημα, ενώ το υπερκείμενο αυτής της φυγοκέντρησης φυγοκεντρήθηκε ξανά στα 100.000 g/30 λεπτά /4⁰ C. Το υπερκείμενο σε αυτή την περίπτωση αποτελεί το διαλυτό-κυτταροπλασματικό τμήμα του κυττάρου, ενώ το ίζημα περιείχε όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες (ενσωματωμένες ή περιφερικά συνδεδεμένες).

Εναλλακτικά η μέθοδος του παγώματος/ξεπαγώματος (freeze/thaw) χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των βακτηριακών κυττάρων. Εδώ, τα κύτταρα αρχικά επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, πάγωσαν σε κρύα από ξηρό πάγο αιθανόλη και στη συνέχεια έλιωσαν στους 30⁰ C. Μετά από 5 κύκλους παγώματος και ξεπαγώματος, το κυτταρικό διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 100.000 g/30 λεπτά/4⁰ C, ενώ οι πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν στο υπερκείμενο της φυγοκέντρησης αυτής

αντιπροσωπεύουν ένα συγκεκριμένο υπο-κυτταρικό κλάσμα (mild lysis fraction). Το κλάσμα αυτό χαρακτηρίστηκε με αποδιατακτική και μη ηλεκτροφόρηση, καθώς περιείχε επιλεκτικά τις πρωτεΐνες με ενδιαφέρον για τη μελέτη αυτή (CesAB και EspA).

6.7.3. Έκκριση πρωτεϊνών *in vivo* από στελέχη EPEC.

Έκκριση πρωτεϊνών *in vivo* επάγεται με επώαση EPEC καλλιιεργειών στους 37⁰ C σε θρεπτικό μέσο Luria Broth (LB). Όλα τα υπό μελέτη γονίδια κλωνοποιήθηκαν κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της τετρακυκλίνης (tetracycline inducible promoter) και η έκφραση των διαφόρων γονιδίων επάχθηκε με την προσθήκη 0.2 mg/l ανυδρο-τετρακυκλίνης (IBA, Germany) στη βακτηριακή καλλιέργεια, όταν η οπτική πυκνότητα έφτανε 0.3. Τα κύτταρα και το μέσο αύξησης διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 20.000 g και στους 4⁰ C. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες που εκκρίθηκαν στο μέσο αύξησης κατακρημνίστηκαν με τριχλωρο-οξικό οξύ (20 % w/v; 30 λεπτά; 4⁰ C). Τελικά τα εκκρινόμενα πολυπεπίδια και οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες αναλύθηκαν με 15% SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας πολυκλωνικά αντισώματα ειδικά για τις EspA, EspB και CesAB. Τα εκκρινόμενα πολυπεπίδια ποσοτικοποιήθηκαν με τη βοήθεια της CCD κάμερας (LAS 3000, FujiFilm) και του προγράμματος Image Quant (GE healthcare), καθώς και με την βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης από καθαρές πρωτεΐνες.

6.8 Δοκιμασίες μέτρησης συγγένειας

6.8.1 Θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC)

Το ITC είναι μια ποσοτική μέθοδος, η οποία μετρά άμεσα τη σταθερά πρόσδεσης (K_a), την αλλαγή της ενθαλπίας (ΔH) και τη στοιχειομετρία πρόσδεσης, κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων μορίων στο διάλυμα. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αυτή για τη μέτρηση της σταθεράς πρόσδεσης μεταξύ του εξαμερούς της His-GFP-EscN και της καρβοξυ-τελικής περιοχής της CesAB.

Κατά την πειραματική διαδικασία, απομονωμένο εξαμερές τοποθετήθηκε σε συγκέντρωση 0.02 mM στο κύτταρο (cell) του οργάνου και το πεπτίδιο (C-ουρά) της CesAB τοποθετήθηκε σε συγκέντρωση 0.7 mM στη σύριγγα. Η θερμοκρασία του

πειράματος ήταν 10⁰ C και μετά από 19 συνολικά ενέσεις του συνδέτη της C-ουράς της CesAB (15 μl/ένεση) στο διάλυμα με την GFP-EscN, εκλύθηκε θερμότητα, η οποία καταγράφηκε με τη μορφή ισοθερμικής καμπύλης.

6.9 Χρήση κυτταρικών μοντέλων

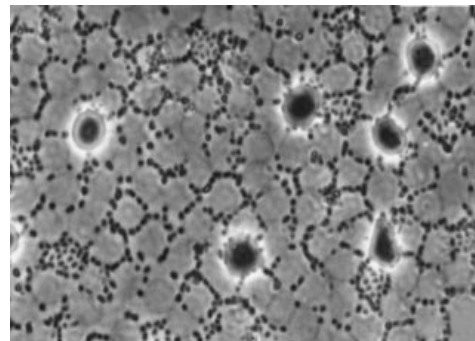
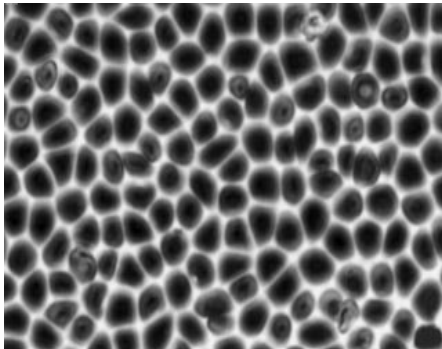
6.9.1 Αιμόλυση ερυθροκυττάρων

Ερυθροκύτταρα από κατσίκια φυγοκεντρήθηκαν, ξεπλύθηκαν 3 φορές με φωσφορικό διάλυμα σαλίνης (PBS) και ένα διάλυμα 3% από τα ξεπλυμμένα ερυθροκύτταρα τοποθετήθηκε για 20 λεπτά σε δισκία 30 mm για κυτταροκαλλιέργειες, τα οποία όμως είχαν επικαλυφθεί με πολυ-λυσίνη. Τα ερυθροκύτταρα που δεν προσκολλήθηκαν με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνθηκαν με επιπλέον πλύσιμο με διάλυμα PBS και η μονοστοιβάδα των ερυθροκυττάρων που απέμεινε ακέραια καλύφθηκε με 2 ml από το θρεπτικό των κυτταροκαλλιεργειών Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), το οποίο όμως δεν περιείχε κόκκινη φαινόλη. Σε κάθε μονοστοιβάδα προστέθηκε 20 μl/ml DMEM από μια βακτηριακή καλλιέργεια (18 ωρών) και η μόλυνση συνεχίστηκε για 4 ώρες (37⁰ C, 5% CO₂). Μετά το πέρας των 4 ωρών, το υπερκείμενο από τα δισκία των κυτταροκαλλιεργειών μεταφέρθηκε σε μικρά δοχεία φυγοκέντρησης (ependorf tubes), όπου τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν. Μόνο τα

υπερκείμενα εξετάστηκαν για την παρουσία ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, μετρώντας την οπτική πυκνότητα στα 543 nm. Την ίδια στιγμή υπερκείμενα από μη-μολυσμένες μονοστοιβάδες ερυθροκυττάρων που επώαστηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προσδιοριστεί ένα βασικό επίπεδο αιμόλυσης (Baseline, B). 100 % αιμόλυση (Total, T) πετύχαμε μετά από επώαση των μονοστοιβάδων με 30 φορές αραιωμένο διάλυμα PBS. Τελικά το ποσοστό της αιμόλυσης υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο :

$\% \text{ λύση} = (X - B) / (T - B)$, όπου X το εξεταζόμενο δείγμα.

Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνονται φωτογραφίες αντίθετης φάσης (phase-contrast) από ακέραιες μονοστοιβάδες ερυθροκυττάρων (αριστερά) και μονοστοιβάδες ερυθροκυττάρων που έχουν προσβληθεί από EPEC (δεξιά).



6.9.2 Επιμόλυνση κυττάρων HeLa

Βακτηριακές καλλιέργειες EPEC στελεχών μετά από 18ωρη αύξηση σε θρεπτικό μέσο LB αραιώθηκαν (1/100) σε DMEM θρεπτικό για κυτταροκαλλιέργειες, προθερμασμένο στους 37⁰ C, και επώστηκαν για 3 ώρες στους 37⁰ C, 5% CO₂, ακίνητα (priming). Στην συνέχεια μονοστοιβάδες HeLa κυττάρων, που είχαν αναπτυχθεί σε γυάλινες καλυπτρίδες, επώστηκαν για 2 ώρες με 500 μl των παραπάνω προετοιμασμένων βακτηρίων. Τα μη προσκολλημένα βακτήρια απομακρύνθηκαν με διαδοχικά ξεπλύματα με διάλυμα PBS, και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα 3% παραφορμαλδεύδης (PFA) σε PBS για 20 λεπτά. Η PFA απομακρύνθηκε με νέα ξεπλύματα και στην συνέχεια τα κύτταρα έγιναν διαπερατά με διάλυμα 0.1% TRITON X-100 σε PBS. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων με διάλυμα (1/500) αντισώματων α-EspA για 45 λεπτά και τελικά τα EspA ινίδια ανιχνεύτηκαν με (1/200 αραιώση) goat a-rabbit αντίσωμα συνδεδεμένο με το φθοροφόρο TRITC (488 nm, κόκκινο χρώμα). Παράλληλα η κυτταρική ακτίνη ανιχνεύτηκε με διάλυμα (1/500) phalloidin-fluorescein isothiocyanate (πράσινο χρώμα) και το DNA με διάλυμα Hoechst (μπλε χρώμα)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gorlich, D. & Mattaj, I.W. Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**, 1513-8 (1996).
2. Walter, P. & Johnson, A.E. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119 (1994).
3. Rothman, J.E. & Wieland, F.T. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-34 (1996).
4. Schatz, G. & Dobberstein, B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-26 (1996).
5. Settles, A.M. & Martienssen, R. Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol* **8**, 494-501 (1998).
6. Cornelis, G.R. & Van Gijsegem, F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735-74 (2000).
7. Kubori, T. et al. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-5 (1998).
8. Rosqvist, R., Magnusson, K.E. & Wolf-Watz, H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia YopE cytotoxin into mammalian cells. *Embo J* **13**, 964-72 (1994).
9. Van Gijsegem, F. et al. The hrp gene locus of Pseudomonas solanacearum, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* **15**, 1095-114 (1995).
10. Fields, K.A., Plano, G.V. & Straley, S.C. A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (ysc) locus lies within the lcrB region of the LCR plasmid in Yersinia pestis. *J Bacteriol* **176**, 569-79 (1994).
11. Woestyn, S., Allaoui, A., Wattiau, P. & Cornelis, G.R. YscN, the putative energizer of the Yersinia Yop secretion machinery. *J Bacteriol* **176**, 1561-9 (1994).
12. Young, G.M., Schmiel, D.H. & Miller, V.L. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6456-61 (1999).
13. Gophna, U., Ron, E.Z. & Graur, D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**, 151-63 (2003).
14. Sekiya, K. et al. Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11638-43 (2001).
15. Tamano, K., Aizawa, S. & Sasakawa, C. Purification and detection of Shigella type III secretion needle complex. *Methods Enzymol* **358**, 385-92 (2002).
16. Tamano, K. et al. Supramolecular structure of the Shigella type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *Embo J* **19**, 3876-87 (2000).
17. Cornelis, G.R. The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 742-52 (2002).
18. Knutton, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells. *Embo J* **17**, 2166-76 (1998).
19. Blocker, A. et al. Structure and composition of the Shigella flexneri "needle complex", a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**, 652-63 (2001).

20. Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3027-30 (2003).
21. Feldman, M.F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G.R. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system. *Mol Microbiol* **46**, 1183-97 (2002).
22. Kimbrough, T.G. & Miller, S.I. Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11008-13 (2000).
23. Galan, J.E. & Collmer, A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-8 (1999).
24. Crago, A.M. & Koronakis, V. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. *Mol Microbiol* **30**, 47-56 (1998).
25. Yip, C.K. et al. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**, 702-7 (2005).
26. Marlovits, T.C. et al. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**, 1040-2 (2004).
27. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. & Galan, J.E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10225-30 (2000).
28. Koster, M. et al. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**, 789-97 (1997).
29. Fadoulglou, V.E. et al. Structure of HrcQB-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 70-5 (2004).
30. Morita-Ishihara, T. et al. *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**, 599-607 (2006).
31. Gonzalez-Pedrajo, B., Fraser, G.M., Minamino, T. & Macnab, R.M. Molecular dissection of *Salmonella* FliH, a regulator of the ATPase FliI and the type III flagellar protein export pathway. *Mol Microbiol* **45**, 967-82 (2002).
32. Pozidis, C. et al. Type III protein translocase: HrcN is a peripheral ATPase that is activated by oligomerization. *J Biol Chem* **278**, 25816-24 (2003).
33. Muller, S.A. et al. Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol* **61**, 119-25 (2006).
34. Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B.B. & Strynadka, N.C. Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 131-7 (2007).
35. Akeda, Y. & Galan, J.E. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911-5 (2005).
36. Jackson, M.W. & Plano, G.V. Interactions between type III secretion apparatus components from *Yersinia pestis* detected using the yeast two-hybrid system. *FEMS Microbiol Lett* **186**, 85-90 (2000).
37. Blaylock, B., Riordan, K.E., Missiakas, D.M. & Schneewind, O. Characterization of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion ATPase YscN and its regulator, YscL. *J Bacteriol* **188**, 3525-34 (2006).
38. Minamino, T. & MacNab, R.M. Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol Microbiol* **35**, 1052-64 (2000).
39. Cordes, F.S. et al. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *J Biol Chem* **278**, 17103-7 (2003).
40. Deane, J.E. et al. Molecular model of a type III secretion system needle: Implications for host-cell sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12529-33 (2006).

41. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature* **424**, 643-50 (2003).
42. Yip, C.K., Finlay, B.B. & Strynadka, N.C. Structural characterization of a type III secretion system filament protein in complex with its chaperone. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 75-81 (2005).
43. Wei, W. et al. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2247-52 (2000).
44. Blocker, A. et al. The tripartite type III secretion system of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* **147**, 683-93 (1999).
45. Sory, M.P. & Cornelis, G.R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583-94 (1994).
46. Pettersson, J. et al. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**, 961-76 (1999).
47. Sarker, M.R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G.R. The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* **180**, 1207-14 (1998).
48. Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C. & Vasselon, T. Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**, 515-25 (1994).
49. Hakansson, S. et al. The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *Embo J* **15**, 5812-23 (1996).
50. Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y. & Attree, I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* **40**, 76-85 (2001).
51. Shaw, R.K., Daniell, S., Ebel, F., Frankel, G. & Knutton, S. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* **3**, 213-22 (2001).
52. Feldman, M.F. & Cornelis, G.R. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**, 151-8 (2003).
53. Ghosh, P. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 771-95 (2004).
54. Parsot, C., Hamiaux, C. & Page, A.L. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**, 7-14 (2003).
55. Wattiau, P., Woestyn, S. & Cornelis, G.R. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**, 255-62 (1996).
56. Luo, Y. et al. Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat Struct Biol* **8**, 1031-6 (2001).
57. Page, A.L. & Parsot, C. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol* **46**, 1-11 (2002).
58. Birtalan, S.C., Phillips, R.M. & Ghosh, P. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol Cell* **9**, 971-80 (2002).
59. Stebbins, C.E. & Galan, J.E. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77-81 (2001).
60. Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Routzahn, K.M. & Waugh, D.S. Three-dimensional structure of the type III secretion chaperone SycE from *Yersinia pestis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 398-406 (2002).
61. Locher, M. et al. Crystal structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *J Biol Chem* **280**, 31149-55 (2005).
62. Trame, C.B. & McKay, D.B. Structure of the *Yersinia enterocolitica* molecular-chaperone protein SycE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 389-92 (2003).

63. Phan, J., Tropea, J.E. & Waugh, D.S. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1591-9 (2004).
64. van Eerde, A., Hamiaux, C., Perez, J., Parsot, C. & Dijkstra, B.W. Structure of Spa15, a type III secretion chaperone from *Shigella flexneri* with broad specificity. *EMBO Rep* **5**, 477-83 (2004).
65. Buttner, C.R., Cornelis, G.R., Heinz, D.W. & Niemann, H.H. Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci* **14**, 1993-2002 (2005).
66. Birtalan, S. & Ghosh, P. Structure of the *Yersinia* type III secretory system chaperone SycE. *Nat Struct Biol* **8**, 974-8 (2001).
67. Boyd, A.P., Lambermont, I. & Cornelis, G.R. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* **182**, 4811-21 (2000).
68. Page, A.L., Sansonetti, P. & Parsot, C. Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol Microbiol* **43**, 1533-42 (2002).
69. Swietnicki, W. et al. Novel protein-protein interactions of the *Yersinia pestis* type III secretion system elucidated with a matrix analysis by surface plasmon resonance and mass spectrometry. *J Biol Chem* **279**, 38693-700 (2004).
70. Letzelter, M. et al. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *Embo J* **25**, 3223-33 (2006).
71. Krall, R., Zhang, Y. & Barbieri, J.T. Intracellular membrane localization of pseudomonas ExoS and *Yersinia* YopE in mammalian cells. *J Biol Chem* **279**, 2747-53 (2004).
72. Cornelis, G.R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-25 (2006).
73. Neyt, C. & Cornelis, G.R. Role of SycD, the chaperone of the *Yersinia* Yop translocators YopB and YopD. *Mol Microbiol* **31**, 143-56 (1999).
74. Darwin, K.H. & Miller, V.L. Type III secretion chaperone-dependent regulation: activation of virulence genes by SicA and InvF in *Salmonella typhimurium*. *Embo J* **20**, 1850-62 (2001).
75. Vallance, B.A. & Finlay, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8799-806 (2000).
76. Robins-Browne, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev Infect Dis* **9**, 28-53 (1987).
77. Bower, J.R. et al. *Escherichia coli* O114:nonmotile as a pathogen in an outbreak of severe diarrhea associated with a day care center. *J Infect Dis* **160**, 243-7 (1989).
78. Senerwa, D. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. *J Clin Microbiol* **27**, 1307-11 (1989).
79. DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A. & Finlay, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci* **55**, 961-76 (1999).
80. Nataro, J.P. & Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201 (1998).
81. Frankel, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**, 911-21 (1998).
82. McNamara, B.P. & Sonnenberg, M.S. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**, 71-8 (1998).
83. Abe, A. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Mol Microbiol* **33**, 1162-75 (1999).
84. Wainwright, L.A. & Kaper, J.B. EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**, 1247-60 (1998).

85. Elliott, S.J. et al. A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect Immun* **70**, 2271-7 (2002).
86. Neves, B.C. et al. CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD. *Infect Immun* **71**, 2130-41 (2003).
87. Creasey, E.A. et al. CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology* **149**, 3639-47 (2003).
88. Donnenberg, M.S., Kaper, J.B. & Finlay, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**, 109-14 (1997).
89. Levine, M.M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**, 550-9 (1985).
90. Kenny, B., Abe, A., Stein, M. & Finlay, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**, 2606-12 (1997).
91. Kresse, A.U., Rohde, M. & Guzman, C.A. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect Immun* **67**, 4834-42 (1999).
92. Warawa, J., Finlay, B.B. & Kenny, B. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**, 5538-40 (1999).
93. Taylor, K.A., Luther, P.W. & Donnenberg, M.S. Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* **67**, 120-5 (1999).
94. Rosenshine, I. et al. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J* **15**, 2613-24 (1996).
95. Warawa, J. & Kenny, B. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol Microbiol* **42**, 1269-80 (2001).
96. Shaw, R.K., Daniell, S., Frankel, G. & Knutton, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocate Tir and form an intimin-Tir intimate attachment to red blood cell membranes. *Microbiology* **148**, 1355-65 (2002).
97. Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H. & McNeish, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**, 1290-8 (1989).
98. Goosney, D.L., Celli, J., Kenny, B. & Finlay, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *Infect Immun* **67**, 490-5 (1999).
99. Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B. & Sanger, J.W. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**, 279-87 (1996).
100. Kalman, D. et al. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**, 389-91 (1999).
101. Zheng, J. et al. EscC is a chaperone for the *Edwardsiella tarda* type III secretion system putative translocon components EseB and EseD. *Microbiology* **153**, 1953-62 (2007).
102. Ruiz-Albert, J., Mundy, R., Yu, X.J., Beuzon, C.R. & Holden, D.W. SseA is a chaperone for the SseB and SseD translocon components of the *Salmonella* pathogenicity-island-2-encoded type III secretion system. *Microbiology* **149**, 1103-11 (2003).
103. Tan, Y.P., Zheng, J., Tung, S.L., Rosenshine, I. & Leung, K.Y. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. *Microbiology* **151**, 2301-13 (2005).

104. Main, E.R. & Jackson, S.E. Does trifluoroethanol affect folding pathways and can it be used as a probe of structure in transition states? *Nat Struct Biol* **6**, 831-5 (1999).
105. Crepin, V.F., Martinez, E., Shaw, R.K., Frankel, G. & Daniell, S.J. Structural and functional properties of chimeric EspA-FliC_i filaments of EPEC. *J Mol Biol* **378**, 243-50 (2008).
106. Hueck, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433 (1998).
107. Akeda, Y. & Galan, J.E. Genetic analysis of the Salmonella enterica type III secretion-associated ATPase InvC defines discrete functional domains. *J Bacteriol* **186**, 2402-12 (2004).
108. Stebbins, C.E. & Galan, J.E. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**, 701-5 (2001).
109. Fink, A.L. Natively unfolded proteins. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 35-41 (2005).
110. Tompa, P. & Csermely, P. The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *Faseb J* **18**, 1169-75 (2004).
111. Bhattacharyya, J. & Das, K.P. Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, alpha(s)-casein. *J Biol Chem* **274**, 15505-9 (1999).
112. Kim, T.D., Paik, S.R. & Yang, C.H. Structural and functional implications of C-terminal regions of alpha-synuclein. *Biochemistry* **41**, 13782-90 (2002).
113. Park, S.M. et al. Distinct roles of the N-terminal-binding domain and the C-terminal-solubilizing domain of alpha-synuclein, a molecular chaperone. *J Biol Chem* **277**, 28512-20 (2002).
114. Andley, U.P., Mathur, S., Griest, T.A. & Petrash, J.M. Cloning, expression, and chaperone-like activity of human alphaA-crystallin. *J Biol Chem* **271**, 31973-80 (1996).
115. Gorovits, B.M. & Horowitz, P.M. The molecular chaperonin cpn60 displays local flexibility that is reduced after binding with an unfolded protein. *J Biol Chem* **270**, 13057-62 (1995).
116. Lindner, R.A. et al. Mouse Hsp25, a small shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. *Eur J Biochem* **267**, 1923-32 (2000).
117. Gauthier, A. & Finlay, B.B. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **185**, 6747-55 (2003).
118. Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Kihara, M., Namba, K. & Macnab, R.M. The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator, FliH. *J Bacteriol* **185**, 3983-8 (2003).
119. Pallen, M.J., Bailey, C.M. & Beatson, S.A. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci* **15**, 935-41 (2006).
120. Thomas, J., Stafford, G.P. & Hughes, C. Docking of cytosolic chaperone-substrate complexes at the membrane ATPase during flagellar type III protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3945-50 (2004).
121. Zhu, K., Gonzalez-Pedrajo, B. & Macnab, R.M. Interactions among membrane and soluble components of the flagellar export apparatus of Salmonella. *Biochemistry* **41**, 9516-24 (2002).
122. Minamino, T., Tame, J.R., Namba, K. & Macnab, R.M. Proteolytic analysis of the FliH/FliI complex, the ATPase component of the type III flagellar export apparatus of Salmonella. *J Mol Biol* **312**, 1027-36 (2001).
123. Jenks, P.J. et al. A flagellar-specific ATPase (FliI) is necessary for flagellar export in Helicobacter pylori. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 205-11 (1997).

124. McDaniel, T.K. & Kaper, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**, 399-407 (1997).
125. Yamaguchi, S., Fujita, H., Sugata, K., Taira, T. & Iino, T. Genetic analysis of H2, the structural gene for phase-2 flagellin in *Salmonella*. *J Gen Microbiol* **130**, 255-65 (1984).
126. Levine, M.M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**, 1119-22 (1978).
127. Andrade, A., Pardo, J.P., Espinosa, N., Perez-Hernandez, G. & Gonzalez-Pedrajo, B. Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys* **468**, 121-7 (2007).

