

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ Κ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»
Κατεύθυνση «Ανιχνευσιμότητα Γενετικά τροποποιημένων Οργανισμών και Μοριακή Οικολογία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PROLYL CIS-TRANS
ΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΟ *Sinorhizobium meliloti*.**

ΑΛΕΞΙΟΥ Ι. ΣΠΥΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

Π.Μ.Σ. «ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ και ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΓΕΩΠΟΝΙΑ»
Κατεύθυνση «Ανιχνευσιμότητα Γεννητικά τροποποιημένων Οργανισμών και Μοριακή Οικολογία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PROLYL CIS-TRANS
ΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΟ *Sinorhizobium meliloti*.**

ΑΛΕΞΙΟΥ Ι. ΣΠΥΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

Η ανάθεση της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας έγινε με την (16^η Συνεδρία/2/6/2009) απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύγκλησης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Φλεμετάκης Εμμανουήλ, Καθηγητής (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Καθηγητής (Μέλος)

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο «Ανιχνευσιμότητα Γεννητικά Τροποποιημένων Οργανισμών και Μοριακή Οικολογία».

Σε αυτές τις λίγες γραμμές θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και με συμπεριέλαβε στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου του καθώς και για την διαρκή υποστήριξη που μου παρείχε μέσω της καθοδήγησης και των συμβουλών του οποιαδήποτε στιγμή και αν τις χρειάστηκα.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής καθηγητή κ. Φλεμετάκη Μανώλη καθώς και τον Επίκουρο κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις τους.

Νιώθω επίσης το χρέος να ευχαριστήσω θερμά τις Διδάκτορες Δήμου Μαρία και Βενιεράκη Αναστασία για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και για το ενδιαφέρον που έδειχναν σε οποιοδήποτε πρόβλημα μπορεί να αντιμετώπιζα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το σύνολο των συναδέλφων μου που μοιραστήκαμε μαζί πολλές ώρες εργασίας στον χώρο του εργαστηρίου με πολλές αγωνίες αλλά και στιγμές χαράς που θα θυμάμαι πάντα.

Την εργασία αυτή θα ήθελα να την αφιερώσω στην οικογένειά μου και στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Γεωργία Λιάρα αφού χωρίς αυτούς απλά δεν θα τα είχα καταφέρει.

Σας Ευχαριστώ θερμά.

Περίληψη

Οι Πεπτιδυλ-Προλυλ cis-trans ισομεράσες (PPIases E.C. 5.2.1.8), καταλύουν την ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ μιας προλίνης και ενός οποιουδήποτε προπορευόμενου αμινοξέος. Οι PPIάσες θεωρούνται ένζυμα ζωτικής σημασίας αφού ο κύριος ρόλος που διαδραματίζουν είναι να υποβοηθούν την διαδικασία αναδίπλωσης διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων στόχων έτσι ώστε αυτά να αποκτούν την σωστή τριτοταγή και άρα λειτουργική δομή τους. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές οικογένειες PPIακών οι οποίες περιλαμβάνουν τις κυκλοφιλίνες (CYP: Cyclophilins), τις FKBP's (FK506 Binding Proteins) και τις παρβουλίνες (Parvulins). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των τριών αυτών οικογενειών δεν σχετίζονται μεταξύ τους αφού τα μέλη των οικογενειών αυτών διαφέρουν στην εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και την ευαισθησία τους σε διαφορετικούς παρεμποδιστικούς παράγοντες.

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός αντιπροσώπων της οικογένειας των παρβουλινών στο ριζόβιο *Sinorhizobium meliloti*. Με βάση την ομολογία με γνώτες και καλά χαρακτηρισμένες παρβουλίνες του βακτηρίου *E.coli*, εντοπίστηκε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια πιθανή παρβουλίνη στο *Sinorhizobium meliloti*, το Smc02451.

Η αντίστοιχη αμινοξική αλληλουχία μελετήθηκε και βρέθηκε ότι η προς μελέτη πρωτεΐνη διαθέτει μια δομική περιοχή PPIάσης (PPI-PPIC). Επίσης η πιθανή αυτή παρβουλίνη διαθέτει ένα πεπτίδιο οδηγό που την τοποθετεί στην εξωτερική μεμβράνη. Παράλληλα έγινε *in silico* πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της και μέσω εταιρόλογης έκφρασης στην *E.coli*, μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα της υπο έρευνας πρωτεΐνης έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων. Τέλος πραγματοποιήθηκε έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 και πρωτεϊνών του περιπλασματικού χώρου του βακτηρίου *Sinorhizobium meliloti*.

Λεξεις Κλειδια: *Sinorhizobium meliloti*, Smc02451, PPIases, παρβουλίνες, ισομεράσες, ταπερόνιο, αναδίπλωση πρωτεϊνών

Abstract

Peptidyl-prolyl Isomerases (PPIases E.C.5.2.1.8) catalyze the cis-trans isomerisation of the peptidyl-prolyl peptide bond in oligopeptides and proteins, a rate limiting step in the process of protein folding that is essential for generating functional proteins.

PPIases are subdivided into four different sequence-unrelated families. Parvulins comprise the third family of PPIases, being the only enzymes of this superfamily that seem to be essential for cell survival.

One gene in *Sinorhizobium meliloti*, Smc02451, was identified encoding for a putative parvulin-type PPIase. The polypeptide encoded from this gene was expressed in *E.coli*, and the recombinant protein was purified and biochemically characterized. Interactions between the recombinant protein, Smc02451 and periplasmic proteins of *S.meliloti* have been also investigated.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, PPIase, Parvulin, Protein folding, Smc02451, Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, periplasmic proteins

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή	9
1.1 Ο πεπτιδικός δεσμός της προλίνης.	10
1.2 Η αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων.....	10
1.3 Η υπεροικογένεια των ανοσοφιλινών.....	12
1.3.1 Η οικογένεια των κυκλοφιλινών.....	12
1.3.2 Η οικογένεια των FKBP (FK506 Binding Proteins).....	16
1.3.3 Η οικογένεια των Παρβουλινών.....	18
1.4 Το γονιδίωμα του <i>Sinorhizobium Meliloti</i>	27
Υλικά κ Μέθοδοι.....	29
2.1 Καλλιέργεια του βακτηρίου <i>Sinorhizobium meliloti</i>	30
2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.	30
2.3 Πέψη δεοξυριβονουκλεοτιδικών οξέων (DNA) με ενδονουκλεάσες περιορισμού.....	31
2.4 Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης.....	32
2.5 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.	33
2.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA με την χρήση του ενζύμου DNA λιγάσης.....	34
2.7 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	34
2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).....	35
2.9 Έλεγχος βακτηριακών καλλιεργειών για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.	36
2.10 Απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με επιτόπιο 6xHis.	37
2.11 Διαπίδυση.....	38
2.12 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	38
2.13 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford.....	40
2.14 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσών.	40
2.15 Απομόνωση περιπλασμικών πρωτεϊνών από το <i>Sinorhizobium meliloti</i>	41
2.16 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Smc02451) και πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου του <i>Sinorhizobium meliloti</i>	42
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'	43
Σύνθεση Θρεπτικών Μέσων.....	43

A.LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης <i>E.coli</i>	43
B: YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ριζοβίων <i>Sinorhizobium meliloti</i>	43
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β΄	44
Σύνθεση Ρυθμιστικών Διαλυμάτων	44
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ΄	46
Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a.....	46
Αποτελέσματα	48
3.1 <i>In silico</i> ανάλυση.....	49
3.2 Ευθυγράμμιση αλληλουχιών.....	50
3.3 <i>In silico</i> πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Smc02451 του <i>Sinorhizobium meliloti</i>	54
3.4 Ενίσχυση και υποκλωνοποίηση της ακολουθίας του γονιδίου Smc02451 που κωδικοποιεί για πιθανή παρβουλίνη στο βακτήριο <i>Sinorhizobium meliloti</i> σε κατάλληλο φορέα έκφρασης.	55
3.5 Εταιρόλογη έκφραση σε κύτταρα <i>E.coli</i> BL21 και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πολυπετιδίων με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας.	57
3.6 Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας PPIασών.	59
3.7 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 με πρωτεΐνες του περιπλασμικού χώρου του <i>Sinorhizobium meliloti</i>	62
Συζήτηση.....	64
4.1 Έκφραση των γονιδίων των παρβουλινών.....	65
4.2 Μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.	65
4.3 Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 και περιπλασμικών πρωτεϊνών του <i>Sinorhizobium melliloti</i>	65
Βιβλιογραφία.....	68

Εισαγωγή

1.1 Ο πεπτιδικός δεσμός της προλίνης.

Η προλίνη είναι ένα α-αμινοξύ, ένα από τα 20 αμινοξέα που συμμετέχουν στην βιοσύνθεση των πρωτεϊνικών μορίων. Τα κωδικόνια που κωδικοποιούν για την ενσωμάτωση του αμινοξέως αυτού στην πολυπετιδική αλυσίδα είναι τα CCU, CCC, CCA και CCG. Ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να συνθέσει την προλίνη χρησιμοποιώντας ως πρόδρομο μόριο το L-γλουταμινικό και έτσι δεν είναι αναγκαία η πρόσληψη του αμινοξέος μέσω της τροφής. Είναι επίσης το μοναδικό από τα 20 αμινοξέα που συμμετέχουν στην σύνθεση των πρωτεϊνών το οποίο διαθέτει δευτεροταγή αμιδική ομάδα.

Η χαρακτηριστική κυκλική δομή της πλευρικής ομάδας της προλίνης, παρεμποδίζει την ελεύθερη περιστροφή της και «κλειδώνει» την διεδρική (ϕ) γωνία που σχηματίζει με το κεντρικό μόριο του αμινοξέως περίπου στις 75° αποκτώντας έτσι μια εξαιρετική διαμορφωτική ευελιξία σε σύγκριση με άλλα αμινοξέα. Ως συνέπεια του γεγονότος αυτού, κατά την αναδίπλωση η προλίνη χάνει λιγότερη διαμορφωτική εντροπία και αυτό μπορεί να εξηγήσει και την έντονη παρουσία της στις πρωτεΐνες διαφόρων θερμοφιλικών οργανισμών.

Η προλίνη όταν βρίσκεται στο μέσω κάποιας δευτεροταγούς πρωτεϊνικής δομής όπως α-έλικας ή β-πτυχωτής, διακόπτει την συνέχεια της αλλά ταυτόχρονα μπορεί να βρεθεί σαν το πρώτο κατάλοιπο κάποιας α-έλικας καθώς και σαν τελικό κατάλοιπο κάποιας β-πτυχωτής δομής. Επίσης η προλίνη βρίσκεται συχνά και στα σημεία συστροφής των πρωτεϊνικών αλυσίδων γεγονός που εξηγεί το ότι βρίσκεται συχνά εκτεθειμένη στο εξωτερικό διάλυμα χωρίς να διαθέτει μια καθαρά αλειφατική αλυσίδα. Η αμιδική ομάδα της προλίνης στερείται ενός υδρογόνου και έτσι μπορεί να λειτουργήσει μόνο ως δέκτης πρωτονίου για την δημιουργία υδρογονικού δεσμού.

1.2 Η αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων.

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων και κατ' επέκταση η διαμόρφωση της τριτοταγούς λειτουργικής δομής τους, θεωρούνταν μια αυτόματη διαδικασία που καθορίζονταν από την πρωτοταγή αλληλουχία των πολυπετιδικών αλυσίδων και πραγματοποιούνταν σε τάξεις χρόνου δευτερολέπτων ή ακόμα και δεκάτων του δευτερολέπτου. Μια όμως διαμορφωτική αλλαγή που πραγματοποιείται κατά την διαδικασία αναδίπλωσης απαιτεί πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να πραγματοποιηθεί. Η διαμορφωτική αυτή αλλαγή είναι η cis/trans ισομερίωση του πεπτιδικού προλυλ δεσμού της προλίνης.

Οι περισσότεροι πεπτιδικοί δεσμοί στην φύση αποκτούν την trans διαμόρφωση (συνήθως σε ποσοστό 99,5% των περιπτώσεων), κυρίως γιατί το αμιδικό υδρογόνο στο trans ισομερές παρουσιάζει μικρότερη στερική αλληλεπίδραση με το προπορευόμενο α-άνθρακα απ' ό,τι με τον επόμενο όπως συμβαίνει στην cis διαμόρφωση.

Σε αντίθεση με τα προαναφερθέντα οι cis και trans διαμορφώσεις του πεπτιδικού προλυλ-δεσμού της προλίνης X-Pro (όπου X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ που συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση), είναι σχεδόν ίσες ενεργειακά. Το ποσοστό σε φυσικές συνθήκες της cis διαμόρφωσης του δεσμού X-Pro κυμαίνεται από 10-40% το οποίο μπορεί να καθοριστεί και από το

προπορευόμενο αμινοξύ με το οποίο συνδέεται η προλίνη αφού τα αρωματικά αμινοξέα φαίνεται να ευνοούν την *cis* διαμόρφωση.

Μέσω της πραγματοποίησης πειραμάτων αναδίπλωσης πρωτεϊνικών μορίων, έχει αποδειχθεί ότι η ισομερίωση του πεπτιδικού-προλύλ δεσμού είναι το βήμα που καθορίζει και τον ρυθμό της διαδικασίας αναδίπλωσης του όλου πρωτεϊνικού μορίου. Τα ενδιάμεσα προϊόντα αναδίπλωσης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην πρωτεολυτική αποδόμιση, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κάποιος ενζυματικός μηχανισμός είναι υπεύθυνος για την κατάλυση της διαδικασίας ισομερίωσης.



Εικόνα 1.1 Ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού προλίνης από την διαμόρφωση *trans* προς την διαμόρφωση *cis*.

Ο ενζυματικός αυτός μηχανισμός αποδόθηκε στις *cis/trans* ισομεράσες (PPIases). Τα ένζυμα της κατηγορίας αυτής καταλύουν την *cis/trans* ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης με το προπορευόμενο αμινοξύ που συμμετέχει στην πολυπεπτιδική αλυσίδα (εικόνα 1.1). Τα ένζυμα αυτής της υπεροικογένειας των ανοσοφιλινών κατηγοριοποιούνται σε τρεις διακριτές οικογένειες, τις κυκλοφιλίνες (CYPs), τις FKBP (FK506 Binding Proteins) πρωτεΐνες και τις παρβουλίνες (Parvulins). Παρακάτω ακολουθεί μια γενική επισκόπηση με τα χαρακτηριστικά των τριών οικογενειών ενζύμων.

1.3 Η υπεροικογένεια των ανοσοφιλινών.

Ουσίες ανοσοκαταστολής όπως η κυκλοσπορίνη A (CsA), η FK506 και η ραπαμυκίνη χρησιμοποιούνται κλινικά στις εγχειρήσεις μεταμοσχεύσεων για την παρεμπόδιση της διαδικασίας απόρριψης του μοσχεύματος. Κατά την πορεία για την αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού της ανοσοκαταστολής από τις ουσίες αυτές, οι κυτταρικοί υποδοχείς τους απομονώθηκαν, καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν (Schreiber 1992, Fruman et al. 1994). Η κυκλοσπορίνη A (CsA) συνδέεται σε μια οικογένεια υποδοχέων γνωστή και ως οικογένεια των κυκλοφιλινών ενώ οι FK506 και ραπαμυκίνη συνδέονται με μια οικογένεια υποδοχέων γνωστών ως FKBP. Το σύνολο των πρωτεϊνών (υποδοχέων) που ανήκουν στις δύο προαναφερθείσες οικογένειες καλείται η υπεροικογένεια των ανοσοφιλινών (Schreiber 1991).

Τα σύμπλοκα που δημιουργούνται μεταξύ των ανοσοφιλινών και των γνωστών τους στόχων, αποτελούν και το όχημα για την επίτευξη της ανοσοκαταστολής. Μόνο τα σύμπλοκα μεταξύ CYp-CsA και FKBP-FK506 μπορούν να επάγουν την ανοσοκαταστολή και όχι τα ξεχωριστά μέρη που απαρτίζουν το σύμπλοκο, αλληλεπιδρώντας με την καλσινευρίνη (μια φωσφατάση εξαρτώμενη από την καλμοντουλίνη) παρεμποδίζοντας έτσι την λειτουργία της (Liu et al. 1991). Έρευνες έχουν δείξει ότι η ανενεργοποίηση της καλσινευρίνης είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση της διαδικασίας ανοσοκαταστολής (Clipstone and Crabtree, 1992; Liu et al., 1992; O'Keefe et al., 1992; Rao et al., 1997).

Η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των λειτουργικών στόχων των ανοσοφιλινών (όπως η καλσινευρίνη), ξεκαθάρισε στην μοριακή βάση του μηχανισμού της ανοσοκαταστολής από τις ανοσοκατασταλτικές ουσίες CsA, FK506 και ραπαμυκίνη, παρ'όλο που οι μελέτες αυτές δεν κατάφεραν να αποδώσουν έναν κυτταρικό ρόλο στις κυκλοφιλίνες απουσία των ουσιών αυτών. Κατά την δεκαετία που πέρασε, ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ανοσοφιλινών, απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε όχι μόνο από ζωικούς ιστούς αλλά από ένα μεγάλο εύρος οργανισμών εκτεινόμενο από τα βακτήρια μέχρι τις ζύμες και τα ανώτερα φυτά (Schreiber, 1991; Fruman et al., 1994; Luan, 1998). Το υψηλό επίπεδο συντήρησης που παρουσιάζουν και η έντονη και άφθονη παρουσία τους σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών και σχεδόν σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των ανοσοφιλινών διαδραματίζουν έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές διαδικασίες. Η εμφανής δραστηριότητα πεπτιδυλ-προλύλ ισομεράσης που παρουσιάζουν (PPIase, E.C 5.2.1.8), οδήγησε στην πρόταση ότι οι ανοσοφιλίνες διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνικών μορίων *in vivo* καθώς και την διακίνησή τους (trafficking).

1.3.1 Η οικογένεια των κυκλοφιλινών.

Οι κυκλοφιλίνες είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες πρωτεΐνες και είναι ιδιαίτερα συντηρημένες κατά τον κύκλο της εξέλιξης. Εντοπίζονται σε μύκητες, βακτήρια, φυτά, ζώα καθώς και τα επίπεδα έκφρασης τους είναι ιδιαίτερα υψηλά σε πολλές κατηγορίες ιστών. Όλες οι κυκλοφιλίνες διαθέτουν

ένα λειτουργικό μοτίβο που είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της ισομερίωσης του πεπτιδύλ-προλυλ δεμού της προλίνης και άρα εμφανίζουν και ενζυμική δραστικότητα PPIάσης. Το λειτουργικό αυτό μοτίβο έχει μήκος 109 αμινοξέων περίπου και περιβάλλεται από δύο άλλες περιοχές οι οποίες είναι μοναδικές για το κάθε μέλος της οικογένειας και σχετίζονται με την υποκυτταρική διαμερισματοποίηση των μορίων και την λειτουργική τους εξειδίκευση.

Τουλάχιστον 8 διαφορετικοί τύποι ανθρώπινων κυκλοφιλινών έχουν απομονωθεί των οποίων το μοριακό βάρος κυμαίνεται από 18 kDa μέχρι και 150 kDa (Πίνακας 1.1). Στην *Drosophila* εμφανίζονται τουλάχιστον εννέα τέτοια ένζυμα, στο *Arabidopsis thaliana* εικοσιέξι και οχτώ κυκλοφιλίνες (CPR1-CPR8) έχουν βρεθεί στον ασκομύκητα *Saccharomyces Cerevisiae*.

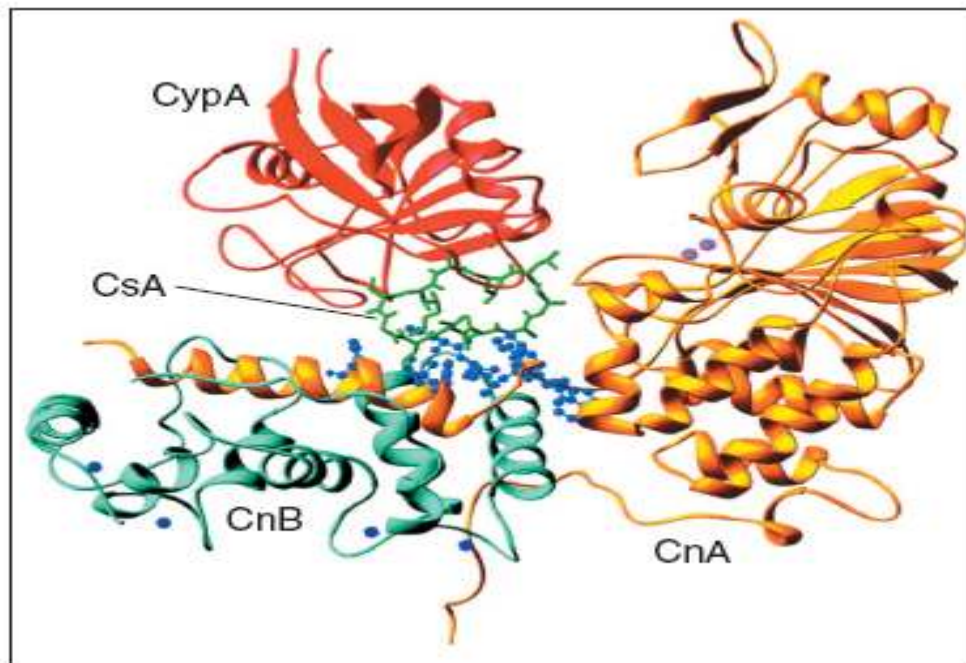
Γονίδιο	Μοριακό Βάρος	Ομόλογο γονίδιο στα θηλαστικά	Υποκυτταρικός εντοπισμός	Χαρακτηριστικά
CPR1	17kD	CypA	Κυτόπλασμα	Πρωταρχικός υποδοχέας της CsA
CPR2	20kD	CypB	Απεκριτικό μονοπάτι	Επάγεται από θερμικό σοκ
CPR3	20kD	CypD	Μιτοχόνδρια	Επιταχύνει την αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου Su9-DHFR
CPR4	33kD	CypC	Απεκριτικό μονοπάτι	Επάγεται από θερμικό σοκ
CPR5	23kD	-	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Επάγεται από τουνικαμυκίνη
CPR6	45kD	Cyp40	Κυτόπλασμα	Συνδέεται με την HSP90 σε έναν ανενεργό υποδοχέα στεροειδών
CPR7	45kD	Cyp40	Κυτόπλασμα	Συνδέεται με την HSP90 σε έναν ανενεργό υποδοχέα στεροειδών
CPR8	35kD	CypC	Ενδοπλασματικό δίκτυο	Ομόλογη της CPR4

Πίνακας 1.1 Κυκλοφιλίνες που έχουν απομονωθεί στον άνθρωπο. Διακρίνονται το μοριακό τους μέγεθος, η υποκυτταρική τους θέση καθώς και ο λειτουργικός τους ρόλος όπου είναι γνωστός.

Η κυκλοφιλίνη-A (CypA) είναι η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας μοριακού βάρους 18,1kDa και η οποία εντοπίζεται σε όλους τους τύπους ιστών των θηλαστικών και αποκλειστικά στο κυτόπλασμα σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας ή ακόμα και πρωτεΐνες που διαθέτουν κάποιον

τομέα που ομοιάζει με αυτό των κυκλοφιλινών (CLD: Cyclophilin Like Domain), οι οποίες μπορούν να παρατηρηθούν στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια ή ακόμα και στον πυρήνα.

Η ανθρώπινη κυκλοφιλίνη-A αποτελείται από 8 β-πτυχωτές δομές οι οποίες σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη δομή β-βαρελιού. Η όλη δομή περιβάλλεται και από τις δύο πλευρές της από δύο α-έλικες. Επτά αρωματικά και άλλα υδρόφοβα κατάλοιπα σχηματίζουν ένα συμπαγή υδρόφοβο πυρήνα στο εσωτερικό της δομής β-βαρελιού και συνήθως αυτή είναι η περιοχή που μπορεί να συδεθεί η κυκλοσπορίνη-A (CsA). Ένας βρόγχος που ξεκινά από το κατάλοιπο Lys118 έως την His126 και τέσσερις β-πτυχωτές δομές (β3-β6) συνιστούν το σημείο πρόσδεσης της κυκλοσπορίνης-A (CysA) (Kallen J, Spitzfaden et al., 1991).



Εικόνα 1.2. Απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του συμπλόκου της CypA και της καλσινευρίνης. Στο κέντρο εμφανίζεται προσδεμένο το μόριο της κυκλοσπορίνης CsA.

Σημαντική λειτουργία της CypA είναι η υποβοήθηση της ανοσοκατασταλτικής επίδρασης που εμφανίζει η κυκλοσπορίνη-A (CsA). Η υποβοήθηση αυτή εκφράζεται μέσω της δημιουργίας ενός τετραμερούς συμπλόκου μεταξύ της κυκλοσπορίνης-A (CsA), της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης-A (CypA) και της καλσινευρίνης. Η σύνδεση του διμερούς συμπλόκου CypA-CsA στις δύο υπομονάδες της καλσινευρίνης, προσδίδει σταθερότητα στον όλο σχηματισμό και ανθεκτικότητα στην πρωτεολυτική αποδόμηση. Το σύμπλοκο CypA-CsA προσδέεται στην περιοχή μεταξύ της καταλυτικής υπομονάδας και της ρυθμιστικής υπομονάδας της καλσινευρίνης (Εικόνα 1.2) και παρεμποδίζεται έτσι η δραστηριότητα φωσφατάσης που παρουσιάζει η τελευταία και άρα και ο βιολογικός της ρόλος.

Επίσης η CypA προάγει τόσο την δημιουργία όσο και την μολυσματικότητα των ιοειδών του HIV. Αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Gag (το πρωτεϊνικής φύσεως πρόδρομο μόριο των δομικών πρωτεϊνών του ιοειδούς) μέσω 4 καταλοίπων προλίνης που εμφανίζονται στο πρωτεϊνικής φύσεως καψίδιο των ιοειδών (Luban J et al., 1993).

Η CypA διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των νευρικών υποδοχέων. Με την χρήση της κυκλοσπορίνης-A (CsA) για να ανιχνεύσουν την έκφραση ομολιγομερών υποδοχέων οι οποίοι περιείχαν την υπομονάδα του υποδοχέα της νικοτινικής

ακετυλοχολίνης οι Helekar et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η CyPA μπορεί να έχει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των ομοολιγομερών υποδοχέων δρώντας άμεσα ή έμμεσα σαν προλυλ-ισομεράση ή σαν τσαπερόνιο.

H NinaA Μια πολύ καλά χαρακτηρισμένη κυκλοφιλίνη είναι η πρωτεΐνη NinaA που απαντάται στην μύγα της Μεσογείου *D.Melanogaster*. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται αποκλειστικά στον ρετινοειδή ιστό των οφθαλμών του εντόμου και σε υποκυτταρικό επίπεδο εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Stamnes MA., 1991). Κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή της στην διαδικασία ωρίμανσης της ροδοψίνης καθώς και η μεταφορά της στο υποκυτταρικό διαμέρισμα που είναι χρήσιμη. Σε μεταλλαγμένα στελέχη όπου το γονίδιο *ninaA* έχει απενεργοποιηθεί, η ροδοψίνη συσσωρεύεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το άτομο εμφανίζει προβλήματα στην όραση. Η ροδοψίνη και η πρωτεΐνη NinaA δημιουργούν ένα σταθερό, στοιχειομετρικό σύμπλοκο το οποίο επετεύχθη να απομονωθεί και έτσι να αποδειχθεί η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Άτομα του εντόμου που δεν διαθέτουν έστω και ένα αντίγραφο του γονιδίου *ninaA* εμφανίζουν προβλήματα όρασης και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι δυο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν επιβεβαιώνεται ότι η πρωτεΐνη NinaA λειτουργεί ως τσαπερόνιο και βοηθά στην αναδίπλωση και άρα στην ανάκτηση της τριτοταγούς λειτουργικής δομής της ροδοψίνης (Schneuwly et al., 1989).

H πρωτεΐνη Rot της E.coli: Ο εντοπισμός του γονιδίου *rot* της *E.coli* είναι το πρώτο παράδειγμα κυκλοφιλίνης στα βακτήρια πράγμα που απέδειξε και την διεύρυνση της ομάδας των ενζύμων αυτών και στον κόσμο των βακτηρίων. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 550 αμινοξέων η οποία εμφανίζει ενζυμική δραστηριότητα PPIάσης ενώ δεν φαίνεται να παρεμποδίζεται από την κυκλοσπορίνη-A (CsA) όπως συμβαίνει με άλλες γνωστές κυκλοφιλίνες όπως για παράδειγμα με την ανθρώπινη κυκλοφιλίνη-A (hCyp-A). Η τιμή της σταθεράς k_{cat}/K_m που παρουσίασε το ένζυμο αυτό έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-P-NA* ήταν της τάξης του $1,32 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$, σχεδόν ταυτόσημη με εκείνη της ανθρώπινης κυκλοφιλίνης-A (CyPA) η οποία ανέρχονταν στο $1,37 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ (Jun Liu & Christopher T. Walsh 1990). Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Rot διαθέτει στο αμινοτελικό της άκρο ένα πεπτίδιο οδηγό μήκους 26 αμινοξέων σε συνδυασμό ότι δεν διαθέτει οξειδίζουσες κυστεΐνες την χαρακτηρίζουν ως μια περιπλαστική πρωτεΐνη.

H πρωτεΐνη LCY του Legionella pneumoniophila: Το βακτήριο *Legionella pneumoniophila* είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση μιας σοβαρής μορφής πνευμονίας στον άνθρωπο γνωστής και ως η ασθένεια των Λεγεωναριών. Ο μείζον παθογόνος παράγοντας του βακτηρίου, η πρωτεΐνη Mir, ανήκει στην οικογένεια των πετιδυλ-προλυλ- cis/trans ισομερασών (PPIases) και συγκεκριμένα στην υποοικογένεια των FK506-Binding Proteins. Οι Schmidt και συνεργάτες απέδειξαν ότι το βακτήριο αυτό διαθέτει και μια άλλη πεπτιδυλ-προλυλ cis/trans ισομεράση η οποία εντοπίζεται στο κυτόπλασμα και ανήκει στην ομάδα των κυκλοφιλινών. Το γονίδιο *lcy* (*legionella cyclophilin*) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 164 αμινοξέων μοριακού βάρους περίπου 18kDa. Σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης LCY εμφανίζει σημαντική ομολογία με τις κυτοπλασματικές και τις περιπλαστικές κυκλοφιλίνες του *E.coli* της τάξης του 60,5% και 51,5% αντίστοιχα. Η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που παρουσιάζει το συγκεκριμένο ένζυμο καθώς και η παρεμπόδιση του από την κυκλοσπορίνη-A (CsA) παραπέμπουν στα είδη γνωστά πρότυπα άλλων βακτηριακών κυκλοφιλινών.

1.3.2 Η οικογένεια των FKBP (FK506 Binding Proteins).

Οι πρωτεΐνες αυτού του είδους απαρτίζουν μια δεύτερη οικογένεια ανοσοφιλινών των οποίων η λειτουργία παρεμποδίζεται από τις ουσίες FK506 και ραπαμυκίνη. Τέτοιου τύπου πρωτεΐνες μπορούν να απαντηθούν σε όλους τους οργανισμούς και το μέγεθός τους κυμαίνεται από 12 έως 52 kDa. Ο ρόλος που διαδραματίζουν φαίνεται να είναι καθοριστικός στα διάφορα στάδια της κυτταρικής διαίρεσης όπως και της κυτταρικής διαφοροποίησης (Harrar et al.2001), ενώ οι μικρότερου μεγέθους FKBP συμμετέχουν κυρίως σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος με την ικανότητα που διαθέτουν να προσδένονται σε διάφορους υποδοχείς (Schmid 2001).

Η FKPB12

Είναι ίσως η καλύτερα μελετημένη κυκλοφιλίνη με μέγεθος 12 kDa και ισχυρό πρότυπο έκφρασης σε μια μεγάλη ποικιλία ιστών. Εντοπίζεται στο κυττόπλασμα και η δράση της ως πεπτιδύλ- προλυλ-ισομεράση παρεμποδίζεται από την FK506 και την ραπαμυκίνη ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αποτελείται από 108 αμινοξέα τα οποία εμφανίζουν 100% ομολογία μεταξύ ανθρώπου και κουνελιού και 95% ομολογία μεταξύ ανθρώπου και ποντικού (Gothel and Marahiel,1999). Αποτελέσματα διάφορων αναλύσεων έδειξαν ότι η FKBP12 αποτελείται από 5 αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες οι οποίες περιβάλλονται από μία μικρή έκταση α-έλικα (Van Duyn et al 1993).

Η SlyD της *Escherichia Coli*.

Το γονίδιο SlyD (sensitivity to lysis) απομονώθηκε για πρώτη φορά από την *E.coli* ύστερα από επαγωγή του υποκλωνοποιημένου σε αυτήν γονιδίου (E) του βακτηριοφάγου φX174. Μεταλλάγματα *E.coli* που είχαν ανενεργοποιημένο το γονίδιο slyD οδήγησαν σε ενσωμάτωση ολόκληρων των φάγων μέσα στα κύτταρα χωρίς να παρατηρηθεί λύση των κυττάρων. Ανάλυση και σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας της SlyD πρωτεΐνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια ανοσοφιλίνη και μάλιστα της υποοικογένειας των FKBP πρωτεϊνών.

Στην αμινοξική αλληλουχία της SlyD παρατηρούνται δυο διακριτές λειτουργικές περιοχές. Η πρώτη αποτελείται από 146 αμινοξέα, εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, εμφανίζει ομολογία σε ποσοστό 28,1% προς την ανθρώπινη FKBP12 και είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση δραστηριότητας PPIάσης. Η δεύτερη περιοχή εντοπίζεται στο καρβόξυ τελικό άκρο, είναι πλούσια σε ιστιδίνες και σχετίζεται με την σύνδεση με μεταλλικά κατιόντα όπως Ni^{2+} και Zn^{2+} . Πρόμοιες περιοχές που εμφανίζουν συγκεντρωμένα κατάλοιπα ιστιδινών εμφανίζονται κυρίως σε πρωτεΐνες τύπου HgrB, οι οποίες εμπλέκονται στην διαδικασία ενσωμάτωσης του Ni^{2+} στις νιτρογενάσες. Μια πρωτεΐνη με παρόμοια δομή με αυτήν της SlyD έχει απομονωθεί και από τον μικροοργανισμό *Haemophilus Influenzae*.

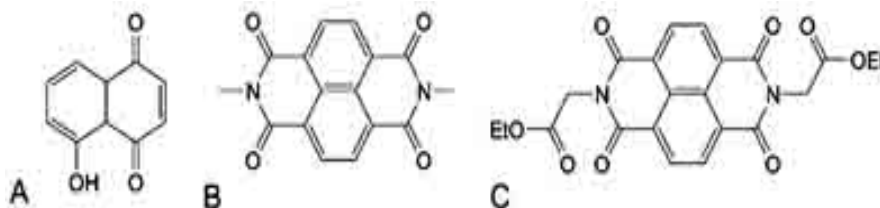
Η ενζυματική δραστηριότητα PPIάσης που εμφάνισε η SlyD σε υποστρώματα όπως: **Suc-Ala-Phe-Pro-Arg-4NA**, **Suc-Ala-Ala-Pro-Arg-4NA**, **Suc-Ala-Leu-Pro-Arg-4NA**, κυμαίνονταν στα 18.600,3.900 και 3.600 $M^{-1}s^{-1}$ αντίστοιχα. Η δραστηριότητα PPIάσης δεν φάνηκε να επηρεάζεται ούτε

από το FK506 ούτε από την κυκλοσπορίνη A. Καμία παρεμπόδιση δραστηριότητας της ΡΡΐασης επίσης δεν εμφανίστηκε σε συγκεντρώσεις NiCl_2 μέχρι $100\mu\text{M}$.

Η περιοχή της SlyD η οποία αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 1-146 αντιπροσωπεύει την ανεξάρτητη λειτουργική περιοχή της (Sandra Hotternot et al.,1997). Αντίθετα η πλούσια σε κατάλοιπα ιστιδίνης περιοχή που εντοπίζεται στο καρβοξυλικό άκρο του πρωτεϊνικού μορίου φαίνεται να μην έχει καμία σχέση με την δραστηριότητα ΡΡΐασης. Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των ιόντων Ni^{2+} και Zn^{2+} και οδηγούν στην υποβάθμιση της λειτουργικότητας που παρουσιάζει το ένζυμο. Η υποβάθμιση αυτή δεν φαίνεται να είναι άμεση και η άποψη αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι δεν προκύπτει κάποια χημική μεταβολή στο μόριο κατά την πρόσδεση των κατιόντων αφού η διαδικασία είναι αντιστρεπτή. Σε φυσικές συνθήκες μπορεί αυτή η παρεμπόδιση να αποτελεί έναν μηχανισμό ρύθμισης της λειτουργίας ΡΡΐασης της SlyD.

1.3.3 Η οικογένεια των παρβουλινών.

Το 1994 ο Rafheld και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν στην *E.coli* μια καινούρια πεπτιδύλ-προλύλ ισομεράση η οποία αποτελούνταν από 92 αμινοξέα. Η ισομεράση αυτή δεν έδειχνε ομοιότητα με τις κυκλοφιλίνες και τις FKBP's πρωτεΐνες της *E.coli*.



Εικόνα 1.3. Η γιουγλόνη (A) και οι τετραοξοβενζοφενανθρολίνες (B,C) μόρια τα οποία έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζουν της λειτουργικότητα ΡΡ1άσης που εμφανίζουν οι παρβουλίνες.

Το ένζυμο αυτό ονομάστηκε παρβουλίνη (λόγω του μικρού του μεγέθους) και αποτέλεσε την αρχή για την δημιουργία ενός νέου κλάδου ισομερασών που ανήκουν στην υπεροικογένεια των ανοσοφιλινών. Η παρβουλίνη εμφάνισε υψηλά επίπεδα δραστηριότητας στο υπόστρωμα **Suc-Ala-Leu-Pro-Phe-4-νιτροανιλίδιο**. Το ένζυμο αυτό διαθέτει επίσης τομείς που εμφανίζουν υψηλά ποσοστά ομολογίας με την PrSA του *B.subtillis*, την SurA του *E.coli*, την PrtM από το *Lactococcus lactis* την ανθρώπινη Pin1 και την Ess1 από τον ασκομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Κάποιες από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες φαίνεται να παίζουν ρόλο στην διαδικασία ωρίμανσης των πρωτεϊνών και ιδιαίτερα των απεκκρινόμενων.

Γενικότερα οι παρβουλίνες δεν εμφανίζουν ομολογία στην ακολουθία τους με τις κυκλοφιλίνες και τις FKBP's. Εμφανίζουν όμως συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία είναι κοινά σε όλα τα μέλη της οικογένειας και με τα οποία διακρίνονται από τις υπόλοιπες δύο κατηγορίες. Διαθέτουν έναν χαρακτηριστικό λειτουργικό μοτίβο παρβουλίνης και επιπρόσθετα καρβόξυ και αμινοτελικά άκρα. Τρεις χαρακτηριστικές ακολουθίες απαρτίζουν το χαρακτηριστικό αυτό δομικό μοτίβο και είναι οι εξής : **H-[ILV]-[LVQ], G-G-[DYILR]-[SKE]-[LIM]-[GSEN]-[WEKAFPY]-[FMVAIL] και G-[YVILWF]-[HEA]-[IVL]-[ILV]**.

Τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών διαχωρίζονται σε τρεις διακριτές υποοικογένειες ανάλογα με την δομή και την λειτουργία τους. Η πρώτη υποοικογένεια αποτελείται από τις παρβουλίνες τύπου Pin1. Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου παρβουλινών είναι ότι διαθέτουν μια αμινοτελική **WW δομική περιοχή** που ακολουθείται από το χαρακτηριστικό δομικό μοτίβο των παρβουλινών. Η δομική αυτή WW περιοχή φαίνεται να σχετίζεται με την ικανότητα αλληλεπίδρασης των παρβουλινών αυτών με άλλες πρωτεΐνες στόχους. Οι φυτικές παρβουλίνες αυτού του τύπου στερούνται την WW δομική περιοχή. Η κρυσταλλική δομή της της ανθρώπινης Pin1 πρωτεΐνης είναι πλέον γνωστή και η δομική περιοχή ΡΡ1άσης φαίνεται να αποτελείται από μια αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια που θυμίζει και δομή μισού β-βαρελίου το οποίο περιβάλλεται από 4 α-έλικες (β₃β₂β₁β₂) (Ramaganathan et al., 1997). Οι παρβουλίνες τύπου Pin1 παρουσιάζουν αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα σε φωσφορυλιωμένα υποστρώματα (pSer/pThr-Pro) τόσο *in vitro* όσο και

in vivo. Τα μέλη της υποοικογένειας αυτής εμπλέκονται κυρίως στην ρύθμιση της μίτωσης (Shen et al.,1998),συνδέονται άμεσα στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και γενικά σε γεγονότα μετα-μεταγραφικού ελέγχου (Wu et al.,2000).

Η δεύτερη υποοικογένεια χαρακτηρίζεται από την δομική περιοχή των PPIασών που είναι παρόμοια με αυτήν της ανθρώπινης παρβουλίνης hPAR14. Η διαφορά της υποοικογένειας αυτής με τις παρβουλίνες τύπου PinI έγκειται στο γεγονός ότι η α1 έλικα και ο βρόγχος που προηγείται αυτής στις παρβουλίνες τύπου hPar14, στερούνται ένα σημαντικό αριθμό αμινοξικών καταλοίπων σε σχέση με τις παρβουλίνες τύπου PinI. Επίσης οι παρβουλίνες τύπου hPar14 παρουσιάζουν μια προσθήκη αμινοξέων στον βρόγχο ανάμεσα στην α4 έλικα και στον β3 κλωνο.Ο φυσιολογικός ρόλος των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής δεν είναι ακόμα γνωστός.

Στην τρίτη υποοικογένεια των παρβουλινών, η καταλυτική δομική περιοχή των PPIασών είναι παρόμοια με αυτήν της παρβουλίνης του *E.coli*, την Par10. Τα μέλη της υποοικογένειας αυτής στερούνται την προσθήκη των παρβουλινών τύπου hPar14 και την περιοχή των PinI που είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα και εμπλέκονται στην σύνδεσή τους με τα φωσφορυλιωμένα υποστρώματα. Πολλές παρβουλίνες της υποοικογένειας αυτής είναι βακτηριακές και παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αναδίπλωσης και ωρίμανσης εξωκυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Οι περιπλασματικές SurA και η PpiD, οι οποίες είναι μέλη της υποοικογένειας αυτής, συμμετέχουν στην συναρμολόγηση πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μεμβράνης (Vitikainen et al.,2004).

H Par10 της *Escherichia coli*.

Το 1994 οι Rahfeld et al., κατάφεραν να απομονώσουν την πρώτη παρβουλίνη που είναι η Par10 και προέρχεται από την *E.coli*. Η ιδιαιτερότητα του ενζύμου αυτού και γενικά όλων των παρβουλινών έγκειται στο γεγονός ότι η δραστικότητα τους δεν παρεμποδίζεται από τους καταστολείς κυκλοσπορίνη-A ,FK506 και ραπαμυκίνη. Αργότερα όμως το 1998, οι Hemming et al., έδειξαν ότι η γιουγκλόνη (junglone) μπορεί να παρεμποδίσει την δράση αρκετών παρβουλινών. Η Par10 είναι ένα ένζυμο που χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα μικρό μέγεθος, καθώς αποτελείται από μόλις 92 αμινοξέα και η μοριακή του μάζα ανέρχεται στα 10.1 kDa. Φέρει μία μόνο δομική περιοχή που της προσφέρει την ιδιότητα της cis/trans προλυλ-ισομεράσης και η οποία αποτελεί την ελάχιστη καταλυτική δομική περιοχή ανάμεσα στα ένζυμα τύπου παρβουλίνης.

Αναλύσεις στην τριτοταγή δομή της παρβουλίνης του *E.coli* έδειξαν ότι αποτελείται από 4 β-κλώνους που σχηματίζουν μια αντιπαράλληλη κυρτή β-πτυχωτή επιφάνεια που περικλύεται από 4 α-έλικες. Η τρισδιάστατη αυτή δομή ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό τόσο με την κρυσταλλική δομή της δομικής περιοχής PPIασης της hPINI όσο και με της hPar14.

Η Par10 παρουσιάζει ισχυρή ενζυμική δραστηριότητα έναντι τετραπεπτιδίων που περιέχουν προλίνη. Η σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m με υπόστρωμα το τετραπεπτίδιο **ηλεκτρυλο-Ala-Leu-Pro-Phe-νιτροανιλίδιο**, ανέρχεται στα $1,69 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, μια τιμή η οποία πλησιάζει και τις ενεργές κυκοφιλίνες που γνωρίζουμε μέχρι σήμερα. Η par10 εμφανίζει μεγαλύτερη ενζυμική δραστηριότητα από τις FKBP, αλλά όπως και αυτές, προτιμά υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα, όπως λευκίνη ή φαινυλανίνη στην θέση που προηγείται της προλίνης στα τετραπεπτίδια (Rahfeld et al. 1994).

Για να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα της Par10 όσον αναφορά την συμμετοχή της στην διαδικασία αναδίπλωσης πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα μια παραλλαγή της ριβονουκλεάσης T1, η RCM-(S54G/P55N)-RNase T1. Η αγρίου τύπου RNase T1 περιέχει δύο κατάλοιπα προλίνης στις θέσεις 39 και 55, τα οποία βρίσκονται στην διαμόρφωση cis. Η ισομερίωση

στις θέσεις αυτές αποτελεί και τον περιοριστικό παράγοντα στο ολικό ρυθμό αναδίπλωσης της T1 RNase. Η RCM-(S54G/P55N)-RNase T1 φέρει μόνο μία προλίνη, αυτήν στην θέση 39. Ο μηχανισμός αναδίπλωσης αυτής της παραλλαγής είναι ιδιαίτερα απλός και έχει χαρακτηριστεί λεπτομερώς. Στην περίπτωση της Par10 χρησιμοποιήθηκε η ανηγμένη και καρβόξυ-μεθυλωμένη μορφή (Disulfide Reduced and CarboxyMethylated) καθώς είναι οριακά σταθερή, τα ενδιάμεσα διπλώματος δεν συσσωρεύονται και ο δεσμός της προλίνης στην θέση 39 είναι προσβάσιμος για κατάλυση από τις cis/trans ισομεράσες (Scholz et al., 1997).

Η ριβονουκλεάση RCM-(S54G/P55N)-RNase T1 αποτελεί άριστο υπόστρωμα για μεγάλο αριθμό PPIασών. Το 85% των μορίων της μη αναδιπλωμένης μορφής στον μοναδικό δεσμό προλίνης που περιέχει στην θέση 39, βρίσκονται στην λανθασμένη, για την αναδιπλωμένη ριβονουκλεάση trans διαμόρφωση. Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται από μία αμφίδρομη αντίδραση ενός σταδίου της οποίας η ταχύτητα εξαρτάται από την αργή trans σε cis ισομερίωση του προλυλ-πεπτιδικού δεσμού στην Pro39. Η Par10 αποδείχθηκε ότι καταλύει την ισομερίωση του δεσμού αυτού και ο σχετικός ρυθμός της διαδικασίας αναδίπλωσης αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσής της. Η σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m έχει τιμή ίση με $30.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ και είναι συγκρίσιμη με τις τιμές που έχουν παρατηρηθεί στην Cyp18 και FKBP12 που προέρχονται από ανθρώπινους ιστούς, όμως η τιμή αυτή είναι ιδιαίτερα χαμηλή αν συγκριθεί με αυτήν της ισομερίωσης του τετραπεπτιδίου που προαναφέρθηκε παραπάνω (Scholz et al., 1997).

Η Par10 όχι μόνο καταλύει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης RCM-(S54G/P55N)-RNase T1, αλλά όπως και η FKBP12, επιταχύνει την δική της αναδίπλωση αυτοκαταλυόμενη. Τα περισσότερα μόρια της παρβουλίνης που δεν βρίσκονται στην αναδιπλωμένη μορφή τους, αναδιπλώνονται με αργούς ρυθμούς γεγονός που υποδηλώνει ότι μία από τις 5 προλίνες της παρβουλίνης είναι στην cis μορφή στην αναδιπλωμένη πρωτεΐνη. Πράγματι κατά την μελέτη και τελικά την αποσαφήνιση της τριτοταγούς δομής της Par10, βρέθηκε ότι ο δεσμός της προλίνης στην θέση 76 βρίσκεται στην cis διαμόρφωση και πιθανότατα ευθύνεται για την αυτοκαταλυόμενη συμπεριφορά της (Kuhlewein et al., 2004). Η αυτοκατάλυση επιταχύνει ισχυρά την αναδίπλωση όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται, επιπροσθέτως οδηγεί σε μια φαινομενική παραβίαση ενός θεμελιώδους νόμου της ενζυματικής κινητικής, ο οποίος αναφέρει ότι κάτω από πανομοιότυπες συνθήκες η κινητική της ισορροπίας θα έπρεπε να είναι η ίδια ανεξαρτήτως των αρχικών συνθηκών, όμως αυτός ο κανόνας δεν ισχύει για μια αυτοκαταλυόμενη αντίδραση αναδίπλωσης.

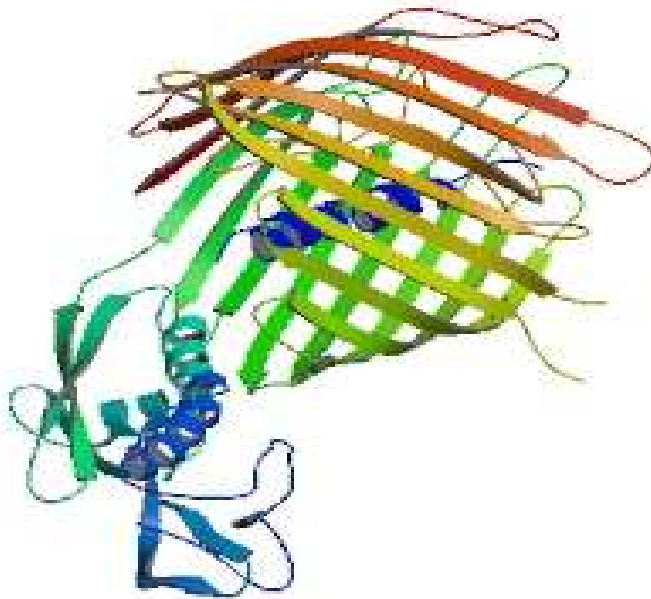
H Sur A της Escherichia Coli.

Το γονίδιο *surA* απομονώθηκε για πρώτη φορά σε μια προσπάθεια να ταυτοποιηθούν τα γονίδια που θεωρούνται απαραίτητα για την επιβίωση του *E. coli* κατά την στατική φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας. Το 1990 οι Torno et al., έδειξαν ότι στελέχη που δεν εκφράζουν το γονίδιο *surA* χάνουν την ικανότητά τους να δημιουργούν αποικίες κατά την στατική φάση, δεν κατάφεραν όμως να ταυτοποιήσουν το βιοχημικό ρόλο του γονιδίου αυτού. Αργότερα το 1996, έγιναν προσπάθειες ώστε να ταυτοποιηθεί ο φυσιολογικός ρόλος του γονιδίου αυτού και το πώς αυτό επιδρά στην βιοσιμότητα του *E. coli*.

Οι Lazar και Kolter απέδειξαν ότι ο βιολογικός ρόλος της SurA έγκειται στην διατήρηση της ακεραιότητας της εξωτερικής μεμβράνης. Αυτό φάνηκε από το γεγονός ότι στελέχη τα οποία δεν εκφράζουν το *surA* γονίδιο, παρουσιάζουν ευαισθησία σε χημικούς παράγοντες όπως, bacitracin, vancomycin καθώς και σε άλατα χολικού οξέος. Σε φυσιολογικές συνθήκες το *E. coli* είναι ανθεκτικό σε αυτούς τους παράγοντες εξαιτίας του φραγμού που παρέχεται από την

παρουσία της εξωτερικής μεμβράνης. Επίσης, τα *surA* μεταλλάγματα κατά την στατική φάση χάνουν εύκολα την ακεραιότητά τους, αλλοιώνεται το σχήμα τους και εμφανίζουν ανωμαλίες στην επιφάνεια του κυτταρικού φακέλου (Lazar & Kolter, 1996).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του *surA* γονιδίου ταυτοποιήθηκε και η προτεινόμενη αμινοξική αλληλουχία έδειξε ότι τα πρώτα 20 αμινοξέα αποτελούν ένα τυπικό σήμα για έκκριση της πρωτεΐνης. Συνεπώς η SurA είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη, που όπως αποδείχτηκε απελευθερώνεται από το κύτταρο σε καταστάσεις ωσμωτικού στρες. Το γεγονός αυτό εξηγεί και τον εντοπισμό της SurA στον περιπλαστικό χώρο.



Εικόνα 1.4 Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης *surA*. Παρατηρείται η χαρακτηριστική δομή β-βαρελιού που σχηματίζεται από τις αντιπαράλληλες β-πτυχωτές δομές.

Η σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας της SurA με άλλες πρωτεΐνες, έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τον βιοχημικό ρόλο της αφού εμφάνιζε μεγάλες ομοιότητες με την Par10 της *E.coli*. Η SurA φαίνεται να εμπλέκεται στην διαδικασία αναδίπλωσης πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων σταδίων. Κάποια στάδια γίνονται με γρήγορους ρυθμούς, σχεδόν αστραπιαία, ενώ κάποια άλλα στάδια πραγματοποιούνται με βραδύτερους ρυθμούς και απαιτούν την παρουσία ενζύμων. Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης καθώς και του περιπλαστικού χώρου μεταφέρονται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κατόπιν αναδιπλώνονται με την βοήθεια ενζύμων. Ένα ακόμα αργό στάδιο στην διαδικασία αναδίπλωσης είναι και η ισομερίωση του προλυλ-δεσμού. Για τον λόγο αυτό και οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται απαιτούν την δράση της προλυλ-ισομεράσης για το καθορισμένη αναδίπλωσή τους ώστε να αποκτήσουν την τριτοταγή λειτουργική τους δομή. Η *surA* φαίνεται λοιπόν να είναι ένα τέτοιο ένζυμο, μια περιπλαστική προλυλ-ισομεράση, αφού παρουσιάζει και υψηλά ποσοστά ομολογίας με την κυτταροπλασματική παρβουλίνη του *E.coli*, την Par10.

Για να αποδειχθεί η συμμετοχή της *surA* στην διαδικασία αναδίπλωσης πρωτεϊνών έγινε έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας με μία μέθοδο που παρουσίαζε ευαισθησία στην θρυψίνη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγαλύτερη

ευαισθησία στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση απ ότι οι αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε διάφορες μεμονομένες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης καθώς και σε περιπλαστικές σε στελέχη αγρίου τύπου και σε στελέχη που δεν εξέφραζαν το γονίδιο της *surA*.

Η πρώτη πρωτεΐνη που ελέγχθηκε ήταν η LamB, μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης η οποία λειτουργεί και ως υποδοχέας για τον βακτηριοφάγο λ αλλά και ως μια maltodextran πορίνη. Τα μονομερή της LamB συνθέτουν σχεδόν ασταθή τριμερή σύμπλοκα τα οποία σταθεροποιούνται με την ενσωμάτωση τους στην εξωτερική μεμβράνη (Misra et al.,1991). Στα στελέχη αγρίου τύπου , η ολική συγκέντρωση της LamB παραμένει σταθερή και δεν επηρεάζεται από την παρουσία θρυψίνης. Αντίθετα η συγκέντρωση των τριμερών LamB στα μεταλλαγμένα στελέχη είναι σημαντικά μικρότερη ακόμα και απουσία θρυψίνης. Αυτό συνεπάγεται ότι τα μονομερή δεν είναι σε κατάλληλη θέση ώστε να συνθέσουν τα τριμερή της πρωτεΐνης. Προυσία θρυψίνης, ο αριθμός των μονομερών που ανιχνεύονται είναι σημαντικά μειωμένος στα μεταλλαγμένα στελέχη ενώ σταθερά τριμερή μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από 5 λεπτά αναμονής. Ο μικρός αυτός αριθμός μονομερών πιθανότατα οφείλεται σε μια αυθόρμητη , αλλά με αργούς ρυθμούς, αντίδραση προλύλ-ισομερίωσης. Η αντίδραση αυτή είναι γνωστό ότι συμβαίνει αυθόρμητα, όμως παρουσία ισομερασών προάγεται με ταχύτερους ρυθμούς (Schmid,1993). Ακόμη δύο πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης ελέγχθηκαν, οι OmpA και OmpF, οι οποίες έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με την προαναφερθείσα LamB.

Η απουσία της *surA* επηρεάζει ένα πρώιμο στάδιο αναδίπλωσης για την ωρίμανση της LamB στην αναδίπλωση των μονομερών και έτσι επηρεάζει αρνητικά την έκφραση του κυρίου τριμερούς πορινών , OmpC, OmpF και LamB όπως και την έκφραση της OmpA.

Η SurA αποτελείται από μια εκτεταμένη αμινο τελική περιοχή, δύο διαδοχικές περιοχές τύπου παρβουλίνης και μια καρβόξυ τελική ουρά. Η δραστηριότητά της ΡΡΙΑσης στην *surA* εντοπίζεται στην μια μόνο από τις δομικές περιοχές παρβουλίνης. Η N-τελική περιοχή σε συνδυασμό με την C-τελική περιοχή φαίνεται να έχουν την δραστηριότητα μοριακού συνοδού και θεωρούνται υπεύθυνες για την λειτουργία της *surA* in vivo. Ο συνδυασμός αυτών των δύο περιοχών, επίσης καθιστάται υπεύθυνος για την αναγνώριση διαφόρων πρωτεϊνών στόχων, κατά προτίμηση πορινών. Γενικά ο ρόλος της *surA* στην βιογένεση των πορινών είναι να αναγνωρίζει επιλεκτικά τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και να βοηθά στην αναδίπλωση και την συναρμολόγησή τους. Επομένως η δραστηριότητα ΡΡΙΑσης στην SurA παίζει πολύ μικρό ρόλο στην γενική λειτουργία του ενζύμου (Behrens et al.2001).

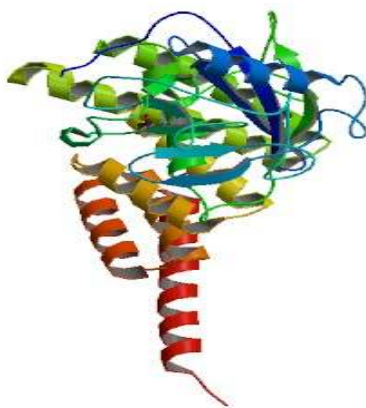
Η PpiD της *Escherichia Coli*.

Η PpiD απομονώθηκε από τον περιπλαστικό χώρο της *E.coli* και φαίνεται να συμμετέχει στην διαδικασία αναδίπλωσης πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της οικογένειας των παρβουλινών. Αναλύσεις στην αμινοξική ακολουθία της PpiD έδειξαν ότι περιέχει μια δομική περιοχή τύπου παρβουλίνης, στην περιοχή των αμινοξέων μεταξύ 227 και 357. Σύμφωνα με αυτό αποδείχτηκε ότι η PpiD πρωτεΐνη έχει δραστικότητα PPIάσης in vitro (Darigalongue & Raina , 1998).

Η σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m με υπόστρωμα το τετραπεπτιδίο **ηλέλτρυλο-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-νιτροανιλίδιο**, κυμαίνεται μεταξύ $0,4-3,4 \mu M^{-1}s^{-1}$. Η τιμή αυτή είναι υψηλότερη από την σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m της SurA. Η μέγιστη ενζυμική δραστικότητα παρουσιάστηκε όταν το προπορευόμενο αμινοξύ της προλίνης ήταν το γλουταμινικό με σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m ίση με $3,4 \mu M^{-1}s^{-1}$. Και ακολούθησαν η λευκίνη και η αλανίνη με $2,3$ και $1,1 \mu M^{-1}s^{-1}$. Μάλιστα τα αμινοξικά κατάλοιπα G347 και I350 της PpiD φαίνεται να διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην δραστηριότητα της PPIάσης που εμφανίζει το ένζυμο. Με βάση την ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, τα αμινοξέα αυτά φαίνεται να είναι τοποθετημένα στο ενεργό κέντρο της PpiI ανθρώπινης ομόλογης παρβουλίνης (Ramaganathan et al.,1997).

Το γονίδιο PpiD απομονώθηκε ως το γονίδιο αναστολέας της έκφρασης του surA, μετάλλαξη του οποίου, προκαλεί παρεμπόδιση στην προκαθορισμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη PpiD τοποθετείται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω ενός μόνο διαμεμβρανικού τμήματος ενώ το ενεργό της κέντρο στρέφεται προς τον περιπλαστικό χώρο (Darigalongue & Raina,1998).

Έχει βρεθεί ότι οι περισσότερες περιπλαστικές πρωτεΐνες που καταλύουν αντιδράσεις αναδίπλωσης πρωτεϊνών βρίσκονται υπό τον έλεγχο είτε του παράγοντα σίγμα (σ^E) είτε του συστήματος δύο στοιχείων CpxR-CpxA (Danese & Silhavy,1997).



Εικόνα 1.5 . Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης PpiD.

Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι απουσία και των δύο γονιδίων *ppiD* και *surA* τα κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν. Η θνησιμότητα αυτή εξηγείται από την επικάλυψη που υπάρχει στην λειτουργία των προϊόντων των δύο αυτών γονιδίων αλλά στην ανεξάρτητη και διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης του καθενός. Οι επικαλυπτόμενες λειτουργίες τους βασίζονται στις παρακάτω ιδιότητες :

α) Η υπερέκφραση του *ppiD* γονιδίου μπορεί να επαναφέρει την μεμβράνη στην φυσιολογική της μορφή σε *surA* μεταλλαγμένα βακτήρια καθώς και να αναστείλει και άλλες ανωμαλίες της μεμβράνης όπως αυξημένη ευαισθησία σε κάποια αντιβιοτικά.

β) Η υπερπαραγωγή της *PpiD* μπορεί να επαναφέρει την αυξημένη δραστηριότητα του παράγοντα σ^E που παρατηρείται σε *surA* μεταλλάγματα.

γ) τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των *ppiD* μεταλλαγμένων βακτηρίων μπορούν να αντισταθμιστούν από την υπερέκφραση του *surA* γονιδίου.

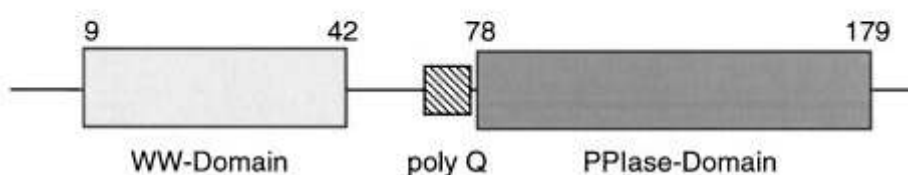
H SSP1 της Neurospora Crassa.

Σε σύγκριση με άλλες ευκαρυωτικές παρβουλίνες που είναι γνωστές έως και σήμερα η SSP1 του *Neurospora Crassa* είναι μοναδική για δύο λόγους:

(Α) Είναι ένζυμο το οποίο εμφανίζεται σε μεγάλες ποσότητες (0,05-0,1% της συνολικής κυτταρικής πρωτεΐνης), σε αντίθεση με την ομόλογη ανθρώπινη πρωτεΐνη Pin1 όπου η συγκέντρωσή της σε HeLa κύτταρα εκτιμήθηκε σε 0,5 μ M. Συνεπώς η συγκέντρωση της SSP1 είναι της ίδιας κλίμακας όπως και άλλων PPIάσων που εντοπίζονται στην *Neurospora Crassa* όπως η Cyp20 και η FKBP13. Επίσης η SSP1 δεν εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα αλλά μπορεί να απομονωθεί και από το κυτταρόπλασμα του *N. Crassa*.

(Β) Σε αντίθεση με τα γνωστά έως σήμερα μέλη της οικογένειας των ευκαρυωτικών παρβουλινών από τον *Saccharomyces Cerevisiae* και από την *Drosophila Melanogaster*, η SSP1 διαθέτει μια πολυγλουταμινική περιοχή (Εικόνα 1.6) η οποία εντοπίζεται στο διάστημα ανάμεσα του WW εξειδικευμένου μοτίβου αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες και της λειτουργικής περιοχής PPIάσης. Οι πολυγλουταμινικές περιοχές είναι χαρακτηριστικά λειτουργικά μοτίβα, παρόντα σε πολλές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αντιγραφή, την μεταγραφή και την κυτταρική ρύθμιση. Παρ' όλα αυτά ο λειτουργικός ρόλος της πολυγλουταμινικής περιοχής της SSP1 δεν έχει έως σήμερα διευκρινιστεί.

B



Εικόνα 1.6. Απεικόνιση της δομής της SSP1. Η αμινοξική ακολουθία αποτελείται από έναν WW τομέα στο αμινοτελικό άκρο, έναν τομέα PPIάσης στο καρβοξυ-τελικό άκρο και ενδιάμεσα εμφανίζεται η πολυγλουταμινική περιοχή (polyQ).

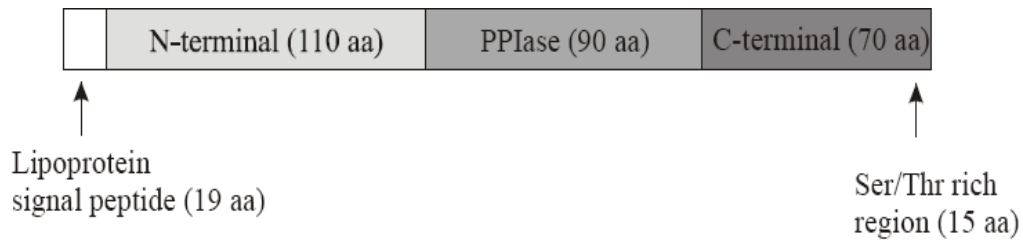
Σε αντίθεση με τις CYPs και τις FKBP's η SSP1 εμφανίζει μεγάλη εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και ιδιαίτερα σε μικρά πεπτίδια. Πειράματα έχουν δείξει ότι πεπτίδια που διαθέτουν όξινα αμινοξικά κατάλοιπα όπως το γλουταμινικό, την φωσφοσερίνη ή την φωσφοθρεονίνη πριν την προλίνη κατά την δημιουργία του ιμιδικού δεσμού ευνοούν σημαντικά την δραστηριότητα ΡΡ1άσης της SSP1 (Oliver Kors et al., 1998). Η εξειδίκευση ως προς το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα που εμφανίζει η SSP1 και η τιμή K_{cat}/K_m είναι συγκρίσιμες με αυτές της ανθρώπινης Pin1.

H PrsA του B.subtilis.

Το 1998 οι Kontinen & Sarvas απομόνωσαν μια διαμεμβρανική λιποπρωτεΐνη από το *B.subtilis*, την PrsA. Το prsA γονίδιο είναι ένα μονοκιστρονικό μήνυμα 876 νουκλεοτιδίων το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη 292 αμινοξέων. Η PrsA είναι μια πρωτεΐνη που διαθέτει στο N-τελικό άκρο ένα πεπτίδιο οδηγό μήκους 19 αμινοξέων όπως και μία θέση δράσης μιας πεπτιδάσης. Το πρόδρομο μόριο της PrsA έχει μέγεθος 32,5 kDa ενώ η ώριμη πρωτεΐνη 30,5 kDa (Vitikainen et al. 2004).

Η PrsA είναι μια πρωτεΐνη πλούσια σε λυσίνη (18,7%) με αποτέλεσμα να παρουσιάζει έναν υδροφιλικό χαρακτήρα, υψηλό $pI(8,5)$ και ένα θετικό καθαρό φορτίο της τάξεως του +3. Υπάρχει μία μόνο περιοχή πλούσια σε λυσίνη στην πρωτεΐνη ενώ οι περισσότερες λυσίνες είναι διάσπαρτα καταναμημένες σε ολόκληρη την ακολουθία της PrsA. Ένα επιπλέον ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της PrsA είναι μια περιοχή μήκους 15 αμινοξέων πλούσια σε σερίνη/θρεονίνη στην άκρη του κάρβοξυ-άκρου. Χαρακτηριστικές ακολουθίες πλούσιες σε σερίνες όπως υπάρχουν στο *Bacillus subtilis* έχουν βρεθεί μόνο σε πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το κυτταρικό τοίχωμα. Σύμφωνα με προβλέψεις της τριτοταγούς δομής της PrsA φαίνεται ότι αποτελείται κυρίως από α -έλικες και κάποιες β -πτυχωτές επιφάνειες που απαρτίζουν κυρίως το μέσο της πρωτεΐνης. Δεν υπάρχουν κάποια μοτίβα στην PrsA που να δηλώνουν ότι υπάρχει σύνδεση με κάποια μεμβράνη (kontinen et al., 1991).

Η PrsA είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 3 δομικές περιοχές (Εικόνα 1.7). Η μεσαία περιοχή της PrsA αποτελεί την καταλυτική περιοχή ΡΡ1άσης μεγέθους περίπου 90 αμινοξέων. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ομολογίας με πολλά μέλη της οικογένειας των παρβουλινών (Rudd et al. 1995). Το ποσοστό ομολογίας που παρουσιάζει η PrsA με την Par10 της *E.coli*, την Pin1 και την Par14 είναι 40,52% και 41% αντίστοιχα. Παρ'όλα αυτά, το N-τελικό άκρο (~110 αα) καθώς και το C-τελικό άκρο (-70αα) δεν εμφανίζουν καμία ομολογία με άλλες χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες. Το N-τελικό άκρο παρουσιάζει ομοιότητες μόνο με πρωτεΐνες τύπου PrsA από συγγενικά Gram θετικά βακτήρια, ενώ το C-τελικό άκρο δεν παρουσιάζει καμία ομολογία ακόμα και ανάμεσα και σε συγγενικά είδη του *B.subtilis*. (Sarvas et al., 2004).



Εικόνα 1.7. Σχηματική αναπαράσταση της λιποπρωτεΐνης PrsA. Διακρίνονται οι τρεις δομικές περιοχές, το N-τελικό άκρο, η κεντρική δομή PPIάσης, το C-τελικό άκρο με την πολύση σε σερίνες και θρεονίνες περιοχή καθώς και το πεπτίδιο οδηγός (19αα).

Το πρώτο αμινοξύ στο αμινο-τελικό άκρο της ώριμης PrsA πρωτεΐνης είναι μια κυστεΐνη που συνδέεται ομοιοπολικά με ένα μόριο δι-άκυλο-γλυκερόλης που εν συνεχεία συνδέει την πρωτεΐνη στην μεμβράνη. Έχει προταθεί ότι η PrsA καταλύει ή συμμετέχει στην διαδικασία αναδίπλωσης εξωκυτταροπλασματικών πρωτεϊνών αλλά και στην σταθεροποίηση τους στο διαμέρισμα ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα (Hyggylainen et al., 2001). Ο ρυθμός έκκρισης της AmyQ α-αμυλάσης, μιας πρωτεΐνης μοντέλου που χρησιμοποιείται σε πολλά πειράματα, φαίνεται ότι εξαρτάται γραμμικά από τα κυτταρικά επίπεδα της PrsA. Η PrsA είναι μια σημαντική πρωτεΐνη για το *Bacillus subtilis* αφού μείωση των κυτταρικών επιπέδων κάτω από 200 μόρια ανά κύτταρο επιφέρει λύση των κυττάρων. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του αρνητικού φορτίου του κυτταρικού τοιχώματος με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η εκκραιότητά του (Vitikainen et al., 2001).

Για να ελεγχθεί και να προσδιοριστεί η ενζυμική δραστηριότητα της PrsA όσον αναφορά την συμμετοχή της στο δίπλωμα πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η προλίνη της ριβονουκλεάσης T1. Η καταλυτική δραστηριότητα της PrsA ήταν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα με σταθερά εξειδίκευσης k_{cat}/K_m για υπόστρωμα το τετραπεπτίδιο ηλεκτρουλο-Ala-Lys-Pro-Phe-4-νιτροανιλίδιο η οποία ανέρχεται στα $6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Παρά το γεγονός ότι έχουν αναφερθεί πολύ υψηλότερες δραστηριότητες από άλλες πρωτεΐνες όπως την Par10 της *E.coli* και την Pin1, η ενζυμική δραστηριότητα της PrsA κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτήν της SurA. Μάλιστα για την δραστηριότητα της PrsA ως PPIάση απαιτείται μόνο η παρουσία της δομικής περιοχής τύπου παρβουλίνης ενώ οι περιοχές εκατέρωθεν αυτής δεν είναι απαραίτητες.

Η NifM του *Azotobacter vinelandii* και του *Klebsiella pneumoniae*.

Το 2002, οι Gavini και Pulakat έδειξαν ότι η NifM πρωτεΐνη ανήκει στην οικογένεια των ΡΡΙΑσών και μάλιστα στην υποοικογένεια των παρβουλινών. Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε σε αναλύσεις ομολογίας της πρωτεΐνης αυτής με άλλες χαρακτηρισμένες παρβουλίνες αλλά και με βάση την ενζυμική της δραστηριότητα. Η πρωτεΐνη NifM του *Klebsiella Pneumoniae* αποτελείται από 266 αμινοξέα ενώ η NifM του *Azotobacter vinelandii* αποτελείται από 292 αμινοξέα. Οι Jacobson et al. (1989) συγκρίνοντας τις αμινοξικές αλληλουχίες και των δύο αυτών πρωτεϊνών ανακάλυψαν ότι ένα μεγάλο ποσοστό ομολογίας εντοπιζόταν στο κάρβοξυ-άκρο τους το οποίο αποτελεί και το 1/3 του συνόλου της πρωτεΐνης. Αντίθετα η αμινοξική αλληλουχία στο άμινο-άκρο των πρωτεϊνών αυτών παρουσίαζε πολύ χαμηλό ποσοστό ομολογίας.

Η NifH είναι ο κύριος δότης ηλεκτρονίων της MoFe-πρωτεΐνης και έχει διάφορους ρόλους τόσο στην βιολογική αζωτοδέσμευση όσο και στην ωρίμανση της νιτρογενάσης. Η σύνθεση μιας λειτουργικής NifH πρωτεΐνης εξαρτάται από την διαθεσιμότητα της NifM. Το γεγονός ότι η NifM διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση της Fe πρωτεΐνης πηγάζει από αναλύσεις που έχουν γίνει στην *K.pneumoniae* και στο *A.vinelandii* σε στελέχη μεταλλαγμένα ως προς το nifM γονίδιο και τα οποία παρατηρήθηκε δραματικά μειωμένη δραστηριότητα της Fe πρωτεΐνης και συσσώρευση σημαντικού αριθμού πολυπετιδίων της Fe πρωτεΐνης.

Με βάση το γεγονός ότι, η C-τελική δομική περιοχή της NifM έχει όμοια ακολουθία με αυτών των ΡΡΙΑσών, έχει προταθεί ότι ο ρόλος της NifM μπορεί να είναι ο ισομερισμός ενός καταλοίπου προλίνης στην Fe πρωτεΐνη. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της NifH, που προέρχονται από 60 διαφορετικούς οργανισμούς. Ως αποτέλεσμα ήταν να βρεθεί μια κοινή ακολουθία η οποία χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη επτά πλήρως συντηρημένων καταλοίπων προλίνης. Από αυτά μόνο η προλίνη 258 φαίνεται να είναι υπόστρωμα στο οποίο δρα η NifM.

Σύμφωνα με την δομή της NifH η θέση της προλίνης 258 είναι στην C-τελική περιοχή της υπομονάδας της NifH. Είναι φανερό ότι η δομή αυτής της περιοχής, που οφείλεται στην συγκεκριμένη διαμόρφωση του ισχυρού προλύν-πεπτιδικού δεσμού της προλίνης 258, που προφανώς μετατράπηκε σε trans διαμόρφωση από την δράση της NifM, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση της NifH ώστε να καθιστάται ενεργή. Γενικά η μετατροπή του προλύν-πεπτιδικού δεσμού της Pro258 με την δράση της NifM παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντικά χαρακτηριστικά για την καθορισμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης, την ωρίμανση της καθώς και την σωστή συναρμολόγηση ενός NifH λειτουργικού διμερούς (Gavini et al.2006).

Η καταλυτική δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα. Η σταθερά εξειδίκευσης K_{cat}/K_m για υπόστρωμα το τετραπεπτίδιο **ηλεκτρολο-Ala-Phe-Pro-Phe-4 νιτροανιλίδιο** ανέρχεται στα $1.09 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Gavini et al.,2006). Η τιμή αυτή της σταθεράς εξειδίκευσης είναι συγκρίσιμη με την σταθερά εξειδίκευσης της Par10 του *E.coli* η οποία ανέρχεται στα $1.69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ όταν χρησιμοποιείται το ίδιο υπόστρωμα (Rahfeld et al.,1994). Συμπερασματικά, η δραστηριότητα ΡΡΙΑσης που παρουσιάζει η NifM κυμαίνεται σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα και είναι αντίστοιχη της ενζυμικής δραστηριότητας της Par10 του *E.coli*, που είναι και ομολογή της.

1.4 Το γονιδίωμα του *Sinorhizobium meliloti*.

Το γονιδίωμα του *S.meliloti* αποτελείται από 3 ρεπλικόνια: ένα μεγαλύτερο ρεπλικόνιο της τάξης των 3.65 Mb και δύο μικρότερα ρεπλικόνια τα *pSymA* και *pSymB* μεγέθους 1.35 και 1.68 Mb αντίστοιχα. Παρά το γεγονός ότι το γονιδίωμα του *S. meliloti* αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα σε μέγεθος βακτηριακά χρωμοσώματα που έχουν αλληλουχηθεί μέχρι σήμερα, είναι λίγο μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με εκείνο του *M.loti*. Από την ανάλυση των δεδομένων αλληλούχισης προβλέπεται η ύπαρξη 6204 γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Με βάση την σύγκριση της ομολογίας των πιθανών λειτουργικών πρωτεϊνών με άλλες πρωτεΐνες γνωστής λειτουργίας, μπόρεσε να αποδοθεί πιθανή λειτουργία στο 59,7% των πρωτεϊνών του *S.meliloti* ενώ το 8,2% των πρωτεϊνών δεν εμφάνισαν καμία ομολογία. Το ποσοστό των «ορφανών» αυτών γονιδίων ήταν σαφώς μεγαλύτερο στα δύο μεγαπλασμίδια σε σχέση με το χρωμόσωμα με ποσοτά 11,5% και 12,3% στα πλασμίδια *pSymA* και *pSymB* αντίστοιχα.

Ο μεταβολισμός του αζώτου που πραγματοποιείται από όλα τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια είναι ένα εμφανές χαρακτηριστικό που προκύπτει και από τη μελέτη του γονιδιώματος του *S. meliloti*. Παρόλο που στην *Klebsiella pneumoniae* η σύνθεση και η λειτουργία της νιτρογενάσης απαιτεί την έκφραση είκοσι *nif* γονιδίων, μόνο εννέα *nif* γονίδια μπόρεσαν να εντοπιστούν στο γονιδίωμα του *S.meliloti* (*nifA*, *nifB*, *nifHDKE*, *nifX*, *nifN* και *nifS*). Εκτός από ένα πιθανό ορθόλογο *nifS* γονίδιο καθώς και ένα πιθανό *nifV* γονίδιο που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα, όλα τα άλλα *nif* γονίδια εντοπίζονται στο πλασμίδιο *pSymA*. Γονίδια όπως τα *nifQ*, *nifZ*, *nifW* τα οποία εντοπίζονται στα στελέχη όπως *M.loti* και *Risobium sp.NGR234* ή ομόλογά τους δεν εντοπίστηκαν στο γονιδίωμα του *S.meliloti*.

Στο γονιδίωμα του *S.meliloti*, τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την σύνθεση και την έκφραση των Nod παραγόντων εντοπίζονται στο πλασμίδιο *pSymA*. Έπειτα από αναλύσεις έχουν βρεθεί δύο γονίδια που εμφανίζουν μεγάλη συντηρητικότητα. Το *NodM* το οποίο εμφανίζει μια ομολογία της τάξης του 99% στην νουκλεοτιδική του αλληλουχία με το γονίδιο *glmS* και το οποίο κωδικοποιεί για την συνθετάση της D-γλυκοζαμίνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το *nodM* γονίδιο προήλθε ύστερα από διπλασιασμό του χρωμοσωμικού γονιδίου *glmS*. Κάθε μεγαπλασμίδιο περιέχει ένα αντίγραφο του γονιδίου *nodPQ* το οποίο εμφανίζει ποσοτό ομολογίας 99% σε νουκλεοτιδικό επίπεδο και το οποίο εμπλέκεται στην διαδικασία μετατροπής του θείου σε φωσφοαδενοσίνη, ένα απαραίτητο συστατικό για την σύνθεση κάποιων *nod* παραγόντων. Πειράματα έδειξαν ότι το αντίγραφο του γονιδίου *nodPQ* που εμφανίζεται στο πλασμίδιο *pSymA* προέρχεται από την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του *S.meliloti* ενός αντιγράφου του πλασμιδίου *pSymB* αρχέγονης προελεύσεως.

Γενικότερα από την ανάλυση του γονιδιώματος του *S.meliloti* προκύπτει ότι τα *nod* γονίδια που εντοπίζονται σε αυτό προήλθαν είτε από οριζόντια μεταφορά η οποία καθορίστηκε από την εισαγωγή του *pSymA* πλασμιδίου από άγνωστο βακτήριο είτε από τον αναδιπλασιασμό ήδη υπάρχοντων γονιδίων του γενώματος του *S.meliloti*.

Υλικά κ Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργεια του βακτηρίου *Sinorhizobium Meliloti*.

Για την ανάπτυξη βακτηριακής καλλιέργειας του *Sinorhizobium meliloti* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό διάλυμα YMB (Yeast Manitol Broth medium). Για την παρασκευή ενός λίτρου τέτοιου θρεπτικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά σε γραμμάρια ανά λίτρο (Πίνακας 2.1).

Υλικό	Ποσότητα gr/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
yeast extract	1
mannitol	10

Πίνακας 2. 1 Σύνθεση του θρεπτικού μέσου YMB (Yeast Manitol Broth) και οι ποσότητες του κάθε υλικού που χρησιμοποιήθηκε σε γραμμάρια ανά λίτρο θρεπτικού διαλύματος.

Οι υγρές καλλιέργειες αφού αποστειρώθηκαν, εμβολιάστηκαν με τον μικροοργανισμό από προυπάρχουσα αποθηκευμένη καλλιέργεια σε στοκ γλυκερόλης σε βαθεία κατάψυξη. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε για 2 ημέρες στους 30°C.

2.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

Σύμφωνα με το QIAprep Spin Miniprep Kit της QIAGEN™.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων *E.coli*, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί επιτυχώς με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια ανπτύσσεται στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται στις 6000 σ.α.λ για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 μl διαλύματος P1 που εμπεριέχει Rnase A.
- Προστίθενται 250 μl P2, το διάλυμα αναδεύεται απαλά και αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 5 λεπτά. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος N3, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε στήλη QIAprep.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Σε αυτό το στάδιο το πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στην στήλη και έτσι το διάλυμα που την έχει διαπεράσει πετάγεται.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος PE και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη πετάγεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση ώστε να απομακρυνθεί τελείως το διάλυμα PE καθώς εμπεριέχει αιθανόλη, η οποία εάν παραμείνει μπορεί να κατασταθεί παρεμποδιστικός παράγοντας για περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.

- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα errendorf και ακολουθεί έκλουση του προσδεσμένου στη στήλη DNA με την προσθήκη 30 μl διαλύματος EB.
- Το δείγμα φυλάγεται στους -20°C.

Σύμφωνα με την μέθοδο του βρασμού.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχουν το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων E.coli, τα οποία έχουν μετασχηματισθεί επιτυχώς με το προς απομόνωση πλασμίδιο. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37°C με συνεχή ανακίνηση για περίπου 16 ώρες.
- 1,5 ml από την παραπάνω καλλιέργεια μεταφέρονται σε σωλήνα errendorf και φυγοκεντρώνονται στις 6.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 150 μl διαλύματος STET, πρόσθετοντας ταυτόχρονα και 1 μl λυσοζύμης (50mg/ml).
- Γίνεται επώαση στους 100° C για 45 δευτερόλεπτα.
- Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το ίζημα απομακρύνεται με την βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και το πλασμιδιακό DNA κατακρυμνίζεται σε την προσθήκη 180 μl ισοπροπανόλης.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για την συλλογή του πλασμιδιακού DNA.
- Ακολουθεί εκπλυση του αδιαφανούς ιαήματος με 70% αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

2.3 Πέψη δεοξυριβονουκλεοτιδικών οξέων (DNA) με ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Οι πέψεις των δειγμάτων DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο που κυμαίνεται από 20 μl μέχρι και 100 μl, ανάλογα με την ποσότητα και καθαρότητα του DNA που υποβάλλεται σε πέψη, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πραγματοποίηση των αντιδράσεων.

- Σε σωλήνα errendorf τοποθετείται το δείγμα DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για την δράση του ενζύμου και ddH₂O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Συνήθως χρησιμοποιείται μία μονάδα ενζύμου (1 unit) για κάθε μικρογραμμάριο δείγματος DNA. Για παράδειγμα μια τυπική αντίδραση πέψης σε τελικό όγκο 30 μl περιλαμβάνει:

Διάλυμα DNA 1 μg	εως 10 μl
10X ρυθμιστικό διαλ. Ενζύμου	3 μl
Ένζυμο περιορισμού (1 unit/μl)	1 μl
RNAse A (1 mg/ml)	0,5 μl
ddH ₂ O εως τελικό όγκο	30 μl

- Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και επωάζεται για 3-4 ώρες σε κατάλληλη θερμοκρασία.
- Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα αναλύονται σε πηκτή αγαρόζης.

Περιοριστική Ενδονουκλεάση	Αλληλουχία αναγνώρισης	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης
NCOI	C [∇] CATG [∇] G	37° C
NOTI	C [∇] GGCCG [∇] C	37° C

Πίνακας 2.2 Ενδονουκλεάσες περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση του γονιδίου Smc02451. Στον πίνακα αναφέρονται οι αλληλουχίες αναγνώρισης, το σημείο πέψης καθώς και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του κάθε ενζύμου.

2.4 Ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης

Ο διαχωρισμός των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων βάσει του μεγέθους και της διαμορφώσής τους γίνεται μέσω της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Σε περίπτωση διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA, ο διαχωρισμός τους σε πηκτή αγαρόζης είναι ανάλογος του μεγέθους τους. Το εύρος μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από την συγκέντρωση της πηκτής και συμαίνεται από 0,1 έως και 100 kb. Στον πίνακα 2.3 αναφέρονται οι τυπικές συγκεντρώσεις αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Αγαρόζη (%)	Εύρος διαχωρισμού γραμμικών μορίων DNA (kb)
0,3	1,0-70
0,5	0,7-45
0,8	0,4-20
1,0	0,3-10
1,2	0,2-8
1,5	0,2-6
2,0	0,1-5

Πίνακας 2.3 Συγκέντρωση πηκτής αγαρόζης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

Τα μόρια DNA γίνονται ορατά με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και να φθορίζει παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Η προετοιμασία της πηκτής και των δειγμάτων γίνεται ως εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει.

- Στην λιωμένη αγαρόζη προστίθεται 0,001% v/v διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου και αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50° C.
- Το διάλυμα προστίθεται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συσκευή εφαρμόζεται η κατάλληλη «χτένα» ώστε να σχηματισθούν στην πηκτή τα βοηθία φόρτωσης.
- Μόλις στερεοποιηθεί η πηκτή, απομακρύνεται η χτένα και τοποθετείται στο δοχείο ηλεκτροφόρησης το οποίο συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1xTAE.
- Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται 1/10 του όγκου του διαλύματος, διάλυμα φόρτωσης (loading buffer).
- Τα δείγματα τοποθετούνται στα βοηθία φόρτωσης και αναλύονται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως που δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 6 Vcm⁻¹.

2.5 Ανάκτηση κλάσματος DNA από πηκτή αγαρόζης.

Η απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης έγινε σύμφωνα με το QIAquick Gel Extraction Kit της QIAGEN™.

- Το κομμάτι της πηκτής αγαρόζης το οποίο φέρει την ζώνη DNA που μας ενδιαφέρει αφαιρείται και τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf και ζυγίζεται.
- Προστίθεται για κάθε mg πηκτής 3 ml διαλύματος QG.
- Γίνεται επώαση του δείγματος στους 50° C για 10 λεπτά. Ανά δύο με τρία λεπτά ανακινούμε το δείγμα ισχυρά. Εάν χρειαστεί παρατείνεται ο χρόνος επώασης έως ότου διαλυτοποιηθεί η πηκτή πλήρως.
- Προστίθεται ποσότητα ισοπροπανόλης 1 ml για κάθε mg πηκτής.
- Το διάλυμα τοποθετείται σε στήλη QIAQuick Spin. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στην φάση αυτή το DNA προσδένεται στην στήλη. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται.
- Προστίθενται 500 ml διαλύματος QG. Ακολουθεί φυγοκέντριση της στήλης στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται.
- Προστίθενται 750 ml PE. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα που διαπέρασε την στήλη πετάγεται και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση.
- Το πάνω μέρος της στήλης τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf. Για την έκλυση του DNA προστίθενται ddH₂O ή διάλυμα EB (30μl).
- Αφού αφήσουμε την στήλη να σταθεροποιηθεί για 1 λεπτό, ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.000 σ.α.λ. για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το δείγμα φυλάσσεται στους -20° C.

2.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA με την χρήση του ενζύμου DNA λιγάσης.

Η αντίδραση της DNA λιγάσης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10 μl. Για την μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία άκρων πλασμιδίου φορέα και ένθετου DNA ρυθμίζεται στο 1:3 αντίστοιχα.

Σε σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται τα παρακάτω:

DNA πλασμιδιακός φορέας	1 μl
DNA ένθεσης	1 μl
10 X Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1 μl
Ένζυμο Κιγάση T4 (1 unit/μl)	1 μl
ddH ₂ O	6 μl

Το δείγμα επωάζεται στους 4° C για 14-16 ώρες ή εναλλακτικά στους 25° C για 3 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση της λιγάσης με θέρμανση του δείγματος στους 60° C για 10 λεπτά.

2.7 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*.

- Σε σωλήνα erpendorf μεταφέρονται μέσα σε πάγο 100 μl ικανά προς μετασηματισμό κύτταρα *Escherichia coli*.
- Αφού τα κύτταρα ξεπαγώσουν, προστίθενται 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των κυττάρων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία του μετασηματισμού.
- Το μίγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Η είσοδος του πλασμιδίου στα δεκτικά κύτταρα επιτυγχάνεται με θερμικό σοκ στους 42° C για 1-2 λεπτά.
- Προστίθενται 100 μl θρεπτικού διαλύματος LB και τα κύτταρα επωάζονται στους 37° C για 1 ώρα.
- Τα κύτταρα στρώνονται σε τριβλύο που περιέχει το θρεπτικό μέσο LB και το κατάλληλο αντιβιοτικό (καναμυκίνη) ώστε να επιτευχθεί η επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων.
- Ακολουθεί επώαση τους 37° C για 18 ώρες.

2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

Η τεχνική αυτή (Mullis K, et. Al,1986) αποτελεί την πλέον ευαίσθητη και αποτελεσματική μέθοδο ενίσχυσης μορίων DNA και RNA, in vitro ή ακόμα και in situ. Η λειτουργία της διαδικασίας βασίζεται σε χαρακτηριστικές αρχές της διαδικασίας αντιγραφής του DNA. Το μόριο στόχος ή ακόμα και κάποια συγκεκριμένη περιοχή του που επιζητούμε να ενισχυθεί, υποβάλλεται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (94° C) όπου και αποδιάτασσεται. Οι δύο μονόκλωνες αλυσίδες που προκύπτουν από την αποδιάταξη αποτελούν ουσιαστικά εκμαγείο από το οποίο θα προκύψουν τα πανομοιότυπα αντίγραφα. Δύο κατάλληλα σχεδιασμένα μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) υβριδίζουν εκατέρωθεν της περιοχής στόχου και αποτελούν το σημείο έναρξης της δράσης του ενζύμου DNA πολυμεράσης η οποία ως γνωστόν διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στην διαδικασία της αντιγραφής, πολυμερίζοντας τις αλυσίδες DNA προσθέτοντας νουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5'-3'. Με την δράση λοιπόν του ενζύμου και την συμπλήρωση των μονόκλωνων μορίων που έχουν προκύψει από την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου, προκύπτουν δύο πανομοιότυπα μόρια με το αρχικό. Τα δύο αυτά αντίγραφα μπορούν ξανά να υποβληθούν σε διαδικασία αποδιάταξης και να προκύψουν πλέον 4 μονόκλινα μόρια ως εκμαγεία για να υβριδίσουν οι εκκινητές. Εάν αυτός ο κύκλος επαναληφθεί (n) φορές τότε θα προκύψουν 2ⁿ δίκλινα μόρια DNA που αποτελούν αντίγραφα της αλληλουχίας μεταξύ των δύο εκκινητών και περιλαμβάνουν και τις αλληλουχίες των εκκινητών στα άκρα τους.

Η εκθετική αυτή συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιείται εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως η έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών και η παραγωγή παρεμποδιστικών ουσιών που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την λειτουργία της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση του προϊόντος εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού καθώς και από την εξειδίκευση των θέσεων υβριδισμού των συγκεκριμένων εκκινητών στην μήτρα του DNA. Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόζονται κάθε φορά στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης στην συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti* καθώς και για να δημιουργηθούν κατάλληλα συμπληρωματικά άκρα τα οποία επέτρεψαν την υποκλωνοποίηση του γονιδίου σε φορέα έκφρασης. Ως εκμαγείο, χρησιμοποιήθηκε γενωματικό DNA που απομονώθηκε από το *Sinorhizobium meliloti*. Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε, DynNAzyme EXT™, (FINNZYMES), παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό σφαλμάτων κατά την σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον πίνακα 2.4.


Εκκινητές	Προϊόν (bp)	Αλληλουχία αναγνώρισης ενδονουκλεάσης	Tm
Smc02451-F AAACCATGGAAGGGACCGATCCGGTCATCGCG	860	C [∇] CATG [∇] G	68° C
Smc02451-R AAAGCGGCCGCCTTGTTTCCTGCGGCTTCG		C [∇] GGCCG [∇] C	70° C

Πίνακας 2.4 Στον πίνακα παρουσιάζεται το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πείραμα καθώς και οι θέσεις περιορισμού και η θερμοκρασία Tm.

Οι συνθήκες της αντίδρασης καθώς και οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθες;

Σε ειδικό σωλήνα erpedorf (100μl) προστίθενται:

- Μήτρα DNA 1 μl
- Εκκινητής ευθείας κατεύθυνσης (3mM) 1,5μl
- Εκκινητής αντίστροφης κατεύθυνσης (3mM) 1,5μl
- Μίγμα dNTPs (2mM) 1 μl
- 10x PCR ρυθμιστικό διάλυμα 5 μl
- Taq DNA πολυμεράση (1unit/μl) 0,5μl
- ddH₂O εως τελικό όγκο 50 μl

Αρχική αποδιάταξη	94° C για 2-4 λεπτά		30 κύκλοι
Αποδιάταξη	94° C για 1 λεπτό		
Υβριδισμός εκκινητών	64° C για 1 λεπτό		
Επιμήκυνση	72° C για 1 λεπτό		
Τελική επιμήκυνση	72° C για 20 λεπτά		

2.9 Έλεγχος βακτηριακών καλλιιεργειών για την έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25 mg/ml) εμβολιάζονται με μοναδική αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων E.coli BL21 με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης και επωάζονται για περίπου 16 ώρες στους 37° C , με συνεχή ανακίνηση.
- 1,25 ml από την προαναφερθείσα καλλιέργεια χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 30 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB (καναμυκίνη 25 μg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37° C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι O.D.₆₀₀=0,6.

- Όταν η οπτική πυκνότητα φθάσει στο κατάλληλο σημείο προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM.
- Η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται στους 37° C, με συνεχή ανακίνηση 5 ώρες.
- 1,5 ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα errendorf και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 75 μl ddH₂O.
- Προστίθενται 75 μl Sample Buffer, ακολουθεί επώαση στους 100° C για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποθήκευση των δειγμάτων στους -20° C.
- Η υπόλοιπη καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρωση της στις 4.000 σ.α.λ για 20 λεπτά, στους 4° C, απομακρύνεται το υπερκείμενο.
- Επαναδιάλυση σε 500μl διαλύματος 500 Tris-HCl pH 7.
- Σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους. Φυγοκέντρωση στις 13.000 σ.α.λ. για 10 λεπτά στους 4° C.
- Συλλέγεται προσεκτικά και φυλάσσεται το υπερκείμενο (περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων).
- Τα κυτταρικά θραύσματα επαναδιαλύονται σε 500 μl διαλύματος Tris-HCl pH 7.
- Σε 100 μl διαλυτών πρωτεϊνών προστίθενται 100 μl Sample Buffer, ακολουθεί επώαση στους 100° C για 5 λεπτά και φύλαξη των δειγμάτων στους -20° C.
- Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται για τα κυτταρικά θραύσματα.
- Η ύπαρξη ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης ελέγχεται με την ανάλυση των παραπάνω πρωτεϊνικών κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

2.10 Απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με επιτόπιο 6xHis.

- 30 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη (25 μg/ml), εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων κυττάρων E.coli BL21 με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης και επωάζονται για περίπου 14 ώρες στους 37° C, με συνεχή ανακίνηση.
- 12,5 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 250 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB (καναμυκίνη 25μg/ml). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 37° C με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας είναι O.D.₆₀₀=0.6.
- Όταν η οπτική πυκνότητα O.D.₆₀₀=0,6 προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM.
- Η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται στους 37° C , με συνεχή ανακίνηση για 5 ώρες.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρωση στις 4.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο.

- Επαναδιάλυση των κυττάρων με 2-5 ml, διαλύματος λύσης ανά γραμμάριο κυττάρων.
- Προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
- Λύση των κυττάρων με υπερήχους (4 φορές για 10 sec στα 200-300Watt με ενδιάμεση πάυση 10 sec).
- Φυγοκέντριση στις 10.000 σ.α.λ. για 20 λεπτά , στους 4° C.
- Συλλέγεται προσεκτικά το υπερκείμενο
- Στο υπερκείμενο προστίθεται 1 ml 50% Ni-NTA. Επώαση υπό συνεχή ανακίνηση στους 4° C για 30 λεπτά.
- Το παραπάνω δείγμα τοποθετείται σε ειδική στήλη χρωματογραφίας.
- Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη συλλέγεται.
- Ακολουθεί καθαρισμός της στήλης με τουλάχιστον τετραπλάσιο όγκο στήλης διαλύματος ξεπλύματος για δύο φορές. Συλλέγουμε δύο δείγματα.
- Ακολουθεί έκλυση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 0,5 ml διαλύματος έκλυσης, επαναλαμβάνουμε τέσσερις φορές.

2.11 Διαπίδυση

Τα κλάσματα της έκλυσης που περιείχαν την ανασυνδιασμένη πρωτεΐνη υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 2000 όγκων κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε με ημιπερατή μεμβράνη κυτταρίνης (Sigma). Η διαδικασία πραγματοποιείται για 16-18 ώρες στους 4° C υπό συνεχή ήπια ανάδευση.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης προτοιμάζονται με βρασμό τους για μία ώρα σε 1 λίτρο διαλύματος το οποίο περιέχει 5 gr EDTA και 8,5 gr NaHCO₃. Στην συνέχεια οι μεμβράνες ξεπλένονται καλά με απιονισμένο νερό και φυλάσσονται στους 4° C βυθισμένες σε αποστειρωμένο δις απιονισμένο νερό.

2.12 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Η ανάλυση πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Οι πρωτεΐνες με θέρμανση τους με το απορρυπαντικό δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate) , παρουσία ενός ισχυρού αναγωγικού παράγοντα όπως η β-μερκαπταιθανόλη, αποδιατάσσονται στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες και όλες αποκτούν αρνητικό φορτίο. Επειδή ο αριθμός των μορίων SDS που προσδένονται σε κάθε πολυπετιδική αλυσίδα είναι σχεδόν ανάλογος με το μοριακό της βάρος, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Το εύρος των μεγεθών που μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης εξαρτάται από την συγκέντρωση της πηκτής σε αυτήν. Το μέγεθος των πόρων που θα σχηματισθούν επηρεάζεται από την αναλογία N,N'-μεθυλένο-δισ ακρυλαμίδης προς ακρυλαμίδη το οποίο θα πρέπει να είναι περίπου 1:29.

Ακρυλαμίδη (%)	Εύρος διαχωρισμού πολυπεπτιδικών αλυσίδων (kDa)
15	10-43
10	12-60
12	20-80
7.5	36-94
5	57-212

Πίνακας 2.5 Συγκέντρωση πηκτής ακρυλαμίδης ανάλογα με το επιθυμητό εύρος διαχωρισμού.

		Πηκτή διαχωρισμού Ποσότητες (ml)						Πηκτή επιστοίβασης
		7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%	
1	Ακρυλαμίδη 30%	7,5	10	12,5	15	17,5	20	1,3
2	1% Bis-ακρυλαμίδη	5,2	3,9	3,1	2,6	2,2	1,9	1
3	3 M Tris-HCl pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	-
4	1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	-	-	-	1,25
5	10% SDS	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1
6	ddH ₂ O	13,04	11,85	10,14	8,14	6,04	3,84	6,24
7	TEMED	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
8	10% APS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Πίνακας 2. 6 Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβασης.

Τα παραπάνω υλικά προστίθενται στο διάλυμα παρασκευής της πηκτής με την σειρά που αναγράφονται. Στο τέλος και σχεδόν ταυτόχρονα προστίθενται το TEMED και το APS. Η Τετραμέθυλο-διαμίνη (TEMED) επιταχύνει τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης με την N,N'-μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδη και το υπερθειικό αμμώνιο (APS) παρέχει τις ελεύθερες ρίζες που είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της διαδικασίας πολυμερισμού. Το μείγμα τοποθετείται στο κενό ανάμεσα από τα τζάμια της συσκευής και αφήνεται να πολυμεριστεί για τουλάχιστον 1 ώρα.

Αφού πολυμεριστεί η κύρια πηκτή διαχωρισμού με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζεται η πηκτή επιστοίβασης και αφού τοποθετηθεί ανάμεσα στα τζάμια τοποθετείται η χτένα προσεκτικά για να μην σχηματιστούν φυσαλίδες. Η πηκτή αφήνεται να πολυμεριστεί για τουλάχιστον μισή ώρα.

Με τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοίβασης η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προστίθεται 1x ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Με μια σύρριγγα απομακρύνονται οι φυσαλίδες που σχηματίζονται στο κάτω μέρος της πηκτής, μεταξύ των τζαμιών. Τέλος αφαιρείται προσεκτικά η «χτένα» και τα βοθρία καθαρίζονται από τυχόν υπολείματα πολυακρυλαμίδης.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν την εφαρμογή τους στην πηκτή, αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος 2x Sample Buffer, ακολουθεί επώαση των δειγμάτων στους 100° C για 5 λεπτά και φυγοκέντρωσή τους στις 13.000 σ.α.λ. για 5 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε ένταση πεδίου 8 Volts/cm όσο βρίσκονται στην πηκτή επιστοίβασης και σε 15 Volts/cm στην πηκτή διαχωρισμού έως ότου η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης για 30 λεπτά στους 60° C με ελαφρά ανακίνηση. Στην συνέχεια ακολουθεί αποχρωματισμός της πηκτής με εμβάπτιση της σε διάλυμα αποχρωματισμού σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφρά ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθιστάται με νέο κάθε μία ώρα.

2.13 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών κατά Bradford.

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Comassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αυτή αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 450nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04mg/ml έως 0,20 mg/ml.

Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το πυκνό αντιδραστήριο Bradford αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1:5 και το διάλυμα που προκύπτει μπορεί να διατηρηθεί σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 24° C για 24ώρες. Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης σε 900μl του διαλύματος αυτού προστίθενται 100μl πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25° C για 30 λεπτά και ακολούθως λαμβάνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm, έχοντας ως αναφορά διάλυμα το οποίο περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη.

Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας σαν πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10μg) αλβουμίνης από ορό μόσχου (fraction V).

2.14 Έλεγχος ενζυμικής δραστηριότητας PPIασων.

Η ενζυμική δραστηριότητα των PPIασων μελετήθηκε έναντι συνθετικού τετραπεπτιδίου της μορφής ηλεκτρολο-Ala-Ala-Pro-Phe-p-νιτροανιλίδιο. Η πειραματική διαδικασία βασίζεται στην ιδιότητα των περισσότερων πρωτεασών και συγκεκριμένα στην περίπτωση μας της α-χυμοθρυψίνης να διασπά τον δεσμό του χρωμοφόρου pNA στον trans πλυθησμό των ολιγοπεπτιδίων όπου ο δεσμός Ala-Pro βρίσκεται στην trans διαμόρφωση. Το χρωμοφόρο όταν απελευθερωθεί απορροφά

στα 390 nm όπου και ποσοτικοποιείται φασματοφωτομετρικά. Η αυθόρμητη μετατροπή από την cis στην trans διαμόρφωση των πεπτιδύλ-προλύλ δεσμών πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς και η δραστηριότητα της ισομεράσης επιταχύνει τον ρυθμό με τον οποίο η cis μορφή ισομεριώνεται στην ευαίσθητη στην χυμοθρυψίνη trans μορφή.

Αναλυτικότερα η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Σε σωλήνα erpendorf αναμιγνύονται 960 μl ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM HEPES pH 8,0, 100mM NaCl με 30 μl α-χυμοθρυψίνης συγκέντρωσης 15 mg/ml σε 0,001M HCl.
- Σε κυβέτα που βρίσκεται στο φωτόμετρο προστίθεται διάλυμα πεπτιδίου συγκέντρωσης 5 mM. Το πεπτίδιο βρίσκεται διαλυμένο σε 470 mM LiCl σε TFE. Στην κυβέτα επίσης έχουμε προσθέσει την ΡΡΙΑση και αυτό λόγω πρώτερης εμπειρίας όπου παρατηρούνταν πρωτεολυτική αποδόμιση του ενζύμου όταν αναμιγνύονταν με το ρυθμιστικό διάλυμα που εμπεριείχε χυμοθρυψίνη.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα που εμπεριέχει την χυμοθρυψίνη τοποθετείται και αυτό με την σειρά του στην κυβέτα που βρίσκεται στο φωτόμετρο. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 ml.
- Κλείνουμε το φωτόμετρο και αμέσως ξεκινάμε να παίρνουμε τις τιμές απορρόφησης στα 390 nm μέχρι να τελειώσει η αντίδραση.
- Από τα σημεία της απορρόφησης τα πρώτα 10 δευτερόλεπτα, όπου είναι γραμμική, υπολογίζεται η κλίση της υθείας που αντιστοιχεί στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης.

2.15 Απομόνωση περιπλασμικών πρωτεϊνών από το *Sinorhizobium meliloti*.

- 30 ml θρεπτικού διαλύματος YMB εμβολιάζονται με μοναδική αποικία *Sinorhizobium meliloti* και επωάζονται για περίπου 48 ώρες στους 30° C, υπο συνεχή ανακίνηση.
- Η παραπάνω καλλιέργεια χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 250 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος YMB. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30° C, υπο συνεχή ανακίνηση έως ότου η καλλιέργεια εισέλθει στην εκθετική φάση.
- Όταν η καλλιέργεια εισέλθει στην εκθετική φάση φυγοκεντρείται στις 6.000 σ.α.λ για 15 λεπτά, στους 4° C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο.
- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος RB (50μl/ml καλλιέργειας).
- Επιάζουμε το διάλυμα στον πάγο για 20 λεπτά και προσθέτουμε EDTA σε τελική συγκέντρωση 1mM.
- Το διάλυμα συνεχίζει να παραμένει στον πάγο υπο ελαφρά ανακίνηση για άλλα 5-10 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε ίσο όγκο παγωμένο MgSO₄ συγκέντρωσης 5mM.

- Το διάλυμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπο συνεχή ανακίνηση για 10 λεπτά στους 4° C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6.000 σ.α.λ για 20 λεπτά στους 4° C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται προσεκτικά αφού εμπεριέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες του περιπλασμικού χώρου του βακτηρίου.

2.16 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (Smc02451) και πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου του *Sinorhizobium meliloti*.

- Δείγμα πρωτεΐνης Smc02451 με το επίτοπο των 6 ιστιδινών όγκου 1 ml αναμιγνύονται με 0,5 ml Ni-NTA 50% και φορτώνεται σε στήλη χρωματογραφίας συγγένειας και επωάζεται για 1 ώρα στους 4° C.
- Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη συλλέγεται.
- Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με τουλάχιστον τετραπλάσιο όγκο διαλύματος ξεπλύματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές και τα δείγματα συλλέγονται.
- Στην συνέχεια φορτώνουμε στην στήλη δείγμα περιπλασμικών πρωτεϊνών του *Sinorhizobium meliloti* και επωάζουμε για 1 ώρα στους 4° C.
- Το διάλυμα που διαπερνά την στήλη συλλέγεται και ακολουθεί έκπλυση της στήλης με κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές και τα δείγματα συλλέγονται.
- Ακολουθεί έκλυση της ανασυνδιασμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 0,5 ml διαλύματος έκλυσης, επαναλαμβάνουμε τέσσερις φορές και τα δείγματα συλλέγονται.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

Σύνθεση Θρεπτικών Μέσων.

A.LB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης E.coli

Για την Παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος LB: σε 1lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10 gr NaCl, 10 gr Bacto-Trypton (Casein), 5 gr εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φυαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4° C.

B: YMB: Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ριζοβίων Sinorhizobium meliloti.

Για την παρασκευή 1lt θρεπτικού διαλύματος YMB: σε 1 lt απιονισμένου νερού προστίθενται 10 gr μανιτόλη, 0,5 gr K_2HPO_4 , 0,2 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 gr NaCl, 0,5 gr εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract). Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία, προστίθεται στο διάλυμα 1,5% άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση. Το υγρό θρεπτικό μέσο φυλάσσεται σε φυαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα τρυβλία με το στερεό μέσο φυλάσσονται στους 4° C.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'

Σύνθεση Ρυθμιστικών Διαλυμάτων

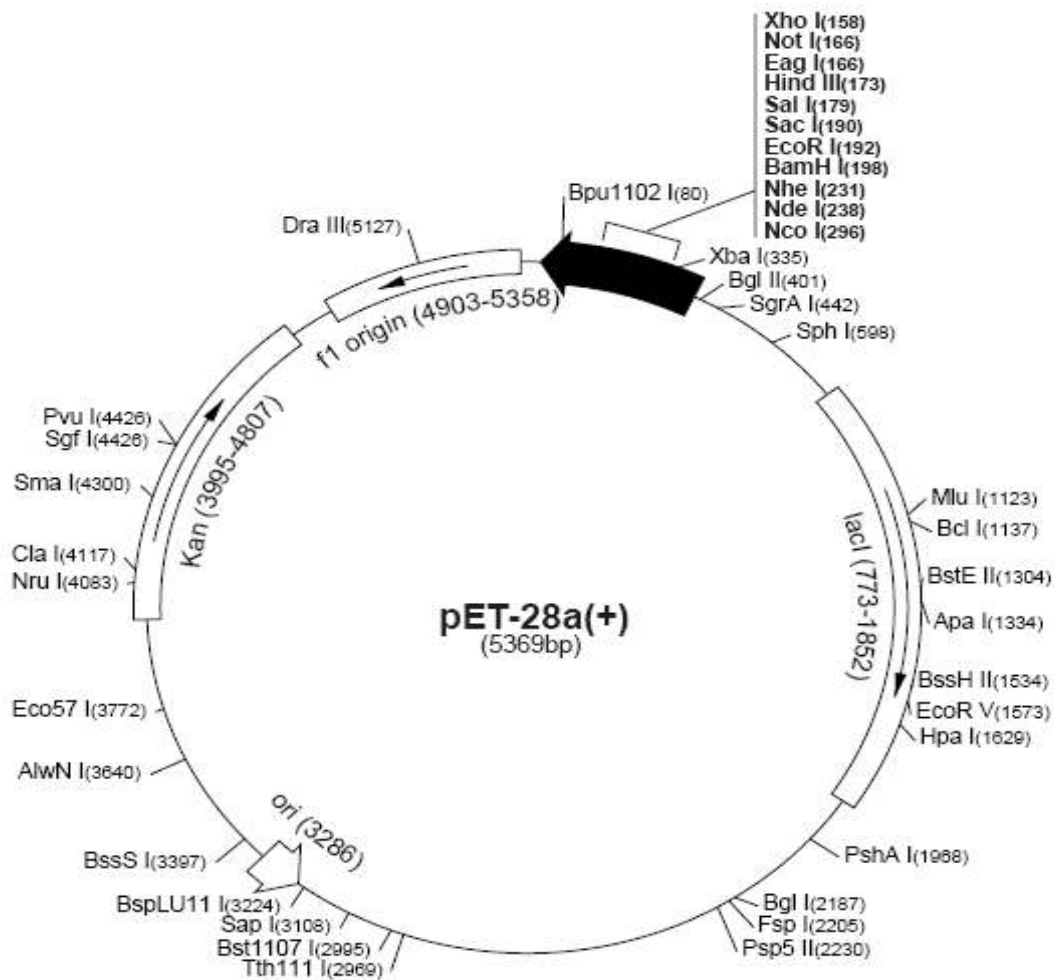
- **Ακρυλαμίδη (30%).** 60 gr ακρυλαμίδης διαλύονται σε 200 ml dH₂O. Το διάλυμα αναδεύεται παρουσία ιοαναταλλακτικής ρητίνης για 30 λεπτά, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4° C.
- **Αντιδραστήριο Bradford:** 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 διαλύεται σε 100 ml υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100 ml πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε θερμοκρασία 25° C.
- **Βρωμιούχο αιθίδιο:** Το βρωμιούχο αιθίδιο παρασκευάζεται ως πυκνό διάλυμα 0,5 mg/ml σε dH₂O και φυλάσσεται στους 4° C. Η τελική συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου στην πηκτή είναι 0,5 μg/μl.
- **BIS(1%)-ακρυλαμίδη:** 0,5 gr BIS-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 50 ml δις απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.
- **Διάλυμα αποχρωματισμού:** 30% μεθανόλη, 10% οξικού οξέος.
- **Διάλυμα α-χυμοθριψίνης:** 15mg/ml σε 0,001M HCl.
- **HEPES (1M Ph:8,0):** Για 100ml τελικού όγκου διαλύματος: 0,114 gr Na₂HPO₄, 0,027 gr KH₂PO₄, 0,018 gr NaCl και 0,075 gr KCl διαλύονται σε δις απεσταγμένο νερό.
- **Δωδεκακυλικό νάτριο 10% (SDS):** Σε 100 ml τελικό όγκο διαλύματος, διαλύονται 10gr SDS. Φύλαξη της θερμοκρασία δωματίου.
- **IPTG (100 mM):** 23,8 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) διαλύονται σε 1 ml ddH₂O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0,22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20° C.
- **KCl (1M):** Σε 100 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 7,45 gr KCl.
- **Λυσοζύμη:** 50 mg λυσοζύμης διαλύονται σε 1 ml dH₂O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20° C.
- **NaCl (5M):** Σε 100ml απιονισμένου νερού διαλύονται 29,22 gr NaCl.
- **NaCl (150mM):** Σε τελικό όγκο 1lt H₂O διαλύονται 8,77 gr χλωριούχου νατρίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσων:** 50 mM HEPES pH:8,0, 100mM NaCl.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x).** 144 gr /lt γλυκίνη, 30,25 gr/lt Tris και 10 gr/lt SDS.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης(10x):** 0,66 MTris-HCl pH:7,6, 50mM MgCl₂, 50mM DDT, 10mM ATP. Το πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης φυλάσσεται σε μικρές ποσότητες στους -20° C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης:** 4% SDS, 10% β-μερκαπτοαιθανόλη, 20% γλυκερόλη, 0,1 M Tris pH:6,8 και 0,0005% χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PCR(10x):** 100 mM Tris-HCl pH:8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% (w/v) gelatin.
- **RNase A:** 10 mg RNase A διαλύονται σε 1 ml 10 mM Tris-HCl pH:7,5/15 mM NaCl. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 100° C για 15 λεπτά, με σκοπό την αδρανοποίηση τυχόν δράσης DNase, αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και φυλάσσεται στους -20° C.
- **STET:** 8% σακχαρόζη, 5% Triton x 100, 50 mM Tris-HCl pH:8,0, 50 mM EDTA.
- **TAE (1x):** Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 50x TAE το οποίο αραιώνεται 50 φορές. 50xTAE: 242 gr Tris base, 57,1 ml οξικού οξέος και 0,5 ml EDTA pH:8,0 σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 1lt.
- **TE:** 10 mM Tris-HCl pH:8,0, 1mM EDTA.
- **TE':** 10 mM Tris-HCl pH:8,0 , 25 mM EDTA.
- **TES:** 10 mM Tris-HCl pH:8,0, 25mM EDTA, 150 mM NaCl.
- **Tris-HCl (1M):** Για 1 lt διαλύματος προσθέτουμε 121,1 gr Tris σε περίπου 800 ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζουμε το διάλυμα στο επιθυμητό pH με την προσθήκη πυκνού HCl, τέλος προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 1lt και το διάλυμα αποστειρώνεται. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Υπερθεικό αμμώνιο (10%) APS:** Σε 100 ml τελικό όγκο διαλύματος διαλύονται 10 gr APS. Φύλαξη στους -20° C.
- **Καναμυκίνη:** Μητρικό διάλυμα -25 mg/ml σε αποστειρωμένο νερό.

Τελική συγκέντρωση 25μg/ml σε θρεπτικού διαλύματος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ'

Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a.



Ο πλασμιδιακός φορέας pET28a διαθέτει μια σειρά έξι ιστιδινών (6xHis Tag) στο αμινοτελικό άκρο καθώς και ένα δεύτερο προεραϊτικό επίτοπο έξι ιστιδινών στο καρβοξυ-τελικό άκρο. Οι σημαντικές περιοχές που μπορεί κάποιος να βρει στην αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα, απεικονίζονται στον κυκλικό χάρτη. Η αλληλουχία του pET28a έχει αριθμηθεί κατά σύμβαση σύμφωνα με την αρίθμηση του πλασμιδιακού φορέα pBR322 έτσι ώστε η περιοχή έκφρασης που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του προαγωγέα T7 να βρίσκεται ανεστραμμένη πάνω στο χάρτη. Η περιοχή της αρχής της αντιγραφής f1 είναι έτσι προσανατολισμένη ώστε τα προκύπτοντα ιοειδή κατά την μόλυνση του κυτταρού με βακτηριοφάγο, να εμπεριέχουν μονόκλινα μόρια DNA που να

αντιπροσωπεύουν την κωδική αλυσίδα. Έτσι η αλληλούχιση μονόκλωνης αλυσίδας θα πρέπει να πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τον T7 προαγωγέα.

Αποτελέσματα

3.1 In silico ανάλυση

Στο βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*, με τα έως τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί μέλη της οικογένειας των παρβουλινών. Για τον σκοπό αυτό και με οδηγό αλληλουχίες γενετικών τόπων που κωδικοποιούν για γνωστές παρβουλίνες από το *E. coli* όπως η SurA, ερευνήθηκε η βάση δεδομένων του NCBI (National Center of Biotechnology) μέσω του λογισμικού αναζήτησης τοπικών ομολογιών BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) για πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν για πιθανές παρβουλίνες στο *Sinorhizobium meliloti*. Από τις πιθανές παρβουλίνες που εντοπίστηκαν ανακτήθηκε η αλληλουχία του γονιδίου Smc02451. Το γονίδιο αυτό εντέθηκε σε ειδικό φορέα έκφρασης pET28a και βρίσκεται υποκλωνοποιημένο στις θέσεις NCOI και NOTI.

Η αμινοξική αλληλουχία του πεπτιδίου που κωδικοποιεί το υπό έρευνα γονίδιο στην παρούσα εργασία (Smc02451 του *S. meliloti*) υπεβλήθη σε ανάλυση με το πρόγραμμα Computer1/MW του διαδικτυακού τόπου EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/>) για την εύρεση του θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου (pI) καθώς και του μοριακού του βάρους. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης προέκυψε ότι το γονίδιο Smc02451 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 284 αμινοξέων, μοριακού βάρους 31459.88 (~31.5kDa) και θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου 5.40.

Έπειτα από υποβολή της αλληλουχίας σε διαδικασία ανάλυσης για τον εντοπισμό γνωστών λειτουργικών μοτίβων που πιθανών να υπάρχουν με την χρήση του προγράμματος (Scan Prosite), εντοπίστηκε η ύπαρξη μιας δομικής περιοχής PPIάσης τύπου PPIC-PPI η οποία εκτείνεται από το αμινοξύ 135 έως 225 με ποσοστό ομολογίας 28,356.

QEENKARHILVKTED-----EAKDVIKELD-AGKNFADLAKAKSTDPNKEEGDLGY
FTKGRMVPEFETAFALEKGAAYTKtPVKTQFGFHVILIED

Λειτουργικό μοτίβο PPIC-PPI της αμινοξικής αλληλουχίας του Smc02451.

Η ύπαρξη ενός τέτοιου λειτουργικού μοτίβου στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης (Smc02451) υποδηλώνει ότι πιθανόν πρόκειται για μία πεπτιδύλ-προλύλ ισομεράση.

Η αλληλουχία αναλύθηκε επίσης για την ύπαρξη πεπτιδίου οδηγού ώστε να διερευνηθεί η υποκυτταρική τοποθέτηση του πρωτεϊνικού μορίου με τα πρόγραμμα TargetP, SignalP και PsortB. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 3.1. Και στις δύο περιπτώσεις αποκλείεται η πιθανότητα η πρωτεΐνη να είναι κυτοπλασματική. Κατά τα αποτελέσματα του προγράμματος TargetP η πρωτεΐνη με μεγάλη πιθανότητα (0.885) εντοπίζεται στο απεκκριτικό σύστημα του βακτηρίου. Στα αποτελέσματα της ανάλυσης με το πρόγραμμα pSortB, το οποίο και αποτελεί μια βελτιωμένη έκδοση του προγράμματος pSort εξειδικευμένη για βακτήρια, φαίνεται με ότι η προς έρευνα πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη με πιθανότητα (9,93). Κατά την ανάλυση με το πρόγραμμα SignalP το οποίο προβλέπει την ύπαρξη πεπτιδίου οδηγού, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη Smc02451 διαθέτει αλληλουχία πεπτιδίου οδηγού η οποία εκτείνεται μέχρι το 23^ο κατάλοιπο (MSRYKTLAAAALVAMIAAGVARA).

Πρόγραμμα	Πρωτεΐνη	Μέγεθος	Μιτοχόνδριο	Απεκκριτικό σύστημα	άλλο	Τελικός εντοπισμός
TargetP	Smc02451	284	0.072	0.885	0.028	Απεκκ.συστημα

Πρόγραμμα Πίνακας 3.1	Πρωτεΐνη	Μέγεθος	Κυττόπλασμα	Κυττοπλα- σματική μεμβράνη	περίπλασμα	Εξωτερική Μεμβράνη
PsortB	Smc02451	284	0	0.01	0.03	9.93

3.2 Ευθυγράμμιση αλληλουχιών

Η αμινοξική αλληλουχία της πιθανής παρβουλίνης του *Sinorhizobium meliloti* (Smc02451) ευθυγραμμίστηκε με τις αμινοξικές αλληλουχίες άλλων γνωστών και καλά χαρακτηρισμένων βακτηριακών παρβουλινών. Η ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προγράμματος MegAlign™ της εταιρίας LaserGene. Η διαδικασία ευθυγράμμισης των αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον αλγόριθμο που αναπτύχθηκε από τους Jotun&Hein και αυτό γιατί οι αλληλουχίες που υπεβλήθησαν στην διαδικασία είναι γνωστό ότι εμφανίζουν στενές σχέσεις συγγένειας. Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας ευθυγράμμισης (Εικόνα 3.1).

Η παρβουλίνη Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti* εμφανίζει μεγαλύτερη ομολογία (42,2%) με την γνωστή και καλά χαρακτηρισμένη παρβουλίνη Par10 της *E.coli*. Επίσης παρουσιάζει μια ομολογία της τάξης του 19,1 % και 22,6% με την NifM του *Azotobacter vinelandii* και *Klebsiella Pneumoniae* αντίστοιχα, 31,5% με την SurA και 28,2% με την Ssp1 από τον *Neurospora Crassa*. Το ποσοτό ομολογίας των ακολουθιών όλων των βακτηριακών παρβουλινών που υπεβλήθησαν στην διαδικασία ευθυγράμμισης αυξάνεται σημαντικά στην δομική περιοχή PPIάσης, ενώ τα απαραίτητα για την κατάλυση αμινοξέα φαίνεται να είναι συντηρηημένα (Εικόνα 3.2). Στην δομική περιοχή PPIάσης η Smc02451 εμφανίζει μια ομολογία της τάξης του 44,2% με την Par10 της *E.coli*, 37,2% με την surA της *E.coli*, 34,6% με την SSp1 του *Neurospora Crassa*, 30% με τη NifM του *Azotobacter vinelandii* και 29,9% με την NifM του *Klebsiella Pneumoniae*.

Στο φυλλογεννητικό δένδρο που προέκυψε από τα δεδομένα ευθυγράμμισης των αλληλουχιών των παρβουλινών φαίνεται ότι η υπό μελέτη πρωτεΐνη Smc02451 σχηματίζει έναν ξεχωριστό εξελικτικό κλάδο με την παρβουλίνη SurA της *E.coli*, ένα γνωστό και καλά χαρακτηρισμένο ένζυμο τύπου παρβουλίνης το οποίο εμπλέκεται στην διαδικασία αναδίπλωσης και ωρίμανσης εκκρινόμενων πρωτεϊνών όπως LamB, η OmpA και η OmpF (Lazzar& Kolter, 1996). Παράλληλα δεν φαίνεται να έχει κοντινή συγγένεια με τις NifM των *Klebsiella pneumoniae* και *Azotobacter vinelandii*, οι οποίες ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες βακτηριακές παρβουλίνες που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία ευθυγράμμισης, σχηματίζοντας έναν ξεχωριστό εξελικτικό κλάδο.

```

      10          20          30
1  M-----SRYWTLA-----Sec02461.ppc
1  M-----AK-----par10.ppc
1  M-----MHWKYL-----SurA E.coli.pro
1  M-----M-----SSpl Neurospora crassa.ppc
1  M-----AS-----ERLADQD-SRYYLKVA NifH Azotobacter vinelandii.pro
1  MHWNQRFAR-----QRLARSRWNR NifH Klebsiella pneumoniae.pro

-----AA-----AALIAA-KV-AAAAE--D-VQ Majority
      40          50          60
9  -----AALVAMIAA-SV-ARAESTDFFVI Sec02461.ppc
5  -----AA-----par10.ppc
9  -----LQ-----IEMIAM-TSFAAQVVDKVA SurA E.coli.pro
5  -----IK-----IGLVFEDWEV-RMSQ-----SSpl Neurospora crassa.ppc
20 HEQFSQAP-----SELSEE-QL-QQADRTISRQ NifH Azotobacter vinelandii.pro
20 -----DP-----AALDFAD-DT-FAVDAQWQRQ NifH Klebsiella pneumoniae.pro

A-NVED-VV-E-SD-D-----IPEKLE-- Majority
      70          80          90
31 AKVSDQEI-HQSELD-----LAITSID-----Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
30 AVVNHGVV-LIADVD-----SLMQSVKLEW-----SurA E.coli.pro
20 -----S-----SSpl Neurospora crassa.ppc
46 RHIREQAVL-MSSEDAISVV-----IPPSQLL-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
40 CHNAGTIVAGVVEGD-----IQAALLS-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

-----HSAAAR-----LPS-LDK-EAK-- Majority
      100         110         120
52 -----PQLQD-----MAD-EQK-AAAAAL Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
58 -----LQQAQQLQD-----DAILHQIM SurA E.coli.pro
28 -----MSATK-----TSKWEVP-SET-----SSpl Neurospora crassa.ppc
70 EAWAHIASRYESEA-----LQQAADA-QAL-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
62 -----MIAAS-----LAIMLDE-GDF-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

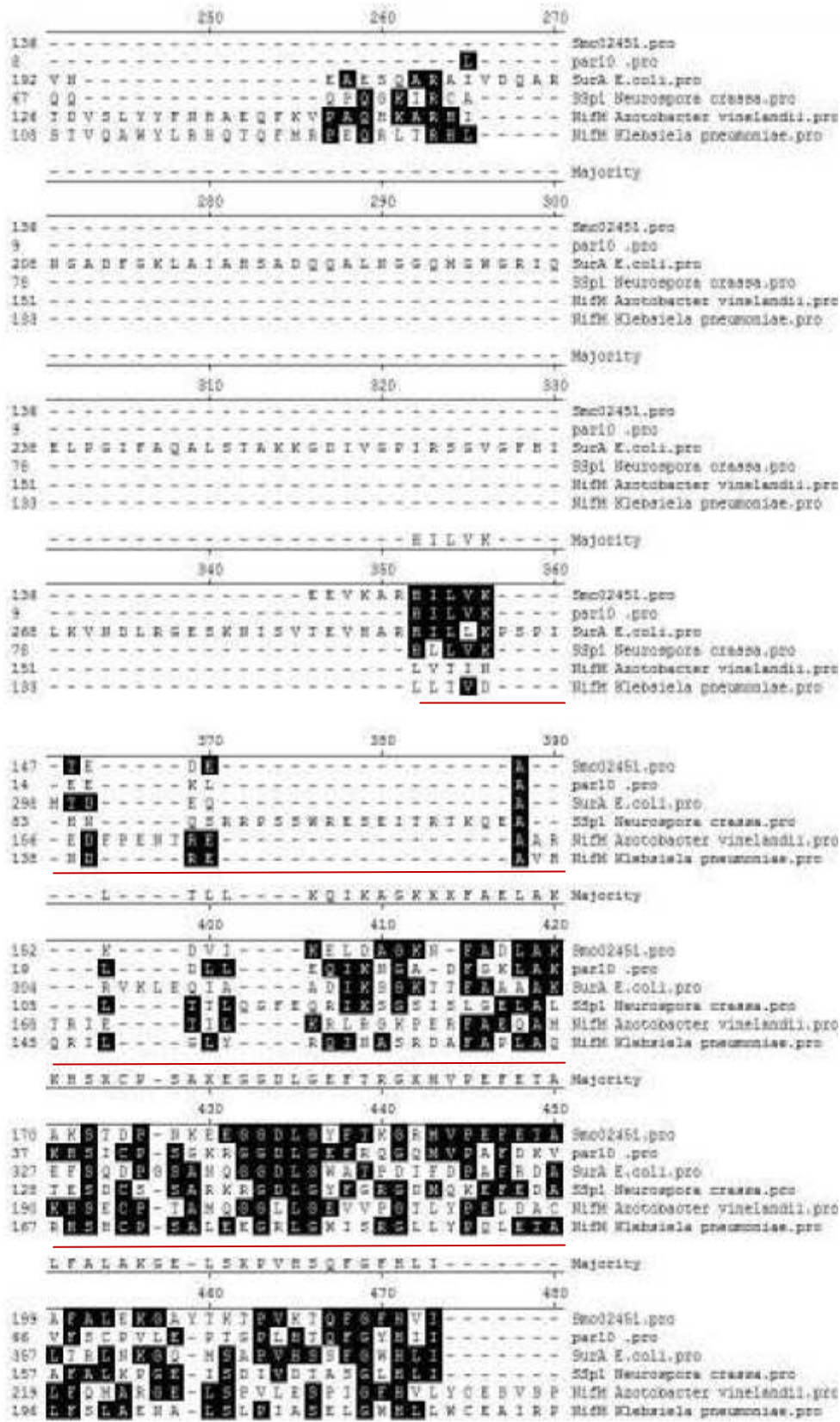
      130         140         150
48 SAVIDVVKLLLRDAEKESLQ-NDAAFKQFVA Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
72 ERLINDQIILQMSQRMSVRYSDQLDQAIA SurA E.coli.pro
43 -----S-----SSpl Neurospora crassa.ppc
96 -----DAASMPAMLA-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
77 -----APPERAAIVR-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

K-AE-E-----L-YAK-- Majority
      160         170         180
97 FLTERE-----LHNDFPKKH Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
102 NIAKQHHTLDQMRRLAYDSDNYHTYRNQ SurA E.coli.pro
53 N-----VNS-----SSpl Neurospora crassa.ppc
105 REIARVE-----AVLDC-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
87 NNAARLE-----CAVAD-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

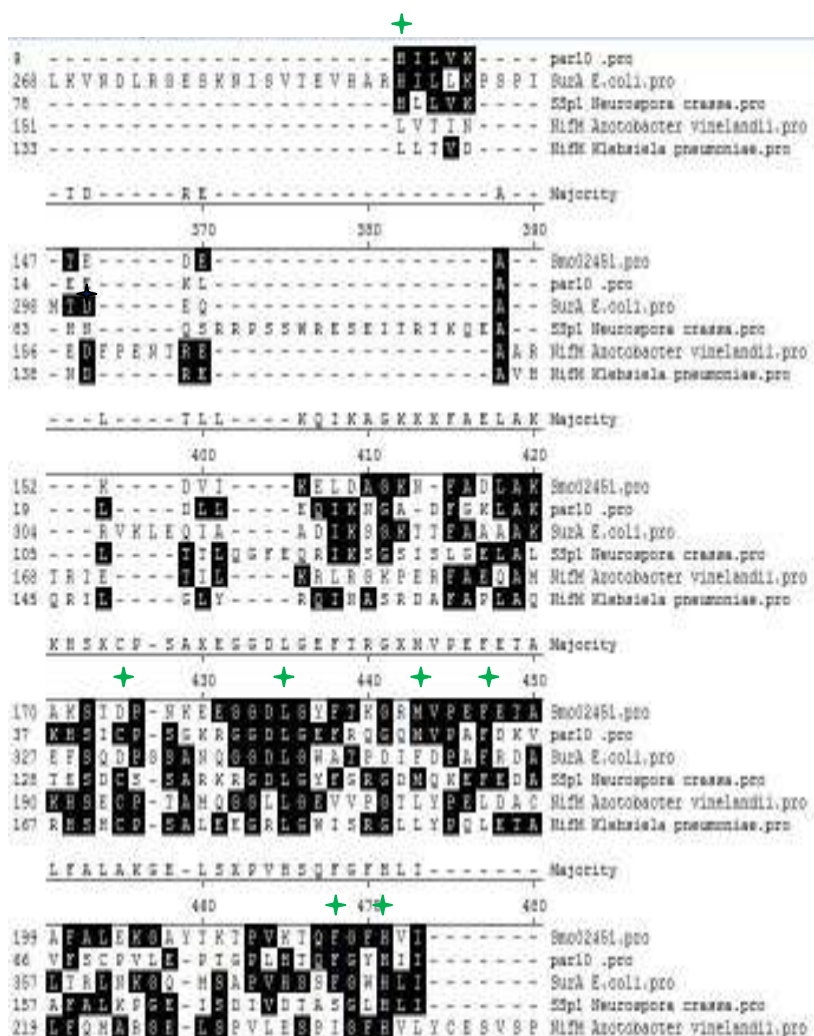
-----VAEQK Majority
      190         200         210
112 -----VVDAVTSEEVKARYD-----KEVAAIIP Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
132 IAKENIISEVVRNHEVRRITILPQEVESLA SurA E.coli.pro
57 -----S-----SSpl Neurospora crassa.ppc
136 -----VCRSL-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
98 -----IAKDA-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

EQ-----DQ Majority
      220         230         240
194 PQ-----Sec02461.ppc
5  -----S-----par10.ppc
162 QQVGNQNDASTELNLSWILIPLEMPISDQ SurA E.coli.pro
62 QS-----SSpl Neurospora crassa.ppc
124 PE-----ISD-----NifH Azotobacter vinelandii.pro
103 PQ-----PDL-----NifH Klebsiella pneumoniae.pro

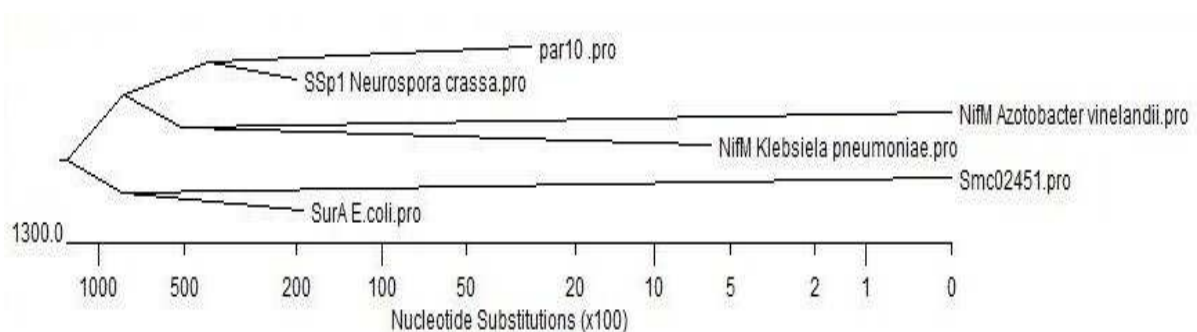
```



Εικόνα 3.1 Πολλαπλή ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας των παρβουλινών Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti* , NifM του *Azotobacter vinelandii* και *Klebsiella pneumoniae*, Par10 και SurA της *E.coli*, και SSP1 της *Neurospora Crassa*. Με κόκκινη γραμμή είναι υπογραμμισμένη η δομική περιοχή ΡΡΙΙάς.



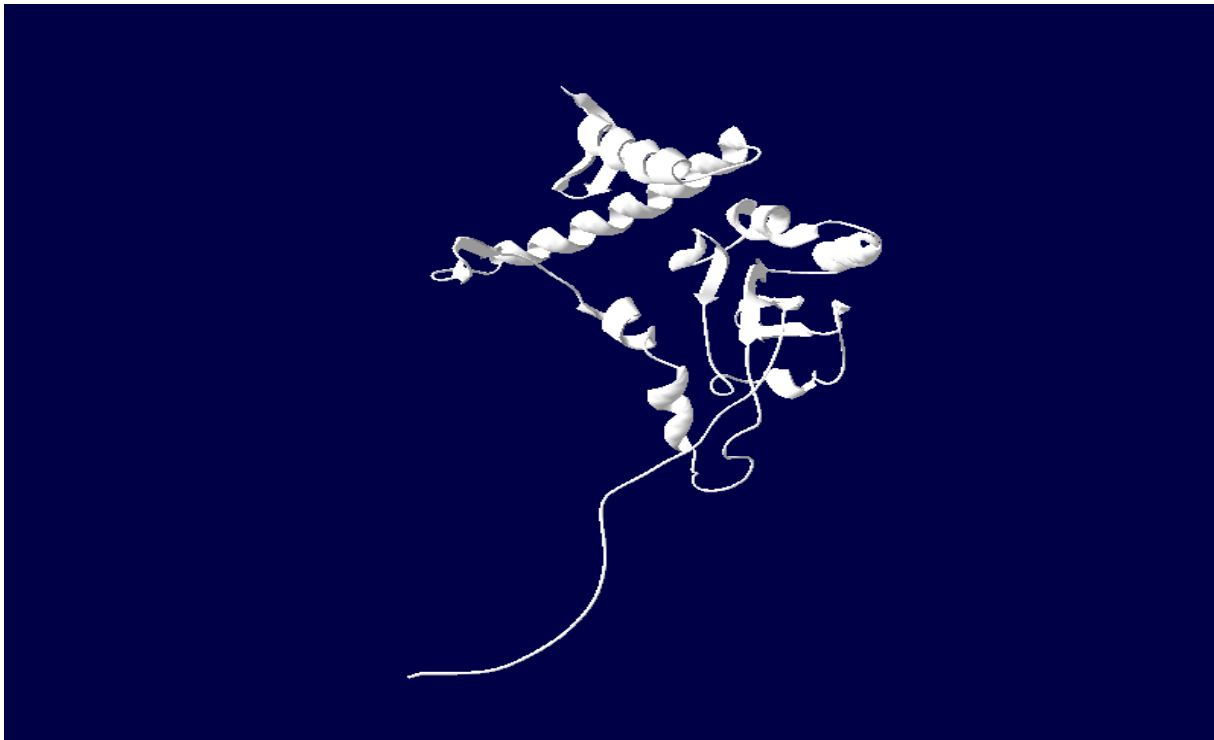
Εικόνα 3.2. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών της δομικής περιοχής ΡΠ1άσης των παρβουλινών Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti*, Par10 και SurA της *E.coli*, SSp1 του *Neurospora Crassa*, NifM του *Azotobacter vinelandii* και NifM του *Klebsiella pneumoniae*. Τα απαραίτητα για την κατάλυση αμινοξέα είναι σημασμένα με αστερίσκο.



Εικόνα 3.3 Φυλογεννητικό δένδrogramma των παρβουλινών par10 και SurA της *E.coli*, NifM των *Azotobacter vinelandii* και *Klebsiella pneumoniae*, SSp1 του *Neurospora Crassa* και της Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti*.

3.3 In silico πρόβλεψη της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti*.

Για την πρόβλεψη της πιθανής τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Smc02451 χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>), η οποία αποτελεί ένα αυτοματοποιημένο σύστημα σύγκρισης πρωτεϊνών άγνωστης δομής με πρωτεΐνες γνωστής δομής. Η πιθανή τριτοταγής δομή της παρβουλίνης Smc02451 παρουσιάζεται στην εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4 In silico αναπαράσταση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης Smc02451. Παρατηρούμε ότι εμφανίζεται η κλασική δομή παρβουλίνης με β-κλώνους που σχηματίζουν μια κυρτή, αντιπαράλληλη, β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία περιβάλλεται από α-έλικες.

Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 3.1, η πρωτεΐνη Smc02451 φαίνεται να διαθέτει τα βασικά χαρακτηριστικά της τριτοταγούς δομής μιας τυπικής ΡΡ1άσης. Αποτελείται δηλαδή από β-κλώνους που σχηματίζουν μια κυρτή αντιπαράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια η οποία περιβάλλεται από α-έλικες. Μάλιστα από τα αποτελέσματα που δόθηκαν από την εφαρμογή SwissModel, η Smc02451 παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με την τριτοταγή δομή της δομικής περιοχής ΡΡ1άσης της παρβουλίνης Ess1 του μύκητα *Candida albicans*.

3.4 Ενίσχυση και υποκλωνοποίηση της ακολουθίας του γονιδίου Smc02451 που κωδικοποιεί για πιθανή παρβουλίνη στο βακτήριο *Sinorhizobium meliloti* σε κατάλληλο φορέα έκφρασης.

Για την κλωνοποίηση της ακολουθίας του γονιδίου SMC02451 που κωδικοποιεί για πιθανή παρβουλίνη στο *Sinorhizobium meliloti*, ενισχύθηκε η κωδική περιοχή του αντίστοιχου γονιδίου που εντοπίζεται στο γενωματικό DNA του ριζοβίου με την χρήση της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Αρχικά με με βάση την ομολογία της γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του υπο έρευνα γονιδίου σχεδιάστηκε ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών. Ο εκκινητής με κατεύθυνση 5'-3' δεν έφερε κωδικώνιο έναρξης (ATG) ώστε η διαδικασία της μετάφρασης να ξεκινήσει από το κωδικώνιο έναρξης του φορέα και η πολυπεπτιδική αλυσίδα που θα προκύψει να φέρει στο αμινοτελικό της άκρο έξι ιστιδίνες (6-His Tag). Ο εκκινητής με κατεύθυνση 3'-5' έφερε το κωδικώνιο λήξης για τον επιτυχή τερματισμό της διαδικασίας της μετάφρασης. Επίσης στο 5' και στο 3' άκρο των εκκινητών νοηματικής και αντινοηματικής αλυσίδας εισήχθησαν αλληλουχίες αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού για την προσανατολισμένη κλωνοποίηση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) στον φορέα έκφρασης.

Ο φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pET28a. Ένθεση της κωδικής περιοχής της πιθανής παρβουλίνης στον φορέα αυτόν έχει ως αποτέλεσμα οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που εκφράζονται να φέρουν στο αμινο-τελικό τους άκρο μια ουρά συγγένειας έξι ιστιδινών που είναι απαραίτητη για τον ευκολότερο και γρηγορότερο καθαρισμό των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη αγαρόζης που φέρει ακινιτυποϊμένα μεταλλικά ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose), QIAGEN™.

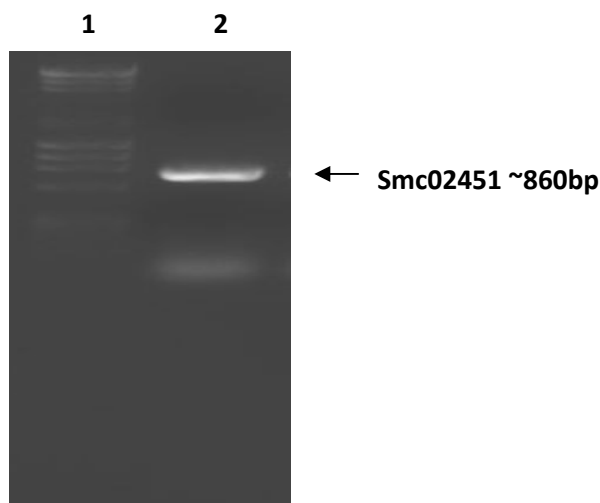
Ο φορέας έκφρασης που χρησιμοποιήθηκε με το αντίστοιχο παραγόμενο ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο παρουσιάζεται αναλυτικά στον πίνακα 3.2.

Φορέας έκφρασης	Παραγόμενο ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο
PET28a	HHHHHHMSRYKTLAAALVAMIAAGVARAEGTDPVIAKVGDDQEIQRQSELDLAITSLDPQ LQRMPDEQKRAAALSVIDVKKLLKDAEKEGLQNDFAFKQRVAFILTERELHNAFFKHHV DAVTSEENVKARYDKEVAAIPPQEEVKARHILVKTEDEAKDVIKELDAGKNFADLAKAKSTD PNKEEGDLGYFTKGRMVPEFETAFALEKGYTKTPVKTKQFGFHVILIEDKRPQAPPTLE QVEPQVRQLVMRDKYLELLNSAKESTAVEISDPALKKAYDEAGKPQETK

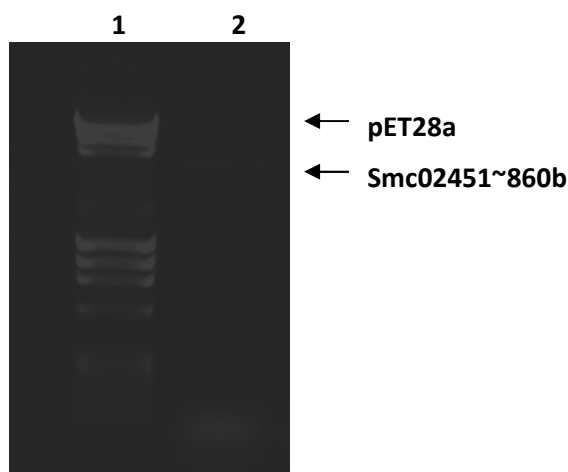
Πίνακας 3.2 Το παραγόμενο ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο ύστερα από την υποκλωνοποίηση του στον φορέα έκφρασης pET28a. Διακρίνεται το επίτοπο έξι ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο του παραγόμενου πολυπεπτιδίου καθώς και το πεπτίδιο οδηγός που κατευθύνει την πρωτεΐνη στον περιπλασματικό χώρο του βακτηρίου.

Για την ενίσχυση της κωδικής περιοχής του γονιδίου Smc02451 πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR τα προϊόντα της οποίας αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v (Εικόνα 3.2.1). Αφού επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη ενός μόνο προϊόντος στο αναμενόμενο για την αλληλουχία μας μέγεθος, τα προϊόντα της αντίδρασης καθαρίστηκαν σύμφωνα με το QIAquick PCR Purification kit της εταιρίας QIAGEN™ (Παράγραφος 2.5).

Η αλληλουχία της πιθανής παρβουλίνης του *Sinorhizobium meliloti* αλλά και ο φορέας έκφρασης pET28a υπεβλήθησαν σε πέψη με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού για την δημιουργία συμβατών κολλωδών άκρων. Τα τμήματα του DNA διαχωρίστηκαν σε πηκτή αγαρόζης και τέλος απομονώθηκαν από την πηκτή (Εικόνα 3.2.2). Ακολούθησε λιγοποίηση των τμημάτων με τον φορέα μέσω της δράσης του ενζύμου T4 λιγάση. Με το προϊόν της αντίδρασης αυτής μετασηματίστηκαν δεκτικά βακτήρια *E.coli* στελέχους XL1 Blue. Η επιλογή των μετασηματισμένων βακτηρίων έγινε με την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα LB το οποίο εμπεριείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν ένα μεγάλο ποσοστό τους ανακαλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB με καναμυκίνη, ακολούθησε απομόνωση πλασμιδίων και έλεγχος της ύπαρξης της ένθεσης με πέψη των πλασμιδίων με τις κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού.



Εικόνα 3.2.1. Προϊόν αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) της ενίσχυμένης κωδικής περιοχής του γονιδίου Smc0251. Η ζώνη που εμφανίζεται στην στήλη 2, αντιπροσωπεύει την ενισχυμένη περιοχή και εντοπίζεται στο αναμενόμενο μέγεθος (~860 bp). Στην στήλη 1 εμφανίζεται ο μάρτυρας μοριακών βαρών (marker).

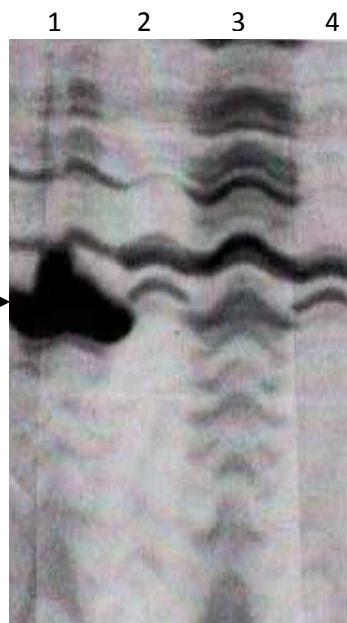


Εικόνα 3.2.2. Πέψη του πλασμιδίου έκφρασης που φέρει την κωδική περιοχή της πιθανής παρβουλίνης Smc02451. Στήλη 1: Μάρτυρας μοριακών βαρών(marker), Στήλη 2: Ανάλυση των προϊόντων πέψης. Παρατηρούνται δύο ζώνες. Η ανώτερη ζώνη αντιπροσωπεύει τον φορέα έκφρασης pET28a και η κατώτερη (~860bp) αντιπροσωπεύει το γονίδιο Smc02451.

Κάποιες από τις καλλιέργειες που έφεραν την ένθεση ανανεώθηκαν με σκοπό την απομόνωση του πλασμιδίου που φέρει την ένθεση με την βοήθεια του QIAprep Spin Miniprep Kit της QIAGEN™. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση της ένθεσης για να διαπιστωθεί εάν βρίσκεται στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο καθώς και αν πραγματοποιήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις κατά την αντίδραση της πολυμεράσης. Από τα ποτελέσματα της διαδικασίας αλληλούχισης δεν προέκυψε κάποια σημειακή μεταλλαγή και το υποκλωνοποιημένο γονίδιο φαινόταν να έχει ενταχθεί στο σωστό αναγνωστικό πλαίσιο.

3.5 Εταιρόλογη έκφραση σε κύτταρα *E.coli* BL21 και απομόνωση των ανασυνδυασμένων πολυπετιδίων με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας.

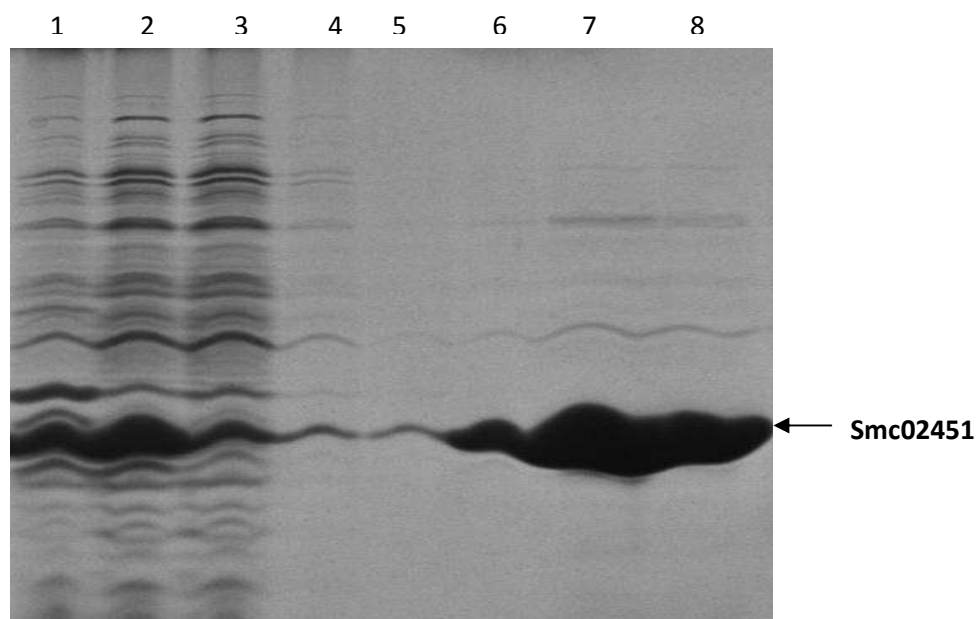
Το πλασμίδιο έκφρασης pET28a-Smc02451 που έφερε την αλληλουχία της πιθανής παρβουλίνης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών βακτηρίων *E.coli* στελέχους BL21. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε με την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα LB που εμπεριείχε το αντιβιοτικό καναμικίνη. Μονή αποκία κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για περίπου 14 ώρες στους 37° C. Μέρος της καλλιέργειας αυτής και σε αναλογία 1:20 χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό μεγαλύτερης ποσότητας θρεπτικού υποστρώματος και συνεχίστηκε η επώαση της έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας O.D.₆₀₀ να είναι 0,6. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η επαγωγή της έκφρασης του ανασυνδυασμένου πολυπετιδίου με την προσθήκη β-D-ισοπροπυλικής-θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG) τελικής συγκέντρωσης 0,5 mM. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών συνεχίστηκε για 5 ώρες όπου και έγινε η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 3.3. Ανάλυση σε αποδιατακτική πήκτη πολυακρυλαμίδης (SDS- Page) 1,5% w/v των πρωτεϊνικών κλασμάτων που συλλέχθηκαν ύστερα από θραύση με υπερήχους μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* BL21. Στήλη 1: Κλάσμα διαλυτών πρωτεϊνών. Στήλη 2; Κλάσμα μη διαλυτών πρωτεϊνών. Στήλη 3: Κλάσμα μη διαλυτών πρωτεϊνών πριν την επαγωγή της έκφρασης. Στήλη 4: Κλάσμα διαλυτών πρωτεϊνών πριν την επαγωγή της έκφρασης.

Από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε απομόνωση ολικών, διαλυτών και μη διαλυτών πρωτεϊνών με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης αλλά και της διαλυτότητας των πολυπετιδίων. Τα κλάσματα των πρωτεϊνών που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-Page) (Εικόνα 3.3). Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται καθαρά ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451 βρέθηκε στο διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών.

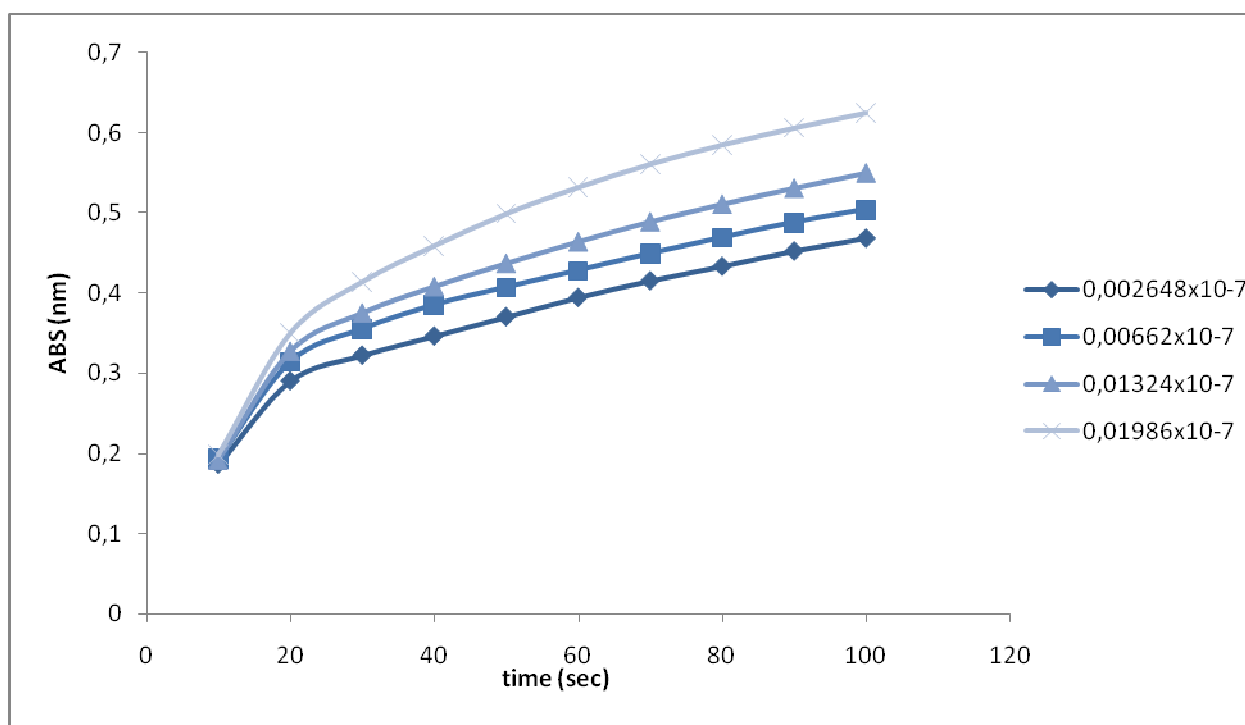
Αφ' ότου ελέγχθηκε η παρουσία των ανασυνδυασμένου πολυπετιδίου στο διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών των μετασηματισμένων βακτηριακών κυττάρων ακολούθησε απομόνωση του πολυπετιδίου με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγένειας σε στήλη αγαρόζης που έφερε ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου (Ni-NTA Agarose). Περιληπτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν όπως προηγουμένως μέχρι και το στάδιο της επαγωγής της έκφρασης. Ακολούθησε συλλογή των βακτηριακών κυττάρων, επαναδιάλυσή τους με διάλυμα λύσης, προσθήκη λυσοζύμης, λύση των κυττάρων με υπερήχους, φυγοκέντρηση για καθίζηση των κυτταρικών θραυσμάτων και φύλαξη του υπερκείμενου που περιέχει το διαλυτό μέρος των πρωτεϊνών. Το υπερκείμενο αναμιγνύεται με την στήλη αγαρόζης, ακολουθεί ελαφρά ανάδευση για αποτελεσματικότερη πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα σφαιρίδια αγαρόζης, στην συνέχεια το δείγμα τοποθετείται στην ειδική στήλη χρωματογραφίας όπου και ξεπλένεται για να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεΐνες που προσδέθηκαν στην στήλη. Τέλος η έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης σε ιμιδαζόλιο.



Εικόνα 3.4. Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE) 15%(w/v) πρωτεϊνών από μετασηματισμένα κύτταρα *E.coli* BL21 με το πλασμίδιο έκφρασης pET28a-Smc02451 μετά την επαγωγή της έκφρασης καθώς και οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες μετά την χρωματογραφία συγγένειας. Στήλη 1: Μη διαλυτές πρωτεΐνες. Στήλη 2: Διαλυτές πρωτεΐνες. Στήλη 3: Πρωτεΐνες από το διάλυμα που διαπερνά την στήλη. Στήλες 4 και 5: Πρωτεΐνες από το διάλυμα έκπλυσης της στήλης. Στήλες 6,7 και 8: Κλάσματα έκλυσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Η χρώση της στήλης έγινε με την χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R250.

3.6 Έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσών.

Ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας της ανασυνδυασμένης ΡΡΙΑσης Smc02451, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Fischer et al. 1984 και βελτιώθηκε από τους Kofron et al. 1991. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της χυμοθρυψίνης να διασπά τον κάρβοξυ-τελικό δεσμό του χρωμοφόρου υποστρώματος ηλεκτρυλο-Ala-Χαα-**Pro**-Phe-p-νιτροανιλίδιο όταν ο δεσμός Χαα-Pro βρίσκεται στην trans διαμόρφωση, όπου Χαα ένα από τα αμινοξέα αλανίνη, λευκίνη και αργινίνη. Το πεπτιδίο στο ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης βρίσκεται στην cis αλλά και στην trans διαμόρφωση. Η α-χυμοθρυψίνη διασπά πολύ γρήγορα την trans μορφή του πεπτιδίου και στην συνέχεια η cis διαμόρφωση του πεπτιδίου μετατρέπεται αργά στην trans διαμόρφωση όπου και διασπάται και πάλι από την α-χυμοθρυψίνη. Η διάσπαση αυτή του πεπτιδίου είναι δυνατόν να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά με την μέτρηση της απορρόφησης του p-νιτροανιλιδίου στα 390 nm.



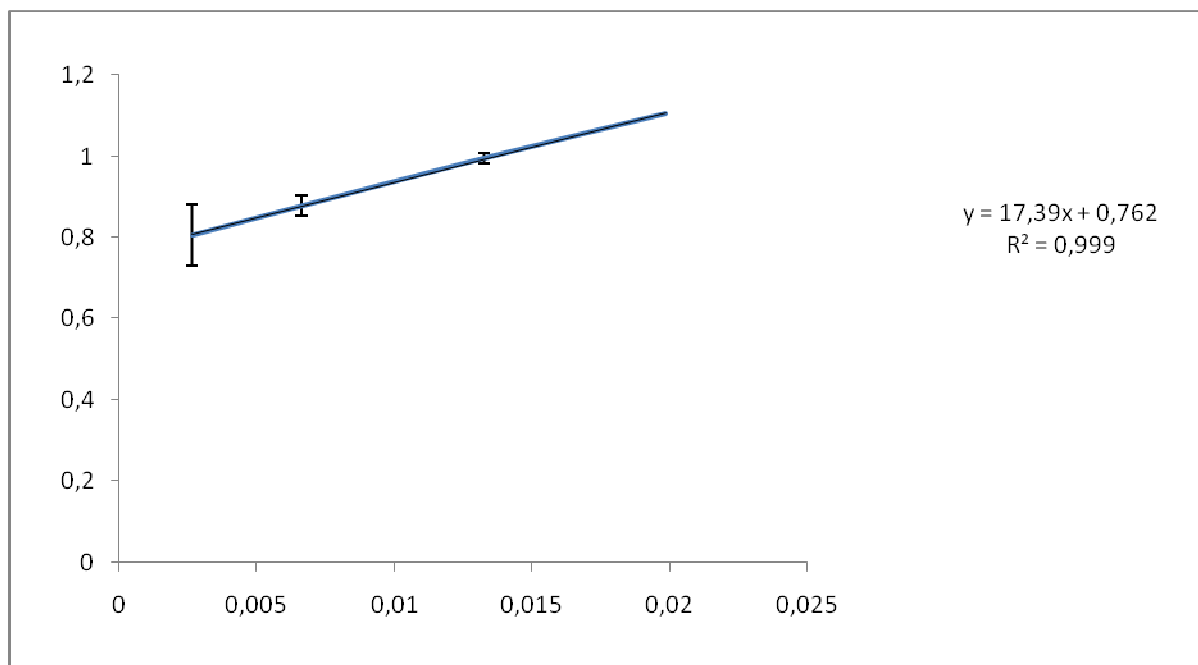
Γράφημα 3.1. Γραφική απεικόνιση της ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡΙΑσης συναρτήσει του χρόνου στις διάφορες συγκεντρώσεις του ενζύμου.

Παρουσία cis-trans ισομεράσης, η μετατροπή του cis ισομερούς σε trans είναι αρκετά πιο γρήγορη γεγονός που μας επιτρέπει να μελετήσουμε ενζυμικά την ανασυνδυασμένη ΡΡΙΑση, Smc02451.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς εξειδίκευσης (K_{cat}/K_m) της βακτηριακής παρβουλίνης έναντι της ισομερίωσης των τετραπεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις υποστρώματος τέτοιες ώστε $[S] \ll K_m$ όπου τα σημεία απορρόφησης να ταιριάζουν σε αντίδραση πρώτης τάξης, η ταχύτητα της αντίδρασης να εμπίπτει στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης και να είναι ευθέως ανάλογη προς την συγκέντρωση του υποστρώματος. Οι τιμές των σταθερών εξειδίκευσης υπολογίστηκαν σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση (Fischer et al.1994).

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{K_{obs} - K_u}{[PPIase]} \quad (1)$$

Όπου K_u η πρώτη τάξης κινητική σταθερά για την αυθόρμητη cis σε trans ισομερίωση, K_{obs} η ψευδο-πρώτης τάξης σταθερά για την cis-trans ισομερίωση παρουσία PPIάσης και $[PPIase]$ η συγκέντρωση του ενζύμου.



Γράφημα 3.2. Γραφική απεικόνιση της γραμμής τάσης των σημείων απορρόφησης στα 390nm στις διάφορες συγκεντρώσεις του ενζύμου. Δεξιά φαίνεται η εξίσωση της βέλτιστης ευθείας.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Fischer (1) μπορούμε να υπολογίσουμε την σταθερά εξειδίκευσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 :

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{K_{obs} - K_u}{[PPIase]} = \frac{\text{κλίση ευθείας}}{\text{min} * \text{nM}} = \frac{17,39}{60s * 10^{-9}M}$$

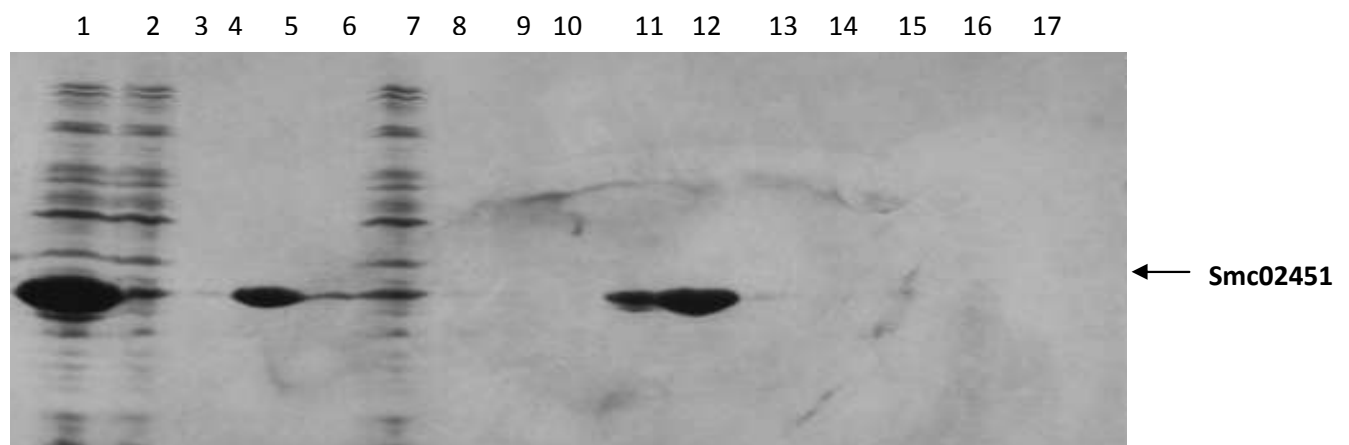
Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η σταθερά εξειδίκευσης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 έναντι του τετραπετιδίου Suc-Ala-Ala-**Pro**-Phe-p-νιτροανιλίδιο, όπως αυτή προέκυψε από τον υπολογισμό της από την σχέση (1). Η τιμή ενζυμικής δραστηριότητας που παρουσίασαν άλλες γνωστές και καλά χαρακτηρισμένες παρβουλίνες όπως η παρβουλίνη Par10 της *E.coli* καθώς και η παρβουλίνη NifM του *Azotobacter vinelandii* ανέρχονταν σε $1,69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rafheld et al. 1994) και $1.09 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Gavini et al.,2006) αντίστοιχα.

Υπόστρωμα	Kcat/Km ($\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$)
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA	28.98×10^7

Πίνακας 3.2 Σταθερά εξειδίκευσης ενζυμικής δραστηριότητας ΡΡιάσης της πρωτεΐνης Smc02451 έναντι τετραπετιδίου που φέρει αλανίνη πριν την προλίνη καθώς και το χρωμοφόρο p-νιτροανιλίδιο.

3.7 Έλεγχος αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 με πρωτεΐνες του περιπλασμικού χώρου του *Sinorhizobium meliloti*.

Το πρώτο στάδιο στην διαδικασία συν-καθίζησης είναι η πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στην ειδική στήλη χρωματογραφίας. Στην συνέχεια γίνεται έλεγχος πιθανών αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες του *Sinorhizobium meliloti*. Για τον λόγο αυτό γίνεται απομόνωση των πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου του *Sinorhizobium meliloti* σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.15. Το κλάσμα περιπλασμικών πρωτεϊνών που απομονώθηκε τοποθετείται σε ειδική στήλη χρωματογραφίας στην οποία βρίσκεται προσδεσμένη η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451. Το μίγμα αναδεύεται ήπια ώστε να αλληλεπιδράσουν τυχόν πρωτεΐνες που υπάρχουν στο κλάσμα των περιπλασμικών πρωτεϊνών του ριζοβίου. Τέλος γίνεται έκλυση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τις πρωτεΐνες που τυχόν αλληλεπιδρούν και ακολουθεί η συλλογή τους και η ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.



Εικόνα 3.5. Ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS PAGE) 15% (w/v) της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 καθώς και των περιπλασμικών πρωτεϊνών του *Sinorhizobium meliloti* που αλληλεπιδρούν με αυτήν. Στήλη 1: Κλάσμα διαλυτών πρωτεϊνών από κύτταρα *E.coli* BL21 που εκφράζουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μετά την επαγωγή της έκφρασης. Στήλη 2: Κλάσμα μη διαλυτών πρωτεϊνών από κύτταρα *E.coli* BL21 μετά την επαγωγή της έκφρασης. Στήλη 3: Κλάσμα πρωτεϊνών που διαπέρασαν την στήλη. Στήλη 4: Κλάσμα πρωτεϊνών ύστερα από έκπλυση της στήλης με κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης. Στήλες 5 -6: Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451 ύστερα από έκλυσή της από την στήλη με χρήση διαλύματος με υψηλή συγκέντρωση σε ιμιδαζόλιο. Στήλη 7: Κλάσμα πρωτεϊνών από *E.coli* BL21 που διαπερνά την στήλη πριν την πρόσδεση των πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου. Στήλη 8: Κλάσμα πρωτεϊνών από έκπλυση της στήλης πριν την πρόσδεση των πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου. Στήλη 9: Κλάσμα πρωτεϊνών από έκπλυση της στήλης μετά την πρόσδεση πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου. Στήλη 10: Κλάσμα πρωτεϊνών από δεύτερη έκπλυση της στήλης μετά την πρόσδεση των πρωτεϊνών του περιπλασμικού χώρου. Στήλες 11 και 12: Κλάσματα πρωτεϊνών από έκλυση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση σε ιμιδαζόλιο. Στήλη 13: Κλάσμα περιπλασμικών πρωτεϊνών που διαπερνά την στήλη. Στήλη 14-15: Κλάσμα περιπλασμικών πρωτεϊνών από έκπλυση της στήλης. Στήλες 16-17: Κλάσμα περιπλασμικών πρωτεϊνών που τυχόν αλληλεπιδρούν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ύστερα από έκπλυση της στήλης με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου.

Όπως φαίνεται από την *εικόνα 3.5*, δεν καταφέραμε να απομονώσουμε κάποια πρωτεΐνη η οποία να αλληλεπιδρά με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451.

Συζήτηση

4.1 Έκφραση των γονιδίων των παρβουλινών.

Στόχος της παρούσας εργασίας υπήρξε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός του γονιδίου Smc02451 που κωδικοποιεί για μια παρβουλίνη από το βακτήριο *Sinorhizobium meliloti*. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό ομολογίας της τάξης του 40,2% με την γνωστή και καλά χαρακτηρισμένη παρβουλίνη Par10 της *E.coli*, η οποία ομολογία μεταξύ των δύο αυτών πρωτεϊνών αυξάνεται ακόμα περισσότερο στην δομική περιοχή PPIάσης. Επίσης τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας PPIάσης εμφανίζονται ως συντηρημένα. Παράλληλα η κύρια αρχιτεκτονική της δομικής περιοχής PPIάσης φαίνεται να είναι παρόμοια με άλλες χαρακτηρισμένες παρβουλίνες και αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια αποτελούμενη από 4 β-κλώνους περιβεβλημένους από 4 α-έλικες. Το γονίδιο Smc02451 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 284 αμινοξέων, μεγέθους 31,4 kDa και θεωρητικού ισοηλεκτρικού σημείου 5,40. Η πρωτεΐνη διαθέτει πεπτιδίο οδηγό που την κατευθύνει στην εξωτερική μεμβράνη, άρα ουσιαστικά πρόκειται για μία πρωτεΐνη του περιπλάσματος. Ύστερα από ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας της Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti* εντοπίστηκε ένα δομικό λειτουργικό μοτίβο PPIάσης (PPIC-PPIase) το οποίο εκτείνεται από το αμινοξύ 135 έως 225.

4.2 Μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

Η δραστηριότητα PPIάσης που παρουσίασε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451 του *Sinorhizobium meliloti* μελετήθηκε πειραματικά έναντι συνθετικού τετραπεπτιδίου. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Smc02451 παρουσίασε μια μεγάλη ενζυμική δραστηριότητα έναντι του τετραπεπτιδίου Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, που έφερε δηλαδή ένα κατάλοιπο αλανίνης πριν την προλίνη. Η τιμή της σταθεράς εξειδίκευσης K_{cat}/K_m για το συγκεκριμένο υπόστρωμα ήταν ίση με $28,98 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Οι τιμές της σταθεράς εξειδίκευσης της ενζυμικής δραστηριότητας άλλων γνωστών παρβουλινών όπως της Par10 της *E.coli* καθώς και της NifM του *Azotobacter vinelandii* ανέρχονται σε $1,69 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Rafheld et al. 1994) και $1,09 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Gavini et al., 2006) αντίστοιχα.

4.3 Πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης Smc02451 και περιπλαστικών πρωτεϊνών του *Sinorhizobium meliloti*.

Ο βιολογικός ρόλος των ήδη μελετημένων βακτηριακών παρβουλινών έγκειται στην υποβοήθηση της διαδικασίας αναδίπλωσης και ωρίμανσης εκκρινόμενων πρωτεϊνών (Vittikainen et al., 2004). Η περιπλαστική παρβουλίνη SurA της *E.coli* φαίνεται να συμμετέχει στην αναδίπλωση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης όπως η LamB, η OmpA και η Omp.

Για την μελέτη των πιθανών αλληλεπιδράσεων της Smc02451 με άλλες πρωτεΐνες του περιπλαστικού χώρου του *Sinorhizobium meliloti*, πραγματοποιήθηκε έκφραση της ως υβρίδιο με επίτοπο έξι ιστιδινών με σκοπό το ανασυνδυασμένο πολυπεπτιδίο να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα συνκαθίζησης.

Απ' τα πειράματα αυτά δεν εντοπίστηκε κάποια αλληλεπίδραση με κάποια πρωτεΐνη στόχο, αφού δεν καταφέραμε να απομονώσουμε κάποια πρωτεΐνη διαφορετικής της ανασυνδυασμένης

Smc02451. Η αποτυχία αυτή μπορεί να οφείλεται στην πολύ μικρή χρονική διάρκεια αλληλεπίδρασης που μπορεί να έχει η πρωτεΐνη μας με κάποια άλλη πρωτεΐνη από το κλάσμα περιπλασμικών πρωτεϊνών του *Sinorhizobium meliloti*. Θα ήταν επιθυμητό για τον επιτυχή εντοπισμό αλληλεπιδράσεων η χρήση άλλων μεθόδων μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων όπως η χρήση κατάλληλων χημικών παραγόντων (crosslinkers) που υποβοηθούν την σταθεροποίηση πρωτεϊνικών συμπλόκων που δημιουργούνται μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων που έρχονται σε κοντινή απόσταση, άρα υπάρχει και μεγάλη πιθανότητα να αλληλεπιδρούν.

Βιβλιογραφία

1. **Behrens S., R. Maier, H. De Cock, F.X. Schmid and C.A. Cross.** (2001). The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity. *EMBO j.* **20**:285-294.
2. **Bettina Schmidt , Thomas Tradler , Jens-U. Rahfeld , Birgit Ludwig , Bunty Jain , Karlheinz Mann , K. Peter Rücknagel , Bernhard Janowski , Angelika Schierhorn , Gerhard Küllertz , Jörg Hacker, Gunter Fischer(1996):** A cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Legionella pneumophila* – characterization, molecular cloning and overexpression. *Mol. Microb.* **Vol. 21**, 1147 - 1160
3. **Cabanes D., P. Boistard and J. Batut.** (2000). Symbiotic induction of pyruvate dehydrogenase genes from *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 483-493.
4. **Chain P.S., Hernandez-Lucas I., Golding B. and Finan T. M.** (2000). oriT directed cloning of defined large regions from bacterial genomes: identification of the *Sinorhizobium meliloti* pExo magaplasmid replicator region. *J. Bacteriol.* **182**:5486-5494.
5. **Clipstone NA, Crabtree GR,** (1992): Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**: 695–697.
6. **Correa P., M.J. Miller** (1998). Carcinogenesis apoptosis and cell proliferation . *Br.Med. Bull.* **54**:151.
7. **Danese P.N. and Silhavy T.J**(1997). The $\sigma(E)$ and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **11**: 1183-1193
8. **Dartigalongue C. and Raina S.** (1998). A new heta-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **17**: 3968-3980
9. **Deakin W.J., Parker V.E., Wright e.L, Aschcroft K.J. Loake g.J and Shaw C.H.** (1999). *Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagelin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility, *Microbiology.* 145: 1397-1407.
10. **Drouault S. J, S. Bonneau, A. Bolotin, S.D Ehrlich and P. Renault** (2002). The peptidyl prolyl isomerase motif is lacking in PmpA, the PrsA-like proyein involved in the secretion machinery of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3932-3942.
11. **Ferreira P.A, Nakayama T. A., Pak W. L. and Travis G.H** (1996). Cyclophilin related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature* **383**:637-640.
12. **Fischer G. Begger E. and Bang H.** (1989). Kinetic beta-deuterium isotope effects suggest a covalent mechanism for the protein folding enzyme peptidyl prolyl cis/trans- isomerase. *FEBS Lett* **250**:267-70.
13. **Fischer G.H, Bang H. and Mech C.** (1984). Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans isomerisation of peptide binding in proline-containing peptides. *BioMed Biochim Acta* **43**:1101-11.
14. **Freiberg C., Fellay r., Bairoch A., Broughton W., Rosenthal J. and Perret X.** (1997). Molecular basis of symbiosis between *Risobium* and legumes. *Nature* **387**: 394-401.

15. **Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE (1994):** Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J.* **8:** 391–400.
16. **Gavini N., Tungtur S. and Pulakat L.(2006).** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-independent functional NifH mutant of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **188:**6020-6025.
17. **Glucksmann M. A., Reuber T.L and Walker G.C. (1993).** Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Risobium meliloti*. *J.Bacteriol.* **175:**7033-7044.
18. **Gothel S.F. and Marahiel M.A. (1999).** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol. Life Sci.* **55:**423-436.
19. **Haandrikam A.J., Kok J. and Venema G. (1991).** Lactococcal proteinase maturation protein PrtM is a lipoprotein. *J. Bacteriol* **173:**4517-25.
20. **Hani J., Stumpf G. and Domdey H. (1995).** PTF1 encodes an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae*, which shows strong homology with a new putative family of PPIases. *FEBS Letters:* **365:**198-202.
21. **Harrar Y., Bellini C. and Faure J.D. (2001)** FKBP: at the crossroads of folding and transduction. *TRENDS in Plant Science* **6:**426-431.
22. **Helekar SA, Char D, Neff S, Patrick J,(1994):** Prolyl isomerase requirement for the expression of functional homo oligomeric ligand-gated ion channels. *Neuron* 1994, **12:**179-189.
23. **Henning L.,Christner C.,Kipping M.,Schelbert B.,Rucknagel K.,Grabley S.(1998):** Selective inactivation of parvulin like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by jiglon. *Biochemistry* **37:**5953-5960.
24. Hyyrylainen et al. 2001
25. **Hyyrylainen Hanne-Leena, Albert Bolhuis, Elise Darmon, Leila Muukkonen, Pertti Koski, Marika Vitikainen, Matti Sarvas, Zoltán Pra'gai, Sierd Bron, Jan Maarten van Dijk and Vesa P. Kontinen (2001):** A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. *Molecular Microbiology* **41(5):** 1159–1172.
26. **Jacobson Marty R.,Kevin e. Brigle,Lisa T. Bennet,Robert A. Setterquist,Mark S. Wilson,Valerie L. Cash, Jom Beyon,Wwilliam E. Newton,Dennis Dean.(1989)** Physical and Genetic Map of the Major nif Gene Cluster from *Azotobacter vinelandii*.*Jour.Bacter.***171:**1017-1027.
27. **Jun Liu and Christopher T. Walsh (1990).**Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase from *Escherichia coli*: A periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **Vol. 87,** pp. 4028-4032
28. **Kallen J, Spitzfaden C, Zurini MG, Wider G, Widmer H, Wuthrich K, Walkinshaw MD,(1991):** Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Nature* 1991, **353:**276-279.
29. **Kontinen V.,Sarvas M.,(1988)** Mutants of *Bacillus subtilis* Defective of protein export *Journal of General Microb.* **134:**2333-2344.
30. **Kontinen V.P and Sarvas M. (1993).** The PrSA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high level secretion. *Mol.Microbiol.* **8:**727-737.
31. **Kontinen V.P,Saris P.,Sarvas M. (1991):** A gene (prsA) of *Bacillus subtilis* involved in a novel, late stage of protein export.*Mol.Microbiol.***5:**-1273-1283.
32. **Lazar S.W, Kotler R. (1996):** SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *J.Bacteriol.***178:**1770-1773.

33. **Liu J, Farmer JD Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL, (1991):** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991, **66**:807-815.
34. **Luan S., (1998):** Immunophilins in animals and higher plants. *Bot Bull Acad Sin* **39**: 217–223.
35. **Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP (1993):** Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 1993, **73**:1067-1078.
36. **O’Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O’Neill EA ,(1992):** FK-506-and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature*, 357:692-694.
37. **Oliver Kops, Christoph Eckerskorn, Sandra Hottenrott, Gunter Fischer, Huaifeng Mi and Maximilian Tropschug (1998):** Ssp1, a Site-specific Parvulin Homolog from *Neurospora crassa* Active in Protein Folding. *Journal of biological Chemistry* **273**:31971-31976.
38. **Rahfeld J.U.,Rucknagel K.P.,Schelbert B.,Ludwig B.,Hacker J.,Mann K.,Fischer G.,(1994):** Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett* **352**:180-184.
39. **Rahfeld J.U.,Schierhorn A.,Mann K.,Fischer G.,(1994):** A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **343**:65-69.
40. **Rahfeld J.U., Rucknagel K.P.,Schelbert B.,Ludwig B.,Hacker J., Mann K.,Fischer G. (1994).** A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **343**:65-69.
41. **Ramaganathan R.,Hunter K.P.,Noel J.P,(1997):** Structural and functional analysis of mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell* **89**:875-886.
42. **Rao Anjana, Chun Luo, and Patrick G. Hogan (1997):** TRANSCRIPTION FACTORS OF THE NFAT FAMILY: Regulation and Function. *Annual Review of Immunology* Vol. **15**: 707-747.
43. **Rudd K.E., Sofia H.J.,Koonin E.V.,Plunkett G.,Lazar S.,Rouviere P.E. (1995).** A new family of peptidyl prolyl isomerases. *Trends Biochem. Sci.* **20**:12-14.
44. **Sandra Hottenrott, Thomas Schumann, Andreas Plu" ckthun, Gunter Fischer and Jens-Ulrich Rahfeld.(1997):** The *Escherichia coli* SlyD Is a Metal Ion-regulated Peptidyl-prolyl cis/trans-Isomerase. *The journal of biological chemistry* Vol**272** No**25**:15697-15701.
45. **Sarvas Matti, Colin R. Harwood, Sierd Bronc and Jan Maarten van Dijld(2004):** Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. *Biophysica et Biochimica Acta* .vol **1694** :issues 1-3.
46. **Schmid F.X. (1993):** Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein folding reactions. *Annu Rev. Biomol. Struct.* **22**:123-143.
47. **Schmid F.X. (2001):** Prolyl isomerases. *Adv Protein Chem* **377**:417-24.
48. **Schmid F.X.,Mayr L.M.,Mucke M.,Schonbrunner E.R.,(1993):** Prolyl isomerases: role in protein folding. *Advant Protein Chem.* **44**:25-66.
49. **Schneuwly S., Shortridge R. D., Larrivee D. C., Ono T., Ozaki M. and Pak W. L. (1989)** *Drosophila ninA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporin A binding protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5390–53949.

50. **Scholtz C.,Rahfeld J.,Fischer G.,Schmid F.X.** (1997): Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol* **273**:752-762.
51. **Schreiber S. L. and Crabtree G. R.** (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol. Today* **13**:136–142.
52. **Schreiber S.L.**(1991) :Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands
53. *Science*, Vol **251**, Issue 4991, 283-287.
54. Schmid 1993 (surA).
55. **Shen M.,Stukenberg P.T., Kirchsner M.W.,Lu K.P.,**(1998). The essential mitotic peptidyl-prolyl 119ft he119se Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* **12**:706-720.
56. **Stamnes M. A., Shieh B. H., Chuman L., Harris G. L. andZucker C. S.** (1991) The cyclophilin homolog ninaA is a tissue specific integral membrane protein required for the proper synthesis of a subset of *Drosophila*.
57. **Van Duyne G.D, Standaert R.F.,Krplus P.A.,Screiber S.L.,Clardy J.,**(1993):Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J.Mol. Biol.* **229**:105-124.
58. **Vitikainen M., Pummi T., Airaksinen U., Wu H, Sarvas M., Kontinen V. P.,** (2001). Quantitation of the capacity of the secretion apparatus and requirement for PrsA in growth and secretion of α -amylase in *B.subtilis*. *J.Bacteriol* **183**:1881-1890.
59. **Vitikainen M.,Lappalainen I.,Seppala R., Antelmann H., Boer H.,Taira S., Savilanthi H.,Hecker M., Vihinen**
60. **M.,Sarvas M.,Kontinen V.P.** (2004). Structure-Function analysis of PrsA Reveals Roles for the parvulin-like and flanking N- and C-terminal domains in protein folding and secretion in *Bacillus subtilis*, *J.Biol. Chem.* **279**:19302-19314.
61. **Wu X.,Wilcox C.B.,Devasahayam G.,Hackett R.L,Arevalo-Rodriguez M.,Cardenas M. E.,Heitman J.,Hanes S.D.**(2000): The Ess1 prolyl isomerase is linked to the chromatin remodeling complexes and the general transcriptional machinery. *EMBO J.* **19**:3727-3738.