

**ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ Cys 23 Ala
ΤΗΣ *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola***

ΙΩΑΝΝΑ Ε. ΠΛΑΤΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών,
Τμήμα Βιολογίας

Σεπτέμβριος 2006

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ :

Στον καθηγητή μου Μ. Κοκκινίδη για την υπομονή που έδειξε στο πρόσωπό μου και την πολύτιμη καθοδήγησή του σε όλο το διάστημα παραμονής μου στο εργαστήριό του.

Στον καθηγητή Ν. Πανόπουλο για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη όλα τα χρόνια της γνωριμίας μας.

Ιδιαίτερη ευχαριστία στην Α. Γαζή για τον υπέροχο χαρακτήρα της και την αβίαστη καθημερινή βοήθειά της.

Στην Β. Φαδούλογλου για τους χρήσιμους προβληματισμούς της στο θέμα της εργασίας μου.

Στην καλή μας τεχνικό, Ν. Κοτσιφάκη για την σωτήρια καθημερινή της παρουσία στο εργαστήριο.

Στην Μ.Μπαστάκη, που έφτιαξε το μετάλλαγμα πάνω στο οποίο βασίστηκε αυτή η εργασία.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης των gram-αρνητικών βακτηρίων.....	1
1.2 Εισαγωγή στο τύπου III εκκριτικό σύστημα.....	5
1.3 Το τύπου III εκκριτικό σύστημα.....	9
1.4 Η πρωτεΐνη HrcQb.....	15
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	23
1.6 Αρχές κρυσταλλογραφίας.....	23
Κεφάλαιο 2	
Καθαρισμός της C23A HrcQb-C του φυτοπαθογόνου <i>P.syringae</i>	
2.1 Εισαγωγή.....	26
2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της C23A της HrcQb-C.....	26
Κεφάλαιο 3	
Κρυστάλλωση της C23A HrcQb-C του φυτοπαθογόνου <i>P.syringae</i>	
3.1 Προσπάθειες κρυστάλλωσης της C23A HrcQb-C του φυτοπαθογόνου <i>P.syringae</i>	36
3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα αποτελεί ένα μηχανισμό μεταφοράς πρωτεϊνών μολυσματικότητας στα gram-αρνητικά βακτήρια. Η πρωτεΐνη HrcQb του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* αποτελεί συντηρημένο μέλος της τύπου III εκκριτικής μηχανής των gram-αρνητικών βακτηρίων.

Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτής (HrcQb-C), τα 79 κατάλοιπα, είναι το τμήμα όπου συγκεντρώνονται υψηλές ομοιότητες με τις άλλες ομόλογες πρωτεΐνες που συμμετέχουν και στο μηχανισμό βιογένεσης του μαστιγίου. Η κρυσταλλική δομή της HrcQb-C όπως αυτή καθορίστηκε από την δρ. Β. Φαδούλογλου είναι ένα επιμήκες, ελαφρά κυρτωμένο ομοτετραμερές με κύριο στοιχείο δευτεροταγούς δομής την β-πτυχωτή επιφάνεια.

Η προσοχή μας εστιάστηκε στο μετάλλαγμα C23A της HrcQb-C, κατά πόσο μπορεί να ευοδώσει κρυστάλλους παρά την έλλειψη του δισουλφιδικού δεσμού στο μόριό της. Το μετάλλαγμα υπερεκφράστηκε σε κύτταρα *E.coli* και καθαρίστηκε. Όμως όλες οι προσπάθειες κρυστάλλωσης απέβησαν άκαρπες καθώς το πρωτεϊνικό αυτό μόριο είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε πρωτεόλυση.

SUMMARY

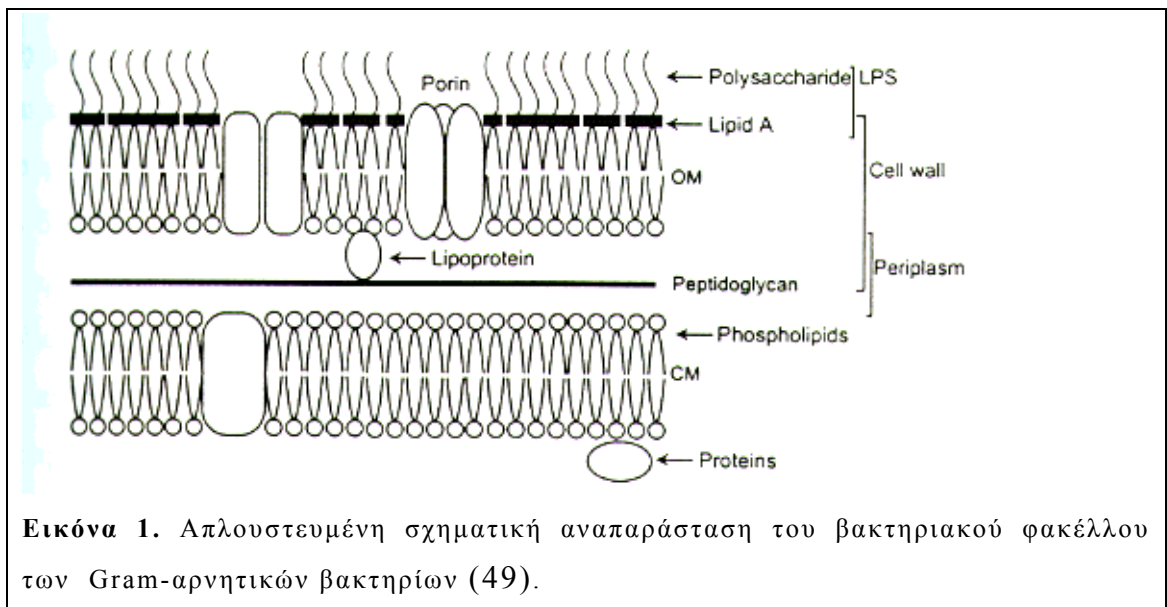
The type III secretion system is a transporter mechanism of gram-negative bacterial effectors. HrcQb of the *Pseudomonas syringae* is a conserved component of the type III secretion apparatus in gram-negative bacteria.

The C-terminal region of this protein, the 79 residues, is the part where significant similarities with the homologous proteins are observed. These homologous proteins also participate in the export mechanism for the flagellum assembly. The crystal structure, as determined by Dr. V. Fadouloglou, of HrcQb-C is an elongated, gently curved homotetramer which can be characterized as an overwhelmingly beta-structure.

We focused on the mutation C23A of HrcQb-C, and on the impact in crystallization of the absence of the disulfide bond. The molecule C23A HrcQb-C was overexpressed in *E.coli* cells and purified. Unfortunately, all the crystallization attempts were unsuccessful as the molecule was very sensitive to proteolysis even in the presence of protein inhibitors at low temperatures.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα gram-αρνητικά βακτήρια αποτελούνται από την κυτοπλασμική μεμβράνη (CM), η οποία ονομάζεται επίσης και εσωτερική μεμβράνη (IM), τον περιπλασμικό χώρο, το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη (OM), (εικόνα 1). Έτσι, κάθε φορά που ένα βακτήριο εξάγει μία πρωτεΐνη από το κυτταρόπλασμα του στον εξωτερικό χώρο, απαιτείται η διάβαση πολλών φραγμών. Γι' αυτό τα gram-αρνητικά βακτήρια έχουν αναπτύξει και εξελίξει ποικίλους μηχανισμούς για να μεταφέρουν τις πρωτεΐνες τους διαμέσου της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης τους καθώς και της ευκαρυωτικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή (96).

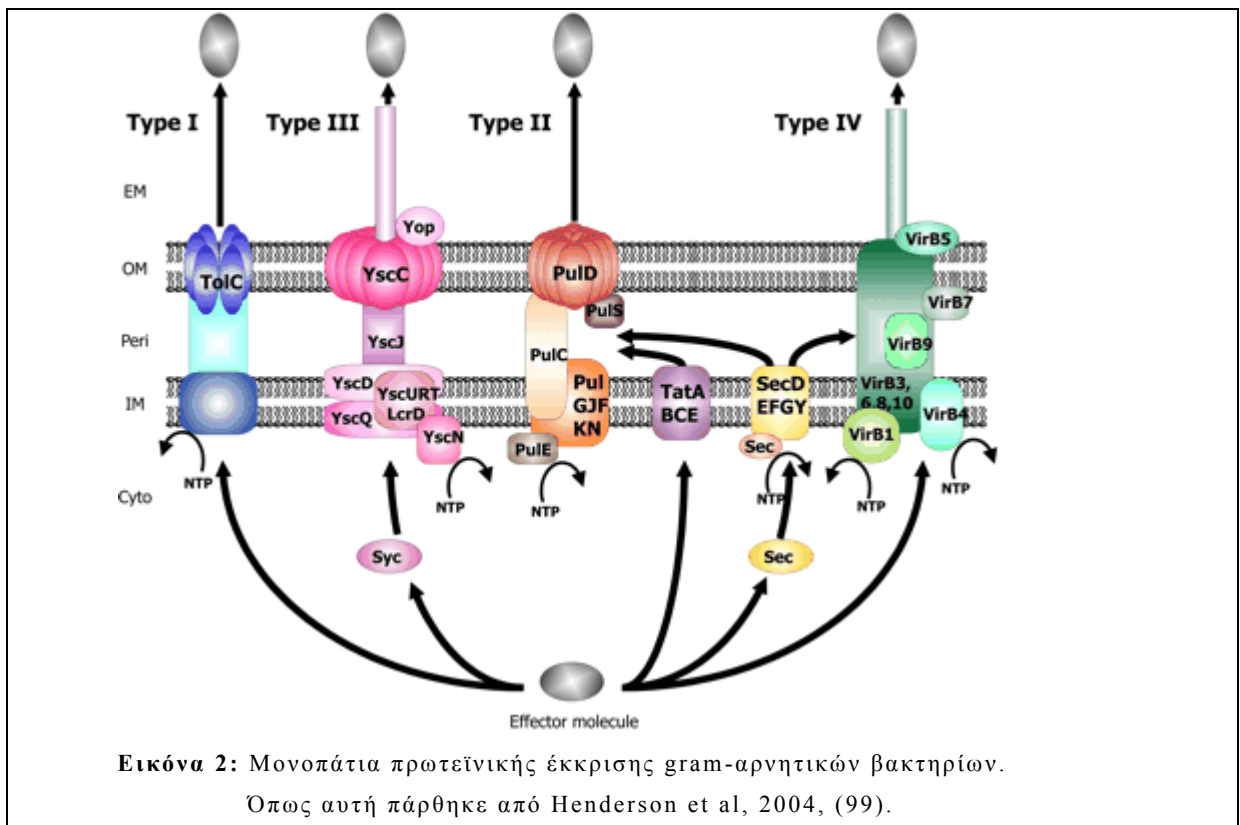


1.1 Μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης των gram-αρνητικών βακτηρίων.

Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι στην έρευνα για τον καθορισμό του μηχανισμού έκκρισης και των πρωτεϊνών, που συμμετέχουν σ' αυτόν στα βακτηριακά κύτταρα. Με βάση παλιότερες δημοσιεύσεις (12, 13, 14, 40, 44), στα gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα εξειδικευμένα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών (τύπου I έως IV), (εικόνα 2). Ένα πέμπτο εκκριτικό (τύπου V) σύστημα έχει

ελάχιστα ταυτοποιηθεί, και χρησιμοποιεί το Sec-σύστημα για να διαπερνά την εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη.

Τα βακτήρια καθώς και τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες χρησιμοποιούν πολλά άλλα ειδικά συστήματα μεταφοράς όπως το σύστημα εξαγωγής πρωτεϊνών Tat (twin-arginine translocation). Το σύστημα αυτό βρίσκεται στην κυτοπλασματική μεμβράνη των περισσότερων προκαρυωτικών οργανισμών και είναι εξειδικευμένο στην μεταφορά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, (98). Το Tat σύστημα είναι αναγκαίο για λειτουργίες όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός, η βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, η αζωτοδεσμευτική συμβίωση και η παθογένεση. Το όνομα του συστήματος αυτού προέρχεται από την ανάγκη ύπαρξης δύο αργινίνων στην σηματοδοτική αλληλουχία ενεργοποίησης του συστήματος.



Τα μονοπάτια αυτά είναι υπεύθυνα για την ελευθέρωση διαλυτών εξωκυττάρων υδρολυτικών ενζύμων στο περιβάλλον μέσο ή για τη μεταφορά και ειδική στόχευση των πρωτεϊνών στο κύτταρο-ξενιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης είναι παρόμοια με εκείνα, που συμμετέχουν στην οργάνωση των βακτηριακών κυτταρικών εξαρτημάτων (μαστιγίων-flagella, αγωγών-pili). Η επιλογή του μονοπατιού, το οποίο μια πρωτεΐνη θα χρησιμοποιήσει, δεν υπαγορεύεται μόνο από την ειδική ανάγκη της να διασχίσει τον μεμβρανικό φάκελλο στη λειτουργική της μορφή, αλλά επίσης από την ανάγκη να ελευθερωθεί στη σωστή θέση δράσης μετά την έξοδο της από το βακτηριακό κύτταρο (11). Τα μονοπάτια κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το αν η έκκριση γίνεται σε διακριτά στάδια ή είναι μια συνεχής πορεία.

Έτσι στα τύπου II και IV η έκκριση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια: (i) μεταφορά της εκκρινόμενης πρωτεΐνης κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα του βακτηρίου μέσω του λεγόμενου Sec-συστήματος μεταφοράς και (ii) μεταφορά κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Η τύπου II έκκριση είναι το κύριο μονοπάτι για την έκκριση αποικοδομητικών ενζύμων από τα gram-αρνητικά βακτήρια, (41). Το τύπου IV εκκριτικό μονοπάτι περιλαμβάνει μια ομάδα αυτομεταφερόμενων πρωτεϊνών όπως: η γονοκοκκική ανοσοσφαιρίνη A και άλλες πρωτεάσες, η κυτταροτοξίνη του *H.pylori*, πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης της *B.pertussis* και τις SepA και EspC εκκρινόμενες πρωτεΐνες της *S.flexneri* και *EPEC*, αντίστοιχα. Όπως και στο τύπου II μονοπάτι, αυτές οι πρωτεΐνες εξάγονται από το κυτταρόπλασμα μέσω του Sec-μονοπατιού, με την απαλοιφή ενός σηματοδοτικού αμινοτελικού πεπτιδίου, (40). Το τύπου I εκκριτικό σύστημα χρειάζεται τρεις εκκριτικές πρωτεΐνες: μία ATPase-μεταφορέα της εσωτερικής μεμβράνης, η οποία παρέχει ενέργεια για πρωτεϊνική έκκριση, μία πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης, η οποία εξάγεται μέσω του Sec-μονοπατιού και μία μεμβρανική συγχωνευμένη πρωτεΐνη αγκυροβολημένη στην εσωτερική μεμβράνη συνδεδεμένη με τον περιπλασμικό χώρο, (1).

Το τύπου III εκκριτικό σύστημα αποτελεί ένα μηχανισμό μεταφοράς βακτηριακών πρωτεϊνών μολυσματικότητας (effectors) στο κυτταρόπλασμα ευκαρυωτικών ξενιστών (ανθρώπινων, ζωικών ή φυτικών), που απαιτεί την

σύγχρονη και οργανωμένη δράση πολλών πρωτεϊνών (2-7, 39). Τα συμπτώματα των μολυσματικών ασθενειών όπως η βουβωνική πλάκα, η σιγκέλλωση, η σαλμονέλλωση, ο τυφοειδής πυρετός και η παιδική διάρροια, εξαρτώνται από το ρεπερτόριο των βακτηριακών πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του τύπου III εκκριτικού συστήματος, και από τη δράση της κάθε πρωτεΐνης όταν αυτή εισέλθει στο ευκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστή, (1). Όπως το σύστημα τύπου I, έτσι και το σύστημα τύπου III έκκρισης είναι ανεξάρτητο του Sec-συστήματος, αν και η συναρμολόγηση της εκκριτικής μηχανής πιθανά να το χρησιμοποιεί, (1).

Στον πίνακα 1 περιέχονται τα χαρακτηριστικά των εκκριτικών μονοπατιών τύπου I-V.

Πίνακας 1. ΕΚΚΡΙΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ GRAM-ΑΡΝΗΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ- ΓΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΣΤΗΝ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ, ΤΟΝ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟ ΧΩΡΟ, ΕΓΧΕΟΜΕΝΕΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ.

A. ΤΥΠΟΥ I

1. Όχι πολύ σύνηθες (Rtx τοξίνες, *E.coli* αιμολυσίνη)
2. Όχι κλασσική σηματοδοτική αλληλουχία, GEP-ανεξάρτητο
3. Άμεση έκκριση από το κυτταρόπλασμα στο εξωτερικό, προσπερνώντας το περίπλασμα.
4. Συμμετέχει ο ABC (ATP binding cassette) μεταφορέας, μαζί με πρωτεΐνες της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης
5. Η σηματοδοτική αλληλουχία βρίσκεται στο C-άκρο.
6. Δεν έχουν αναγνωριστεί βοηθοί πρωτεΐνες να αποτρέψουν το δίπλωμα των πρωτεϊνών.

B. ΤΥΠΟΥ II (ή GSP – general secretion pathway)

1. Ευρέως χρησιμοποιούμενο για πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες
2. Οι πρωτεΐνες εκκρίνονται στο περίπλασμα μέσω του GEP- general export pathway, και μετά εξάγονται μέσω του τύπου II συστήματος.
3. Το σύστημα μεταφοράς περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες (> 12) και στις δύο μεμβράνες.
4. Είναι ομόλογο με του τύπου IV συνθετικά συστήματα αγωγών στα gram-αρνητικά βακτήρια.

Γ. ΤΥΠΟΥ III

1. Εισάγει πρωτεΐνες (παράγοντες μολυσματικότητας) στα κύτταρα ξενιστές (φυτικά ή ζωικά).
2. Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο αποτελεί την εκκριτική μηχανή και στις δύο μεμβράνες (>17).
3. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι GEP-ανεξάρτητες, αλλά η εκκριτική μηχανή είναι GEP-εξαρτώμενη.
4. Ομόλογο του μαστιγίου.
5. Η σηματοδοτική αλληλουχία βρίσκεται στο N-άκρο.
6. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν ξεχωριστές πρωτεΐνες-βοηθούς στο περίπλασμα.

Δ. ΤΥΠΟΥ IV

1. Πολλαπλά παραδείγματα- τοξίνη της *B.pertussis*, CagA του *Helicobacter*.
2. Υπάρχει αφοσιωμένο σύστημα μεταφοράς (9 πρωτεΐνες)
3. Ομόλογο με τα συστήματα μεταφοράς DNA των αγωγών.

Ε. ΤΥΠΟΥ V

1. **Αυτομεταφορέας**- Μία μόνο πρωτεΐνη περιέχει όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για να εκκριθεί έξω από το κύτταρο
2. **Σύστημα 2 παρτενέρ**- Όμοιο με αυτό του αυτομεταφορέα- το ένα τμήμα σχηματίζει πολυχωρικά κανάλια διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης και το άλλο μεταφέρεται διαμέσου του καναλιού έξω από το κύτταρο.
3. Και στα δύο συστήματα οι πρωτεΐνες εκκρίνονται στο περίπλασμα μέσω του GEP.

1.2 Εισαγωγή στο τύπου III εκκριτικό σύστημα

Τα τύπου III εκκριτικά συστήματα (TTSSs) βρίσκονται ολοένα και περισσότερο στα παθογόνα gram-αρνητικά βακτήρια φυτών, σπονδυλωτών και ασπόνδυλων ζώων. Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου III είναι υπεύθυνο για την έκκριση πρωτεϊνών μολυσματικότητας, τόσο από βακτηριακά παθογόνα ζώων (*Yersinia-Yops*, *Salmonella-Sips*, *Shigella-Ipas*) όσο και φυτών (*Harpins* και πρωτεΐνες *Anr*) (2,14,15). Οι *S.typhimurium*, *Yersinia* spp. και *E.coli* έχουν δύο TTSSs (εικόνα 3), τα οποία έχουν ανάλογους ρόλους στα διαφορετικά στάδια της μόλυνσης. Η παρουσία των TTSSs είναι γεγονός και σε συμβιωτικούς οργανισμούς (*Photobacterium luminescens*, *Sodalis glossinidius*, *Sitophilus zeamais*), καθώς επίσης και στον φυτικό συμβιωτικό αζωτοδεσμευτικό βακτήριο του γένους *Rhizobium* (25,8), και σε κάποιους μη-παθογόνους προκαρυώτες (ορισμένα στελέχη του *Pseudomonas fluorescens*), (35). Ορισμένοι λοιπόν, συμβιωτικοί οργανισμοί περιέχουν πρωτεΐνες που διευκολύνουν την αποίκισή τους στον ξενιστή και τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του τύπου III εκκριτικού μηχανισμού, (8). Παρόλο που τα παθογόνα αυτά παράγουν διαφορετικές πρωτεΐνες μολυσματικότητας και προκαλούν συμπτωματολογικά διαφορετικές ασθένειες σε διαφορετικούς ξενιστές, χρησιμοποιούν ένα εξαιρετικά συντηρημένο μηχανισμό έκκρισης, ο οποίος θεωρείται αναγκαίος καθοριστής της παθογόνου ικανότητας. Η ιδιομορφία του μονοπατιού τύπου III σε σχέση με τα υπόλοιπα μονοπάτια έγκειται κυρίως στην ικανότητα του να μεταφέρει πρωτεΐνες κατευθείαν από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα (16,17).

Όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων έχουν από κοινού έναν αριθμό κύριων δομικών συστατικών που είναι συντηρημένα (1). Αυτά τα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι προβλεπόμενες εξωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένης και μιας πρωτεΐνης που παρουσιάζει αμινοξική ομοιότητα με μια οικογένεια μεταφορικών πρωτεϊνών καθώς και λιγότερες συντηρημένες λιποπρωτεΐνες. Η άλλη ομάδα αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης στην

μεμβράνη που παρουσιάζουν ομοιότητες με τη συσκευή εξαγωγής του μαστιγίου (flagella), (εικόνα 4).

ΚΑΘΟΛΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΤΤSS (T3aSS)

Sec-ανεξάρτητο

ΑΤΡάση-εξαρτώμενο

Κοίλη νηματοειδής προέκταση από την εξωτερική μεμβράνη

Οι πρωτεΐνες εκκρίνονται διαμέσου ενός καναλιού το οποίο εκτείνεται σε όλο τον κυτ. Φάκελο

Εννέα συντηρημένες πρωτεΐνες

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΗΧΑΝΗΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΙΓΙΟΥ (T3bSS)

Hook και filament του μαστιγίου

Περιστρεφόμενη και στατική

Χημειοτακτική

Παράγοντας σίγμα με εκκρινόμενο αντι-σίγμα

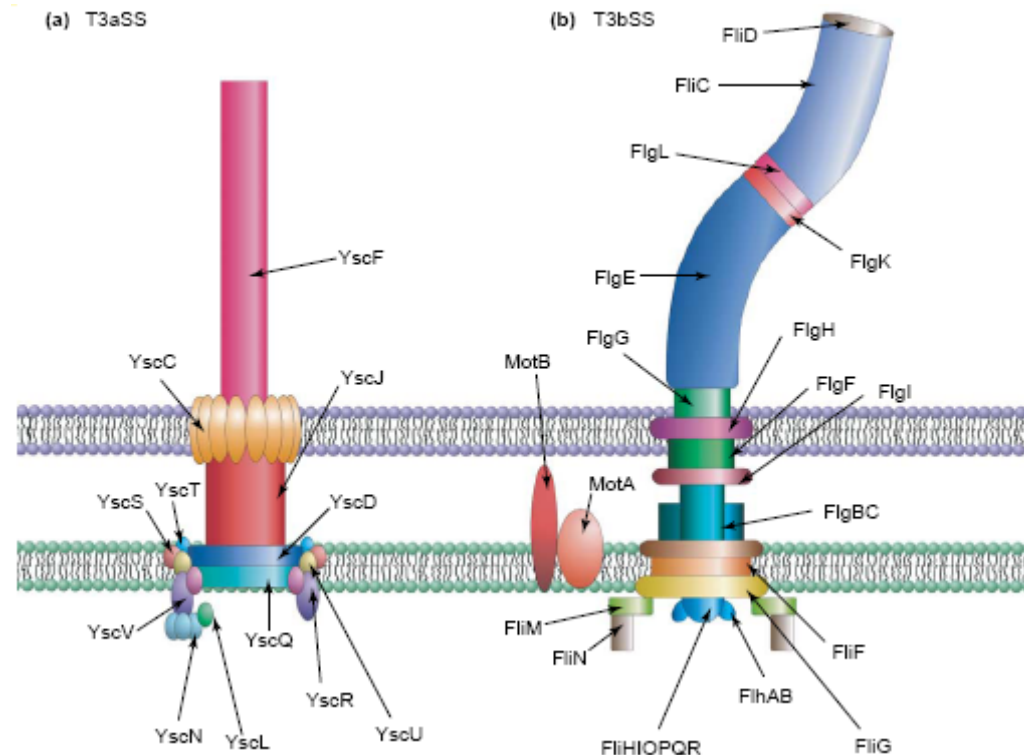
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ-ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΤΤSS (T3bSS)

Βελόνα

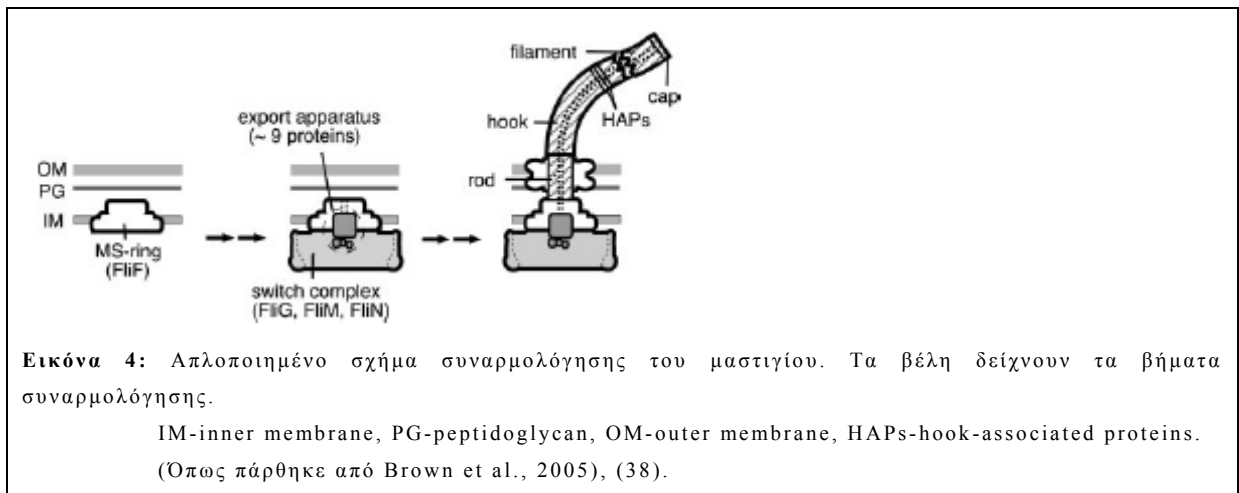
Πόρος μεταφοράς

Μεταφορά μολυσματικών πρωτεϊνών στα ευκαρυωτικά κύτταρα

Εναλλαγή υποστρώματος μεσολαβούμενη από μία ομόλογη της YopN-TyeA



Εικόνα 3: (α) Σύστημα μεταφοράς TTSS (T3aSS). Το παράδειγμα είναι του Ysc-Yop συστήματος, το οποίο υπάρχει στα είδη της *Yersinia*. Η μηχανή μεταφοράς δεν φαίνεται καθώς το συστατικό αυτό ποικίλλει στη σύνθεσή του από το ένα σύστημα στο άλλο. Ysc JLNPRSTUV μοιράζονται ομολογίες με συστατικά του μαστιγίου. (β) Το μαστίγιο του βακτηρίου (T3bSS). Η εξαγωγή και συναρμολόγηση του μαστιγίου (hook και filament) βασίζεται σε ένα αφοσσωμένο TTSS του μαστιγίου το οποίο συνδέεται με το βασικό σώμα. FliFHNIKPNRQ και FliHAB μοιράζονται ομολογία με συστατικά του μη-μαστιγιακού TTSS. (Όπως παρήκε από Desvaux et al, 2006), (78).



Τα gram-αρνητικά φυτοπαθογόνα βακτήρια, που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* και *Xanthomonas*, περιέχουν μία ομάδα γονιδίων, τα γονίδια *hrp*, τα οποία είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, τόσο με ευαίσθητες όσο και με ανθεκτικές ποικιλίες φυτών (47). Ο εκκριτικός μηχανισμός τύπου III (3,9,10) και τα σχετιζόμενα με αυτόν γονίδια ονομάστηκαν Hrp και *hrp* αντίστοιχα (hypersensitive response και pathogenicity) επειδή συνδέθηκαν εκτός από την εκδήλωση ασθένειας και με την εμφάνιση μιας αμυντικής αντίδρασης, της λεγόμενης αντίδρασης υπερευαισθησίας στα φυτά (4, 7, 50). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι εννέα από τα *hrp* γονίδια παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με γονίδια που συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του μαστιγίου και επιβεβαιώθηκε ο υψηλός βαθμός συντήρησής τους σε όλα τα βακτήρια (φυτικά και ζωικά) που περιέχουν τύπου III εκκριτικά συστήματα. Τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hrc* (*hrp* gene conserved) και τα προϊόντα τους θεωρείται ότι συνθέτουν τον πυρήνα της εκκριτικής μηχανής (2). Η συντήρηση αυτών των εννέα γονιδίων υποθέτει παρόμοιους κανόνες δόμησης και μηχανισμούς λειτουργίας στην έκκριση πρωτεϊνών μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III και οργάνωσης του μαστιγίου (flagellum assembly).

Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων *hrp* και η αποκάλυψη ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες που οργανώνουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα ζωικά παθογόνα, υποδηλώνει ότι το εκκριτικό σύστημα Hrp είναι ένα εκκριτικό σύστημα τύπου III. Επιπλέον, το εκκριτικό αυτό σύστημα εμφανίζει ομοιότητες και με το σύστημα βιογένεσης του βακτηριακού μαστιγίου.

Η μεταφορά βακτηριακών πρωτεϊνών παθογένειας, όπως Yops, κατευθείαν μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, φαίνεται να χαρακτηρίζει και το εκκριτικό μονοπάτι Hrp. Οι ομοιότητες του εκκριτικού μονοπατιού Hrp με τα υπόλοιπα εκκριτικά μονοπάτια τύπου III επεκτείνεται και στον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση των γονιδίων *hrp*. Τα γονίδια *hrp* εκφράζονται μετά από επαφή του βακτηρίου με τους φυτικούς ιστούς, καθώς και σε θρεπτικά μέσα που μιμούνται τις συνθήκες του αποπλάστη των φύλλων, χαμηλό pH και χαμηλή συγκέντρωση οσμολυτών (90), όπως συμβαίνει και στη *Yersinia*.

Τέλος, το γεγονός ότι τα γονίδια *hrp*, όπως και τα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, είναι ομαδοποιημένα και σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίζονται σε πλασμίδια και έχουν διαφορετικό ποσοστό G-C από εκείνο του βακτηριακού ξενιστή τους, έχει οδηγήσει στην άποψη ότι ίσως έχουν αποκτηθεί με οριζόντια μεταφορά από άλλα βακτήρια (91, 92, 93). Πράγματι στα φυτοπαθογόνα βακτήρια *Ralstonia solanacearum* και στην *Erwinia herbicola* τα γονίδια *hrp* βρίσκονται σε πλασμίδια, όπως και τα γονίδια *ysc* της *Yersinia* (94, 95).

Συμπερασματικά, είναι σήμερα αποδεκτό ότι τα εκκριτικά συστήματα τύπου III απαιτούνται για την οργάνωση των μαστιγίων στα ευβακτήρια, για την έκκριση πρωτεϊνών παθογένειας από τα ζωικά παθογόνα βακτήρια και από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια που φέρουν ομάδες γονιδίων *hrp*.

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, όπως και τα περισσότερα μέλη της ομάδας, προκαλεί μία από τις εξής δύο αντιδράσεις σε φυτά: α) είτε ασθένεια με χαρακτηριστικά συμπτώματα κηλίδωσης, σε όσα φυτά αποτελούν ξενιστές της (π.χ. σε ευπαθείς ποικιλίες του *Phaseolus vulgaris*, φασολιά) ή β) αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε όλα τα υπόλοιπα φυτά μη ξενιστές της, όπως π.χ. σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς, σε καπνό, ντομάτα κ.λ.π. Στην περίπτωση της φασολιάς, τα συμπτώματα της ασθένειας (halo blight) εμφανίζονται στο φύλλωμα και στους λοβούς, υπό τη μορφή υδατωδών λιπαρών κηλίδων, διασυστηματικής χλώρωσης και νανισμού των φυτών.

Η εκδήλωση της υπερευαισθησίας ή η εμφάνιση ασθένειας εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι αντίστοιχα ενός συμπληρωματικού ζεύγους γονιδίων : του γονιδίου ανθεκτικότητας στο ξενιστή (R) και του αμολυσματικότητας γονιδίου (*avr*- *avirulence*) στο παθογόνο (3). Αντίθετα, τα δευτερογενή

συμπτώματα της ασθένειας δεν ελέγχονται από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp*, αλλά οφείλονται στη δράση μιας εξωτοξίνης, που παράγει το βακτήριο, της φασεολοτοξίνης.

Πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια προϊόντα ανθεκτικότητας, “R” (resistance genes), ασχέτως αν αφορούν ανθεκτικότητα σε ιικά, βακτηριακά, μυκητιακά ή φυτοπαθογόνους, νηματώδεις μοιράζονται παρόμοια δομή (51), δηλώνοντας ένα συντηρημένο μηχανισμό για αναγνώριση παθογόνων και διαδικασίες μεταγωγής σήματος. Σε αντίθεση, προϊόντα γονιδίων μη μολυσματικότητας (avirulence) μοιράζονται χαμηλή ομολογία, αν και είναι γνωστό πως τα βακτηριακά προϊόντα των γονιδίων αυτών, μαζί με άλλες πρωτεΐνες μολυσματικότητας (effectors) εισέρχονται στο κύτταρο-ξενιστή μέσω του TTSS, το οποίο είναι συντηρημένο ανάμεσα σε φυτικά και ζωικά παθογόνα.

Οι πρωτεΐνες μολυσματικότητας του *P.syringae* αναφέρονται Avr (avirulence) ή Hop (Hrp outer proteins) σύμφωνα με μία πρόσφατη ονοματολογία (52), και εμπλέκονται στην καταστολή των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή σε συμβατικές αλληλεπιδράσεις με φυτικούς ξενιστές (53).

Το στέλεχος 1448 A της *P.syringae* pv. *phaseolicola* περιέχει τουλάχιστον 22 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες θα παραδωθούν μέσω του TTSS στο φυτικό κύτταρο (97). Μεταλλάξεις σε αρκετά *hrp* και *hrc* γονίδια που κωδικοποιούν το Hrp του TTSS εξαφανίζουν την ικανότητα του *P.syringae* pv. *phaseolicola* να προκαλέσει ασθένεια ή αντίδραση υπερευαισθησίας σε μη ξενιστές ή σε φυτά ανθεκτικότητας (20).

1.3 Μοριακή δομή της οργάνωσης του τύπου III εκκριτικού συστήματος

Το TTSS των gram-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων χαρακτηρίζεται ως μια μηχανή μεταφοράς με τις εξής ιδιότητες: (i) είναι ικανή να μεταφέρει δομικά διαφορετικά πρωτεϊνικά μόρια διαμέσου των δύο βακτηριακών μεμβρανών και της ευκαρυωτικής κυτταρικής μεμβράνης απευθείας στο κυτταρόπλασμα του ευκαρυωτικού κυττάρου, (ii) ενεργοποιείται όταν το παθογόνο έρθει σε επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή και (iii) λειτουργεί

επίσης *in vitro* σε κατάλληλες συνθήκες οι οποίες μιμούνται το περιβάλλον του κυττάρου-ξενιστή.

Η οργάνωση του πολύπλοκου τύπου III εκκριτικού μηχανισμού έχει κυρίως στόχο τη μεταφορά και εναπόθεση μολυσματικών πρωτεϊνών (effectors) στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (21). Το τύπου III εκκριτικό σύστημα περιλαμβάνει μια πλειάδα πρωτεϊνών που μπορούν να διακριθούν σε δομικές, εκκρινόμενες και βοηθούς. Οι δομικές σχηματίζουν: (i) Το βασικό σώμα της εκκριτικής μηχανής που είναι μια υπερμοριακή δομή, ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που δομείται από περίπου 20 πρωτεΐνες, που διαπερνά τις δύο μεμβράνες και το περίπλασμα του βακτηρίου και συνδέει το κυτταρόπλασμα με τον εξωκυττάριο χώρο. (ii) Μια εξωκυττάρια προέκταση του βασικού σώματος, που είναι μια επίμηκης, κυλινδρική και κοίλη δομή (needle complex) και λειτουργεί πιθανότατα ως αγωγός μέσω του οποίου μεταφέρονται οι μολυσματικές πρωτεΐνες στον ξενιστή. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι τα υποστρώματα του εκκριτικού μηχανισμού και γι' αυτές τις πρωτεΐνες δεν έχει ταυτοποιηθεί μια αποκολλούμενη πεπτιδική αλληλουχία ικανή να κατευθύνει την έκκριση (secretion signal). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διακρίνονται : (i) Στις μολυσματικές πρωτεΐνες που δρουν στο εσωτερικό του ξενιστή και (ii) Στις πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς (translocators) που θεωρούνται υπεύθυνες για τη διάνοιξη πόρου στη μεμβράνη του ξενιστή. Τέλος, υπάρχει μια ομάδα βοηθητικών πρωτεϊνών (chaperones) των οποίων οι πιθανοί ρόλοι είναι να βοηθήσουν το εκκριτικό σύστημα για τη μεταφορά των πρωτεϊνών μολυσματικότητας, (21).

Ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι απόλυτος αφού έχει δείχτεί ότι οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να έχουν και ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση άλλων παραγόντων του συστήματος (HrpA),(55), ενώ σε ορισμένες πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς έχει αποδοθεί τοξική δράση (IpaB, SipB), (5).

Οι πρωτεΐνες-βοηθοί (τσαπερόνες) του TTSS που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι σήμερα (56) είναι μικρές (~15 kDa), όξινες (pI<5) πρωτεΐνες χωρίς φανερή αμινοξική ομολογία ανάμεσά τους. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάση των πρωτεϊνών (μολυσματικότητας ή μεταφοράς) των οποίων βοηθούν την έκκριση/μεταφορά. Μεταχειρίζονται το ευκαρυωτικό κύτταρο-ξενιστή, διευκολύνοντας την απόκτηση θρεπτικών ουσιών, και συμβάλλουν στην αύξηση του μεγέθους της αποικίας καθώς και στην εξάπλωσή της (23,24).

Μεταξύ άλλων εμπλέκονται στην ιεραρχική έκκριση των υποστρωμάτων του εκκριτικού συστήματος και παράλληλα διασφαλίζουν την ακεραιότητα τους στο κυτταρόπλασμα του παθογόνου.

Οι πρωτεΐνες διάνοιξης/μεταφοράς αποτελούν υποστρώματα του τύπου ΙΙΙ εκκριτικού μηχανισμού, έχουν προβλεπόμενες διαμεμβρανικές περιοχές, έχουν την ιδιότητα να ολιγομερίζονται, να αναγνωρίζουν μεμβράνες, να προσδέονται σε αυτές και να τις καταστρέφουν δημιουργώντας πόρους (4, 57), με σκοπό την πρόσβαση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή.

Οι πρωτεΐνες αμολυσματικότητας (avirulence proteins) εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα και σε πολλές περιπτώσεις τους αποδίδεται ενζυμική ενεργότητα φωσφατάσης, κινάσης, τρανσφεράσης, κυκλάσης ή λιπάσης (1, 58). Η δομή τους αποτελείται από μία αμινοτελική περιοχή (κατάλοιπα 1-50) που παρέχει εκκριτικό και μεταφορικό σήμα, μία περιοχή 100 καταλοίπων (κατάλοιπα 50-150) η οποία αποτελεί την θέση πρόσδεσης των πρωτεϊνών-βοηθών, και το υπόλοιπο της πρωτεΐνης διευθύνει την ενεργότητα των πρωτεϊνών μολυσματικότητας. Αν και οι πρωτεΐνες μολυσματικότητας των TTSS δεν έχουν κλασσικά εκκριτικά σήματα, για την έκκρισή τους απαιτείται τουλάχιστον μια περιοχή 15 αμινοτελικών καταλοίπων. Η έλλειψη αμινοξικής ομολογίας αυτής της περιοχής ανάμεσα στις πρωτεΐνες μολυσματικότητας έχει παρακινήσει την έρευνα για τον προσδιορισμό της φύσης του εκκριτικού σήματος. Συστηματική μεταλλαξιγένεση κωδικονίων του αμινοτελικού άκρου διαφόρων πρωτεϊνών μολυσματικότητας από ζωικά παθογόνα και φυτοπαθογόνα, οδήγησε στην πρόταση πως τα σήματα τα οποία ελέγχουν την έκκριση πιθανά να ανήκουν στο mRNA, παρά στην πρωτεϊνική αλληλουχία, (59, 60). Ωστόσο, αυτή η υπόθεση παραμένει αμφιλεγόμενη.

Πρόσφατες αναφορές αναγνωρίζουν κάποια άλλα χαρακτηριστικά στις αμινοτελικές περιοχές τα οποία μοιράζονται πολλές μολυσματικές πρωτεΐνες φυτικών και ζωικών παθογόνων. Αυτά περιλαμβάνουν 5 υδροφιλικά κατάλοιπα της αμινοτελικής περιοχής, απουσία όξινων καταλοίπων στις θέσεις 12 της αμινοτελικής περιοχής επανεμφάνιση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών όπως η αμφιπαθικότητα και η συχνή εμφάνιση των αμινοξέων Ser και Gln, στα πρώτα 50 κατάλοιπα (48, 61, 62, 63).

Πάντως, όποιο και να είναι το εκκριτικό σήμα φαίνεται να λειτουργεί καθολικά. Μία ομάδα 8-10 πρωτεϊνών είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα σε όλα τα TTSS και το μαστίγιο. Αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου ή στο κυτταρόπλασμα του και συνεργάζονται χαλαρά με τη μεμβράνη. Σχηματίζουν ένα συντηρημένο πυρήνα του βασικού σώματος της τύπου III εκκριτικής μηχανής, ο οποίος πιθανά να εμπλέκεται στην αναγνώριση ενός καθολικού εκκριτικού σήματος. Αυτή η υπόθεση θα μπορούσε να ερμηνεύσει τον ετερόκλητο χαρακτήρα της συσκευής, όπως αυτός έχει επιβεβαιωθεί σε πολλές μελέτες (59, 64, 66). Κάποια παραδείγματα για την κατανόηση του χαρακτήρα της συσκευής είναι : η YopE μολυσματική πρωτεΐνη της *Yersinia* μπορεί να εκκριθεί από το TTSS των φυτοπαθογόνων *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Pseudomonas*, ενώ το TTSS της *Yersinia* μπορεί να εκκρίνει τις πρωτεΐνες AvrB και AvrPto του *Pseudomonas* και το TTSS του *Xanthomonas* εκκρίνει την PopA της *Ralstonia* και τις AvrB πρωτεΐνες της *Pseudomonas*.

Οι συντηρημένες πρωτεΐνες έχουν ταξινομηθεί σε οικογένειες ομόλογων (1) και πολλές μελέτες ασχολούνται με την τοποθεσία τους στο κύτταρο καθώς και με τη λειτουργία τους (πίνακας 2), (35). Δηλαδή, εκκριτικά υποστρώματα του TTSS ενός παθογόνου βακτηρίου μπορούν να αναγνωριστούν από το TTSS ενός άλλου παθογόνου (39, 59, 66). Αθροίζοντας αυτά τα ευρήματα, το συμπέρασμα είναι πως οι πρωτεΐνες μολυσματικότητας της εκκριτικής μηχανής ενεργοποιούνται με παρόμοιο μηχανισμό.

Μία ομάδα πρωτεϊνών μολυσματικότητας του TTSS (AvrRxv/YopJ οικογένεια), η οποία υπάρχει σε ζωικά παθογόνα (*Y.pseudotuberculosis*, *S.enterica*), σε φυτοπαθογόνα (*R.solanacearum*, *X.campestris*, *P.syringae*, *E.amylovora*) καθώς επίσης και σε βακτήρια του γένους *Rhizobium* (65), εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του ξενιστή και έχει ενεργότητα κυστεϊνικής πρωτεάσης. Αυτή η ενεργότητα πρωτεάσης δεν έχει αποδειχτεί για όλες της πρωτεΐνες αυτής της ομάδας και δεν είναι ακόμα γνωστό αν όλα τα μέλη αυτής της ομάδας στοχεύουν τα ίδια κυτταρικά μονοπάτια του ξενιστή.

Animal pathogens <i>Yersinia</i>	Plant pathogens <i>P. syringae</i>	Flagellum	Protein characteristics, function and location
YscR	HrcR	FIIP	Integral inner membrane proteins with periplasmic extensions, participate in the rod formation
YscS	HrcS	FIIQ	
YscT	HrcT	FIIR	
LcrD (YscV)	HrcV (HrpI)	FlhA	LcrD and FlhA: regulation HrcV: secretion
YscU	HrcU	FlhB	Integral inner membrane proteins with periplasmic extensions, participate in the rod formation
YscJ	HrcJ	FIIF	
YscQ	HrcQ _a ^a	FIIN/FIY	YscJ and HrcJ: lipoproteins, putative connectors of the secretion apparatus across the periplasm FIIN/Y: peripheral cytoplasmic protein, part of the switch complex that is connected with the MS-ring
YscN	HrcN	FIH	Soluble components, ATPases Outer membrane proteins, may be considered the functional equivalents of flagellum P- and O-rings
YscC	HrcC	FIJ	
YscO	HrpO	FIJ	FIJ: protein of the export apparatus, cytoplasmic, proposed a chaperone-like activity Proteins have limited sequence similarities
YopN	HrpJ		Hydrophilic proteins YopN: located on the bacterial surface, a putative stop-valve (also characterized as effector/translocator).

a. Only for *P. syringae* pathovars, for other plant pathogen TTSS the equivalent protein is HrcQ, a fusion of HrcQ_a with HrcQ_b (see text). More detailed tables have been given by He (1997), Alfano and Collmer (1997), Hueck (1998), Alzawa (2001).

Πίνακας 2. Ισοδύναμες (ή υποτιθέμενα ισοδύναμες) πρωτεΐνες από το TTSSs των *Yersinia*, *P. syringae* και του μαστιγίου. Όπως αυτός πάρθηκε από τους Tampakaki *et al* (35).

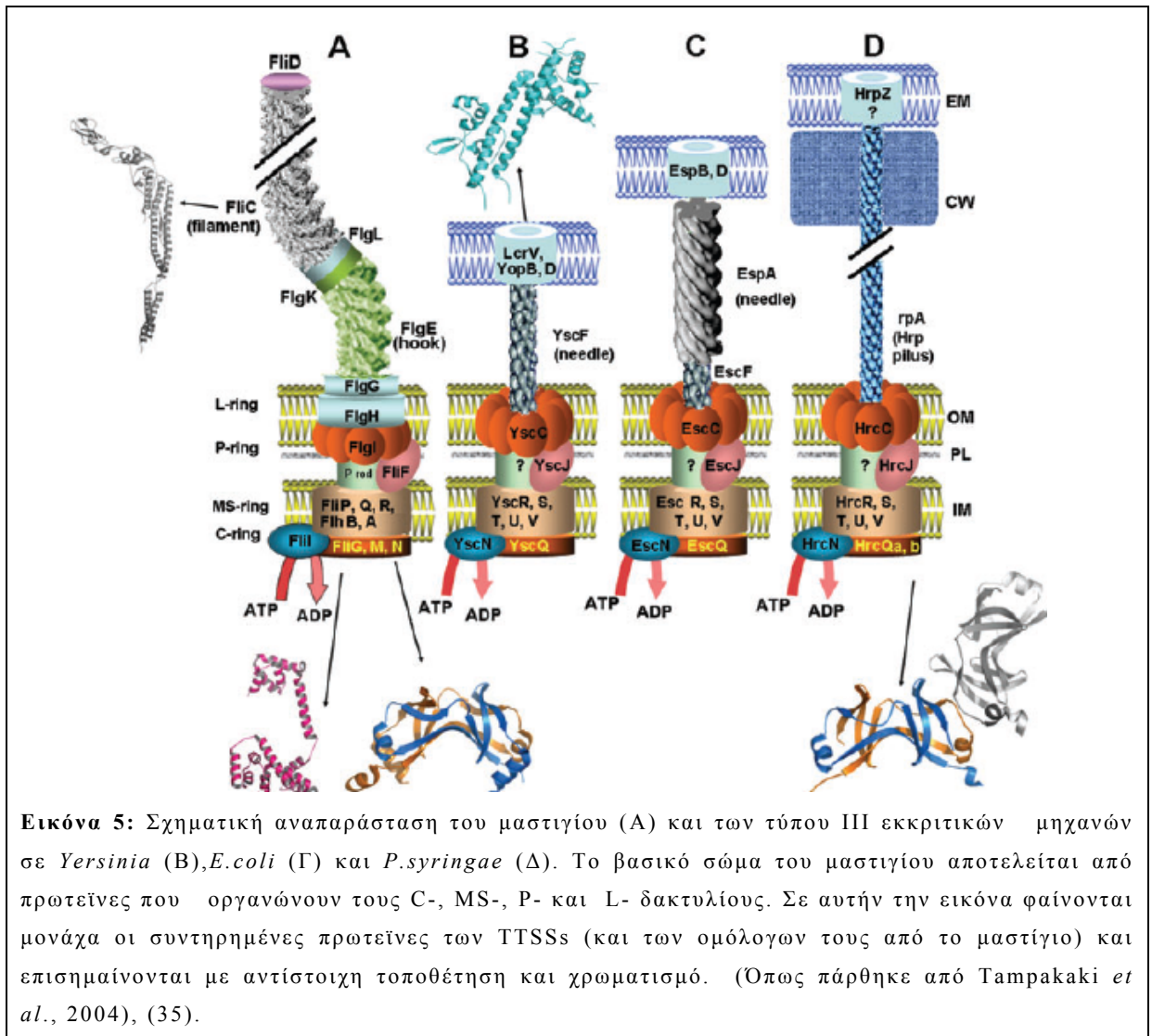
Μία ομάδα πρωτεϊνών μολυσματικότητας του TTSS (AvrRxv/YopJ οικογένεια), η οποία υπάρχει σε ζωικά παθογόνα (*Y.pseudotuberculosis*, *S.enterica*), σε φυτοπαθογόνα (*R.solanacearum*, *X.campestris*, *P.syringae*, *E.amylovora*) καθώς επίσης και σε βακτήρια του γένους *Rhizobium* (65), εμπλέκεται στα σηματοδοτικά μονοπάτια του ξενιστή και έχει ενεργότητα κυστεϊνικής πρωτεάσης. Αυτή η ενεργότητα πρωτεάσης δεν έχει αποδειχτεί για όλες της πρωτεΐνες αυτής της ομάδας και δεν είναι ακόμα γνωστό αν όλα τα μέλη αυτής της ομάδας στοχεύουν τα ίδια κυτταρικά μονοπάτια του ξενιστή. Κάποιες τύπου III πρωτεΐνες μολυσματικότητας φυτοπαθογόνων φαίνεται να καταστέλλουν την άμυνα του ξενιστή: οι AvrRpm1, AvrB και AvrRpt2 από το *P.syringae* προσδέονται στον RIN4 του *Arabidopsis*, ένας πιθανός ρυθμιστής των βασικών αμυντικών μηχανισμών του φυτού (66, 67). Οι AvrPphF Orf2, VirPphA, AvrPphC και AvrRpt2 του *P.syringae* εμπλέκονται στην αντίδραση υπερευαισθησίας όταν αυτή προκαλείται από μία άλλη Avr πρωτεΐνη (68, 69). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως έξι πρωτεΐνες μολυσματικότητας του *P.syringae* εμποδίζουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (ΠΚΘ) ο οποίος προκαλείται από άλλες πρωτεΐνες μολυσματικότητας και την ικανότητα της προ-αποπτικής πρωτεΐνης Bax να επάγει τον ΠΚΘ σε φυτά και μύκητες, (73).

Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, χαμηλής ανάλυσης, φανέρωσαν την μορφολογία της εκκριτικής συσκευής τύπου ΠΙ ζωικών παθογόνων (*Salmonella*, *Shigella*, *EPEC*), ενώ όσων αφορά τα φυτικά παθογόνα μονάχα το εξωκυτταρικό μέρος της συσκευής ήταν ορατό, (26,32,45,46). Πρόκειται για μία κυλινδρική δομή που περιβάλλεται από 2 ζεύγη δακτυλίων. Το ένα ζεύγος εντοπίζεται στην περιοχή της εξωτερικής μεμβράνης και το δεύτερο στην περιοχή της εσωτερικής. Η συσκευή απολήγει στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου σε ένα δακτύλιο που στο μαστίγιο ονομάζεται κυτταροπλασματικός (C-ring).

Έτσι, η συσκευή αποτελείται από δύο διακριτά μέρη (εικόνα 2) : (i) το εξωκυττάριο μέρος του μαστιγίου που είναι μια επιμήκης, κοίλη δομή που αναφέρεται ως «needle» (βελόνα, στα ζωικά παθογόνα) και ως «Hrp pilus» (αγωγός, στα φυτοπαθογόνα), (70, 71), (ii) μια κυλινδρική βάση, όμοια του βασικού σώματος του μαστιγίου η οποία διανύει τις δύο βακτηριακές μεμβράνες και εξασφαλίζει τη σταθερότητα ολόκληρης της δομής πάνω στον κυτταρικό φάκελο (εικόνα 5). Η σημαντικότερη διαφορά που παρατηρήθηκε είναι το πολύ μεγαλύτερο μήκος του pilus συγκριτικά με το needle που μάλλον οφείλεται στο ότι το pilus πρέπει να διαπερνά όλο το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος (>100nm) προκειμένου να προσεγγίσει το φυτικό κύτταρο (65).

Και οι δύο δομές, το needle και το pilus, είναι συνδεδεμένες με το βασικό σώμα και θεωρείται πως έχουν ανάλογες λειτουργίες. Πιστεύεται πως μέσω αυτών των δομών εδραιώνεται η προσκόλληση στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και λειτουργούν ως οδηγοί για τη μεταφορά/έκκριση των μολυσματικών πρωτεϊνών. Αν και ο πρώτος ρόλος που αναφέρθηκε παραμένει αναπόδεικτος, δεν συμβαίνει το ίδιο και για τον δεύτερο, για τον οποίο από πειράματα *in situ* immunogold labeling, έδειξαν πως η έκκριση πραγματοποιείται μονάχα στις περιοχές του Hrp pili το οποίο εκκρίνει πρωτεΐνες μόνο από τα άκρα του (50). Μία επιπρόσθετη δομή, η οποία προεξέχει από την εσωτερική μεμβράνη έως το κυτταρόπλασμα του βακτηρίου, αναφέρεται ως bulb, παρατηρείται περιστασιακά στα εκκριτικά παρασκευάσματα της *Shigella* (72).

Το bulb είναι ανάλογο ενός κυτταροπλασματικού συμπλόκου του μαστιγίου, το οποίο αποτελείται από την ΑΤΡάση και άλλες πρωτεΐνες, και ένα μέρος του αντιστοιχεί στον C-δακτύλιο του μαστιγίου.



Σε αναλογία με το νηματοειδές του μαστιγίου, το οποίο αποτελείται από πολλά αντιγραφα της πρωτεΐνης flagellin, τα εξωκυτταρικά εξαρτήματα του TTSS συναρμολογούνται βήμα προς βήμα από τον πολυμερισμό ενός κυρίου συστατικού, π.χ. HrpA στο *P.syringae* και στο *E.amylovora*, HrpY στο *R.solanacearum*, MxiH στη *Shigella*, PrgI στη *Salmonella*, YscF στη *Yersinia* PscF στη *P.aeruginosa*, EscF και EspA στο *EPEC*, (36, 46, 77).

Τα μονομερή αυτά είναι μικρές υδροφιλικές πρωτεΐνες με χαμηλή ομολογία. Επιδεικνύουν πρότυπα των επτά επαναλήψεων, το οποίο γενικά υποδεικνύει συνεργαζόμενες α-έλικες. Αυτό επιβεβαιώνεται με την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης flagellin και της δομής της νηματοειδής προέκτασης του μαστιγίου όπως αυτή αποκαλύφθηκε από πειράματα ηλεκτρονικής κρυομικροσκοπίας,(73, 74). Οι μηχανισμοί που ελέγχουν το μήκος αυτών των εξαρτημάτων δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

1.4 Η πρωτεΐνη *HrcQb*

Η *HrcQb* από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P.syringae* pv. *phaseolicola* είναι μια μικρή (14 kDa), υδρόφιλη πρωτεΐνη με ομόλογες σε όλα τα παθογόνα που εκφράζουν τύπου III εκκριτικά συστήματα και το μαστίγιο. Είναι χαρακτηριστικό ότι η ομολογία εντοπίζεται στα 80 περίπου κατάλοιπα του καρβοξυτελικού της άκρου (1). Η πρωτεΐνη εκφράζεται από το γονίδιο *hrcQb* που βρίσκεται στο οπερόνιο *hrpU* δίπλα στο γονίδιο *hrcQa*.

Δεδομένα από πειράματα κλασμάτωσης των Ταμπακάκη & Πανόπουλου εντοπίζουν την πρωτεΐνη του παθογόνου *P.syringae* pv. *phaseolicola* στο κυτταροπλασματικό και μεμβρανικό κλάσμα και όχι στο υπερκείμενο θρεπτικό μέσο, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα πως δεν αποτελεί εκκρινόμενο συστατικό. Τα δεδομένα αυτά που κατ' αρχήν δικαιώνουν τις αρχικές υποθέσεις μπορούν να ερμηνευτούν θεωρώντας ότι η πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με μεμβρανικούς παράγοντες.

Πάντως παραμένει προς διερεύνηση η υπόθεση να αποτελεί συστατικό της εκκριτικής συσκευής απαραίτητο για την έκκριση άλλων παραγόντων αλλά σε κάποιο στάδιο της πορείας της έκκρισης μεταφέρεται και η ίδια και προσκολλάται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου όπως έχει δειχτεί για την ομόλογη της *Spa33* από τη *Shigella* (75).

Με πειράματα γενετικής (yeast two-hybrid system) και βιοχημική ανάλυση (far western και ανοσοκατακρήμνιση) που έγιναν στο εργαστήριο Πανόπουλος έδειξαν ότι: (i) η *HrcQb* αλληλεπιδρά με την *HrcQa*, η οποία

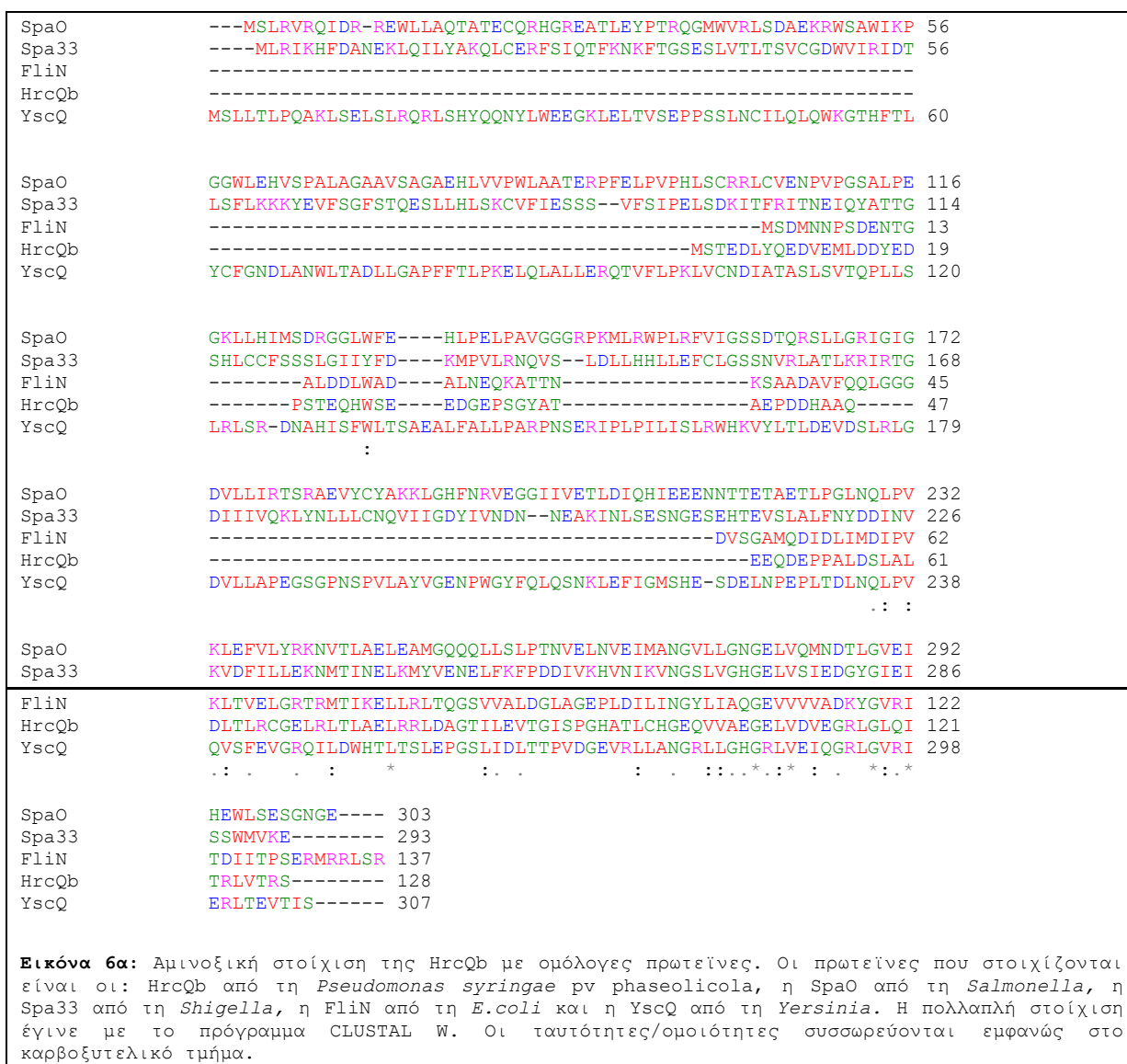
κωδικοποιείται από ένα γονίδιο upstream στο *hrcQb*. (ii) Η HrcQb-C (τα 79 κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της HrcQb) διατηρεί την ιδιότητα της ολόκληρης πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την HrcQa. (iii) Μονάχα το καρβοξυτελικό άκρο (62-238) της HrcQa εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με την HrcQb. Η αλληλεπίδραση των HrcQb-HrcQa είναι σύμφωνη με την παρατήρηση πως αυτές οι πρωτεΐνες εκφράζονται ως ένα προϊόν, το οποίο ονομάζεται HrcQ (9), στις οικογένειες των *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*.

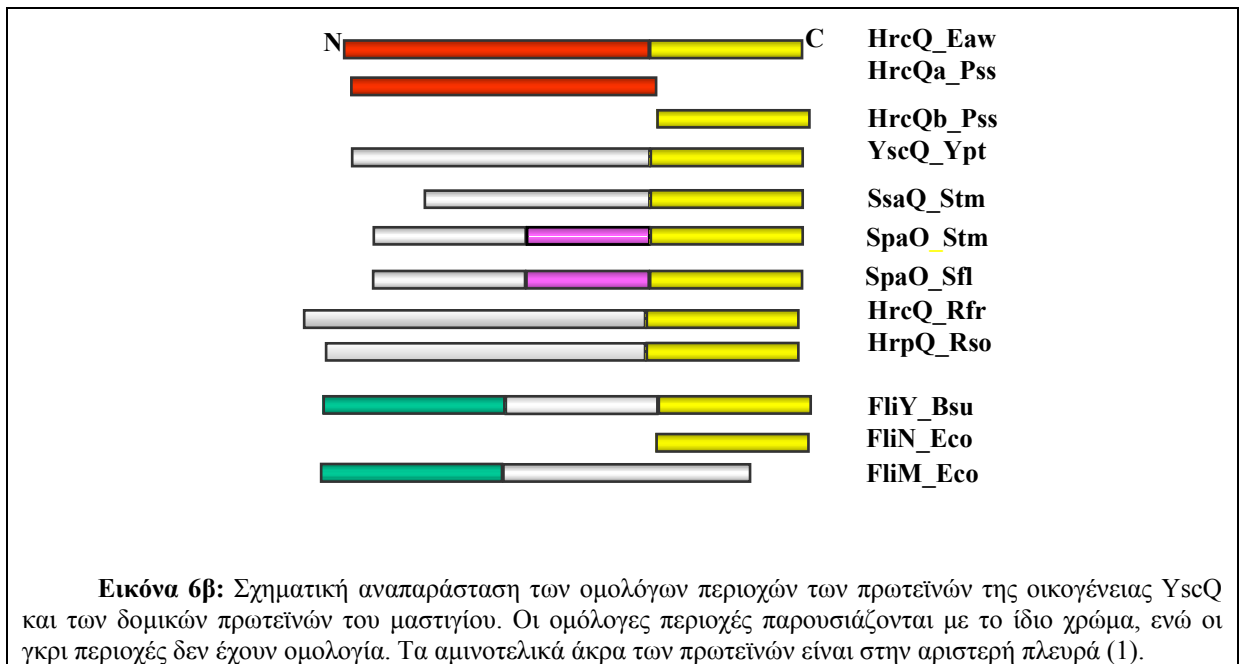
Σε πειράματα που έγιναν για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της HrcQb και HrcQa οδήγησαν στο συμπέρασμα πως είναι κυτταροπλασματική ή συνδέεται χαλαρά με μεμβρανικό συστατικό, ενώ η HrcQa βρίσκεται αποκλειστικά στο μεμβρανικό τμήμα (27). Τα αποτελέσματα αυτά με δεδομένη την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών μπορούν να ερμηνευτούν αν θεωρήσουμε ότι η HrcQb βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του βακτηρίου και ότι η επαφή της με την εσωτερική μεμβράνη επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης με την μεμβρανική HrcQa. Αυτά τα ευρήματα είναι σε συμφωνία με την παρουσία ενός διαμεμβρανικού τμήματος το οποίο προβλέφθηκε βασιζόμενο σε δεδομένα αλληλουχίας, και με τον υδρόφιλο χαρακτήρα της HrcQb.

Με συνέπεια σε αυτή την υπόθεση, παρατηρείται επίσης μια σημαντική ομολογία (20.5% ταυτόσημα και 54.5% ομοιότητα) ανάμεσα στην HrcQb και στο καρβοξυτελικό τμήμα της HrcQa σύμφωνα με την προβλεπόμενη δευτεροταγή δομή, (33). Μια πλήρη σύμπτωση βρέθηκε ανάμεσα στην προβλεπόμενη και στα πειραματικά καθορισμένα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής για τα κατάλοιπα 170-185 της HrcQa και του ομόλογου τμήματος HrcQb-C (κατάλοιπα 65-80), αντίστοιχα. Αυτό το τμήμα της HrcQb-C περιέχει ένα σύμπλεγμα καταλοίπων πιθανά εμπλεκόμενο σε αλληλεπιδρούσες επιφάνειες πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Η HrcQb πρωτεΐνη από το *P.syringae* ανήκει στο συντηρημένο μέρος του πυρήνα του βασικού σώματος της εκκριτικής μηχανής του TTSS. Η HrcQb είναι ομόλογη (1, 2) με τις HrcQ πρωτεΐνες των φυτοπαθογόνων

βακτηρίων *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, με την YscQ από τη *Yersinia*, με τη SpaO από τη *Salmonella*, με τη Spa33 από τη *Shigella*, με τη BscQ από τη *Bordetella* (76) και με τις FliN/Y πρωτεΐνες του μαστιγίου (77). Η ομολογία της HrcQb με τα ομόλογα της είναι περιορισμένη στις καρβοξυτελικές περιοχές (1). Αυτή η συντήρηση μαζί με την ποικιλότητα της αμινοτελικής περιοχής οδήγησε στην πρόταση πως αυτές οι πρωτεΐνες πιθανόν να μεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα συντηρημένα και στα ειδικά του είδους συστατικά των TTSS, (1). Στο καρβοξυτελικό άκρο της HrcQb εντοπίζεται η υψηλή αμινοξική συντήρηση ανάμεσα στην HrcQb της *P.syringae* pv. *phaseolicola* με τις ομόλογες από άλλα φυτοπαθογόνα και ζωικά παθογόνα, (εικόνα 6).





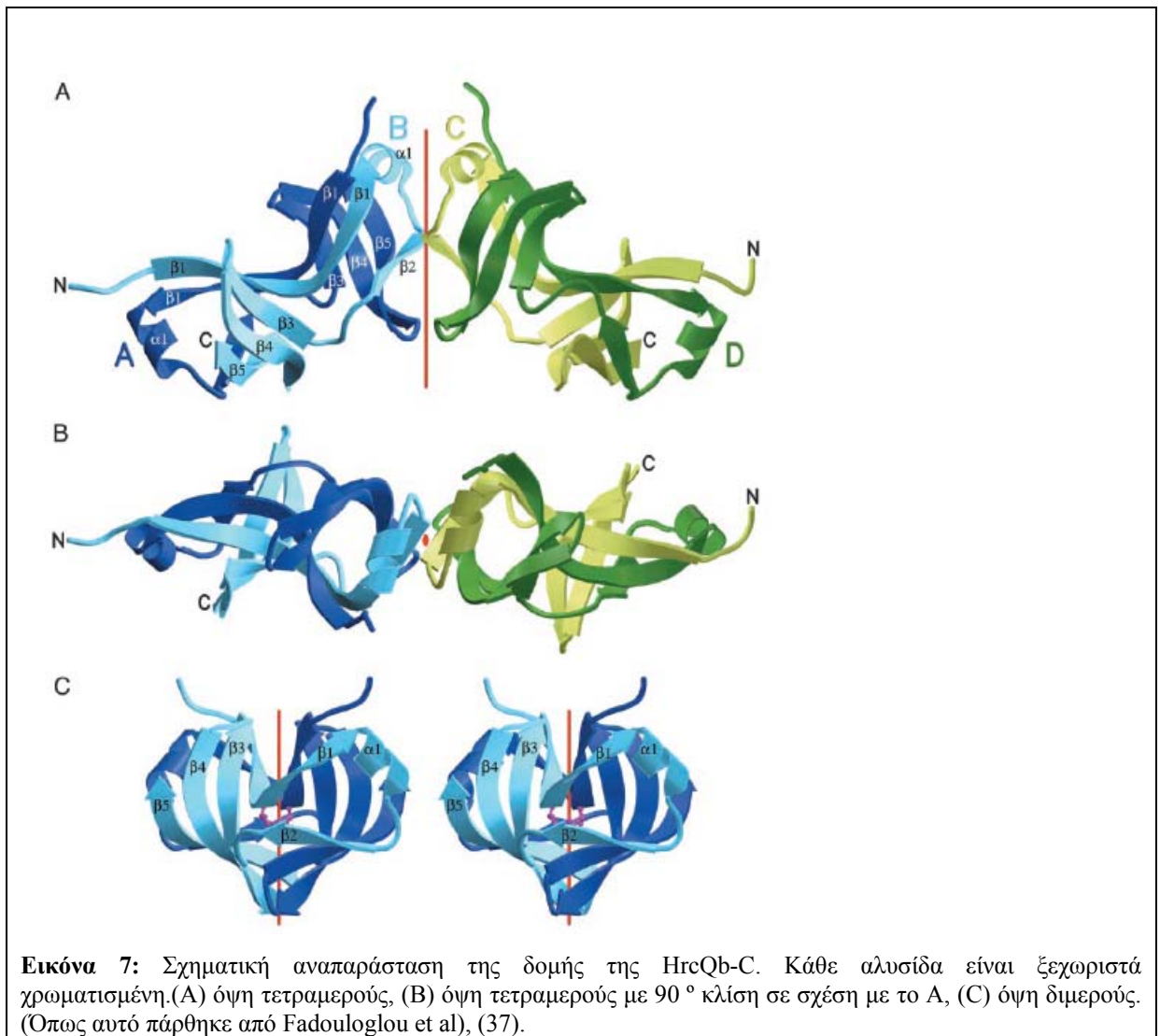
Έτσι, το συντηρημένο καρβοξυτελικό άκρο της HrcQb (HrcQb-C, 50-128) από το *P.syringae* pv. phaseolicola κλωνοποιήθηκε στην *E.coli* και η δομή του προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, (37).

Η HrcQb-C ήταν ιδιαίτερα σταθερή σε σύγκριση με το πλήρους μήκους μόριο. Πρόκειται για ένα επίμηκες, ελαφρά κυρτωμένο ομοτετραμερές. Τα τέσσερα μονομερή συναθροίζονται σε 2 διμερή που πακετάρονται μαζί και σχηματίζουν ένα διμερές διμερών. Η δευτεροταγής δομή κάθε μονομερούς αποτελείται από 5 β-κλώνους και 1 α-έλικα, (εικόνα 7).

Η HrcQb παρουσιάζει αμινοξική ταύτιση από 33% έως 89% με το καρβοξυτελικό άκρο των ομολόγων της από άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια και από 29% έως 33% με τις FlhN πρωτεΐνες του μαστιγίου και αμινοξική ομολογία 28%-32% με ομόλογες από ζωικά παθογόνα. Με τη μέθοδο της πολλαπλής στοίχισης φαίνονται πολύ καλά συντηρημένα αμινοξέα όπως τα: Ley-77, Gly-108, Val-111, Gly-118.

Η πρωτεΐνη FlhN είναι συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου, η οποία υπάρχει σε επίπεδα πάνω από 100 αντίγραφα και σχηματίζει το κύριο μέρος του C δακτυλίου, μια δομή όμοια με τυμπάνου στο εσωτερικό άκρο του βασικού σώματος.

Εκτός από την αμινοξική ομολογία της HrcQb και της FlhN και τον ίδιο υποκυτταρικό εντοπισμό, οι δύο πρωτεΐνες μοιράζονται ομοιότητες και στις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μέλη της εκκριτικής μηχανής.



Έτσι, αποτελέσματα έρευνας για το σύστημα του μαστιγίου από την *Thermotoga maritima* δείχνουν πως :

(i) Η FliN/FliM πρωτεΐνες οι οποίες είναι μέρη του μαστιγίου, όμοια της HrcQb/HrcQa αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (27,28,29,30).

(ii) Το καρβοξυτελικό άκρο της FliN (ομόλογο της HrcQb) είναι επαρκές για τη συναρμολόγηση και τη λειτουργία του μαστιγίου (28)

(iii) Το καρβοξυτελικό άκρο της FliM είναι επαρκές για την πρόσδεσή της με τη FliN (29).

(iv) Το σύμπλοκο FliN-FliM βρίσκεται και αυτό στο κυτταρόπλασμα. Η πρόσδεσή του στον MS δακτύλιο της εσωτερικής μεμβράνης σταθεροποιείται μέσω της FliM (27,28,29,30,31).

Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ανάλογους ρόλους ανάμεσα στην FliN και HrcQa. Βασιζόμενοι στην αμινοξική ομολογία η οποία παρατηρήθηκε ανάμεσα σε FliN και FliM, προτάθηκε πως αυτές οι δύο πρωτεΐνες πιθανά μοιράζονται κάποια κοινά λειτουργικά χαρακτηριστικά που συμμετέχουν στο σχηματισμό του C-δακτυλίου, (27,28,29,30). Όπως η FliN, έτσι και τα μονομερή της HrcQb συνδέονται για να σχηματίσουν διμερή, αλλά τα διμερή αυτά ενώνονται σε δεύτερη φάση για το σχηματισμό τετραμερούς στην κρυσταλλική μορφή, (εικόνα 8). Σε πειράματα ιζηματογένεσης, φάνηκε πως η FliN και αυτή σχηματίζει τετραμερή είτε με τον εαυτό της (*E.coli*) είτε με τη FliM (*T.maritima*). Βασιζόμενοι στις εντυπωσιακές αναλογίες των HrcQb/HrcQa με τις FliN/FliM προτάθηκε πως η Hrp εκκριτική μηχανή του *P.syringae*, η HrcQb και το C-άκρο της HrcQa μάλλον συνεργάζονται για το σχηματισμό μιας κυτοπλασματικής συναρμολόγησης ανάλογης του C-δακτυλίου του μαστιγίου. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από πειράματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (26,32) τα οποία έδειξαν μορφολογικές ομοιότητες ανάμεσα στα τύπου III συστήματα των ζωικών παθογόνων και του μαστιγίου, υποδηλώνοντας την παρουσία μιας κοινής αρχιτεκτονικής παρούσα στα τύπου III συστήματα.

Η FliN είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση του μαστιγίου, καθώς απαλοιφή του *fliN* γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα φαινότυπο χωρίς μαστίγιο. Οι λειτουργίες όσων αφορά την συναρμολόγηση δεν φαίνεται να παρεμποδίζονται εύκολα από σημειακές μεταλλάξεις (38).

Οι Irikura et al (1993), ανέλυσαν κάποιες μεταλλάξεις της FliN και βρήκαν πως η συναρμολόγηση του μαστιγίου εμποδιζόταν μόνο από αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης ή πρόωρο τερματισμό. Οι περισσότερες missense μεταλλάξεις δίνουν mot φαινότυπο, στον οποίο υπάρχει συναρμολόγηση μαστιγίου αλλά όχι περιστροφή. Υπήρχε μερική αποκατάσταση της περιστροφής όταν οι mot μεταλλαγμένες πρωτεΐνες υπερεκφράζονταν, το οποίο δηλώνει πως οι μεταλλάξεις μείωσαν τα επίπεδα της πρωτεΐνης ή ελάττωσαν την ικανότητά της να σχηματίσει πλήρως λειτουργικούς C-δακτυλίους.

Οι Zhu et al (2004), αντικατέστησαν μερικές συντηρημένες όξινες υπομονάδες της FliN με αλανίνη και βρέθηκε πως καμία δεν ήταν κριτική για τη συναρμολόγηση ή τη λειτουργία του μαστιγίου.

Οι θέσεις οι οποίες μεταλλάχθηκαν ήταν οι 72,76,107,112,115,127,133 και 141, οι περισσότερες εκ των οποίων βρίσκονται στις πλευρές του αυχένα (κατακόρυφα στο υδροφοβικό κομμάτι). Αν και καμία από τις αντικαταστάσεις των όξινων υπομονάδων με αλανίνη δεν παρεμπόδισε τη λειτουργία της FliN, πολλές από αυτές κατέληξαν σε μία αύξηση του επιπέδου της FliN το οποίο χρειαζόταν για βέλτιστη συγκέντρωση. Αυτό υποδεικνύει πως αυτές οι υπομονάδες παίζουν κάποιο ρόλο στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης ή στη διευκόλυνση της ενσωμάτωσής της στον C-δακτύλιο.

Έχει παλαιότερα προταθεί πως η Spa33 (ή οι ομόλογες με αυτήν πρωτεΐνες) είναι συστατικό του C-δακτυλίου της TTSS (1,34,35,36), καμία άμεση απόδειξη δεν υπήρχε για την βακτηριακή εκκριτική μηχανή του τύπου III. Μετέπειτα μελέτες παρέχουν αποδείξεις για να υποστηριχθεί αυτή η υπόθεση (37). Τα ευρήματα-αποδείξεις είναι:

(i) μετάλλαξη έλλειψης του *sra33* της *Shigella* παράγει μια δομή της TTSM χωρίς βελόνα, η οποία είναι ανίκανη να εκκρίνει μολυσματικές πρωτεΐνες μέσω του TTSS.

(ii) Η Spa33 βρίσκεται κάτω από την TTSM, σε συνεργασία με τα δύο κύρια συστατικά της TTSM της εσωτερικής μεμβράνης (MxiG, MxiJ).

(iii) Αν και η Spa33 είναι ανίκανη να αλληλεπιδράσει με συστατικά της βελόνας (MxiN, Spa32, Spa47) απαραίτητες για το σχηματισμό της βελόνας.

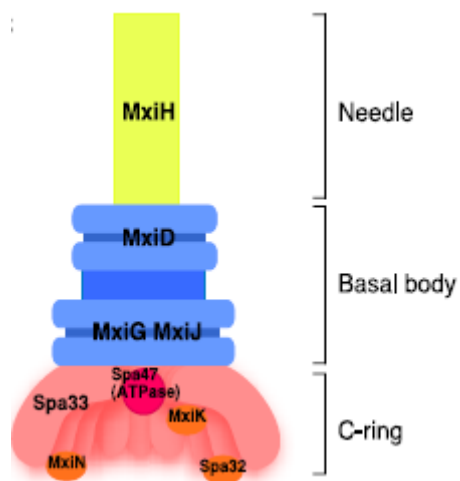
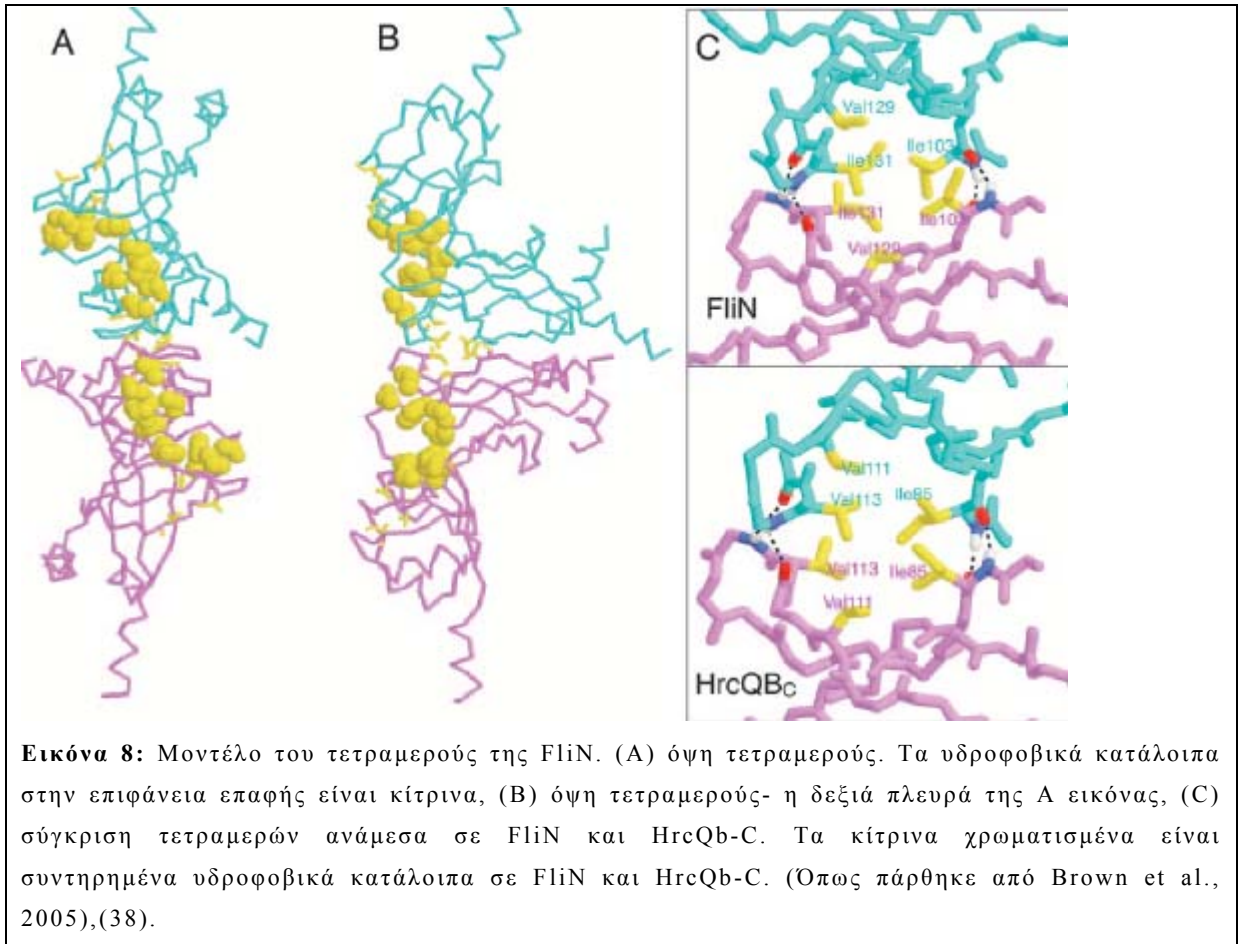
(iv) Η Spa33 είναι ικανή να αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες μολυσματικότητας που εξάγονται από το TTSS (IpaB, IpaC, IpgB1, VirA).

(v) Κάποια κατάλοιπα του C-άκρου της Spa33, τα οποία είναι υψηλά συντηρημένα στις ομόλογες πρωτεΐνες, εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με την MxiN (απαιτείται για τον σχηματισμό της βελόνας).

(vi) Η λειτουργία της Spa33 της TTSM της *Shigella* δεν υπόκεινται σε εσωτερική αλλαγή με αυτές των άλλων ομόλογων της Spa33.

Ο C-δακτύλιος, που πιθανά αποτελείται από τη Spa33 (37) είναι απαραίτητος για το σχηματισμό μιας λειτουργικής εκκριτικής μηχανής, αφού το *sra33* μετάλλαγμα είναι ανίκανο να σχηματίσει τη δομή της βελόνας ή να μεσολαβήσει στην έκκριση των πρωτεϊνών μολυσματικότητας.

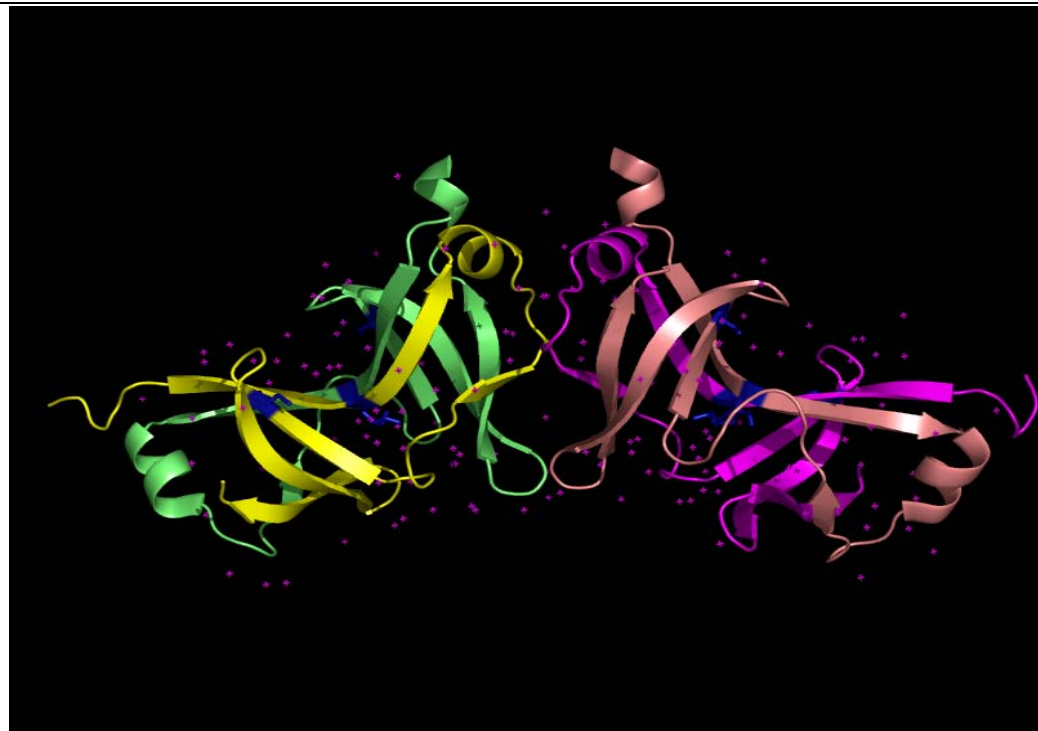
Ο σχηματισμός του C-δακτυλίου θα μπορούσε να συμβαίνει μετά το σχηματισμό του βασικού σώματος, αφού η απουσία της Spa33 από το βακτήριο είναι ικανή να σχηματίσει μία ελλατωματική δομή του βασικού σώματος εντός του φακέλου (37), (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Εκκρητική μηχανή τύπου III της *Shigella*. (Όπως αυτή πάρθηκε από Morita-Ishihara et al., 2006), (89).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της σταθερότητας της δομής της HrcQb-C C23A σε σύγκριση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη. Η κυστεΐνη της θέσης 23 αντικαταστάθηκε από αλανίνη, με αποτέλεσμα ο δισουλφιδικός δεσμός να εκλείπει στο μετάλλαγμα, (εικόνα 10). Η αλανίνη επιλέχθηκε καθώς είναι το δεύτερο απλούστερο αμινοξύ, το οποίο έχει μία μεθυλομάδα στην πλευρική της αλυσίδα, έτσι ώστε να μην υπάρξουν στερικές παρεμποδίσεις. Η δομική σύγκριση με την native πρωτεΐνη, καθώς και η αλλοστερική επίδραση στις αλληλεπιδρούσες επιφάνειες του τετραμερούς της HrcQb-C αποτελούν το αντικείμενο της έρευνας αυτής.



A



B

Εικόνα 10: (A) Το μόριο της HrcQb-C. Τα τέσσερα μονομερή συναθροίζονται σε 2 διμερή που πακετάρονται μαζί και σχηματίζουν ένα διμερές διμερών. (B) Φαίνεται με μπλέ χρώμα ο δισουλφιδικός δεσμός ο οποίος υπάρχει κανονικά στην HrcQb-C αλλά εκλείπει από το μετάλλαγμα C23A HrcQb-C.

1.6 Αρχές κρυσταλλογραφίας

Ένας κρύσταλλος είναι μια καλά οργανωμένη διάταξη μορίων που σχηματίζεται από την επανάληψη πολλών δισεκατομμυρίων αντίγραφων του βασικού αντικειμένου (π.χ. του πρωτεϊνικού μορίου). Το πρότυπο σκέδασης των ακτίνων-Χ από τα ηλεκτρόνια των μεμονωμένων ατόμων στην επαναλαμβανόμενη μονάδα η οποία σχηματίζει τον κρύσταλλο έχει προσθετικές ιδιότητες, ώστε η συνολική σκέδαση να σχηματίζεται προσθετικά και όλα τα αντίγραφα της μονάδας στον κρύσταλλο. Η σκεδασμένη ακτινοβολία μπορεί να υπολογιστεί για να επανασυστήσει μια εικόνα της κατανομής της πυκνότητας των ηλεκτρονίων στην επαναλαμβανόμενη μονάδα (π.χ. την πρωτεΐνη).

Τα βασικά στάδια του προσδιορισμού της δομής της πρωτεΐνης μπορούν να οριστούν ως εξής:

(i) Κρυστάλλωση. Συγκεκριμένες συνθήκες πρέπει να βρεθούν κάτω από τις οποίες οι αδύναμες διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων θα οδηγήσουν σε κανονικό πακετάρισμά τους υπό μορφή κρυστάλλου αντί τυχαίου ιζήματος.

(ii) Συλλογή δεδομένων. Γενικά τα δεδομένα συλλέγονται με την περιστροφή του πρωτεϊνικού κρυστάλλου εντός μονοχρωματικής δέσμης των ακτίνων-Χ και καταγραφή των εντάσεων των σχηματιζόμενων ανακλάσεων. Αυτές οι εντάσεις αντιστοιχούν τα πλάτη των παραγόντων δομής. Εναλλακτικά, στην μέθοδο Laue, ο κρύσταλλος παραμένει στάσιμος αλλά τα δεδομένα συγκεντρώνονται χρησιμοποιώντας ένα συνεχές φάσμα μηκών κύματος ακτίνων-Χ.

(iii) Προσδιορισμός φάσεων. Το πλάτος και η φάση ενός παράγοντα δομής είναι ανεξάρτητα μεγέθη. Επειδή όλες οι πληροφορίες για τις φάσεις των παραγόντων δομής χάνονται κατά τη συλλογή των πειραματικών δεδομένων, ένας υπολογισμός των τιμών τους πρέπει να αποκτηθεί μέσω χρήσης επιπλέον πληροφοριών. Αυτό το στάδιο, με εξαίρεση την κρυστάλλωση, παραμένει κατά κανόνα το πιο προβληματικό στάδιο του προσδιορισμού της δομής.

(iv) Βελτίωση φάσεων. Η ποιότητα και κατά συνέπεια η ερμηνευσιμότητα του χάρτη της ηλεκτρονικής πυκνότητας εξαρτάται από την ακρίβεια των φάσεων. Κάτω από συγκεκριμένες ευνοϊκές οι αρχικές εκτιμήσεις των φάσεων μπορούν να βελτιωθούν σημαντικά χρησιμοποιώντας υπερδειγματοληψία στα δεδομένα.

(v) Ερμηνεία του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας. Ο προσδιορισμός των φάσεων των ανακλάσεων επιτρέπει να υπολογιστεί μία απεικόνιση της ηλεκτρονικής πυκνότητας στην επαναλαμβανόμενη μονάδα του κρυστάλλου. Αν αυτή η απεικόνιση είναι επαρκώς λεπτομερής (π.χ. βασισμένη σε αρκετά υψηλή διακριτική ικανότητα των δεδομένων, το οποίο συνήθως σημαίνει την ύπαρξη δεδομένων περίθλασης διακριτικής ικανότητας τουλάχιστον 3.5 Å), τότε η τρισδιάστατη δομή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μπορεί να προσδιοριστεί. Ένα μοντέλο της πρωτεϊνικής δομής μπορεί να κατασκευαστεί υπό μορφή ατομικών συντεταγμένων, εάν η αμινοξική αλληλουχία είναι γνωστή.

(vi) Βελτίωση δομής. Το αρχικό μοριακό μοντέλο βελτιώνεται με βάση τα πειραματικά δεδομένα λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς που υπαγορεύονται από τα στερεοχημικά δεδομένα (μήκη δεσμών, γωνίες, κτλ.) που είναι γνωστά είτε από δομές μικρών πεπτιδίων είτε από βάσεις δεδομένων για πρωτεΐνες.

Καθαρισμός της πρωτεΐνης HrcQb-C, Cys23Ala του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv *phaseolica* NP53121.

2.1 Εισαγωγή

Η C23A HrcQb-C εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη με μία αλληλουχία έξι ιστιδινών και μία ενδιάμεση αμινοξική αλληλουχία που αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση rTEV. Η προσθήκη της αλληλουχίας των ιστιδινών αποσκοπεί στη διευκόλυνση του καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου, ενώ η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την πρωτεάση επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση των ιστιδινών από την πρωτεΐνη μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού.

2.2 Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης C23A HrcQb-C.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί το υψηλά συντηρημένο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης HrcQb κλωνοποιήθηκε στον πλασμειδιακό φορέα pPROEX HTa (Life Technologies Inc.). Η κλωνοποίηση έγινε στα πλαίσια συνεργασίας με το εργαστήριο του καθηγητή Ν. Πανόπουλου από την Δρ. Α.Ταμπακάκη. Η μετάλλαξη της κυστεΐνης από αλανίνη στη θέση 23 έγινε στο εργαστήριο του ίδιου καθηγητή από την Μ. Μπαστάκη. Ο φορέας pPROEX HTa (Polayes 1996) αποτελείται από τον υποκινητή Ttrc για υψηλά επίπεδα έκφρασης σε *E.coli* και τον καταστολέα lacI για ρύθμιση της έκφρασης με IPTG και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη σαν μέσο επιλογής. Επιλέχτηκε γιατί φέρει μια νουκλεοτιδική αλληλουχία που εκφράζεται στο αμινοτελικό άκρο της κλωνοποιημένης πρωτεΐνης ως έξι διαδοχικές ιστιδίνες. Μεταξύ των ιστιδινών και της πρωτεΐνης μεσολαβεί το επταπεπτίδιο ENLYFQG το οποίο αναγνωρίζεται ειδικά από την πρωτεάση rTEV που το πρωτεολύει στη θέση QG (*). Το επταπεπτίδιο επιτρέπει την εύκολη απομάκρυνση των ιστιδινών από την πρωτεΐνη μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού. Το προϊόν εκφράζεται σε κύτταρα *E coli* της σειράς DH5α.

Η κυστεΐνη (C) της θέσης 23 μεταλλάχθηκε σε αλανίνη (A) στο εργαστήριο του καθηγητή Ν.Πανόπουλο από την Μ. Μπαστάκη.

MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQ*GAMDPQDEPPALDSLALDLTLRCGEL
RLTLAELRRLDAGTILEVTGISPGHATLCHGEQVVAEGELVDVEGRLGLQI
TRLVTRS



MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQ*GAMDPQDEPPALDSLALDLTLRAGEL
RLTLAELRRLDAGTILEVTGISPGHATLCHGEQVVAEGELVDVEGRLGLQI
TRLVTRS

Με πλάγια γράμματα φαίνονται οι ιστιδίνες. Ο αστερίσκος δηλώνει τη θέση πρωτεόλυσης από την rTEV.

- *Παραγωγή της C23A HrcQb-C.*

Η πρωτεΐνη εκφράζεται από κύτταρα *E.coli* της σειράς DH5a που μεγαλώνουν παρουσία αμπικιλίνης σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (LB θρεπτικό μέσο, 79). Ακολουθήθηκαν οι συνθήκες καλλιέργειας όπως αυτές καθορίστηκαν από την Δρ.Β.Φαδούλογλου, βάση των αποτελεσμάτων σε πειράματα για την HrcQb-C. 20 ml από καλλιέργεια μεγαλωμένη για ~18 ώρες στους 30°C, ενύονται σε 1 lt θρεπτικού μέσου που περιέχει 100μg/ml αμπικιλίνη και επωάζονται εκ νέου στους 30°C μέχρι η οπτική πυκνότητα στα 600 nm είναι 0.7-0.9. Η υπερέκφραση επάγεται με 0,5 mM IPTG και η επώαση διαρκεί ~18 ώρες στους 30 °C. Τα κύτταρα διαχωρίζονται από το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση στα 6000 rpm (φυγόκεντρο, Beckman, ρότορα. JA-20) για 20 min στους 4 °C. Η κυτταρική πάστα συλλέγεται και λύεται αμέσως ή φυλάσσεται στους -80 °C.

- *Χρωματογραφία συγγένειας*

Σύμφωνα με αυτήν την χρωματογραφία εκμεταλλευόμαστε την υψηλή συγγένεια πολλών πρωτεϊνών για ειδικές χημικές ομάδες. Γενικά, η χρωματογραφία συγγένειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην

απομόνωση πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μία ομάδα X, ως εξής:

- (α) ομοιοπολική δέσμευση του X ή παραγώγου του σε στήλη,
- (β) προσθήκη του μείγματος της πρωτεΐνης στη στήλη, που στη συνέχεια ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν,
- (γ) έκλυση της πρωτεΐνης που επιλέγεται με προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης διαλυτής μορφής του X.

Το υπόστρωμα και ο προσδέτης αποτελούν τη στερεή φάση (στρώμα) την οποία διαπερνά το διάλυμα της πρωτεΐνης (υγρή φάση). Η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον προσδέτη και παραμένει στη στερεή φάση ενώ οι συνοδεύουσες πρωτεΐνες απομακρύνονται από το στρώμα. Η έκλυση της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται εκπλένοντας το στρώμα με διάλυμα ουσίας μεγαλύτερης συγγένειας για τον προσδέτη απ'ότι η πρωτεΐνη (80).

Στη χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) το ρόλο του προσδέτη αναλαμβάνουν ιόντα μετάλλων. Η αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη βασίζεται στην ιδιότητα ορισμένων αμινοξέων να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και να προσδένουν κατιόντα (81, 82, 83). Ένα τέτοιο αμινοξύ είναι η ιστοιδίνη. Σε pH μεγαλύτερο από 6.0 προσδένει ισχυρά δισθενή μεταλλικά ιόντα όπως Ni(+2) και Cu(+2). Η αύξηση της συγγένειας μιας πρωτεΐνης για ιόντα μετάλλου επιτυγχάνεται με την προσθήκη μιας ουράς συνήθως έξι, διαδοχικών ιστοιδινών στο αμινο- ή καρβοξυτελικό άκρο της.

Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με μείωση του pH ή με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου (84). Στην απομόνωση της C23A HrcQb-C χρησιμοποιήθηκε η κολώνα Ni-Nta agarose (Nickel nitrilotriacetic acid), η οποία περιέχει νικέλιο, το οποίο μπορεί να δεσμεύσει πρωτεΐνες που περιέχουν ιστοιδίνες (His).

Για να αποφευχθεί η χαλαρή μη-ειδική δέσμευση των πρωτεϊνών που έχουν ενδογενώς ιστοιδίνες, στο διάλυμα εξισορρόπησης της κολώνας (lysis buffer) προσθέτουμε ιμιδαζόλιο του οποίου ο δακτύλιος ανταγωνίζεται αυτόν της ιστοιδίνης. Η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με την προσθήκη διαλύματος με υψηλή συγκέντρωση σε ιμιδαζόλιο, το οποίο ανταγωνίζεται ιστοιδίνες.

- *Τεχνική διαπίδυσης*

Συνήθως είναι απαραίτητη η αλλαγή του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη για την μεταβίβαση στο επόμενο στάδιο καθαρισμού. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την μέθοδο διαπίδυσης μέσω ημιπερατής μεμβράνης, το μέγεθος των πόρων της οποίας καθορίζει το μέγεθος των μορίων που θα ανταλλάγουν. Μόρια με διαστάσεις πολύ μεγαλύτερες από τους πόρους της μεμβράνης μένουν εντός αυτής, ενώ τα μικρά μόρια και τα ιόντα περνούν τους πόρους αυτής της μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα έξω από τη μεμβράνη. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να αλλάξουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μέσα στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη.

- *Απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών.*

Η πρωτεάση rTEV (πρωτεάση του tobacco etch virus, 85) με μια αλληλουχία ιστιδινών που προστίθεται στο αμινοτελικό της άκρο (86) αναγνωρίζει την αλληλουχία ENLYFQG και πρωτεολύει μεταξύ QG. Χρησιμοποιείται ευρέως για την απομάκρυνση της ουράς ιστιδινών από ανασυνδιασμένες πρωτεΐνες γιατί συνδυάζει πλεονεκτήματα όπως υψηλό βαθμό ειδικότητας, έλλειψη ευαισθησίας στους αναστολείς πρωτεασών και εύκολο διαχωρισμό από το μίγμα της αντίδρασης πρωτεόλυσης λόγω της ουράς των ιστιδινών. Η ποσότητα της πρωτεάσης που απαιτείται για την πλήρη πρωτεόλυση του υποστρώματος ποικίλλει και εξαρτάται από το πόσο η δομή της πρωτεΐνης αφήνει εκτεθειμένη την αλληλουχία που αναγνωρίζει και πρωτεολύει η πρωτεάση.

- *Χρωματογραφία μοριακής διήθησης*

Η κολώνα μοριακής διήθησης ακολουθεί την δεύτερη στήλη Ni-NTA για το διαχωρισμό μορίων πρωτεάσης που πιθανόν να εξακολουθούν να συνοδεύουν το δείγμα λόγω της μεγάλης της συγκέντρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης πρωτεόλυσης. Σύμφωνα με αυτήν την χρωματογραφική μέθοδο ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών εξαρτάται από την υδροδυναμική τους ακτίνα, η οποία είναι ανάλογη του μοριακού βάρους για σφαιρικές πρωτεΐνες.

Το δείγμα μπαίνει στην κορυφή μιας στήλης που αποτελείται από πορώδεις κόκκους φτιαγμένους από αδιάλυτο πολυμερές, που μπορεί όμως να συγκρατήσει πολύ νερό, όπως η δεξτράνη, η αγαρόζη ή το πολυακρυλαμίδιο. Μικρά μόρια περνούν μέσα από αυτούς τους κόκκους, αλλά τα μεγάλα δεν μπορούν να περάσουν. Αποτέλεσμα είναι ότι τα μικρά μόρια κατανέμονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσα στους κόκκους και μεταξύ τους, ενώ τα μεγάλα μόρια βρίσκονται μόνο μεταξύ των κόκκων. Τα μεγάλα μόρια περνούν πιο εύκολα μέσα από τη στήλη και εμφανίζονται πρώτα γιατί βρίσκονται σε μικρότερο όγκο υγρού (Stryer L. 1997).

Στην απομόνωση της C23A HrcQb-C χρησιμοποιήθηκε το χρωματογραφικό υλικό Sepharyl S-100 της Pharmacia. Το Sepharyl παράγεται από ενδομοριακή σύνδεση αλλυλικής δεξτράνης και N,N-δισακρυλαμιδίου του μεθυλενίου. Είναι χημικά σταθερό σε όλα τα συχνά χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ λειτουργεί σε εύρος pH 2-11. Το μέγεθος των πόρων ελέγχεται επιμελώς από τις κατασκευαστικές εταιρίες. Στην S-100 το χρήσιμο εύρος διαχωρισμού είναι από 5.000 έως 75.000 Dalton.

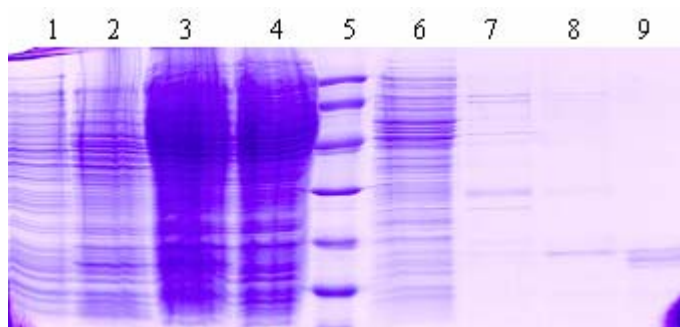
- *Σχήμα καθαρισμού της 6 His- C23A HrcQb-C.*

Παράγονται ~20 g κυττάρων που ομογενοποιούνται με 180 ml 20 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH=8.0 (διάλυμα A). Προστίθενται αναστολείς πρωτεασών σε τελικές συγκεντρώσεις 1 mM PMSF, 20 µg/ml leupeptin, 150 µg/ml benzamidin και τα κύτταρα διαρρηγνύονται με λυσοζύμη (1 mg/ml, 30 min στους 4 °C) και υπερήχους. Το κυτταρικό περιεχόμενο διαχωρίζεται από τα κυτταρικά υπολείμματα με φυγοκέντρηση (14000g, 60 min, 4 °C). Το υπερκείμενο φορτώνεται με ταχύτητα 60 ml/h, σε στήλη Ni-NTA agarose QIAGEN (όγκος κολόνας 12 ml), εξισορροπημένη με 10 όγκους κολόνας διαλύματος A. Ακολουθούν εκπλύσεις με:

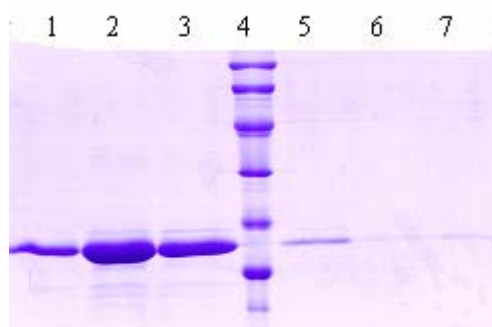
- (i) 50 όγκους κολόνας διαλύματος A, (wash 1).
- (ii) 10 όγκους κολόνας 20 mM ιμιδαζόλιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0, (wash 2).
15 όγκους κολόνας 40 mM ιμιδαζ.λιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0, (wash 3).

(iv) 35 όγκους κολόνας 40 mM ιμιδαζ.λιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0, (wash 4).

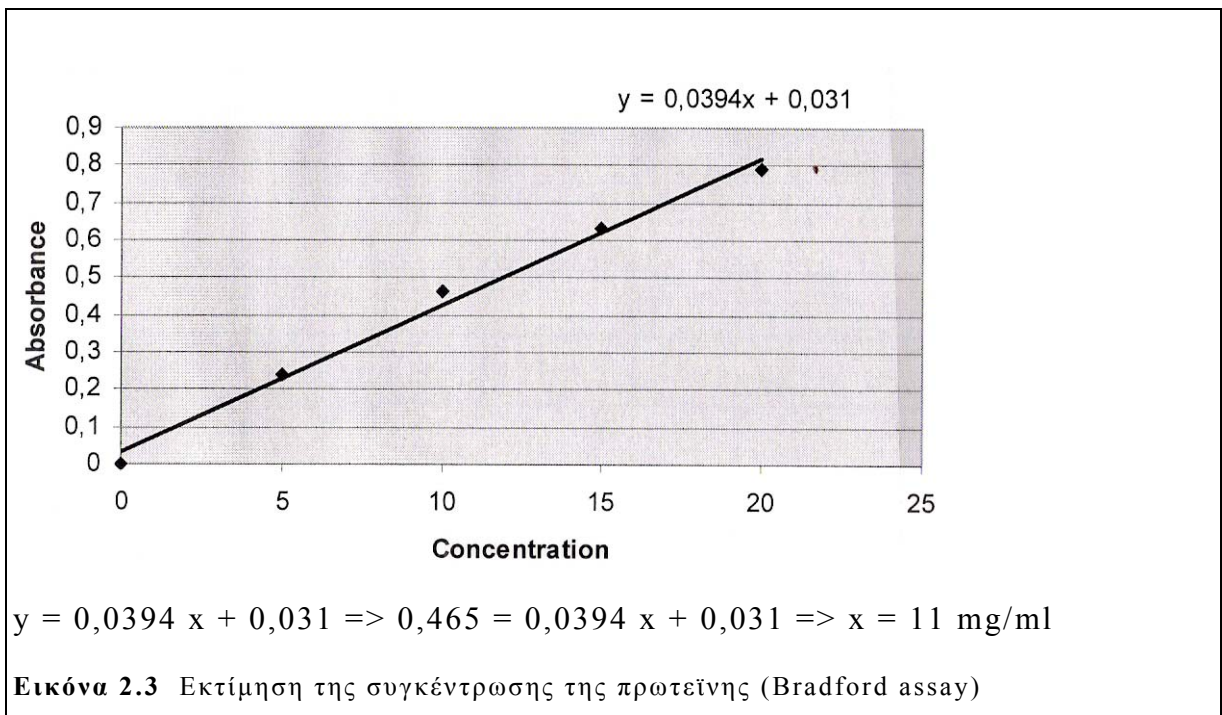
Η πρωτεΐνη εκλούεται σε κλάσματα των 12 ml, με 300 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0 (διάλυμα B). Τα βήματα του καθαρισμού ελέγχονται με SDS-PAGE, (εικόνες 2.1 και 2.2) Η απόδοση στο τέλος αυτού του σταδίου είναι κατά μέσο όρο 50 mg πρωτεΐνης όπως εκτιμάται με Bradford (Bradford 1976), (εικόνα 2.3). Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενώνονται και υποβάλλονται σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA.



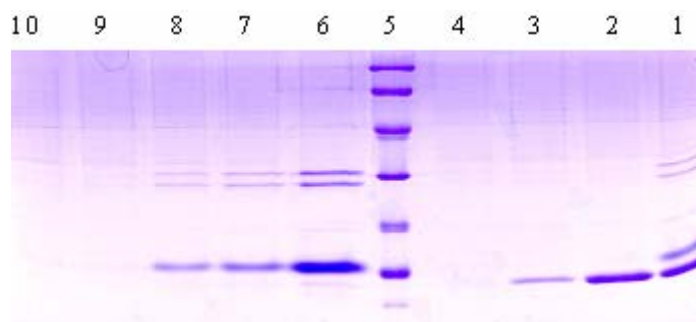
Εικόνα 2.1: Δείγματα από την πρώτη στήλη Ni-NTA που αναλύονται σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμένο με Coomassie Blue). 1. Δείγμα πριν την επαγωγή. 2. Δείγμα μετά την επαγωγή. 3. Δείγμα που φορτώθηκε στην στήλη Ni-NTA. 4. Δείγμα που εκλούεται κατά το φόρτωμα 5. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω, σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14. 6. Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζ.λιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0. 7. Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζ.λιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0. 8. Έκπλυση με 40 mM ιμιδαζ.λιο, 300 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0. 9. Έκπλυση με 40 mM ιμιδαζ.λιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0.



Εικόνα 2.2: 1-3, 5-7 Διαδοχικά κλάσματα έκλουσης με 300 mM ιμιδαζόλιο, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0. 4. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω, σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.



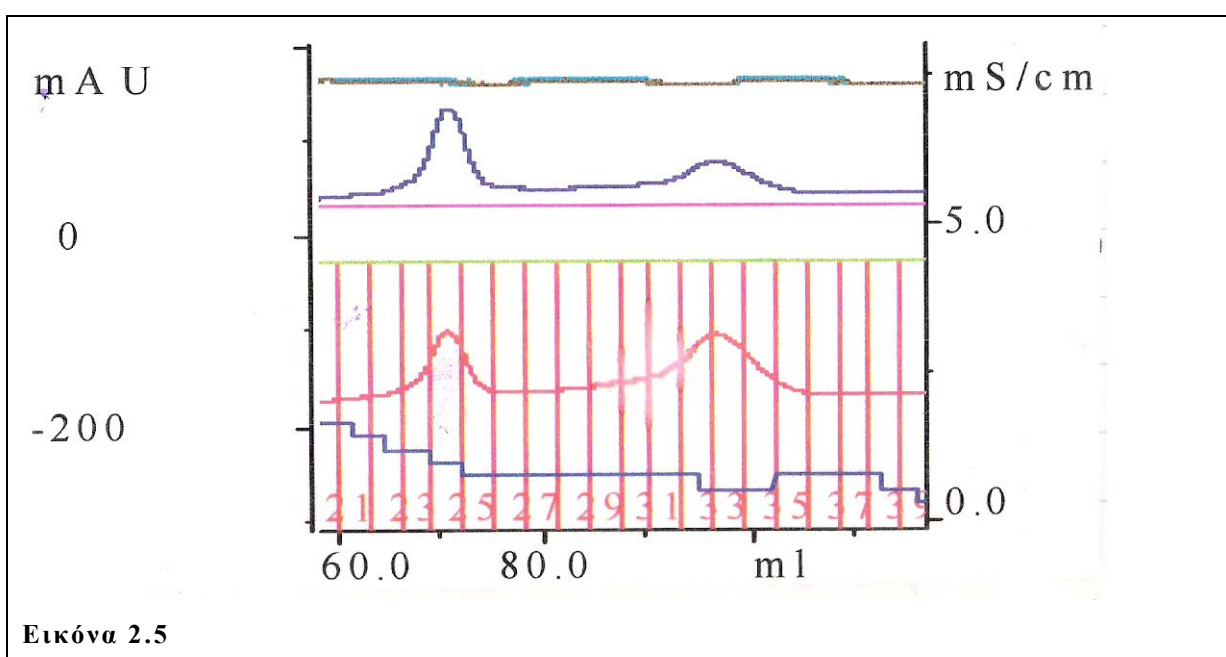
Στο δείγμα προστίθεται rTEV σε αναλογία μαζών πρωτεάση:πρωτεΐνη 1:10. Η αντίδραση πρωτεόλυσης λαμβάνει χώρα για 6 ώρες στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια το μίγμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM ιμιδαζολίου, 50 mM NaCl, 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.0 (διάλυμα Γ) στους 4 °C. Ακολουθεί η απομάκρυνση της πρωτεάσης από το διάλυμα της HrcQB-C. Το δείγμα φυγοκεντρείται για την απομάκρυνση των στερεών υπολειμμάτων (κατακρημνισμένες πρωτεΐνες) που σχηματίζονται κατά την αντίδραση πρωτεόλυσης και φορτώνεται με ταχύτητα 50 ml/h σε δεύτερη στήλη Ni-NTA agarose QIAGEN (όγκου 10 ml), εξισορροπημένη με διάλυμα Γ. Η κολόνα εκπλένεται με: (i) 30 ml διάλυμα Γ, (ii) 30 ml διάλυμα Α, (iii) 50 ml διάλυμα Β, (εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4 Δείγματα από τη δεύτερη στήλη Ni-NTA που αναλονται σε 15% SDS-PAGE (Laemmli, βαμμ.νο με Coomassie Blue). 1. Το μίγμα πρωτεΐνης/πρωτεάσης που φορτώνεται στη δεύτερη στήλη Ni-NTA. 2. Το δείγμα που εκλύεται κατά το φόρτωμα της στήλης 3. Έκπλυση με 10 mM ιμιδαζόλιο 4. Έκπλυση με 20 mM ιμιδαζόλιο 5. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω,σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4. 6-10 Διαδοχικά κλάσματα έκλυσης με 300 mM ιμιδαζόλιο.

Η απόδοση πρωτεΐνης στο τέλος αυτού του σταδίου είναι 20-25 mg. Η υπολογιζόμενη απώλεια μετά την πρωτεόλυση με την rTEV είναι της τάξης του 50%. Μετά τη δεύτερη στήλη Ni-NTA μπορεί να ακολουθήσει μια κολόνα μοριακής διήθησης Sephacryl S-100 για το διαχωρισμό μορίων πρωτεάσης που πιθανόν να εξακολουθούν να συνοδεύουν το δείγμα λόγω της μεγάλης της συγκέντρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης πρωτεόλυσης.

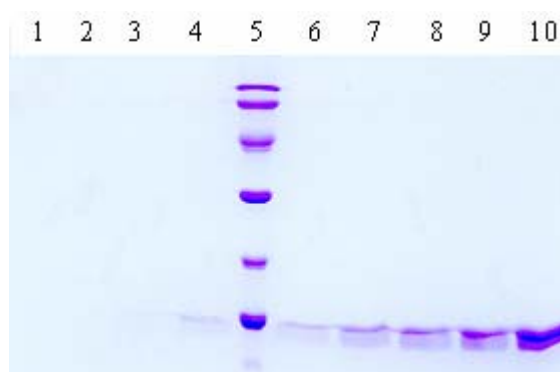
Η ολιγομερική κατάσταση της πρωτεΐνης σε διάλυμα διερευνήθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Βρέθηκε με τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης μοριακό βάρος 45 kDa. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε τετραμερές, 9 περίπου kDa το μονομερές, (εικόνα 2.5).



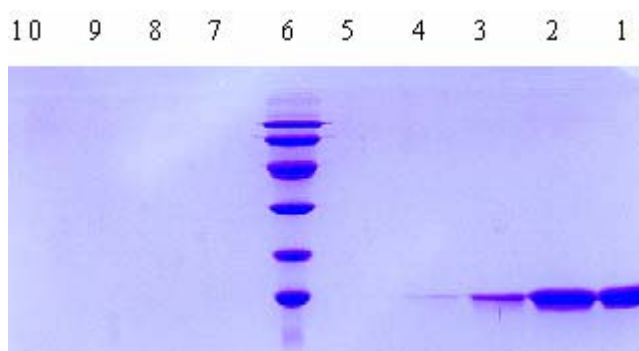
Εικόνα 2.5

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν φαίνονται στις εικόνες 2.6 και 2.7. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη ενώνονται και υποβάλλονται σε συνθήκες διαπίδυσης έναντι διαλύματος 50 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5. Το δείγμα που χρησιμοποιείται για κρυσταλλώσεις συγκεντρώνεται με Centriprep 3 (MW cutoff 3 kDa, Millipore corporation, Bedford, USA) μέχρι τα 8-11 mg/ml (Bradford). Αποθηκεύεται στους 4 °C ή ψύχεται απότομα σε υγρό άζωτο (flash cooling) και φυλάσσεται στους -70 °C.

Δείγμα από το πρωτεϊνικό διάλυμα όπως προκύπτει με το παραπάνω σχήμα καθαρισμού υπέστη διαπίδυση έναντι 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.5 και συγκεντρώθηκε μέχρι τα ~3 mg/ml. Ακολουθεί gel filtration.



Εικόνα 2.6: 1-4, 6-10 κλάσματα που συλλέχθηκαν από το gel filtration 5. Μάρτυρας μοριακών βαρών, από πάνω προς τα κάτω, σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4.



Εικόνα 2.7 : 1-5, 7-10 κλάσματα που συλλέχθηκαν από το gel filtration, 6. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω, σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4.

κ ε φ ά λ α ι ο 3

Κρυστάλλωση της HrcQb-C C23A του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae*.

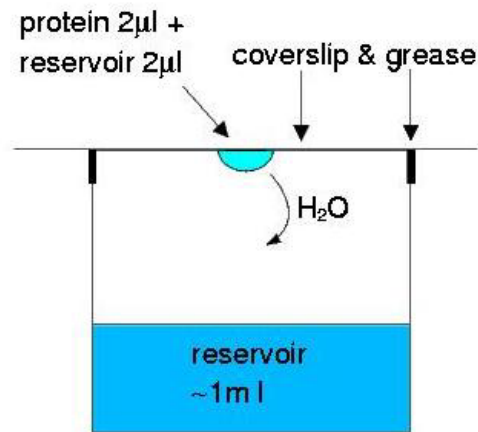
3.1 Προσπάθειες κρυστάλλωσης της C23A HrcQb-C.

Περίπου 100 mg καθαρής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθούν περίπου 1000 συνθήκες κρυστάλλωσης. Η μέθοδος κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διάχυση ατμών με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας, (εικόνα 3.1).

Η μέθοδος της διάχυσης ατμών περιλαμβάνει ένα κλειστό σύστημα δύο υδατικών διαλυμάτων με διαφορετικές συγκεντρώσεις των συστατικών τους. Τα διαλύματα αυτά εξισορροπούνται μέσω της τάσης των ατμών του νερού και των τυχόν πτητικών ουσιών που περιέχουν. 2 μl του πρωτεϊνικού διαλύματος αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος δεξαμενής. Η σταγόνα τοποθετείται σε σιλικοναρισμένη καλυπτρίδα που χρησιμοποιείται για να κλείσει αεροστεγώς δοχείο με 1 ml διαλύματος δεξαμενής. Το σύστημα αφήνεται προς εξισορρόπηση στους 18°C.

Στην κρεμαστή σταγόνα, το διάλυμα που περιέχει το βιομόριο συγκρατείται με δυνάμεις συνάφειας από το καπάκι του κλειστού συστήματος. Σε αυτό το διάλυμα περιέχονται και οι απαιτούμενοι παράγοντες κρυστάλλωσης των οποίων οι αρχικές συγκεντρώσεις είναι τέτοιες έτσι ώστε να μην επιφέρουν κορεσμό στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Στο κάτω μέρος του συστήματος βρίσκεται το μεγαλύτερο, σε όγκο διάλυμα της δεξαμενής, που περιέχει τους παράγοντες κρυστάλλωσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, αλλά όχι το προς κρυστάλλωση βιομόριο. Αποτέλεσμα της εξισορρόπησης της τάσης ατμών είναι η μείωση του όγκου της σταγόνας, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να φτάσει βαθμιαία στον υπερκορεσμό.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση είναι κοινοί με εκείνους της διαλυτότητας των πρωτεϊνών, με κυριότερους τη συγκέντρωση και την καθαρότητα της πρωτεΐνης στο διάλυμα, τη φύση των αλατιών και των οργανικών διαλυμάτων, το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται η προς κρυστάλλωση πρωτεΐνη και την θερμοκρασία (87).



(Εικόνα 3.1) Κρεμαστή σταγόνα

Εκτός από τις συνθήκες κρυστάλλωσης που αναγράφονται στον πίνακα 3.1, δοκιμάστηκαν και τα εμπορικά διαθέσιμα από την Hampton Research Grid screens PEG (6000), MPD, AS, NaCl, PEG/LiCl, και τα Crystal screen I και II και PEG/Ion.

Πίνακας 3.1 Συνθήκες που δοκιμάστηκαν για την κρυστάλλωση της C23A HrcQb-C με την τεχνική της κρεμαστής σταγόνας	
-	-
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής: MPD (v/v)
50 mM Bis-Tris pH 6	
80mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
50 mM Bis-Tris pH 6.2	
90mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
80mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
50 mM Bis-Tris pH 6.4	
90mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
50 mM Bis-Tris pH 6.6	
90mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
80mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
50 mM Bis-Tris pH 6.8	
90mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
80mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
50 mM Bis-Tris pH 7.0	
90mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
80mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
70mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
60mM (AcO)Mg	10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%
100 mM Bis-Tris pH 6.2	
90mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
80mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
70mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
60mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
100 mM Bis-Tris pH 6.4	Κατακρημνιστής : MPD (v/v)
90mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
80mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%

70mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
60mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
100 mM Bis-Tris pH 6.6	
90mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
80mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
70mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
60mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
100 mM Bis-Tris pH 6.8	
90mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
80mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
70mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
60mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
100 mM Bis-Tris pH 7.0	
90mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
80mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
70mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
60mM (AcO)Mg	10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής: PEG's
pH 7.4, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 7.8, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 8.2, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 8.4, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 8.6, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 8.8, 0.1 M HEPES	PEG 8000 (w/v): 5%, 10%, 15%, 20%
pH 6.7, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 7.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 8.0, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 8.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 8.9, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 9.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9% και 10 MgCl ₂
pH 6.7, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9%
pH 7.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9%
pH 8.0, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9%
pH 8.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9%
pH 8.9, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%, 7%, 8%, 9%

pH 9.5, 0.1 M Tris-HCl	PEG 8000 (w/v): 6%,7%,8%,9%
100 mM Bis-Tris pH 6.2	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
100 mM Bis-Tris pH 6.6	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
100 mM Bis-Tris pH 7.0	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
100 mM Bis-Tris pH 7.5	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
100 mM Bis-Tris pH 8.0	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
100 mM Bis-Tris pH 8.5	PEG 8000 (w/v): 5%,10%,15%,20%
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής : MPD (v/v)
pH=4.0, κιτρικό οξύ/ κιτρικό νάτριο 0.1M	10%, 20%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%
pH=4.5, κιτρικό οξύ / κιτρικό νάτριο 0.1M	10%, 20%, 40%, 45%, 50%, 55%,60%, 65%
pH=5.0, κιτρικό οξύ/ κιτρικό νάτριο 0.1M	40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%
pH=5.0, AcOH/AcONa 0.1M	10%, 20%, 40%, 60%
pH=6.0, MES 0.1M	10%, 20%, 40%, 60%
pH=6.2, Bis-Tris 0.1M	10%, 20%, 40%, 60%
pH=7.0, HEPES 0.1M	2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%
pH=7.2 HEPES 0.1M	10%, 20%, 30%, 40%, 60%
pH=7.5 HEPES 0.1M	20%, 25%, 30%, 35%
pH=7.5 Tris-HCl 0.1M	30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%
pH=7.8, HEPES 0.1M	20%, 25%, 30%, 35%
pH=7.8, HEPES 0.1M	2%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%
pH=7.8, HEPES 0.1M	35%, 40%, 45%, 50%, 60%
pH=8.2 Tris-HCl 0.1M	35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%
pH=8.3 Tris-HCl 0.1M	20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH=8.6 Tris-HCl 0.1M	35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%
pH=9.0, Bicine 0.1M	10%,20%, 40%, 50%, 60%
pH=9.0 Tris-HCl 0.1M	2%,5%,10%,15%,20%, 30%, 40%
pH=9.0 Tris-HCl 0.1M	45%, 50%, 60%, 65%
pH=9.5, Glycine/NaOH 0.1M	10%, 15%, 20%, 25%, 30%,35%, 40%
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής: PEG's (w/v)

pH=5.0, κιτρικό οξύ / κιτρικό νάτριο 0.1M	PEG 6000: 5%, 10%, 20%, 30%
pH=6.0, MES 0.1M	PEG 3350: 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%,25%, 30%, 35%, 40%
pH=6.0, MES 0.1M	PEG 6000: 5%, 10%, 20%, 30%
pH=6.2, Bis-Tris 0.1M	PEG 6000: 1%, 3%, 6%
pH=7.0, HEPES 0.1M	PEG 3350: 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%
pH=7.0, HEPES 0.1M	PEG 6000: 5%, 10%, 20%, 30%
pH=7.2, HEPES 0.1M	PEG 6000: 1%, 3%, 6%
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 1000: 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 3350:2%,4%, 6%, 8%,10%, 20%, 25%, 30%, 35%,40%
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 4000: 2%, 4%, 5%, 6%, 8%, 10%
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 6000: 5%, 10%, 20%, 30%
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 8000: 2%, 4%, 6%, 8%, 10%
pH=9.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 3350: 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%,25%, 30%, 35%, 40%
pH=9.0 Tris-HCl 0.1M	PEG 6000: 1%, 3%, 6%
pH=9.0, Bicine 0.1M	PEG 6000: 5%, 10%, 20%, 30%
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής: Άλατα
pH=4.0, κιτρικό οξύ / κιτρικό νάτριο 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.2, 0.8, 1.4, 1.6, 2.0, 2.4, 2.6, 3.0, 3.2
pH=5.0, κιτρικό οξύ / κιτρικό νάτριο 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.2, 0.8, 1.4, 1.6, 2.0, 2.4, 2.6, 3.0, 3.2
pH=5.5, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6
pH=6.0, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.2, 0.8, 1.4, 1.6, 2.0, 2.4, 2.6, 3.0, 3.2
pH=6.2, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.6
pH=6.5, HEPES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6
pH=7.0, HEPES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.4, 2.0, 2.4
pH=7.2, HEPES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.7

pH=7.5, HEPES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.4
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1.1, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.6, 3.0, 3.2
pH=9.0, Bicine 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.8, 1.6, 2.4, 3.2
pH=9.0, Tris-HCl 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.4, 1.6, 2.0, 2.4, 2.6, 3.0
pH=4.5, κιτρικό οξύ / κιτρικό νάτριο 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
pH=5.0, AcOH/AcONa 0,1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
pH=6.2, Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
pH=7.2, HEPES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
pH=8.0 Tris-HCl 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4
pH=9.0 Tris-HCl 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4

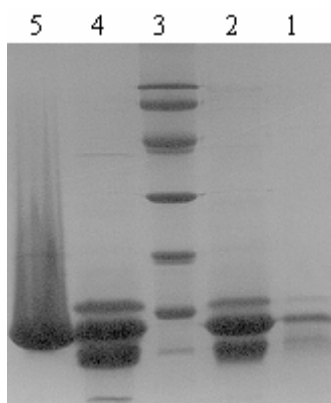
pH, Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής 1 : Αλας	Κατακρημνιστής 2: MPD (v/v)
pH=5.4, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.4, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.6, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.6, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.7, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	36%, 38%, 40%, 42%
	0.2, 0.25, 0.3	
pH=5.8, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.8, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.0, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.0, Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	36%, 38%, 40%, 42%
	0.2, 0.25, 0.3	
pH=6.2, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.4, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%

pH=6.4,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.7,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3	36%, 38%, 40%, 42%
pH=8.0,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.4, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.4,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.6, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.6,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.7,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.8, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=5.8,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.0, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.0,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.2, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.4, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.4,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=6.7,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH=8.0,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	36%, 38%, 40%, 42%
pH,Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστής 1 : Άλας	Κατακρημνιστής 2: PEG's
pH=5.4, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.4,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%

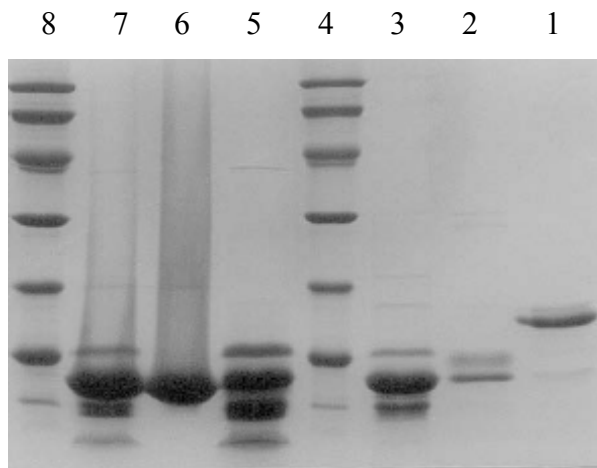
pH=5.6, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.6,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.7,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
	0.2, 0.25, 0.3	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.8, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.8,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.0, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.0,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
	0.2, 0.25, 0.3	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.2, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.4, MES 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.4,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.1	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.7,Bis- Tris0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
	0.2, 0.25, 0.3	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=8.0,Bis-Tris 0.1M	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M): 0.05, 0.1, 0.15,	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.6,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.7,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.8, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=5.8,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.0, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%

pH=6.0,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.2, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.4, MES 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.4,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=6.7,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%
pH=8.0,Bis-Tris 0.1M	NaCl (M) : 0.3, 0.6, 1.2, 2.4	PEG 6000: 6%,8%, 10%, 12%, 14%, 16%

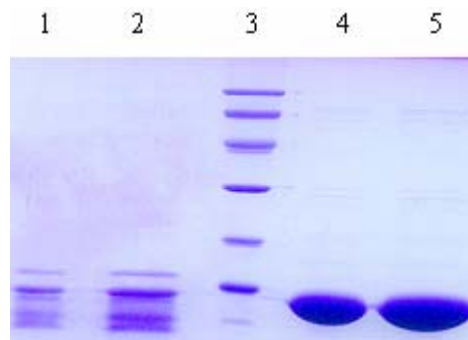
Σε καμία από τις συνθήκες κρυστάλλωσης της C23A HrcQb-C δεν εμφανίστηκαν κρύσταλλοι. Με SDS-PAGE δείχτηκε πως το πρωτεϊνικό δείγμα πρωτεολύθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα, γεγονός που εξηγεί γιατί οι προσπάθειες κρυστάλλωσης απέβησαν άκαρπες (εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: 1,2 HrcQb fragment mutant (πρώτος και δεύτερος καθαρισμός αντίστοιχα) 3. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω,σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4. 4. HrcQb fragment mutant (τρίτος καθαρισμός) 5. Πρωτεϊνικό δείγμα της HrcQb-C από σταγόνες που εμφανίστηκαν κρύσταλλοι (Υλικό της Δρ. Β. Φαδούλογλου).



Εικόνα 3.3 : 1,2 Δείγματα της πρωτεΐνης με και χωρίς την ουρά των ιστιδινών αντίστοιχα. 3, Δείγμα που φορτώθηκε στην S-100. 4, 8 Μάρτυρας μοριακών βαρών σε kDa (94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4). 5, HrcQb-C C23A συμπυκνωμένη. 6, HrcQb-C . 7, Ισόποση ανάμειξη HrcQb-C και HrcQb-C C23A.



Εικόνα 3.4: 1, 2 1μl και 2μl HrcQb-C C23A αντίστοιχα μετά από 10 μέρες στους 4°C. 3. Μάρτυρας μοριακών βαρών. Αρχίζοντας από πάνω προς τα κάτω,σε kDa : 94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4. 4, 5 1μl και 2μl αντίστοιχα της HrcQb-C C23A η οποία τοποθετήθηκε στους -80°C αμέσως μετά τον καθαρισμό.

3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Με σκοπό τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της C23A HrcQb-C και την σταθερότητα αυτού του μορίου σε σύγκριση με του αγρίου τύπου πρωτεΐνη, η C23A HrcQb-C υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε σε ομοιογένεια. Κατά την διάρκεια αυτών των πειραμάτων αποδείχτηκε πως η πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε πρωτεόλυση. Η πρωτεόλυση αποτελεί σοβαρό και σχετικά συχνό πρόβλημα στην απομόνωση υπερεκφραζόμενων πρωτεϊνών που παράγονται για δομικές μελέτες (88). Η χαμηλή θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα ο καθαρισμός και η παρουσία αναστολέων πρωτεασών δεν είναι παράγοντες ικανοί να αποτρέψουν την πρωτεόλυση και η πρωτεΐνη φαίνεται να κόβεται σε δύο σημεία. Αυτή η συμπεριφορά της C23A HrcQb-C φαίνεται να ταιριάζει με αυτή της HrcQb, όπως διερευνήθηκε στο εργαστήριο του καθηγητή Μ.Κοκκινίδη από την δρ.Β.Φαδούλογλου.

Σε καμία από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν δεν μεγάλωσαν κρύσταλλοι, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην απόσπαση του δισουλφιδικού δεσμού από το πρωτεϊνικό μόριο. Αυτή η υπόθεση όμως δεν είναι σύμφωνη με την συμπεριφορά της ομόλογης FliN πρωτεΐνης, η οποία χωρίς να έχει δισουλφιδικό δεσμό στο μόριο της, μπορεί να σχηματίζει διμερή και τετραμερή (με την FliM στην *T.maritima* και με τον εαυτό της στην *E.coli*).

BIBΛIOΓPAΦIA

1. Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379-433.
2. Alfano, J.R. & Collmer, A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria trafficking harpins, Avr proteins and death, *J. Bacteriol.* **179**, 5655-5662.
3. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions, *Science* **276**, 726-733.
4. Buttner, D. & Bonas, U. (2002). Getting across- bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell, *EMBO J.* **21**, 5313-5322.
5. Cornelis, G.R. (2000). Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host, *Phil. Trans. R. Lond. B.* **355**, 681-693.
6. Cornelis, G.R. & Van Gijsegem, F (2000). Assembly and function of type III secretion systems, *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 735-774.
7. He, S.-Y. (1997). Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellr assembly?, *Trends Microbiol.* **5**, 489-495.
8. Dale, C., Plague, G.R., Wang, B., Ochman, H. Moran, N.A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12397-12402.
9. Charkowski, A.O., Huang, H.C. & Collmer, A. (1997). Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* hrp mutants suggest that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of Gram-negative Bacteria, *J. Bacteriol.* **179**, 3866-3874.
10. Galan, J.E. (1996). Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells, *Mol. Microbiol.* **20**, 263-271.
11. Lory, S. 1998. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 27-35.
12. Salmond, G. P. C., and P.J. Reeves. 1993. Membrane traffic warden and protein secretion in Gram-negative bacteria. *TIBS.* **18**, 7-12.
13. Salmond, G. P. C. 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**, 181-200.

14. Van Gijsegem, F., S. Genin, and C. Boucher. 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* **1**,175-180.
15. Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello, and C. Boucher. 1995. The hrp 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(6)**, 1095-1114.
16. Cornelis, G. R. 1997. Contact with eucaryotic cells: a new signal triggering bacterial gene expression. *Trends in Microbiol.* **5(2)**,43-44.
17. Lee, C. A. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eucaryotic cells? *Trends in Microbiol.* **5(4)**, 148-156.
18. Young, J. M., D.W. Dye, J.F. Brandburg, C.G.Panagopoulos, and C.F. Robbs.(1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z.J. Agri. Res.* **21**, 153-177.
19. Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas,U., Boucher,C.A., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J., et al (1996) *Mol. Microbiol.* **20**, 681-683.
20. Lindgrem, P.B., Peet, R.E. & Panopoulos, N.J. (1986) *J.Bacteriol.* **168**, 512-522.
21. Collmer, A., Lindeberg,M., Petnicki-Ocwieja, T., Schnieder, D.J. & Alfano, J.R. (2002). Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol.* **10**, 462-469.
22. Sawada,H., Suzuki,F., Matsuda,I. & Saitou,N. (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argKargK* and the evolutionary stability of *hrp* gene cluster. *J.Mol.Evol.* **49**,627-644.
23. Chang,J.H., Goel,A.K., Grant,S.R., & Dangl,J.H. (2004). Wake of the flood: ascribing functions to the wave of the type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Curr. Opin.Microbiol.* **7**, 11-18.
24. Espinosa, A. & Alfano,J. R. (2004). Disabling surveillance : Bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol.* **6**, 1027-1040.
25. Grant,S.R., Fisher E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., Dangl, J.L. (2006). Subterfuge and Manipulation : Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*

26. Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E. & Aizawa, S.I. (1998). Supramolecular structure of *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Science* **280**, 602-605.
27. Francis, N.R., Sosinsky, G.E., Thomas, D. & DeRosier, D.J. (1994). Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex, *J. Mol. Biol.* **235**, 1261-1270.
28. Tang, H., Billings, S., Wang, X., Sharp, L & Blair, D.F. (1995). Regulated underexpression and overexpression of the FliN protein of *Escherichia coli* and evidence for an interaction between FliN and FliM in the flagellar motor, *J. Bacteriol.* **177**, 3496-3503.
29. Mathews, M.A.A., Tang, H.L. & Blair, D.F. (1998). Domain analysis of the FliM protein of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **180**, 5580-5590.
30. Zhao, R., Pathak, N., Jaffe, H., Reese, T.S. & Khan, S. (1996). FliN is a major structural protein of the C-ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body, *J. Mol. Biol.* **261**, 195-208.
31. Lloyd, S.A., Whitby, F.G., Blair, D.F. & Hill, C.P. (1990). Structure of the C-terminal domain of FliG, a component of the rotor in the bacterial flagellar motor. *Nature* **400**, 472-475.
32. Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S. & Sasakawa, C. (2000). 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**, 3876-3887.
33. McGuffin, L.J., Bryson, K. & Jones, D.T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405.
34. Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: Insights into their function from structural similarities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3027-3030.
35. Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J., and Kokkinidis, M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* **6**, 805-816.
36. Aizawa, S.I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 157-164.

37. Fadouloglou, V.E., Tampakaki, A.P., Glykos, N.M., Bastaki, M.N., Hadden, J.M., Philips, S.E., Panopoulos, N.J., Kokkinidis, M. (2004). Structure of HrcQb-C, a conserved component of the bacterial type III secretion systems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 70-75.
38. Brown, P.N., Mathews, M.A.A., Joss, L.A., Hill, C.P., Blair, D.F. (2005) Crystal Structure of the Flagellar Rotor Protein FliN from *Thermotoga maritima*. *J. Bacteriol.* **187:8**, 2890-2902.
39. Rosqvist, R., Magnusson, K. E., Wolf-Watz H. (1994). Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells, *EMBO J.* **13**, 964-972.
40. Finlay, B.B., and Falkow, S., (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **61**, 136-169.
41. Hoods, M., and Mattick, J.S., (1995). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer system for the formation of surface-associated protein complexes. *Mol. Microbiol.* **10**, 233-243.
42. Winans, S.C., Burns, D.L., and Christie, P.J., (1996). Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **4**, 64-68.
43. E. Hoiczyk and G. Blobel (2001). Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4669-4674.
44. Fath, M.J., and Kolter, R., (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**, 995-1017.
45. Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the EPEC type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11638-11643.
46. He, S.Y., and Jin, Q. (2003) The Hrp pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 15-19.
47. Lawrence, J. G., and J.R. Roth. 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics.* **143**, 1843-1860.
48. Lloyd, S.A., Forsberg, A., Wolf-Watz, H. & Francis, M. (2001). Targetting exported substrates to the *Yersinia* TTSS: different functions for different signals? *Trends Microbiol.* **9**, 367-371.

49. Nikaido, H. 1996. Outer membrane, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
50. Jin, Q., Thilmony, R., Zwiesler-Vollick, J. & He, S.-Y. (2003). Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*, *Microbes Infect.* **5**, 301-310.
51. Lehmann, P. 2002. Structure and evolution of plant disease resistance genes. *J. Appl. Genet.* **43**, 403-414.
52. Lindeberg, M., J. Stavriniades, J.H. Chang, J.R. Alfano, A. Collmer, J.L. Dangl, J.T. Greenberg, J.W. Mansfield, and D.S. Guttman. (2005). Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III Hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 275-282.
53. Alfano, J.R., and A. Collmer. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 385-414.
54. Chang, J.H., J.M. Urbach, T.F. Law, L.W. Arnold, A. Hu, S. Gombar, S.R. Grant, F.M. Ausubel, and J.L. Dangl. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 2549-2554.
55. Wei, W., Plovanich-Jones, A., Deng, W.-L., Jin, Q.-L., Collmer, A., Huang, H.-C. & He, S.Y. (2000). 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. USA* **97**, 2247-2252.
56. Shan, L., H.S., Oh, J. Chen, M. Guo, J. Zhou, J.R. Alfano, A. Collmer, X. Jia, and X. Tang. (2004). The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **17**, 447-455.
57. Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W. & Dessen, A. (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* **22**, 4957-4967.
58. Sato, H. *et al.* (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* **22**, 2959-2969.
59. Anderson, D.M., Fouts, D.E., Collmer, A. & Schneewind, O. (1999). Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12839-12843.

60. Mudgett, M.B., Chesnokova, O., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Rossier, O., Bonas, U. & Staskawicz, B.J. (2000). Molecular signals required for type III secretion and translocation of the *Xanthomonas campestris* AvrBs2 protein to pepper plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13324-13329.
61. Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G. & Greenberg, J.T. (2002). A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* **295**, 1722-1726.
62. Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Scheehter, L.M., Janes, M.D., Buell, R., Tang, X., *et al.* (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7652-7657.
63. Russmann, H., Kubori, T., Sauer, J., and Galan, J.E. (2002). Molecular and Functional analysis of the type III secretion signal of the *Salmonella enterica* InvJ protein. *Mol. Microbiol.* **46**, 769-779.
64. Rossier, O., Wengelnik, K., Hahn, K. & Bonas, U. (2000). The *Xanthomonas* Hrp type III system secretes proteins from plant and mammalian bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9368-9373.
65. Buttner, D. & Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 312-319.
66. Mackey, D., Holt, B.F., III, Wiig, A. & Dangl, J.L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**, 743-754.
67. Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Dangl, J.L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.
68. Jackson, R.W., E. Athanassopoulos, G. Tsiamis, J.W. Mansfield, A. Sesma, D.L. Arnold, M.J. Gibbon, J. Murillo, J.D. Taylor, and A. Vivian (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10875-10880.

69. Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenhull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M.A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J.D., *et al.* (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* **19**, 3204-3214.
70. Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.-I. & Galan, J.E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10225-10230.
71. Kimbrough, T.G. & Miller, S.I. (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11008-11013.
72. Blocker, A., Gounon, P., Larquet, E., Niebuhr, K., Cabiaux, V., Parsot, C. & Sansonetti, P. (1999). The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 683-693.
73. Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M. & Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature* **410**, 331-337.
74. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy, *Nature* **424**, 643-650.
75. Schuch, R. & Maurelli, A.T. (2001). Spa33, a cell surface-associated subunit of the Mxi-Spa type III secretory pathway of *Shigella flexneri*, regulates Ipa protein traffic, *Infect. Immun.* **69**, 2180-2189.
76. Winstanley, C., Hales, B.A., Sibanda, L.M., Dawson, S., Gaskell, R.M. & Hart, C.A. (2000). Detection of type III secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*, *Vet. Microbiol.* **72**, 329-337.
77. Plano, G.V., Day, J.B. & Ferracci, F. (2001). Type III export: new uses for an old pathway, *Mol. Microbiol.* **40**, 284-293.
78. Desvaux, M., Hebraud, M., Henderson, I.R., and Pallen, M.J. (2006). Type III secretion: what's in a name?, *Trends in Microbiology*, **14(4)**, 157-160.
79. Lech, K. & Brent, R. (1987). Media preparation and bacteriological tools, *Current protocols in molecular biology*, eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. **1**, unit 1.1.

80. Bollag, D.M., Rozycki, M.D. & Edelstein, S.J. (1996). Protein methods, second edition, Wiley-Liss, pp 301-349.
81. Hochuli, E. (1988). Large-scale chromatography of recombinant proteins, *J. Chromatogr.* **444**, 293-302.
82. Petty, K.J. (1996). Metal-chelate affinity chromatography, *Current protocols in molecular biology*, ed. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. **2**, unit 10.11B.
83. Lehr, R.V., Elefante, L.C., Kikly, K.K., O'Brien, S.P. & Kirkpatrick, R.B. (2000). A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of Histidine-tagged recombinant proteins expressed in drosophila S2 cells, *Protein Express. Purif.* **19**, 362-368.
84. Janknecht, R., Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R., Nordheim, A. & Stunnenberg, H.G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8972-8976.
85. Polayes, D.A., Goldstein, A., Ward, G. & Hughes, Jr. A.J. (1994). TEV protease, recombinant: a site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins, *Focus* **16**, 2-5.
86. Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A. & Dougherty, W.G. (1994). Release of protein and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, *Anal. Biochem.* **216**, 413-417.
87. McPherson, A., Malkin, A. & Kuznetsov, Y. (1995). The science of macromolecular crystallization, *Structure* **3**, 759-768.
88. Saijo-Hamano, Y., Namba, K. & Oosawa, K. (2000). A new purification method for overproduced proteins sensitive to endogenous proteases, *J. Struct. Biol.* **132**, 142-146.
89. Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. and Sasakawa C. (2006). Shigella Spa33 Is an Essential C-ring of Type III secretion Machinery. *J. Biological Chemistry*, **281**, 599-607.
90. Rahme, L. G., M.N. Mindrinos, and N.J. Panopoulos (1992). Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **174(11)**, 3499-3507.
91. Groisman, E. A., and H. Ochman. (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* **87**, 791-794.

92. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**, 1089-1097.
93. Lawrence, J. G., and J.R. Roth. (1996). Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics.* **143**, 1843-1860.
94. Nizan, R., I. Barash, L. Valinsky, A. Lichter, and S. Manulis. (1997). The presence of *hrp* genes on the pathogenicity-associated plasmid of the tumorigenic bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**(5),677-682.
95. Alfano, J. R., and A. Collmer (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell.* **8**, 1683-1698.
96. Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50-108.
97. Joardar, V. et al (2005). Whole-Genome Sequence Analysis of *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition. *J.Bacteriol.* **187**, 6488-6498.
98. Berks, B. C., Palmer, T. and Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Op. Microbiol.* **8**(2), 174-181.
99. Henderson, I.R., Garcia, F.N., Desvaux, M., Fernandez, R.C. and AlaAldeen D. (2004). Type V Protein Secretion Pathway : the Autotransporter story. *MMBR*, **68**, 692-744.
100. Irikura, V.M., Kinara M., Yamaguchi, S., Sockett and Macnad R.M. (1993). *Salmonella typhimurium* *fliG* and *fliN* mutations causing defects in assembly, rotation, and switching of the flagellar motor. *J. Bacteriol.* **175**, 802-810.