

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής
Μικροβιολογίας

Βελτιστοποίηση συνθηκών
καθαρισμού της πρωτεΐνης NorT1 του
Bradyrhizobium japonicum και
διερεύνηση πρωτεϊνικών
αλληλεπιδράσεων της
με πρωτεΐνες της σόγιας

Της φοιτήτριας Τράμπαρη Ελευθερίας

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του μεταπτυχιακού
προγράμματος σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών,
τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας με τίτλο «Βιοτεχνολογία &
Εφαρμογές στη Γεωπονία»

Αθήνα 2012

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η Τριμελής Επιτροπή της μελέτης.

Η τριμελής Συμβουλευτική και Εξεταστική Επιτροπή:

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκουρος Καθηγήτρια (Εισηγήτρια)

Κατινάκης Παναγιώτης, Καθηγητής (Μέλος)

Χατζηπαυλίδης Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής (Μέλος)

Ευχαριστίες

Με ευκαιρία την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήθελα να εκμεταλευτώ την ευκαιρία και να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνετέλεσαν για την πραγματοποίηση της.

Πρώτη στην λίστα των ευχαριστιών μου δεν θα μπορούσε παρά να είναι η επιβλέπουσα επίκουρος καθηγήτρια και πρότυπο μου Αναστασία Ταμπακάκη. Την ευχαριστώ βαθιά που ήταν σε κάθε βήμα αυτής της μελέτης δίπλα μου, διδάσκοντας και συμβουλευοντας με, με περίσσιο ζήλο. Το όραμα της και η βοήθεια της αποτέλεσαν τον θεμέλιο λίθο στον οποίο στηρίχθηκε αυτή η εργασία. Ο θαυμασμός μου προς το πρόσωπό της δεν πηγάζει μόνο από το σπούδαιο επιστημονικό της έργο αλλά και από το ήθος και την προσωπικότητα της, χαρακτηριστικά που την κάνουν να ξεχωρίζει.

Τις ευχαριστίες μου οφείλω στον Καθηγητή Παναγιώτη Κατινάκη και στον Επίκουρο Καθηγητή Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη τόσο για τον συμβουλευτικό τους ρόλο, όσο και για την συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Φωτιάδη ο οποίος με στήριξε τόσο πρακτικά όσο και ηθικά στην εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής ενώ ήταν πάντοτε παρών και έτοιμος να με βοηθήσει όποτε τον χρειαζόμουν.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω φυσικά από τις ευχαριστίες μου όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και ιδιαιτέρως την Κα Πόπη Παπαμελετίου η οποία αποτελεί τον «αφανή ήρωα» του εργαστηρίου αφού μετά βεβαιότητας, έχει συμβάλει άλλοτε λιγότερο και άλλοτε περισσότερο στις περισσότερες από τις ερευνητικές εργασίες που έχουν εκπονηθεί στο εργαστήριο Γεωργικής Μικροβιολογίας. Την ευχαριστώ ιδιαιτέρως!

Πολλά ευχαριστώ οφείλω στην φίλη μου Ευαγγελία Λάρου με την οποία μοιραστήκαμε την περίοδο του μεταπτυχιακού, δουλεύοντας δίπλα δίπλα. Η παρέα της και οι συμβουλές της έκαναν τις όποιες δυσκολίες να φαίνονται μικρότερες και η καλή της διάθεση δημιουργούσε πάντοτε ένα ευχάριστο κλίμα εργασίας.

Από καρδιάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ζήση και Διονυσία , την αδερφή μου Σοφία και τον σύντροφό μου Δημήτρη. Η συνεχής τους στήριξη, η αγάπη τους και η εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου, μου έδωσαν όλη την απαραίτητη ενέργεια για την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού μου.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	7
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT.....	12
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
2.1. Συμβιωτική αζωτοδέσμευση	15
2.2. Ριζόβια.....	19
2.3. <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	21
2.4. Διαμόρφωση του μηχανισμού άμυνας του ξενιστή κατά τον σχηματισμό συμβιωτικών σχέσεων	21
2.5. Εκκριτικά συστήματα βακτηρίων.....	24
2.6. Τύπου III εκκριτικό σύστημα	25
2.6.1. Δομικά στοιχεία εκκριτικού συστήματος τύπου III.....	27
2.7. Πρωτεΐνες- τελεστές.....	29
2.7.1. Αντίδραση φυτών στις πρωτεΐνες τελεστές	33
2.7.2. Πρωτεΐνες-τελεστές του <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	34
2.8. Οικογένεια πρωτεασών YopT	34
2.9. Σύστημα AnrPphB –PBS1 στο φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
3. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	40

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 42

4.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	42
4.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση.....	42
4.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με την βοήθεια κολώνας ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN).....	42
4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	43
4.3. Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού.....	45
4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	45
4.5. Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτή αγαρόζης	46
4.6. Καθαρισμός προϊόντος από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	46
4.7. Αντίδραση λιγάσης.....	46
4.8. Ταυτοποίηση ανασυνδυσασμένων βακτηριακών κλώνων	47
4.9 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων	47
4.9.1. Για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (heat-shock)	47
4.9.2. Για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση	47
4.10. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων	48
4.10.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με τη μέθοδο του θερμικού σοκ	48
4.10.2 . Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο της ηλεκτρο-διάτρησης.....	48
4.11. Μεταφορά πλασμιδίων μεταξύ βακτηρίων με τριπαραγωγική σύζευξη	49
4.12. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών	49
4.13. Καθαρισμός πρωτεΐνης από ρητίνη αγαρόζης Ni-NTA, υπό φυσικές (native) συνθήκες.....	51

4.14. Καθαρισμός πρωτεΐνης από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	53
4.15. Καθαρισμός πρωτεΐνης από σφαιρίδια συγγένειας τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), υπό φυσικές (native) συνθήκες	53
4.16. Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης κατά Laemmli	55
4.17. Χρώση με μπλε του Coomassie	56
4.18. Ανοσοαποτύπωση Western: Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene fluoride).....	57
4.18.1. Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης Western με το αντίσωμα Ni-NTA AP conjugate.....	57
4.19. Τεχνολογία Gateway Κλωνοποίησης.....	59
4.20. Πλασμιδιακές κατασκευές.....	62
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	65
5.1. Βελτιστοποίηση συνθηκών έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης NorT1.....	65
5.2. Διερεύνηση δράσης των αρχικών αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης NorT1.....	68
5.3. <i>In silico</i> διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης NorT1 με πρωτεΐνες της σόγιας	72
5.4. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pET26b-ccdB-His	79
5.5. Διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης NorT1 με πρωτεΐνες της σόγιας	80
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	83
7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	91
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Διαδικασία σχηματισμού φυματίου	16
Εικόνα 2: Διαδικασία αποικισμού των φυτικών ριζών από συμβιωτικά βακτήρια.	18
Εικόνα 3: Ριζικά φυμάτια.....	20
Εικόνα 4: Χάρτης γονιδιώματος <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110.	22
Εικόνα 5: Επισκόπηση των γνωστών βακτηριακών εκκριτικών συστημάτων.	24
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού μαστιγίου.	28
Εικόνα 7: Φυτικά συστήματα που στοχεύονται από πρωτεΐνες τελεστές των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, οι οποίες εκκρίνονται μέσω του T3ES.....	30
Εικόνα 8: Αρθρωτή αρχιτεκτονική δομή των πρωτεϊνών-τελεστών που εκκρίνονται από εκκριτικά συστήματα τύπου III.	31
Εικόνα 9: Μοντέλο δράσης <i>AnrP</i> σε φυτά <i>Arabidopsis</i> που εμφανίζουν ανθεκτικότητα <i>RPS5</i> και τα οποία μολύνονται από το <i>P. syringae</i>	36
Εικόνα 10: Διαδικασία καθαρισμού πρωτεϊνών με επίτοπο πολυιστιδινών κάτω από φυσικές και αποδιατακτικές συνθήκες, σε στήλη νικελίου	51
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση καθαρισμού πρωτεΐνης από σφαιρίδια συγγένειας μεταφοράς της γλουταθειόνης (<i>GST</i>) υπό φυσικές συνθήκες	54
Εικόνα 12: Εφαρμογές της τεχνολογίας Gateway.	59
Εικόνα 13: Αντίδραση BP κλωνάσης.....	61
Εικόνα 14: Αντίδραση LR κλωνάσης.....	61
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου <i>pET28a-BLR2140-GST</i>	67
Εικόνα 16: Αποτελέσματα καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης <i>NorT1-GST</i> από σφαιρίδια <i>Glutathione Sepharose</i>	68
Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση προϊόντων υπερέκφρασης της πλασμιδιακής κατασκευής <i>pET28a-BLR2140-GST</i>	69
Εικόνα 18: Αποτελέσματα καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης <i>NorT1-GST</i> από στήλη νικελίου.. ..	71
Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση <i>Western</i> στα προϊόντα του καθαρισμού της πρωτεΐνης <i>NorT1</i> σε στήλη νικελίου στοχεύοντας τον επίτοπο <i>His</i> και τον επίτοπο <i>GST</i>	72
Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο που αναπαριστά την σχέση και τη γενετική απόσταση των 13 πρωτεϊνών που υποδείχθηκαν μέσω των μεθόδων βιοπληροφορικής ως πιθανοί στόχοι της πρωτεΐνης <i>NorT1</i> στα κύτταρα της σόγιας.	78
Εικόνα 21: Καλλιέργειες κυττάρων <i>E.coli</i> που προέκυψαν από αντίδραση LR κλωνάσης του φορέα <i>pET26b-ccdB-V5-His</i> με τον φορέα <i>pDONR-GFP</i>	80

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Οι κυριότερες ομάδες ψυχανθών διασταυρούμενου εμβολιασμού	20
Πίνακας 2: Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από τον λάμβδα βακτηριοφάγου και τα ένζυμα που τις καταλύουν	61
Πίνακας 3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή των πλασμιδιακών κατασκευών .	63
Πίνακας 4: Σύγκριση ταυτότητας και ομοιότητας των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 στη σόγια με την πρωτεΐνη PBS1 του <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Πίνακας 5: Ποσοστό ομολογίας των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 με την PBS1 <i>Arabidopsis thaliana</i> και τις CW108, CW75 της σόγιας	74
Πίνακας 6: Χαρακτηριστικό μοτίβο GDK στις πιθανές πρωτεΐνες-στόχους της NorT1.....	74
Πίνακας 7: Παρουσία θέσεων μυριστιλίωσης στις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της πρωτεΐνης NorT175	
Πίνακας 8: Θέσεις παλμιτιλίωσης πρωτεϊνών-στόχων της NorT1 όπως αυτές εντοπίστηκαν από το πρόγραμμα <i>Css-Palm</i>	77

Περίληψη

1. Περίληψη

Πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια, είτε παθογόνα είτε συμβιωτικά για φυτά, έντομα ή ζώα έχουν αναπτύξει πολύπλοκες μηχανές για να μεταφέρουν πολλαπλές, βακτηριακά κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών και είναι ευρύτερα γνωστές ως «πρωτεΐνες τελεστές». Η κάθε πρωτεΐνη τελεστής έχει εξειδικευμένη δράση και συγκεκριμένους στόχους στο κύτταρο του ξενιστή τροποποιώντας πολλές φορές λειτουργίες ζωτικής σημασίας του κυττάρου ξενιστή.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγινε μελέτη της πρωτεΐνης-τελεστή NorT1 που εκκρίνεται, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, από το βακτήριο *Bradyrhizobium japonicum* στη σόγια, *Glycine max*. Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση της έκφρασης και του καθαρισμού της πρωτεΐνης στο *E. coli* μετά από έκφραση της στον φορέα pET28a-GST, όπου κλωνοποιήθηκε η κωδικοποιούσα για την πρωτεΐνη αλληλουχία σε κοινό πλαίσιο ανάγνωσης με τον επίτοπο της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST). Το αποτέλεσμα ήταν η αποδοτικότερη έκφραση της πρωτεΐνης NorT1 και ο εύκολος καθαρισμός της υπό φυσικές συνθήκες, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη θετική δράση του επιτόπου GST στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Προηγούμενες μελέτες έδωσαν ενδείξεις για την πιθανή δράση των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων της NorT1 ως μοριακή συνοδό της πρωτεΐνης στο κύτταρο του ξενιστή. Στη συγκεκριμένη μελέτη αυτό διαπιστώθηκε μέσω της κλωνοποίησης της κωδικοποιούσας αλληλουχίας της πρωτεΐνης σε φορέα σε κοινό πλαίσιο ανάγνωσης με τους επιτόπους His (6 κατάλοιπα ιστιδίνης) στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και GST στο καρβοξυτελικό άκρο. Μέσω αυτών των επιτόπων και μετά από τους αντίστοιχους καθαρισμούς έγινε εφικτή η απόδειξη της αλληλεπίδρασης των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης δίνοντας έτσι μία ένδειξη για την πιθανή δράση των πρώτων αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης ως μοριακή συνοδό του λειτουργικού της μέρους. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μέθοδοι βιοπληροφορικής προκειμένου να αναζητηθούν πιθανές πρωτεΐνες-στόχοι της NorT1 στη σόγια. Η μελέτη αυτή βασίστηκε στην αλληλεπίδραση AvrPhB-PBS1 στο παθοσύστημα *Pseudomonas-Arabis* και υπέδειξε δεκατρείς πρωτεΐνες ως πιθανούς

στόχους της NorT1. Επειδή δύο από τις δεκατρείς ήταν οι πιο πιθανές πρωτεΐνες-στόχοι, έγινε προσπάθεια για την πειραματική διαπίστωση της αλληλεπίδρασης τους με την πρωτεΐνη NorT1. Τέλος, για την πιο εύκολη υποκλωνοποίηση των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της πρωτεΐνης NorT1 σε φορέα έκφρασης, με σκοπό τον έλεγχο αλληλεπίδρασης, κατασκευάστηκε εξειδικευμένος φορέας έκφρασης γονιδίων στο οποίο είναι εφικτή η κλωνοποίηση των επιθυμητών αλληλουχιών μέσω της τεχνολογίας Gateway. Η λειτουργικότητα του συγκεκριμένου φορέα ελέγχθηκε πειραματικά με την υποκλωνοποίηση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας του GFP (green fluorescent protein).

Abstract

Many Gram negative bacteria, whether they are pathogens or symbionts to plants, insects or animals, have developed complicated mechanisms to deliver multiple, bacterial encoded proteins into eukaryotic cells. Secreted proteins are able to modify a wide range of cellular functions and are widely known as effector proteins or effectors. Each effector has a specialized function and specific targets in the host cell, modifying frequently basic functions of the host cell.

In the present study, NopT1 was studied as an effector protein secreted by type III secretion system, from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* to soybean, *Glycine max*. Initially, we optimized the expression and extraction of the NopT1 in the *E.coli* system after its expression through pET28a-GST vector, in which the *nopT1* coding sequence was cloned in frame with the coding sequence of the glutathione transferase (GST). The result was the efficient expression of NopT1 and its easy extraction under native conditions, suggesting that the GST epitope positively affected the protein solubility. Previous studies provided evidence that the first 49 amino acid residues of the protein may harbor a chaperone activity. In the present study, this was verified by cloning the protein coding sequence in pET28a-GST in such a way that the hybrid protein is fused to a His tag (6 Histidines) in the N-terminal end and a GST tag in the C-terminal end. The specific protein extraction methods based on these tags indicated the probable interaction between the two parts of the protein, giving a hint for the possible function of the first 49 protein amino acids as chaperones of the functional part of the protein. The next step was to apply bioinformatics in order to find possible NopT1 target-proteins in soybean. This study was based in AvrphB-PBS1 interaction in *Pseudomonas-Arabidopsis* pathosystem and resulted in 13 soybean proteins as potential targets of NopT1. Since two out of thirteen were the best candidates, we tried to prove experimentally the interaction of these proteins with the NopT1. Lastly, to facilitate the interaction analysis and the subcloning of the possible NopT1 target-proteins we made a specific vector for the cloning of the desired sequences via Gateway technology. Vector functionality was verified experimentally by subcloning the GFP coding sequence into the vector.

Εισαγωγή

2. Εισαγωγή

Στην φύση, τα φυτά γίνονται στόχος από μια πληθώρα παθογόνων μικροβίων και φυτοφάγων εντόμων τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες και να δράσουν ως παράσιτα. Εκτός από τις επιβλαβείς όμως σχέσεις μεταξύ φυτών και βακτηρίων, αναπτύσσονται και ωφέλιμες σχέσεις μεταξύ τους. Πολλές φορές τέτοιες σχέσεις δημιουργούνται στην ριζόσφαιρα των φυτών όπου βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών και τα βοηθάνε να αντιμετωπίσουν βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις. Εκατομμύρια μικροβίων μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα γραμμάριο εδάφους. Παρόλα αυτά, η μικροβιακή κοινότητα γύρω από την ριζόσφαιρα διαφέρει κατά πολύ από αυτή που βρίσκεται μακριά από φυτά, δίνοντας έτσι μία ένδειξη για το ότι τα φυτά ίσως είναι ικανά εμμέσως να διαμορφώνουν την σύσταση του μικροβιακού πληθυσμού γύρω από αυτά (Badri & Vivanco, 2009). Καλά μελετημένα παραδείγματα ωφέλιμων μικροβίων είναι οι μυκκοριζικοί μύκητες που μπορούν να αναπτύξουν συμβιωτικές σχέσεις με το περίπου 80% από το σύνολο των χερσαίων φυτικών ειδών (Harrison, 2005). Τέτοιοι ωφέλιμοι οργανισμοί, απορροφούν θρεπτικά συστατικά από το έδαφος και τα παρέχουν στα φυτά με αντάλλαγμα φωτοσυνθετικά προϊόντα που τους παρέχουν τα φυτά. Τα ριζόβια είναι βακτήρια που σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με φυτά της οικογένειας των ψυχανθών, το οποίο οδηγεί σε αμοιβαία αναγνώριση και ανάπτυξη συμβιωτικών δομών στις οποίες τα ριζόβια δεσμεύουν το άζωτο της ατμόσφαιρας και το μετατρέπουν σε μορφή αφομοιώσιμη από τα φυτά (Spaink, 2000). Ωφέλιμες σχέσεις αναπτύσσονται μεταξύ φυτών και βακτηρίων όχι μόνο μέσω συμβίωσης αλλά και με μη-συμβιωτικά βακτήρια και μύκητες, διαφορετικών ειδών. Η ανάπτυξη ωφέλιμων σχέσεων με οργανισμούς που ζουν ανεξάρτητοι βοηθάει τα φυτά να αναπτυχθούν σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος, οι οποίες χωρίς τους οργανισμούς αυτούς δεν θα ήταν κατάλληλες για την ανάπτυξη τους. Οι οργανισμοί αυτοί δρουν κατασταλτικά για άλλους πιθανά παθογόνους οργανισμούς ή παράσιτα (De Vleeschauwer et al, 2009).

Για την ανάπτυξη λειτουργικής συμβιωτικής σχέσης, απαραίτητη είναι η αμοιβαία αναγνώριση των δύο οργανισμών και ουσιαστικός συγχρονισμός

των φυτικών και μικροβιακών αποκρίσεων. Οι συμβιωτικές σχέσεις με ριζόβια και οι μυκκοριζικές σχέσεις μοιράζονται ένα κοινό μονοπάτι μεταφοράς σινιάλου, το οποίο ενεργοποιείται στα φυτικά κύτταρα μετά από την αντίληψη των παραγόντων που εκκρίνονται από τους ωφέλιμους οργανισμούς, παράγοντες Nod για τα βακτήρια και Myc για τους μύκητες (Oldroyd & Downie, 2008). Ενδιαφέρον έχει ότι αυτό το μονοπάτι «αναγνώρισης» ίσως να ενεργοποιείται και από μη-συμβιωτικά βακτήρια (Sanchez et al, 2005).

Τόσο οι συμβιωτικοί όσο και οι μη-συμβιωτικοί οργανισμοί, στην αρχή αναγνωρίζονται από το φυτό ως ξένοι οργανισμοί. Για αυτόν τον λόγο, η ενεργή αλληλεπίδραση με το φυτικό αμυντικό σύστημα είναι απαραίτητη ώστε να γίνει εφικτό να εγκατασταθεί μία επιτυχημένη και στενή συμβιωτική σχέση. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας των φυτών γίνεται μετά την αναγνώριση ξένων προς-αυτά μορίων. Το φυτό δεν μπορεί να διακρίνει αν αυτά τα μόρια προέρχονται από ωφέλιμο ή παθογόνο οργανισμό και γι'αυτό «συμπεριφέρεται» αμυντικά (Millet et al., 2010). Αυτά τα μόρια καλούνται μικροβιακά μοριακά μοτίβα (MAMPs, Microbial associated Molecular Patterns) και η αντίδραση που ενεργοποιούν στο φυτό ονομάζεται MAMP-επαγόμενη ανοσολογική απόκριση (Boller & Felix, 2009). Παρόλο που στα φύλλα έχει μελετηθεί εκτενώς η παραπάνω απόκριση, στις ρίζες δεν έχει γίνει αρκετή μελέτη αυτής της αντίδρασης από την μεριά του φυτού. Αυτή η μελέτη όμως θα ήταν πολύ σημαντική λόγω του ότι η πλειοψηφία των συμβιωτικών σχέσεων ξεκινούν ή συμβαίνουν αποκλειστικά στην ρίζα. Για να εγκαθιδρύνουν τα μικρόβια μία επιτυχημένη συμβιωτική σχέση θα πρέπει να βρουν τρόπους να παρακάμψουν τις αποκρίσεις άμυνας των φυτών, τοπικά στην περιοχή της ρίζας.

2.1. Συμβιωτική αζωτοδέσμευση

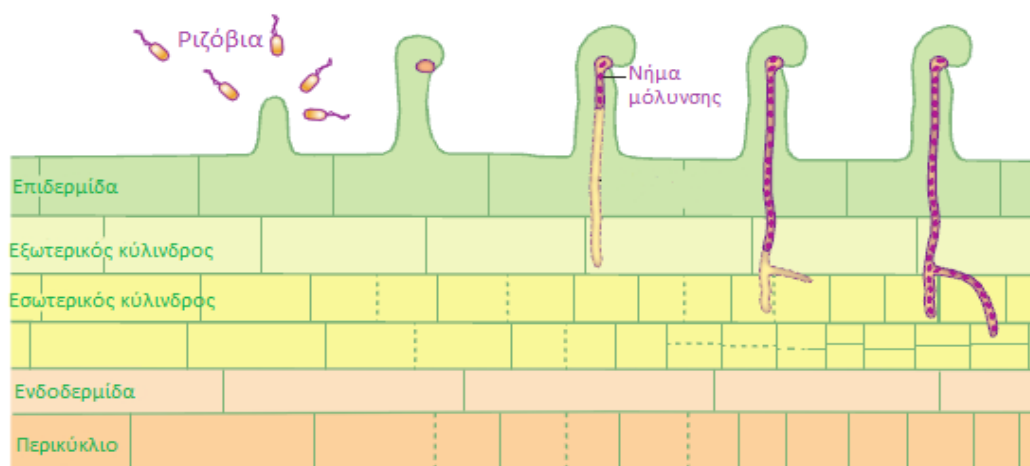
Η δέσμευση του αζώτου είναι η διαδικασία κατά την οποία το στοιχειακό άζωτο της ατμόσφαιρας (N_2) μετατρέπεται σε αμμωνία (NH_3) με την παρουσία μικροοργανισμών (βιολογική δέσμευση) ή χωρίς την παρουσία μικροοργανισμών (μη βιολογική δέσμευση).

Η συμβιωτική αζωτοδέσμευση είναι μια διαδικασία υψίστης σημασίας συμμετέχοντας στον κύκλο του αζώτου και κατά συνέπεια επηρεάζοντας την

παγκόσμια γεωργία. Για την επίτευξη αυτής της συμβίωσης απαραίτητη είναι η ανάπτυξη λειτουργικών σχέσεων μεταξύ φυτού και βακτηρίου. Για να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που διέπουν αυτή την σχέση απαραίτητη είναι η ολιστική προσέγγισή τους μέσω διαφόρων επιστημών όπως είναι η φυσιολογία, η οικολογία και η γενετική των ριζοβίων όπως και τον φυτών-ξενιστών.

Αντίθετα από τα ζώα που παραλαμβάνουν τα απαραίτητα για αυτά θρεπτικά συστατικά μέσω της τροφής τους, τα φυτά πρέπει να δεσμεύσουν άζωτο, σε μορφή νιτρικών και αμμωνιακών, από το έδαφος. Παρόλο που το άζωτο στην ατμόσφαιρα βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό (79%), οι βιολογικά ενεργές μορφές του αζώτου είναι πολύ περιορισμένες, τόσο ώστε να αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των φυτών. Για να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα τα φυτά σχηματίζουν συμβιωτική σχέση με βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα δέσμευσης του μοριακού αζώτου και την μετατροπή του σε μορφή αφομοιώσιμη προς αυτά. Αυτή την συμβιωτική σχέση την έχουν αναπτύξει τα ψυχανθή μαζί με ένα πλήθος βακτηρίων, που στο σύνολο τους ονομάζονται ριζόβια. Γι'αυτό το λόγο τα ψυχανθή έχουν εξαιρετικά μεγάλη γεωργική σημασία αφού καλλιεργούνται για την διατροφή του ανθρώπου και των ζώων.

Στα φυμάτια των ψυχανθών, τα συμβιωτικά βακτήρια μετατρέπουν το



Εικόνα 1: Διαδικασία σχηματισμού φυματίου. Ο σχηματισμός φυματίων εμπλέκει την συντονισμένη ανάπτυξη της βακτηριακής μόλυνσης και της οργανογένεσης του φυματίου. Η διαίρεση του κυττάρου στον εσωτερικό κύλινδρο και το περικύκλιο ξεκινάει άμεσα με την αλληλεπίδραση μεταξύ των ριζών και των ριζοβίων και δίνει το σινιάλο για την έναρξη της μόλυνσης. Τα βακτήρια «παγιδεύονται» στο άκρο του ριζικού τριχιδίου το οποίο κάμπτεται και μέσω αυτής της διαδικασίας αρχίζει ο σχηματισμός του νήματος μόλυνσης (Oldroyd et al, 2011).

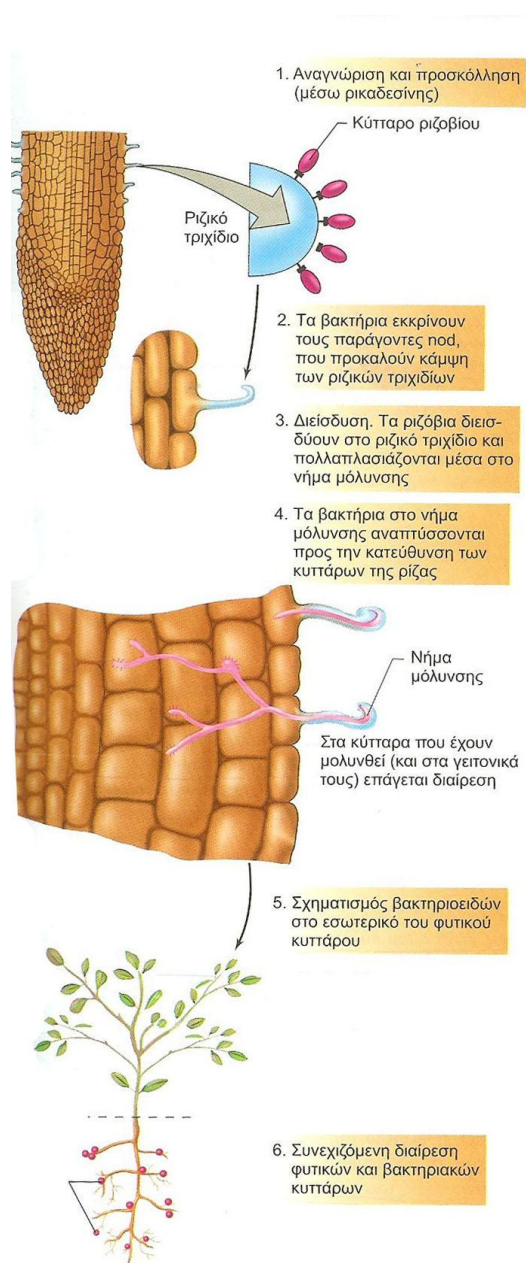
άζωτο της ατμόσφαιρας σε αμμωνία, μέσω της διαδικασίας της αζωτοδέσμευσης. Για την επαγωγή του σχηματισμού των φυματίων είναι απαραίτητα βακτηριακά σινιάλα και άλλοι καθοριστικοί παράγοντες. Η διαδικασία του σχηματισμού των φυματίων χαρακτηρίστηκε ως «μοριακός διάλογος» μεταξύ φυτών και βακτηρίων στις αρχές του 1990. Αυτό επειδή για τον σχηματισμό των φυματίων έχει παρατηρηθεί έντονη συμμετοχή διαφόρων μορίων όπως φλαβονοειδή (εκκρινόμενα από τα φυτά-ξενιστές) και λιποπολυσακχαρικοί παράγοντες, οι λεγόμενοι παράγοντες Nod που παράγονται από τα ριζόβια (Cooper, 2007; Bellato et al., 1997). Οι παράγοντες Nod ενεργοποιούν πολλές αποκρίσεις από την πλευρά του φυτού-ξενιστή, όπως τον ανασχηματισμό των ριζικών τριχιδίων, την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που συμβάλουν στην επιτυχημένη συμβιωτική σχέση και τις διαιρέσεις των κυττάρων του κεντρικού κυλίνδρου του βλαστού του φυτού που οδηγούν στον σχηματισμό του φυματίου (Ontsyna et al, 2003). Ο σχηματισμός των φυματίων είναι εξειδικευμένος δηλαδή συμβαίνει αποκλειστικά μεταξύ συγκεκριμένων ειδών φυτών με συγκεκριμένα είδη βακτηρίων. Η αναγνώριση του βακτηρίου από το φυτό ξενιστή και το αντίθετο γίνεται από συγκεκριμένα μόρια που βρίσκονται εξωτερικά στις μεμβράνες όπως υδατάνθρακες, λιποπολυσακχαρίτες, κυκλικές β-γλουκάνες και αντιγόνα K. Στελέχη ριζοβίων τα οποία είναι ανίκανα να παράγουν τα παραπάνω μόρια έχει παρατηρηθεί ότι δεν προχωρούν στην διαδικασία της συμβίωσης (Staehelin et al, 2006).

Για να επιτευχθεί η συμβιωτική σχέση μεταξύ ψυχανθών και ριζοβίων απαραίτητες είναι δύο αναπτυξιακές διαδικασίες: η οργανογένεση του φυματίου και η βακτηριακή μόλυνση. Παρ'όλο που οι δύο αυτές διαδικασίες ελέγχονται γενετικά πρέπει να συντονίζονται επίσης χρονικά και τοπικά για να διασφαλιστεί ο σχηματισμός του φυματίου με την μόλυνση από το βακτήριο (Oldroyd et al, 2008). Πρώτο βήμα στη συμβίωση ψυχανθών και ριζοβίων είναι η προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό. Όλα τα είδη των γενών *Rhizobium* και *Bradyrhizobium* έχουν στην επιφάνεια τους μια ειδική πρωτεΐνη την ρικαδεσίνη. Η ρικαδεσίνη είναι μια ασβεστιοδεσμευτική πρωτεΐνη που ενδέχεται να σχηματίζει σύμπλοκα ασβεστίου με την επιφάνεια των ριζικών τριχιδίων. Στην προσκόλληση του βακτηρίου στο φυτό συμμετέχουν και

ορισμένες άλλες ουσίες, όπως οι γλυκο-συνδεόμενες πρωτεΐνες, οι λεκτίνες. Η αρχική διείσδυση των κυττάρων των ριζοβίων στα ριζικά τριχίδια γίνεται από το άκρο των ριζικών τριχιδίων. Μετά την προσκόλληση, το ριζικό τριχίδιο κάμπτεται λόγω της δράσης ορισμένων βακτηριακών ουσιών που ονομάζονται παράγοντες Nod.

Στη συνέχεια, το βακτήριο εισέρχεται στο ριζικό τριχίδιο και επάγει τον σχηματισμό του νήματος μόλυνσης, ενός σωληνοειδούς αγωγού από κυτταρίνη, ο οποίος παράγεται από τα φυτικά κύτταρα και εκτείνεται σε όλο το μήκος του ριζικού τριχιδίου. Ο σχηματισμός του νήματος μόλυνσης έχει ως συνέπεια την εξάπλωση της μόλυνσης από τα μολυσμένα ριζικά τριχίδια προς όλο και περισσότερα υγιή κύτταρα των γειτονικών τμημάτων της φυτικής ρίζας, ενώ παράλληλα οι παράγοντες Nod διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της ρίζας, διαδικασία που οδηγεί στο σχηματισμό του φυματίου.

Στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, τα ριζόβια πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και μετασχηματίζονται σε διογκωμένες, παραμορφωμένες και διακλαδισμένες δομές που ονομάζονται βακτηριοειδή. Τα βακτηριοειδή περικλείονται, το καθένα χωριστά ή σε μικρές ομάδες, από τμήματα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του φυτικού κυττάρου και σχηματίζουν μορφώματα που φέρουν τη συλλογική ονομασία συμβιώσωμα. Μόνο μετά τον σχηματισμό του



Εικόνα 2: Διαδικασία αποικισμού των φυτικών ριζών από συμβιωτικά βακτήρια (Madigan et al, 2005).

συμβιωσώματος μπορεί να ξεκινήσει η αζωδέσμευση. Όταν το φυτό νεκρωθεί, τα φυμάτια αποδιατάσσονται και τα βακτήρια απελευθερώνονται στο έδαφος. Τα βακτηριοειδή δεν μπορούν να αναπαραχθούν, αλλά κάθε φυμάτιο περιέχει ένα μικρό αριθμό ραβδόμορφων κυττάρων που βρίσκονται σε λήθαργο. Έτσι, με τον θάνατο του φυτού αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται, χρησιμοποιώντας ως θρεπτικές ουσίες μερικά από τα προϊόντα αποικοδόμησης του φυματίου. Τα νέα βακτήρια μπορούν πλέον να μολύνουν νέες ρίζες ή να ζήσουν μη συμβιωτικά στο έδαφος.

Η σχέση ριζοβίων-ψυχανθών είναι μια πραγματική συμβίωση αφού κάθε εταίρος προσφέρει καταφανώς κάτι συγκεκριμένο στον άλλο. Από τη μία μεριά το δεσμευμένο άζωτο ωφελεί τα φυτά που ζουν σε αζωτοπενικά εδάφη και από την άλλη το φυμάτιο παρέχει φυσική προστασία και αφθονία τροφής στα ριζόβια. Πουθενά αλλού στη μικροβιολογία δεν βλέπουμε μια τόσο καλά ανεπτυγμένη και αμοιβαία επωφεληή σχέση φυτού-βακτηρίου όσο η συμβίωση ριζοβίων-ψυχανθών. Επιπλέον, το όφελος για τη γεωργία από τους τουλάχιστον 120 εκατομμύρια τόνους ατμοσφαιρικού αζώτου που μετατρέπονται ετησίως σε αμμωνία είναι τεράστια.

2.2. Ριζόβια

Στο έδαφος υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών, βακτήρια, μύκητες, ακτινομύκητες και φύκη. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους είναι σημαντικοί επειδή επηρεάζουν τις χημικές, φυσικές και βιολογικές ιδιότητες του εδάφους συμμετέχοντας σε μεγάλο αριθμό διεργασιών.

Μεταξύ των μικροοργανισμών του εδάφους, υπάρχει μια ξεχωριστή κατηγορία βακτηρίων, τα ριζόβια τα οποία έχουν θετική επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών και συγκεκριμένα των ψυχανθών. Τα ψυχανθή συνιστούν μια πολυμελή ομάδα φυτών που χαρακτηρίζονται από λοβώδεις καρπούς, στην οποία ανήκουν φυτά με μεγάλη οικονομική σημασία, όπως η σόγια, το τριφύλλι, τα λούπινα, τα φασόλια, ο αρακάς κ.λπ. Επειδή πολλά εδάφη είναι εκ φύσεως φτωχά σε άζωτο, τα ψυχανθή με ριζικά φυμάτια έχουν στις συγκεκριμένες συνθήκες συγκριτικό πλεονέκτημα και μπορούν να αναπτυχθούν καλά σε περιοχές στις οποίες άλλα φυτά αδυνατούν.

Τα ριζόβια διακρίνονται από την ικανότητα τους να ζουν είτε ελεύθερα στο έδαφος είτε να σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά ξενιστές. Χαρακτηριστικά γένη αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων είναι τα *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* και *Azorhizobium* τα οποία είναι αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια με ικανότητα αυτοτελούς κίνησης. Μόλυνση της ρίζας ψυχανθούς με τα προαναφερθέντα οδηγεί στον σχηματισμό ριζικών φυματίων (Εικ. 3), τα οποία μπορούν να ενσωματώσουν αέριο άζωτο σε ενώσεις του αζώτου με μια διαδικασία που ονομάζεται δέσμευση αζώτου, ή αζωτοδέσμευση. Για να επιτευχθεί η συμβίωση μεταξύ φυτού βακτηρίου είναι απαραίτητη η αναγνώριση του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους από τα φυτό.



Εικόνα 3: Ριζικά φυμάτια. Τα φυμάτια αναπτύσσονται μετά από μόλυνση του φυτού με κάποιο από τα γένη των ριζοβίων (Science Photo Library).

Πίνακας 1: Οι κυριότερες ομάδες ψυχανθών διασταυρούμενου εμβολιασμού

Φυτικός ξενιστής	Φυματογόνος μικροοργανισμός
Αρακάς	<i>Rhizobium leguminosarum</i> βιοποικιλία <i>viciae</i>
Φασόλι	<i>Rhizobium leguminosarum</i> βιοποικιλία <i>phaseoli</i> , <i>Rhizobium tropici</i>
Λωτός	<i>Mesorhizobium loti</i>
Τριφύλλι	<i>Rhizobium leguminosarum</i> βιοποικιλία <i>trifolii</i>
Λούπινο	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
Σόγια	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>Bradyrhizobium elkanii</i>

2.3. *Bradyrhizobium japonicum*

Το *Bradyrhizobium japonicum* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδόμορφο, αζωτοδεσμευτικό βακτήριο, που σχηματίζει συμβιωτική σχέση με τη σόγια (*Glycine Max*). Ανήκει στην οικογένεια των συμβιωτικών αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων *Rhizobiaceae*. Όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα ριζόβια, το *B. japonicum* έχει μεγάλη γεωργική σημασία καθώς αυξάνει σημαντικά τις ποσότητες διαθέσιμου αζώτου στο έδαφος και επιπλέον λόγω της ικανότητάς του να δημιουργεί συμβιωτικές σχέσεις με φυτά σόγιας (Kaneko, 2002). Η εκδήλωση της συμβιωτικής σχέσης, όπως και σε όλα τα συμβιωτικά και αζωτοδεσμευτικά βακτήρια, γίνεται από την άκρη των ριζικών τριχιδίων από όπου εισέρχεται το βακτήριο στη ρίζα της σόγιας και σχηματίζει τα φυμάτια. Στο φυμάτιο το βακτήριο παίρνει την μορφή «συμβιοσώματος». Σε αυτή την συμβιωτική σχέση υπάρχει διπλή ωφέλεια, το φυτό προσφέρει ένα ασφαλές περιβάλλον για το βακτήριο και επιπρόσθετα το εφοδιάζει με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία, κυρίως με πηγή άνθρακα, η οποία λειτουργεί ως πηγή ενέργειας για το βακτήριο.

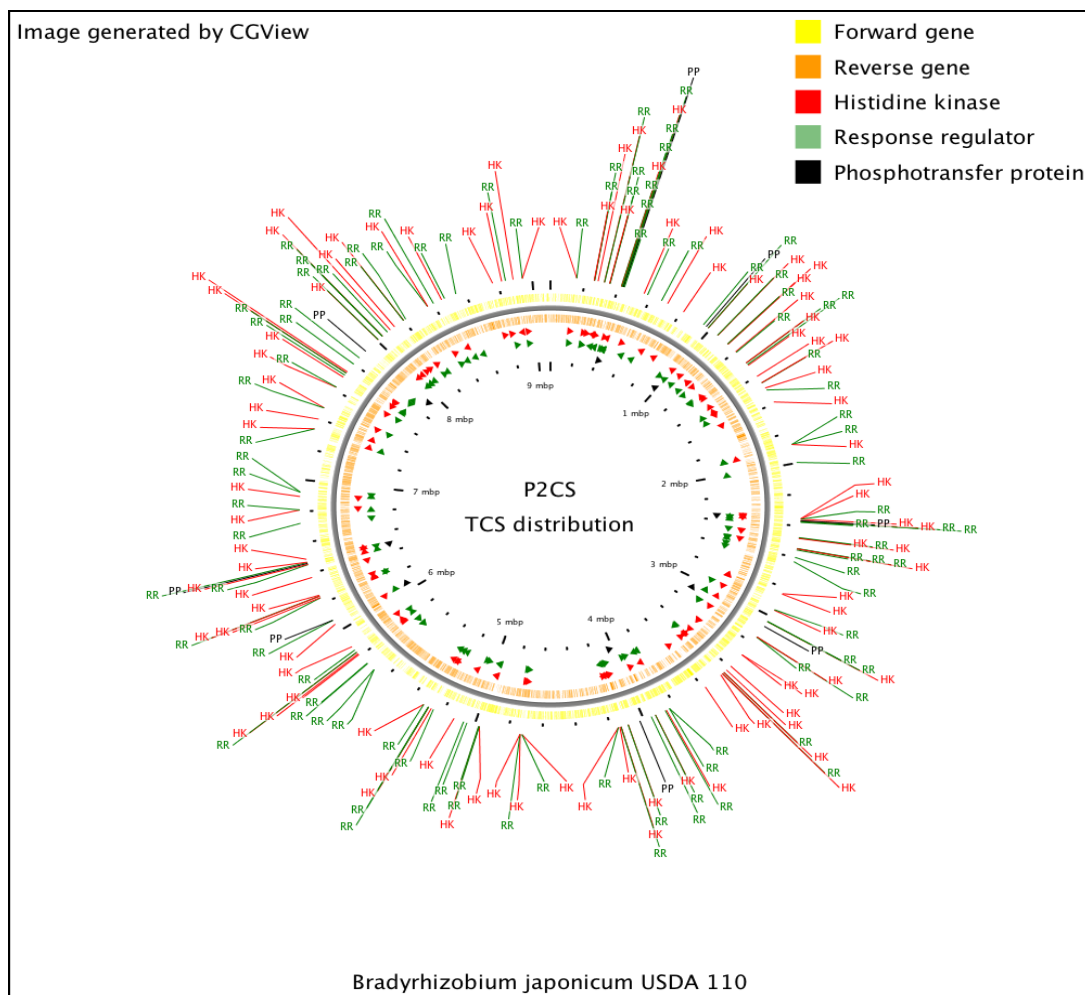
Το γονιδίωμα του *Bradyrhizobium japonicum* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 9,105,828 ζευγών νουκλεοτιδίων με μέσο περιεχόμενο σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη 64.1% (Hayashi & Kojima, 2008), ενώ δεν έχει ανιχνευτεί παρουσία πλασμιδίου στο γονιδίωμα του (Εικ. 4). Περιέχει 8317 πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, μια ομάδα γονιδίων rRNAs και 50 γονίδια tRNAs. Το 52% των παραπάνω γονιδίων του κωδικοποιούν πιθανά για πρωτεΐνες οι οποίες έχουν γνωστή λειτουργία, ενώ το 30% αντιστοιχούν σε υποθετικά γονίδια. Το υπόλοιπο 18% των γονιδίων δεν έχουν σαφή ομοιότητα με γνωστά γονίδια. Το 43% των γονιδίων του *Bradyrhizobium japonicum* έδειξαν ομοιότητα ως προς την αλληλουχία με αντίστοιχα γονίδια στα βακτήρια *Mesorhizobium loti* και *Sinorhizobium meliloti* (Kaneko, 2002).

2.4. Διαμόρφωση του μηχανισμού άμυνας του ξενιστή κατά τον σχηματισμό συμβιωτικών σχέσεων

Τα ριζόβια έχουν εξελιχθεί ώστε να μειώνουν ή να παρακάμπτουν την ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος του ξενιστή. Για να αποφύγουν την αναγνώριση από το φυτό, οι «επιτυχημένοι» μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει

τρόπους για να παρεμποδίσουν την αναγνώριση των μορίων τους από το φυτό.

Η μαστιγίνη είναι μία από της πιο χαρακτηριστικές βακτηριακές πρωτεΐνες αφού είναι η κύρια πρωτεΐνη του μαστιγίου τους. Η πρωτεΐνη αυτή είναι το πιο κοινό μόριο που αναγνωρίζεται από τα φυτά ως μοριακό πρότυπο που σχετίζονται με μικροοργανισμούς (microbe associated molecular pattern-MAMP). Στο *Arabidopsis*, η μαστιγίνη προσδένεται σε ειδικό υποδοχέα στα φυτικά κύτταρα και αρχίζει ένας καταρράκτης αντιδράσεων ο οποίος τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση του μηχανισμού άμυνας των φυτών. Η επαγωγή του αμυντικού συστήματος γίνεται συγκεκριμένα από το συντηρημένο αμινο-



Εικόνα 4: Χάρτης γονιδιώματος *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110.

Πηγή της εικόνας:

<http://www.p2cs.org/page.php?base=BrajaDB&PHPSESSID=741c305d2442fd43a5876a50938097e3>

τελικό άκρο της μαστιγίνης.

Έχει δειχτεί ότι στο *Sinorhizobium meliloti*, το μόριο της μαστιγίνης παρουσιάζει διαφορές στο αμινο-τελικό άκρο και με αυτό τον τρόπο δεν αναγνωρίζεται από το φυτό- ξενιστή (Felix et al, 1999). Γενικά, θεωρείται ότι η επιλεκτική πίεση που έχει ασκηθεί από τους υποδοχείς της μαστιγίνης των φυτών στα βακτήρια έχει οδηγήσει, στην διατήρηση μεταλλαγών στον ενεργό επίτοπο της μαστιγίνης και κατά συνέπεια, στην εξέλιξη βακτηριακών συμβιωτικών ειδών τα οποία δεν επάγουν τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού.

Τα ριζόβια μετά την αναγνώριση του μοριακού μικροβιακού σινιάλου αρχικά μπαίνουν σε κατάσταση άμυνας η οποία όμως σταδιακά παύει. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες στο *Medicago truncatula* έχουν δείξει μία συγκεκριμένη επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την καταπόνηση και την άμυνα. Παρόλα αυτά, έχει δειχθεί ότι τα ίδια γονίδια καταστέλλονται σε μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης της συμβίωσης κάτι που υπονοεί την πιθανή καταστολή τους από μόρια των μικρο-συμβιωτών (El Yahyaoui et al, 2004).

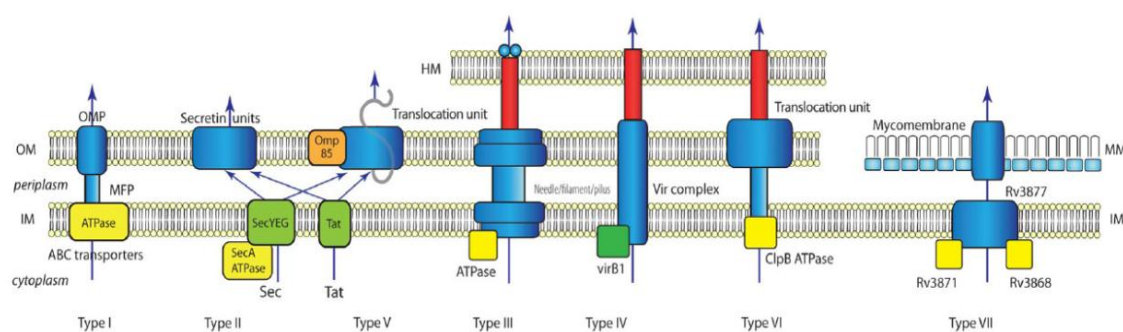
Πολλά μόρια προερχόμενα από τα ριζόβια έχει δειχτεί ότι δρουν σαν μοριακά μοτίβα και ενεργοποιούν τους αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού. Τέτοια μόρια θεωρούνται και οι λιποπολυσακχαρίτες (ΛΠΣ) και οι εξωπολυσακχαρίτες (ΕΠΣ). Οι ΛΠΣ αποτελούν δομικά στοιχεία της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και γενικά είναι χαρακτηριστικά βακτηρίων που σχετίζονται με φυτά (Zeidler et al, 2004). Καθαρισμένοι ΛΠΣ προκαλούν τυπική ενεργοποίηση της άμυνας του φυτού σε μη συμβιωτικά φυτά καπνού. Εν αντιθέσει, κυτταρικές καλλιέργειες *Medicago sativa* είχαν πολύ μικρή απόκριση στους ΛΠΣ του *S. meliloti* (Albus et al, 2001). Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι ΛΠΣ ίσως δρουν κατασταλτικά για τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών κάτι το οποίο χρίζει περαιτέρω διευκρίνισης. Το γεγονός όμως ότι οι ΛΠΣ από το *S. meliloti* επάγουν την φυτική άμυνα σε φυτά μη-ξενιστές, ενώ σε φυτά ξενιστές την καταστέλλουν αποτελεί ισχυρή ένδειξη του ότι τα ψυχανθή έχουν εξελίξει ένα πολύπλοκο και ιδιαίτερο σύστημα αναγνώρισης των μοριακών σινιάλων. Αυτό το σύστημα τους δίνει την ικανότητα να αποκρίνονται διαφορετικά σε παθογόνα και διαφορετικά σε συμβιωτικά βακτήρια.

Οι εξωπολυσακχαρίτες είναι μόρια μεγάλου μοριακού βάρους που εκκρίνονται από αρνητικά κατά Gram βακτήρια και έχουν καλά χαρακτηρισμένη λειτουργία όσον αφορά τον ρόλο τους στην φυσιολογία και στην παθογένεια των βακτηρίων. Οι οξικοί ΕΠΣ είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη της συμβιωτικής σχέσης με τα ριζόβια. Οι εξωπολυσακχαρίτες καταστέλλουν το αμυντικό σύστημα των φυτών λόγω της ιδιότητάς τους να χηλοποιούν τα ιόντα ασβεστίου και με αυτό τον τρόπο να μπλοκάρουν την ροή ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η ροή ασβεστίου είναι απαραίτητη διαδικασία για την ενεργοποίηση πολλών φυτικών αμυντικών αποκρίσεων έναντι μικροβιακών μορίων (Aslam et al, 2008).

Ένας άλλος τρόπος καταστολής της φυτικής άμυνας από τους μικροοργανισμούς είναι η καταστολή αμυντικών μηχανισμών που σχετίζονται με το σαλικυλικό οξύ, χρησιμοποιώντας το μονοπάτι των γονιδίων *nod* (Peleg-Grossman et al., 2009).

2.5. Εκκριτικά συστήματα βακτηρίων

Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μεθόδους ώστε να έρχονται σε επαφή με τον περιβάλλοντα σε αυτούς χώρο. Στον άνθρωπο η ικανότητα να έρχεται σε επαφή με τα αντικείμενα γύρω του εξαρτάται από την αίσθηση της αφής η οποία βασίζεται στην λήψη σημάτων από τα νευρικά κύτταρα, και την μεταγωγή τους στον εγκέφαλο όπου γίνεται η



Εικόνα 5: Επισκόπηση των γνωστών βακτηριακών εκκριτικών συστημάτων. Μία απλουστευμένη αναπαράσταση των βασικών στοιχείων κάθε εκκριτικού συστήματος. HM: Μεμβράνη του ξενιστή, OM: εξωτερική μεμβράνη, IM: εσωτερική μεμβράνη, MM:μυκομεμβράνη, OMP: εξωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη, MFP:μεμβρανική fusion πρωτεΐνη. Οι ATPασες και οι σαπερόνες συμβολίζονται με κίτρινο (Tseng et al, 2009).

επεξεργασία. Τα βακτήρια, κατά αντιστοιχία, έχουν αναπτύξει διαφορετικούς τρόπους για να «αισθάνονται» το περιβάλλον που τα περιβάλλει. Πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια που είναι είτε παθογόνα είτε σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με τα φυτά, τα έντομα ή τα ζώα, έχουν αναπτύξει πολύπλοκες μηχανές για να μεταφέρουν διάφορες βακτηριακά εκφραζόμενες πρωτεΐνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα με σκοπό την τροποποίηση της κυτταρικής φυσιολογίας και της ανάπτυξης του κυττάρου στόχου. Τα εκκριτικά αυτά συστήματα έχουν κατανεμηθεί σε επτά κύριες κατηγορίες, τύπου ένα μέχρι επτά. Τουλάχιστον τρία από αυτά τα συστήματα έχουν μελετηθεί διεξοδικά και είναι γνωστά σαν τύπου III, τύπου IV και τύπου VI εκκριτικά βακτηριακά συστήματα (Christie et al., 2005). Πολλές ερευνητικές εργασίες έχουν επικεντρωθεί στα παραπάνω συστήματα αφού παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεια διαφόρων παθογόνων βακτηρίων.

Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κάποιες εκκρινόμενες πρωτεΐνες εκκρίνονται μέσω της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου σε ένα μόνο βήμα μέσω των εκκριτικών συστημάτων τύπου I, III, IV και VI. Άλλες πρωτεΐνες εκκρίνονται πρώτα στον περιπλασμικό χώρο με την βοήθεια του καθολικού συστήματος Sec ή του μονοπατιού των δύο αργινινών (Tat) και μετά κατευθύνονται στο εξωτερικό του κυττάρου μέσω των εκκριτικών συστημάτων τύπου II και τύπου V και ακόμα πιο σπάνια μέσω των συστημάτων I, IV.

Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες συνήθως μεταφέρονται μέσω του συστήματος Sec ή του Tat. Παρόλα αυτά, στα θετικά κατά Gram βακτήρια όπως τα μυκοβακτήρια που έχουν υδρόφοβο και σχεδόν αδιαπέραστο κυτταρικό τοίχωμα, που ονομάζεται μυκομεμβράνη, ένα εξειδικευμένο τύπου VII εκκριτικό σύστημα εκκρίνει τις πρωτεΐνες στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω της μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος (Tseng et al., 2009).

2.6. Τύπου III εκκριτικό σύστημα

Τα φυτικά και ζωικά παθογόνα μικρόβια έχουν αναπτύξει έναν εξειδικευμένο μηχανισμό έκκρισης των μορίων τους, που καλείται τύπου τρία εκκριτικό σύστημα (T3ES). Μέσω αυτού του συστήματος εκκρίνουν πρωτεΐνες τελεστές απευθείας στα κύτταρα του ξενιστή (McCann & Guttman, 2008).

Από μελέτες έχει προκύψει ότι πολλές πρωτεΐνες τελεστές που εκκρίνονται από Τ3ΕΣ έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών ή να τροποποιούν συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια του ξενιστή προς όφελος τους (Boller & Felix, 2009) . Εκτός από τα παθογόνα, λειτουργικά Τ3ΕΣ έχουν βρεθεί και σε πολλά ριζόβια (Krause et al., 2002). Στα ριζόβια τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό του Τ3ΕΣ (*tts genes*) είναι οργανωμένα σε οπερόνια στο γονιδίωμα, τα οποία είναι ομόλογα με τα γονίδια *hrc* (hypersensitive response conserved) των παθογόνων βακτηρίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας στα φυτά. Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα Τ3ΕΣ των ριζοβίων είναι γνωστές ως Nops (**N**odulation **o**uter **p**roteins) (Marie et al, 2001) . Αυτές οι πρωτεΐνες διακρίνονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες έκκρισης και πρωτεΐνες τελεστές, οι οποίες είτε εκκρίνονται από τα βακτήρια στο εξωκυττάριο μέσο είτε μεταφέρονται στα κύτταρα του ξενιστή, αντίστοιχα. Ο ρόλος των πρωτεϊνών τελεστών στον σχηματισμό φυματίων δεν είναι πλήρως γνωστός, παρόλο που κάποιιοι από αυτούς έχει δείχτει ότι επηρεάζουν τον σχηματισμό φυματίων σε σχέση πάντα με το είδος του ξενιστή (Marie C et al., 2003).

Στις πρωτεΐνες Nops έχει παρατηρηθεί ομολογία με πρωτεΐνες τελεστές από παθογόνους μικροοργανισμούς φυτών και ζώων (Deakin & Broughton , 2009), κάτι που ενισχύει την άποψη ότι οι στόχοι των πρωτεϊνικών τελεστών στα κύτταρα του ξενιστή είναι συντηρημένοι (Buttner & Bonas, 2003) .

Σε αντίθεση με τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εξαρτώνται από λειτουργικά Τ3ΕΣ για να εκδηλώσουν παθογένεια, αυτό δεν συμβαίνει και στα ριζόβια. Από μελέτες έχει προκύψει ότι ακόμη και ριζόβια τα οποία στερούνται λειτουργικά Τ3ΕΣ είναι ικανά να εκδηλώσουν μία επιτυχημένη συμβιωτική σχέση, να σχηματίσουν φυμάτια και να δεσμεύσουν ατμοσφαιρικό άζωτο. Το Τ3ΕΣ στα ριζόβια είναι πιθανόν να είναι υπεύθυνο για την καταστολή των αμυντικών μηχανισμών του φυτού, μία λειτουργία η οποία πιθανόν να υπερέχει των άλλων μηχανισμών που εφαρμόζει το βακτήριο για να καταστείλει την άμυνα του φυτού, δηλαδή τους επιφανειακούς πολυσακχαρίτες και τους παράγοντες Nod. Γενικά υποστηρίζεται ότι από το μίγμα των πρωτεϊνών τελεστών που εκκρίνουν τα βακτήρια από το Τ3ΕΣ,

κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την επαγωγή ενώ άλλες για την καταστολή των αμυντικών μηχανισμών του φυτού.

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III των παθογόνων μικροοργανισμών είναι απαραίτητο για την επικοινωνία μεταξύ των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και των ευκαρυωτικών οργανισμών (Tampakaki et al., 2004) και ορίζεται σαν μία μηχανή υπεύθυνη για την μεταφορά πρωτεϊνών μεταξύ δύο διαφορετικών βασιλείων και η οποία:

- Μπορεί να μεταφέρει προκαρυωτικές πρωτεΐνες οι οποίες ποικίλουν δομικά, μέσω των δύο βακτηριακών μεμβρανών και της μεμβράνης του ευκαρυωτικού κυττάρου, απευθείας στο κυτταρόπλασμα του φυτού.
- Ενεργοποιείται όταν το παθογόνο βρεθεί κοντά στα κύτταρα του ξενιστή
- Λειτουργεί *in vitro* σε συνθήκες που προσομοιάζουν παραμέτρους κλειδιά του περιβάλλοντος του ξενιστή

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III είναι συντηρημένο στα παθογόνα φυτών και ζώων ενώ οι εκκρινόμενες από αυτό πρωτεΐνες διαφέρουν σημαντικά όπως και οι ασθένειες που προκαλούνται που μπορεί να είναι από βουβωνική πανώλη μέχρι σηψαιμία στον άνθρωπο και στα φυτά τοπικές βλάβες, διασυστηματικό μαρασμό και σήψη.

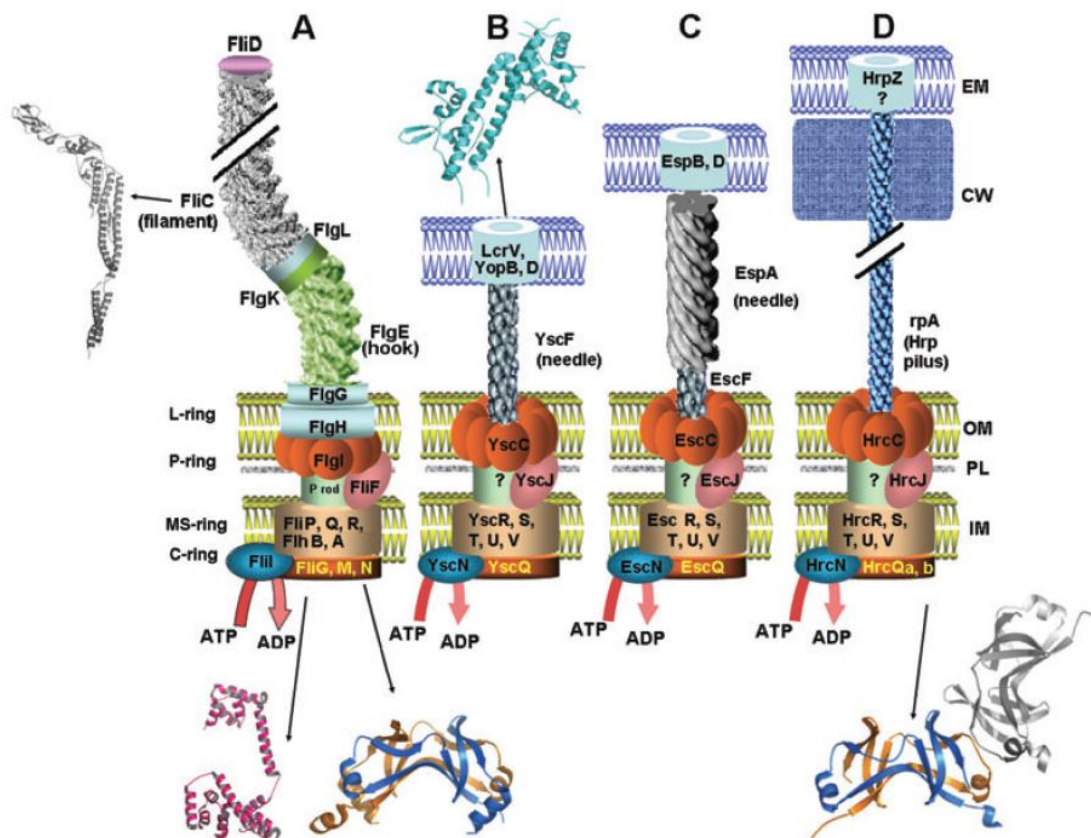
2.6.1. Δομικά στοιχεία εκκριτικού συστήματος τύπου III

Για την μελέτη της δομής του εκκριτικού συστήματος τύπου III έχει γίνει χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας η οποία έχει αποκαλύψει την δομή του συστήματος αυτού σε παθογόνα μικρόβια ζώων (*Salmonella*, *Shigella*, *EPEC*), ενώ σε φυτικά παθογόνα έχει διευκρινιστεί μόνο το εξωκυτταρικό μέρος του συστήματος (Kubori et al., 1998; Tamano et al., 2000; Sekiya et al., 2001; He & Jin, 2003). Αυτές οι μελέτες έδειξαν μία βασικά κοινή δομή η οποία παρουσιάζει εξαιρετική ομοιότητα με το βακτηριακό μαστίγιο (βάση και σώμα του μαστιγίου). Αποτελείται από δύο βασικά δομικά στοιχεία:

- Μία εκτεταμένη, κοίλη εξωκυτταρική δομή, που ονομάζεται βελόνα στα ζωικά παθογόνα και «Hrp αγωγός» στα φυτικά,
- Μία κυλινδρική βάση, όμοια με το βασικό σώμα του μαστιγίου, η οποία διαπερνάει τις δύο μεμβράνες του βακτηρίου και

διασφαλίζει τη σταθερότητα της κατασκευής στηριζόμενη στον κυτταρικό φάκελο.

- Έχει επίσης παρατηρηθεί μία ακόμη χαρακτηριστική δομή η οποία προεξέχει από την εσωτερική μεμβράνη, στο βακτηριακό κυττοσόλιο και αναφέρεται ως βολβός (bulb) και έχει κυρίως παρατηρηθεί κατά την σύσταση του εκκριτικού συστήματος στην *Shigella* (Blocker et al., 1999). Η συγκεκριμένη δομή είναι ανάλογη ενός κυτταροπλασματικού συμπλόκου του μαστιγίου που συντίθεται από την ATPάση και άλλες πρωτεΐνες και του οποίου μέρος μπορεί να προσομοιάζει το C δακτύλιο του μαστιγίου.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού μαστιγίου (A) και του εκκριτικού συστήματος τύπου III στα βακτήρια *Yersinia* (B), *Escherichia coli* (C) και *Pseudomonas syringae* (D). Το βασικό σώμα του βακτηρίου αποτελείται από πρωτεΐνες οργανωμένες στους δακτυλίους C-, MS-, P- και L-. Μόνο οι συντηρημένες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος έχουν συμπεριληφθεί στο σχήμα και είναι επισημασμένες σε ίδια θέση και όμοιο χρώμα (Tampakaki et al, 2004).

Το εξωκυτταρικό μέρος του εκκριτικού συστήματος διαφέρει μεταξύ φυτικών και ζωικών παθογόνων. Ο εκκριτικός αγωγός είναι μία λεπτή, μακριά και

ελαστική δομή σε αντίθεση με την βελόνα που είναι κοντή και πιο συμπαγής. Οι δύο αυτές δομές είναι φυσικά συνδεδεμένες με το βασικό σώμα του εκκριτικού συστήματος και θεωρείται ότι επιτελούν ανάλογες λειτουργίες. Θεωρείται ότι αυτές οι δομές είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των βακτηρίων στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και σκοπός της λειτουργίας τους είναι η μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών στο φυτικό κυτταρόπλασμα. Παρόλο που ο πρώτος τους ρόλος στην προσκόλληση στην μεμβράνη μένει να διερευνηθεί, υπάρχουν ξεκάθαρες αποδείξεις για τον δεύτερο ρόλο τους, οι οποίες δείχνουν ότι η έκκριση πρωτεϊνών από τον αγωγό συμβαίνει μόνο από την άκρη του εκκριτικού αγωγού (Jin et al., 2001).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III είχαν αρχικά περιγραφεί ως οργανωμένα σε ομάδες γονιδίων που ονομάστηκαν *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity).

2.7. Πρωτεΐνες- τελεστές

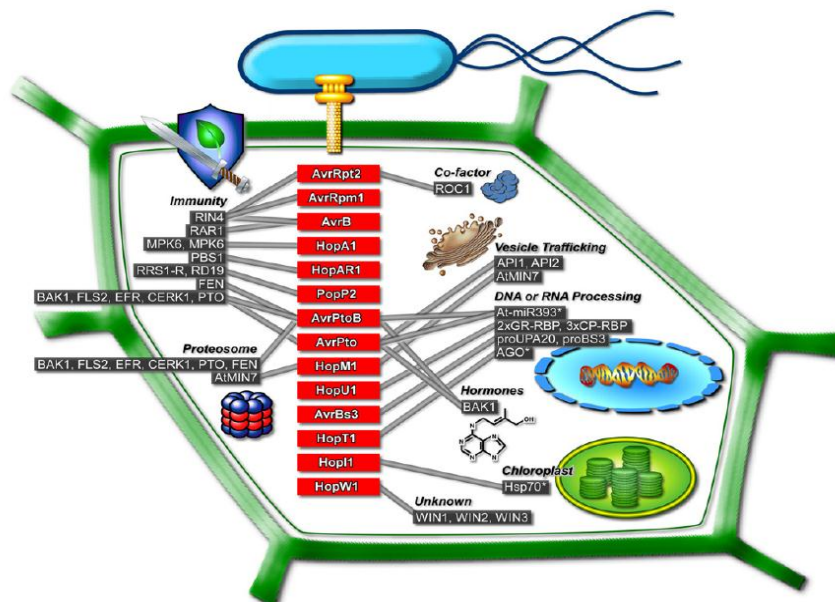
Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρησιμοποιούν τα εκκριτικά συστήματα τύπου III για την μεταφορά πρωτεϊνών τελεστών στους ευκαρυωτικούς ξενιστές τους. Συλλογικά, αυτές οι πρωτεΐνες χρησιμοποιούν το κύτταρο του ξενιστή για την βελτιστοποίηση του ενδοκυτταρικού και διακυτταρικού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη του βακτηρίου και τη διάδοση της ασθένειας που αυτό προκαλεί.

Οι πρωτεΐνες τελεστές διαφοροποιούνται από τις βακτηριακές τοξίνες που είναι επίσης βακτηριακά προϊόντα που έχουν εξωβακτηριακή δράση σε ζωντανά κύτταρα άλλων οργανισμών (Alouf, 2000). Μία βασική διαφορά που διαφοροποιεί τις βακτηριακές τοξίνες από τις πρωτεΐνες τελεστές είναι ότι οι βακτηριακές τοξίνες μπορούν να δράσουν σε μία καλλιέργεια ακόμα και όταν προστεθούν στο μέσο αυτής εξωκυτταρικά, αντίθετα οι πρωτεΐνες τελεστές πρέπει να μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω των ειδικών εκκριτικών συστημάτων. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός μεταφοράς των δύο βακτηριακών προϊόντων δεν είναι η μόνη διαφορά τους. Οι τοξίνες έχουν συνήθως μία μόνο βιοχημική δραστηριότητα η οποία στοχεύει σε ένα μόνο κυτταρικό στόχο, αντίθετα η δράση των πρωτεϊνών τελεστών εξαρτάται από την συντονισμένη δράση ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών τελεστών που εκκρίνονται από το βακτήριο (Mota & Cornelis, 2005). Η δράση των

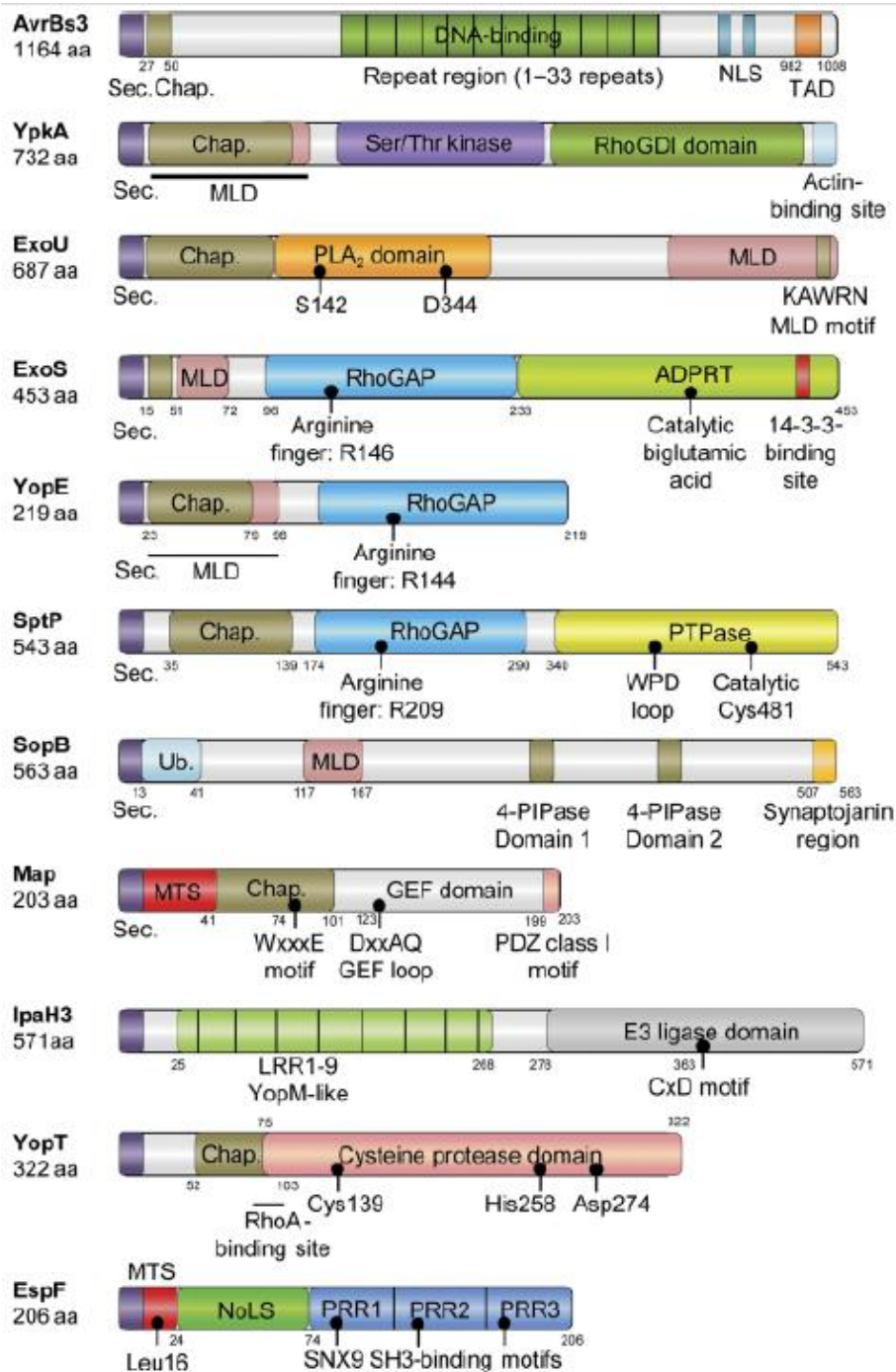
πρωτεϊνών τελεστών είναι περισσότερο συντονισμένη και στοχεύει στην τροποποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών λειτουργιών από το να διακόπτει την κυτταρική ομοιόσταση. Γι' αυτό το λόγο υπάρχουν υπόνοιες ότι η εξέλιξη αυτών των πολύπλοκων μηχανών μεταφοράς πρωτεϊνών έγινε λόγω της ανάγκης μεταφοράς πολλαπλών πρωτεϊνών με συντονισμένο τρόπο ώστε να επιτευχθεί η τροποποίηση πολύπλοκων κυτταρικών λειτουργιών (Galan, 2009).

Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από εκκριτικά συστήματα έχουν την ικανότητα να τροποποιούν ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών και είναι ευρύτερα γνωστές ως «πρωτεΐνες τελεστές». Σε παθογόνα συστήματα τύπου III που στοχεύουν σε ζωικούς οργανισμούς, η μεταφορά των πρωτεϊνών-τελεστών γίνεται πολλές φορές με την βοήθεια σαπερονών, οι οποίες κωδικοποιούνται από γονίδια συνδεδεμένα με αυτά των πρωτεϊνών (Wattiau et al., 1996).

Πολλές πρωτεΐνες τελεστές φυτικών και ζωικών παθογόνων έχουν παρόμοιες λειτουργίες και στόχους, γεγονός που υποδεικνύει ότι στοχεύουν σε συστατικά ή βιοχημικά μονοπάτια που είναι συντηρημένα μεταξύ φυτικών και ζωικών οργανισμών (Lewis et al., 2009). Επίσης, είναι ιδιαίτερα



Εικόνα 7: Φυτικά συστήματα που στοχεύονται από πρωτεΐνες τελεστές των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, οι οποίες εκκρίνονται μέσω του Τ3ΕΣ. Οι άμεσοι στόχοι των πρωτεϊνών-τελεστών ταξινομούνται βασισμένοι στο φυτικό οργανίδιο στο οποίο ανήκουν. Οι γραμμές αναπαριστούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών τελεστών και των κυτταρικών στόχων τους (Lewis et al, 2009).



Εικόνα 8: Αρθρωτή αρχιτεκτονική δομή των πρωτεϊνών-τελεστών που εκκρίνονται από εκκριτικά συστήματα τύπου III. Παραδείγματα πρωτεϊνών-τελεστών οι οποίες διαθέτουν χαρακτηριστικά μοτίβα και περιοχές των πρωτεϊνών-τελεστών (Dean, 2011).

ενδιαφέρον το γεγονός ότι πολλές πρωτεΐνες-τελεστές εμφανίζουν αμινοξικά μοτίβα τα οποία συναντώνται μόνο σε ευκαρυωτικές πρωτεΐνες (Εικ. 8).

Η μοριακή αυτή μιμητικότητα αποτελεί μια «έξυπνη» στρατηγική που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια για να παρακάμψουν την άμυνα του ξενιστή.

Η αποτελεσματική έκκριση και διαμερισματοποίηση πολλών πρωτεϊνών τελεστών εκκρινόμενων από Τ3ΕΣ, είτε σε παθογόνα φυτών είτε σε παθογόνα ζώων, δεν προϋποθέτει μόνο το πρωτεϊνικό σινιάλο αλλά εξαρτάται επίσης από την ικανότητά τους να προσδένονται σε εξειδικευμένες κυτταροπλασματικές σαπερόνες (μόρια συνοδούς) (Ghosh, 2004). Οι σαπερόνες του Τ3ΕΣ είναι μικρές και πλούσιες σε κατάλοιπα λευκίνης πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν διαχωριστεί σε πολλές κατηγορίες βασιζόμενοι στο επίστρωμα με το οποίο αλληλεπιδρούν. Με αυτό το τρόπο χωρίζονται στην κατηγορία IA, σαπερόνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με μία ή περισσότερες ομόλογες πρωτεΐνες τελεστές και πολύ συχνά η κωδικοποιούσα αλληλουχία τους βρίσκεται γενετικά κοντά στην κωδικοποιούσα αλληλουχία της πρωτεΐνης τελεστή. Η δεύτερη κατηγορία σαπερονών είναι η IB, οι οποίες έχουν μικρότερη εκλεκτικότητα και δεσμεύονται σε ευρύ φάσμα πρωτεϊνών τελεστών (Page et al., 2002; Thomas et al., 2005). Σαπερόνες των οποίων η κωδικοποιούσα περιοχή βρίσκεται σε μη συσχετισμένες θέσεις με την κωδικοποιούσα περιοχή της πρωτεΐνης τελεστή κατατάσσονται στην κατηγορία II των σαπερονών (Parsot et al., 2003). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πρόσδεση της σαπερόνης στην πρωτεΐνη τελεστή, συμβάλλει στην σταθεροποίηση της τελευταίας. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία πρόσφατη μελέτη στο βακτήριο *P. syringae*, η οποία έδειξε ότι πρωτεΐνες τελεστές προσδεμένες με σαπερόνη προστατεύονται από την αποδιάταξη που προκαλεί η πρωτεάση Lon (Losada & Hutcheson, 2005).

Οι περισσότερες Τ3ΕΣ σαπερόνες από φυτικά παθογόνα, ταυτοποιήθηκαν στα βακτήρια *E. amylovora* και *P. syringae* και είναι εξειδικευμένες για μία ή περισσότερες πρωτεΐνες τελεστές. Εξαιρέση αποτελεί η σαπερόνη HrpG από το *P. syringae*, η οποία έχει ρυθμιστικό ρόλο. Προσδένεται και αναστέλλει την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη HrpV, μία πρωτεΐνη αρνητικό ρυθμιστή της έκφρασης των γονιδίων *hrp* (Wei et al., 2005; Preston et al., 1998). Η HrpG είναι η πρώτη σαπερόνη που βρέθηκε να έχει ρυθμιστικό ρόλο σε φυτικά παθογόνα. Στα ζωικά παθογόνα, οι ρυθμιστικές σαπερόνες του Τ3Σ δείχτηκε ότι προάγουν την έκκριση αρνητικών ρυθμιστών και /ή ενεργοποιούν τα γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Parsot et al., 2005; Buttner & Bonas, 2006).

2.7.1. Αντίδραση φυτών στις πρωτεΐνες τελεστές

Τα φυτά έχουν αναπτύξει πολύπλοκούς μηχανισμούς αναγνώρισης των βακτηρίων και κατά την μόλυνση μπορούν να συντονίσουν μία εξαιρετικά αποτελεσματική αντίδραση αντιμετώπισης. Η αναγνώριση των μικροβίων συμβαίνει πολύ γρήγορα μετά από την αναγνώριση ξένων προς το φυτό μορίων, τα οποία ενεργοποιούν μια βασική αντίδραση ανθεκτικότητας από τη μεριά του φυτού, η οποία ορισμένες φορές είναι αρκετή για να σταματήσει την μόλυνση (Mackey & McFall, 2006). Παρόλα αυτά, φυτοπαθογόνα βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia amylovora*, και *Ralstonia solanacearum* χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III για να μεταφέρουν μολυσματικές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες τελεστές) στα κύτταρα του ξενιστή όπου αυτές θα καταστείλουν το βασικό αμυντικό σύστημα του φυτού και θα καταστήσουν τα φυτά ευαίσθητα στην ασθένεια (Jones & Dangl, 2006). Το *Pseudomonas syringae pv tomato* εκκρίνει, παραδείγματος χάριν, 30 πρωτεΐνες τελεστές στο φυτικό κύτταρο οι οποίες είναι υπεύθυνες για τον καθορισμό της συγγένειας του ξενιστή και συνολικά είναι απαραίτητες στην εξέλιξη της ασθένειας (Chang et al., 2005).

Τα ανθεκτικά φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να μπορούν να αντιστέκονται ενάντια στην λειτουργία των πρωτεϊνών τελεστών και να αναγνωρίζουν εξειδικευμένα ένα παθογόνο. Αυτά τα φυτά ξεκινούν μία δυναμική αντίδραση άμυνας η οποία χαρακτηρίζεται από τοπικό και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ή αλλιώς αντίδραση υπερευαισθησίας (AY), στο σημείο της μόλυνσης, το οποίο πολλές φορές συμβαίνει ταυτόχρονα με την αναγνώριση της ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού (Scheel, 1998). Παρόλο που ο κύκλος των διαδικασιών που συμμετέχουν στην εκδήλωση υπερευαισθησίας τώρα αρχίζει να μελετάται και δεν είναι ακόμη γνωστός, είναι εμφανές ότι η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι συνδεδεμένη με την φυτική γραμμή άμυνας του φυτού και με προϊόντα γονιδίων ανθεκτικότητας (Resistance genes-R) τα οποία αναγνωρίζουν βακτηριακές πρωτεΐνες αμολυσματικότητας (Avirulence proteins-Avr) (Nimchuk et al., 2003). Το πιο απλό μοντέλο για την έναρξη της άμυνας, που βασίζεται στις πρωτεΐνες R, απαιτεί αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης μεταξύ της πρωτεΐνης Avr του βακτηρίου και της πρωτεΐνης R του φυτού. Μέχρι τώρα μόνο μερικά από αυτά τα συστήματα έχουν χαρακτηριστεί (Deslandes et al.,

2003). Έχει αναπτυχθεί ένα ακόμη μοντέλο το οποίο υποστηρίζει την έμμεση αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης του βακτηρίου με την πρωτεΐνη R του φυτού. Σύμφωνα με αυτό, η πρωτεΐνη Avr του βακτηρίου αναγνωρίζει άλλη πρωτεΐνη στόχο του φυτού, την οποία και τροποποιεί. Το αποτέλεσμα της τροποποίησης αυτής αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη R του φυτού (Jones & Dangl, 2006). Σε αυτή την περίπτωση οι φυτικές πρωτεΐνες R δρουν ως «μοριακές αντένες» που επιτηρούν την τροποποίηση συγκεκριμένων φυτικών πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί από τις πρωτεΐνες Avr του βακτηρίου.

Οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση των πρωτεϊνών R δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί πλήρως, παρόλ' αυτά βιοχημικές και λειτουργικές αναλύσεις για μερικές Avr-R αλληλεπιδράσεις έχουν δείξει τη σημασία της υποκυτταρικής τοποθέτησης των πρωτεϊνών στην ρύθμιση του φυτικού αμυντικού μηχανισμού.

2.7.2. Πρωτεΐνες-τελεστές του *Bradyrhizobium japonicum*

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III έχει μελετηθεί διεξοδικά κυρίως σε παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ λίγη έρευνα έχει γίνει σε αυτό τον τομέα όσον αφορά τα συμβιωτικά βακτήρια. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το *Bradyrhizobium japonicum* χαρακτηρίζεται από λειτουργικό εκκριτικό σύστημα τύπου III και πάνω από 30 γονίδια κωδικοποιούν υποθετικές πρωτεΐνες τελεστές, πολλά εκ των οποίων παρουσιάζουν ομόλογα σε παθογόνα φυτών και ζώων (Göttfert et al., 2001). Πρωτεομική ανάλυση έχει δείξει ότι τουλάχιστον 14 πρωτεΐνες τελεστές εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας (Suss et al., 2006). Μέχρι τώρα, η μοναδική εκκρινόμενη πρωτεΐνη του *Bradyrhizobium japonicum* που έχει μελετηθεί είναι η NopE1 (Wenzel et al., 2010; Schirromeister et al., 2011), παρόλο που ο βιοχημικός ρόλος κάποιων άλλων πρωτεϊνών τελεστών που εκκρίνονται από τα εκκριτικά συστήματα τύπου III μπορεί να προβλεφθεί από μελέτες σε ομόλογες σε αυτές πρωτεΐνες σε άλλα ριζόβια.

2.8. Οικογένεια πρωτεασών YopT

Η οικογένεια YopT παίρνει το όνομά της από την πρωτεΐνη YopT του βακτηρίου *Yersinia*. Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν κοινή δευτεροταγή δομή με τις πρωτεάσες κυστεϊνών. Αυτές οι πρωτεΐνες-τελεστές ανήκουν στην οικογένεια C58 της ομάδας CA (CA clan; πρωτεΐνες όμοιες με την παπαΐνη)

(Shao et al., 2002). Προς το παρόν, αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει 19 γνωστές πρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται στο σύνολό τους από παθογόνα και συμβιωτικά βακτήρια. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας YopT/AvrPphB είναι αυτοπρωτεάσες κυστεΐνης με ένα συντηρημένο καταλυτικό κέντρο τριών αμινοξέων το οποίο αποτελείται από μία κυστεΐνη μία ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό οξύ (D). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό αυτών των πρωτεϊνών είναι ότι παρουσιάζουν θέση εσωτερικής μυριστιλίωσης στο αμινο-τελικό τους άκρο (Shao et al., 2002). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μυριστιλίωση διευκολύνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών τελεστών στην πλασματική μεμβράνη, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την πρόσβαση στις πρωτεΐνες στόχους (Nimchuk et al., 2000).

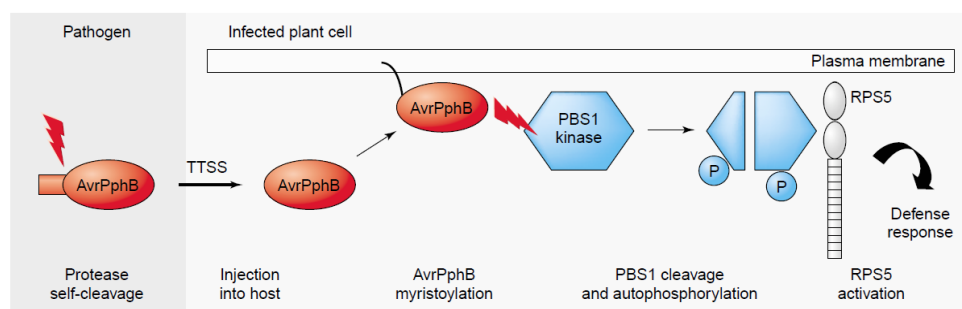
Μέλος αυτής της οικογένειας είναι και η AvrPphB του βακτηρίου *P. syringae*, η ανάλυση της κρυσταλλική της δομής έδειξε ότι το ενεργό της κέντρο προσομοιάζει εκείνο των υπολοίπων πρωτεϊνών της ομάδας CA, επιβεβαιώνοντας την πρωτεολυτική λειτουργία της πρωτεΐνης (Zhu et al, 2004). Περιέργως, τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα που καθορίζουν την σύνδεση με το υπόστρωμα διαφοροποιούνται μεταξύ των μελών της οικογένειας αυτής. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής προσδένονται σε διαφορετικά υποστρώματα και επομένως στοχεύουν διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πειραματική επιβεβαίωση ότι η AvrPphB και η YopT κατέχουν ενζυμική δράση η οποία πρωτεολύει διακριτά υποστρώματα, στηρίζει αυτήν την υπόθεση (Shao et al, 2003; Shao et al, 2002).

2.9. Σύστημα AvrPphB –PBS1 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*

Οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους το παθογόνο ενεργοποιεί την άμυνα του φυτού ξενιστή δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι σήμερα. Η υπόθεση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης του βακτηρίου με συγκεκριμένη πρωτεΐνη στόχο του φυτού έγινε πριν από 40 χρόνια και από τότε υπήρχε υπόνοια ότι η άμυνα του φυτού ενεργοποιείται μόνο με την ταυτόχρονη παρουσία συγκεκριμένου γονιδίου ανθεκτικότητας στο φυτό και γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αμολυσματικότητας στο βακτήριο (*avr gene*) (Flor, 1955). Η απομόνωση πάνω από 30 γονιδίων *R* από διαφορετικά είδη φυτών αποκαλύπτει ότι οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν κοινά μοτίβα

στην περιοχή αλληλεπίδρασης ενώ είναι πλούσιες σε επαναλήψεις λευκίνης (Dangl & Jones, 2001).

Το πιο γνωστό παράδειγμα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών Avr-R έχει αποσαφηνιστεί στο *Arabidopsis thaliana*. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη AvrPphB του *Pseudomonas syringae* ανήκει σε μία νέα οικογένεια πρωτεϊνών, πρωτεάσες κυστεΐνης, και η πρωτεολυτική της δράση είναι απαραίτητη για την επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας στα φυτά του γένους *Arabidopsis* τα οποία φέρουν το γονίδιο ανθεκτικότητας *RPS5*. Η AvrPphB μεταφέρεται από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, αφού μεταλλαγές στο σύστημα αυτό έχουν ως αποτέλεσμα την μη εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας και άρα την εκδήλωση της ασθένειας σε φυτά φασολιάς (Tampakaki et al., 2002).



Εικόνα 9: Μοντέλο δράσης AvrPphB σε φυτά *Arabidopsis* που εμφανίζουν ανθεκτικότητα *RPS5* και τα οποία μολύνονται από το *P. syringae*. Η πρωτεΐνη AvrPphB αυτοπρωτεολύεται πριν από την μεταφορά της στα κύτταρα του ξενιστή. *In planta*, στην AvrPphB γίνονται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της πρωτεΐνης στις μεμβράνες. Η PBS1 αποτελεί στόχο της AvrPphB και πρωτεολύεται. Μετά από αυτοφωσφορυλίωση της PBS1 ενεργοποιείται ο αμυντικός μηχανισμός του φυτού μέσω της πρωτεΐνης RPS5 (Hotson et al, 2004).

Το μοντέλο που έχει προταθεί για το σύστημα αυτό είναι εκείνο της “επιτήρησης” της πρωτεΐνης R, στην συγκεκριμένη περίπτωση της RPS5. Σύμφωνα με αυτό, η πρωτεΐνη AvrPphB μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυτάρου όπου στοχεύει την πρωτεΐνη PBS1 του *Arabidopsis*, την οποία και πρωτεολύει. Το αποτέλεσμα της πέψης ανιχνεύεται από την πρωτεΐνη RPS5, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται διάφοροι μηχανισμοί άμυνας, η φαινοτυπική εκδήλωση των οποίων είναι η εκδήλωση τοπικού

κυτταρικού θανάτου, που ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (Shao et al., 2003).

Το γεγονός ότι η AvrPphB, όταν έχει μεταλλαγμένο ενεργό κέντρο δεν πρωτεολύεται και δεν προκαλεί RPS5-εξαρτώμενη αντίδραση υπερευαισθησίας επιβεβαιώνει την πρόβλεψη ότι πρόκειται για μία πρωτεάση κυστεΐνης. Επιπλέον, εξάγεται το συμπέρασμα ότι απαιτείται η πρωτεόλυση κάποιου υποστρώματος του ξενιστή για την ενεργοποίηση της RPS5. Το υπόστρωμα αυτό, όπως αποδείχθηκε ότι είναι η PBS1, η οποία πρωτεολύεται *in planta* σε δύο επιμέρους πολυπεπτίδια. *In vitro*, η καθαρισμένη AvrPphB αυτοπρωτεολύεται και πρωτεολύει την καθαρή PBS1, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν χρειάζεται επιπλέον παράγοντες του ξενιστή για να δράσει. Η πρωτεόλυση της PBS1 γίνεται μετά την αλληλουχία GDK, η οποία, αν είναι τροποποιημένη παρεμποδίζει την πρωτεόλυσή της από την AvrPphB.

Η πρωτεΐνη AvrPphB είναι μία πρωτεΐνη μεγέθους 35 kDa η οποία αυτοπρωτεολύεται μεταξύ των αμινοξέων Lys⁶² και Gly⁶³ με αποτέλεσμα να σχηματιστούν δύο πολυπεπτίδια βάρους 7 και 28 kDa (Puri et al, 1997). Αμέσως μετά την θέση κοπής της πρωτεΐνης βρέθηκε χαρακτηριστικό μοτίβο τριών αμινοξέων (G²⁴¹D²⁴²K²⁴³) τα οποία εμφανίζονται και στην πρωτεΐνη του φυτού PBS1. Μετά από κατάλληλη πειραματική διαδικασία δείχτηκε ότι η AvrPphB κόβει την PBS1 στη συγκεκριμένη θέση (Shao et al., 2003). Η πρωτεόλυση αυτή εκθέτει μία τυχαία ακολουθία μυριστιλίωσης στο αμινοτελικό άκρο του μεγαλύτερου προϊόντος της πρωτεόλυσης. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το τμήμα αυτό τροποποιείται μέσα στο φυτό και στην συνέχεια οδηγείται στην πλασματική μεμβράνη. Έχει δείχθει ότι η AvrPphB τροποποιείται μετα-μεταφραστικά με την προσθήκη κάποιου λιπαρού οξέος το οποίο συσχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη (Nimchuk et al, 2000).

Σημαντικό επίσης είναι να αναφερθεί ότι για την ανθεκτικότητα μέσω της RPS5 χρειάζονται τόσο η πέψη της PBS1 όσο και η φωσφορυλιωτική της δράση. Αν ληφθούν υπόψη τα παραπάνω συμπεράσματα, είναι πιθανό ότι η αλληλεπίδραση της AvrPphB με την PBS1 στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή απελευθερώνει ένα τμήμα της PBS1 το οποίο είναι πιθανώς

φωσφορυλιωμένο. Το τμήμα αυτό φαίνεται να δρα σαν «μοριακή σκανδάλη» για την ενεργοποίηση της μεταφοράς του σήματος από την RPS5.

Στο *B. japonicum* έχουν βρεθεί δύο πρωτεΐνες, NorT1 και NorT2, οι οποίες παρουσιάζουν ομολογία με μέλη των οικογενειών YopT/AvrPphB. Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III του

B. japonicum και έχουν δράση πρωτεάσης κυστεϊνών. Μελέτες έχουν δείξει (Fotiadis et al., 2011) ότι όταν αυτές οι δύο πρωτεΐνες εκφραστούν στο *E.coli* αυτοπρωτεολύονται. Η πρωτεΐνη NorT1 είναι υπεύθυνη για την εκδήλωση κυτταρικού θανάτου σε φυτά καπνού τα οποία εφαρμόστηκε η τεχνική της μικροέγχυσης με το *Agrobacterium tumefaciens*. Σε αντίθεση με τη NorT1, η πρωτεΐνη NorT2 δεν παρουσιάζει κάποια φαινοτυπική αλλαγή κατά τον ίδιο χειρισμό.

Σκοπός μελέτης

3. Σκοπός μελέτης

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η έκφραση της πρωτεΐνης τελεστή NorT1 που εκκρίνεται από το *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Έγινε προσπάθεια βελτιστοποίησης της έκφρασης και του καθαρισμού της πρωτεΐνης υπό φυσικές συνθήκες μέσω εξοικείωσης με τις διαφορετικές μοριακές τεχνικές που θα το επιτύγχαναν αυτό. Τελικά η βέλτιστη έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης επιτεύχθηκε με την έκφραση της πρωτεΐνης σε μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης, συνδεδεμένης με επίτοπο GST. Ακολούθησε διερεύνηση της δράσης των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης, για τα οποία υπήρχαν ενδείξεις λειτουργίας τους ως μοριακός συνοδός για το λειτουργικό μέρος της πρωτεΐνης NorT1.

Το επόμενο βήμα της μελέτης ήταν η εύρεση πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 στη σόγια μέσω βιοπληροφορικής. Η μελέτη αυτή βασίστηκε στο σύστημα AnrPphB-PBS1 του *Pseudomonas-Arabidopsis* και υπέδειξε δεκατρείς πρωτεΐνες οι οποίες είναι πιθανοί στόχοι της πρωτεΐνης τελεστή NorT1. Τέλος, στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκε φορέας έκφρασης για την υποκλωνοποίηση γονιδίων μέσω της τεχνολογίας Gateway και ελέγχθηκε η λειτουργικότητά του.

Υλικά και μέθοδοι

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

4.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας με αλκαλική λύση

Γίνεται επώαση καλλιέργειας που περιέχει το υπό μελέτη πλασμίδιο στους 37 ° C για 14-16 ώρες. Από αυτή παραλαμβάνονται 3 ml τα οποία φυγοκεντρώνται σε προαποστειρωμένους πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 2 ml για 3 λεπτά στις 13,000 rpm. Γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200μl διαλύματος 50 mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl (pH 8.0). Το επαναιωρημένο ίζημα επωάζεται για 5 λεπτά στο πάγο. Το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη 400μl διαλύματος 0,2 N NaOH και 1% SDS, ανακατεύονται ήπια και επωάζονται στο πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθεται διάλυμα 3M CH₃COOK, ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13,000 rpm στους 4 ° C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο δοκιμαστικό σωλήνα όπου προστίθεται 10mg/ml RNase (DNase free). Ακολουθεί επώαση στους 37 ° C για 20 λεπτά. Προστίθεται ένας όγκος φαινόλη: χλωροφόρμιο, γίνεται ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13,000 rpm και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθεί κατακρήμιση του DNA με διπλάσιο όγκο αιθανόλης και γίνεται επώαση του για 30 λεπτά στους 4 ° C. Τελικά, το διάλυμα φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 13,000 στροφές στους 4 ° C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο δοκιμαστικός σωλήνας αφήνεται να στεγνώσει. Το ίζημα του πλασμιδιακού DNA επαναδιαλύεται σε 30 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού και φυλάσσεται στους -20 ° C για περαιτέρω ανάλυση.

4.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μεσαίας κλίμακας με την βοήθεια κολώνας ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN)

Παραλαμβάνονται 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας φέρουσας το πλασμιδιακό DNA ενδιαφέροντος, η οποία επωάστηκε στους 37 ° C για 14-16 ώρες. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνται σε προαποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες των 50 ml για 30 λεπτά στις 4000 rpm. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 4

ml διαλύματος 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 10mg/ml RNase A. Κατόπιν προστίθενται 4 ml διαλύματος 200mM NaOH, 1%SDS (w/v) και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 4 ml παγωμένου διαλύματος 3M CH₃COOK pH 5.5, το διάλυμα αναμιγνύεται ελαφρά και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά. Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 30 λεπτά στους 40 ° C και το υπερκείμενο φιλτράρεται σε τούλι διπλωμένο πολλαπλές φορές. Ακολουθεί εξיסορρόπηση της στήλης QIAGEN-tip 100 με 4 ml διαλύματος 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% ισοπροπανόλη (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v) σε θερμοκρασία δωματίου (το υλικό της στήλης περιέχει θετικά φορτισμένες ομάδες DEAE [diethylaminoethanol] που συγκρατούν τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό φωσφόρων του DNA. Παρουσία 750mM NaCl στην στήλη δεν μπορούν να κρατηθούν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, μεταβολίτες και χρωστικές). Το φιλτραρισμένο υπερκείμενο φορτώνεται στην στήλη και αφήνεται να περάσει με την βαρύτητα. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος 1M NaCl, 50mM MOPS pH 7 και 15% ισοπροπανόλη (v/v) (παρουσία 1M αλατιού απομακρύνονται από την στήλη tRNA, 5S RNA και rRNA που τυχόν κατακρατήθηκαν στο προηγούμενο βήμα). Η έκλουση του DNA γίνεται με 5 ml διαλύματος 1,25 M NaCl, 50mM Tris-Cl pH 8,5 και 15% ισοπροπανόλη (v/v) (σε αυτό το βήμα αυξάνεται το pH για να εκλουσθεί το πλασμίδιο σε μικρότερη συγκέντρωση NaCl, ίση με 1,25 M). Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 0,7 όγκων ισοπροπανόλης επί του όγκου του διαλύματος και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 30 λεπτά, στους 4 ° C (κατακρήμιση με ισοπροπανόλη μειώνει την κατακρήμιση αλάτων). Το ίζημα ξεπλένεται με 2ml 70% αιθανόλης. Τέλος, το ίζημα του πλασμιδιακού DNA στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε 100 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου H₂O.

4.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια μέθοδος in vitro αντιγραφής του DNA σύμφωνα με την οποία, αφού η διπλή έλικα του DNA αποσυσπειρωθεί σε κατάλληλη θερμοκρασία, πρωταρχικά τμήματα DNA (primers) υβριδίζουν σε συγκεκριμένες θέσεις στις μονές αλυσίδες του DNA βάση του κανόνα της συμπληρωματικότητας και λειτουργούν σαν μήτρα για μία θερμοσταθερή DNA

πολυμεράση ώστε να αρχίσει να συνθέτει τις νέες και συμπληρωματικές αλυσίδες. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (pair-dimers) και κυρίως στο 3' άκρο, το περιεχόμενο σε GC να είναι από 40% ως 60%, η προσθήκη περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται στο 5' άκρο.

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

1. Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων της μήτρας DNA με επώαση στους 94°C :

Κατά την αποδιάταξη, η δίκλωνη έλικα ανοίγει σε δύο αλυσίδες μονόκλωνου DNA και όλες οι ενζυματικές αντιδράσεις σταματούν (για παράδειγμα, η επιμήκυνση του προηγούμενου κύκλου).

2. Υβριδισμός των εκκινητών:

Οι εκκινητές υφίστανται στο διάλυμα διαρκή κίνηση Brown. Ιονικοί δεσμοί μεταξύ των εκκινητών και της μονόκλωνης μήτρας σχηματίζονται και καταστρέφονται διαρκώς. Οι πιο σταθεροί δεσμοί επί της ειδικής αλληλουχίας διαρκούν περισσότερο από τους ασταθείς τυχαίους υβριδισμούς με τη μήτρα, και πάνω σε αυτό το μικρό τμήμα δίκλωνου DNA επικάθεται η πολυμεράση και ξεκινά την επιμήκυνση. Μόλις πολυμεριστούν οι πρώτες λίγες βάσεις, οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ μήτρας και εκκινητή είναι τόσο ισχυροί, που δεν αποδιατάσσονται πλέον στη θερμοκρασία τήξης.

3. Επιμήκυνση στους 72°C :

Η θερμοκρασία αυτή είναι η ιδεατή για τη δράση της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Οι εκκινητές όπου έχει γίνει η πρώτη προσθήκη βάσεων, έχουν ήδη αναπτύξει ισχυρή ιονική έλξη με τη μήτρα, πολύ ισχυρότερη σε σχέση με τις δυνάμεις αποδιάταξης. Εκκινητές που βρίσκονται σε θέσεις μη ειδικού υβριδισμού απελευθερώνονται από τη μήτρα σε αυτήν τη θερμοκρασία και δε δίνουν προϊόν επιμήκυνσης. Τα νουκλεοτίδια τοποθετούνται στο 3' του εκκινητή (η πολυμεράση προσθέτει dNTPs στη διεύθυνση 5'-3', διαβάζοντας τη μήτρα από το 3' προς το 5' άκρο).

4.3. Πέψεις DNA με ένζυμα περιορισμού

Για την προετοιμασία του DNA των φορέων και των ενθέτων (προϊόντα PCR) για την αντίδραση σύνδεσης μεταξύ τους (ligation), πραγματοποιήθηκαν πέψεις των DNA αυτών με περιοριστικά ένζυμα των εταιρειών Biolabs και Promega, στα ενδεικνυόμενα ρυθμιστικά διαλύματα, παρουσία 0.1μg/ml BSA όπου προτεινόταν. Οι αντιδράσεις με τα ένζυμα περιορισμού πραγματοποιήθηκαν στους 37⁰C για 2 έως 8 ώρες. Οι ποσότητες περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά υπάκουαν στον κανόνα-ορισμό της μονάδας (unit) περιοριστικού ενζύμου, βάσει του οποίου μια μονάδα περιοριστικού ενζύμου είναι εκείνη η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για να πέψη πλήρως 1 μg DNA σε 1 ώρα, στους 37⁰C.

4.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθος τους και το φορτίο τους. Όπως είναι γνωστό το DNA είναι φορτισμένα αρνητικά . Σε αυτή την ιδιότητα βασίζεται η ηλεκτροφόρηση για τον διαχωρισμό τμημάτων διαφορετικού μεγέθους. Τα δείγματα, αναμειγμένα με μια χρωστική η οποία μας επιτρέπει να βλέπουμε την πορεία τους στην πηκτή, “φορτώνονται” σε ειδικά σχηματισμένες θέσεις στην πηκτή. Στα δύο άκρα της πηκτής εφαρμόζονται 2 ηλεκτρικοί πόλοι αντίστοιχα, ένας αρνητικός πάνω και ένας θετικός κάτω. Τα μόρια, που είναι αρνητικά φορτισμένα, θα κινηθούν προς τον θετικό πόλο. Τα μόρια που είναι μικρότερα σε μέγεθος κινούνται με μεγαλύτερη ευκολία και πιο γρήγορα στο σύμπλεγμα των πόρων της πηκτής αγαρόζης σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα μόρια και έτσι γίνεται και ο διαχωρισμός τους. Στην ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκεντρώσεις από 0.7% ως 2% ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος ή των τμημάτων που θέλουμε να ανιχνεύσουμε κάθε φορά. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε χώρα σε διάλυμα TBE (10x TBE: 108 g/l Tris base, 55g/l boric acid και 40 ml/l 0.5 M EDTA, pH=8), ενώ η πηκτή είχε στερεοποιηθεί παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για να είναι εφικτή η ανίχνευση των DNAs με λάμπα υπεριώδους φωτός.

4.5. Απομόνωση ζώνης DNA από πηκτική αγαρόζης

Η υπό μελέτη ζώνη DNA αποκόπτεται από την πηκτική αγαρόζης με ένα καθαρό νυστέρι, ελαχιστοποιώντας τον όγκο της αγαρόζης κατά το δυνατόν περισσότερο. Το κομμάτι αγαρόζης που αποκόπηκε ζυγίζεται και σε αυτήν προστίθενται 3 όγκοι διαλύματος QG (διευκολύνει την διαλυτοποίηση της αγαρόζης και την πρόσδεση του DNA στη μεμβράνη πυριτίου της στήλης Qiagen). Ακολουθεί επώαση στους 50°C για 5 λεπτά, ούτως ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το διάλυμα φορτώνεται στη στήλη Qiagen και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στις 13000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25°C). Το διήθημα απομακρύνεται και προστίθενται 0.5 ml QG ακόμα για απομάκρυνση και των τελευταίων ιχνών αγαρόζης από την κολώνα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση ομοίως με παραπάνω. Στη συνέχεια, η κολώνα ξεπλένεται με 0.75 ml PE (διάλυμα πλύσης που περιέχει αιθανόλη) και τέλος γίνεται έκλουση του DNA με 30 μl απιονισμένου και αποστειρωμένου H₂O.

4.6. Καθαρισμός προϊόντος από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Τα προϊόντα που παραλαμβάνονται με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρίζουν καθαρισμού σε ορισμένες περιπτώσεις για να απαλλαγθούν από ενζυμικά κατάλοιπα. Για τον καθαρισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR purification kit της Qiagen. Η ίδια μέθοδος καθαρισμού χρησιμοποιείται σε περίπτωση διπλής πέψης με ένζυμα περιορισμού αφού είναι απαραίτητο για την δεύτερη πέψη να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα από το περιοριστικό ένζυμο της πρώτης.

4.7. Αντίδραση λιγάσης

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

4.8. Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων έγινε με δύο τρόπους:

1. με PCR βακτηριακών αποικιών.
2. με απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα

4.9 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων

4.9.1. Για μετασχηματισμό με θερμικό σοκ (heat-shock)

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1ml LB + 20mM MgSO₄ και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37⁰C. Στη συνέχεια, εμβολιάζεται με την ολονύχτια καλλιέργεια σε αναλογία 1:100, 100ml θρεπτικού μέσου LB + 20 mM MgSO₄ σε γυάλινη φιάλη ενός λίτρου. Η καλλιέργεια επωάζεται για 2,5 με 3 ώρες στους 37⁰C, 250rpm μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου στο 0.35-0.4. Κατόπιν διαμοιράζεται σε δύο αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες τύπου falcon των 50 ml και επωάζεται στον πάγο για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά, στους 4⁰C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται ήπια σε 15 με 20 ml παγωμένου διαλύματος TFBII (30mM CH₃COOK, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη) για κάθε σωλήνα. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 2ml ανά σωλήνα παγωμένου διαλύματος TFBII (10mM MOPS pH 7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% γλυκερόλη). Τέλος, το κυτταρικό διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 200μl ανά δοκιμαστικό σωλήνα, και αποθηκεύεται στους – 80⁰C.

4.9.2. Για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση

Μια μονή αποικία μεταφέρεται σε 1ml LB και ακολουθεί ολονύχτια επώαση στους 37⁰C. Στη συνέχεια, εμβολιάζεται με αυτή σε αναλογία 1:50, 50ml θρεπτικού μέσου LB σε γυάλινη φιάλη ενός λίτρου. Ακολουθεί επώαση για 3 με 4 ώρες στους 37⁰C, 200 rpm μέχρι η OD₆₀₀ να φτάσει περίπου στο 0.8-1,0. Κατόπιν, τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο για 30 min και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται στους 4⁰C για 15 λεπτά στις 4000rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 400 ml

αποστειρωμένου και παγωμένου απιονισμένου H₂O. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων σε συνθήκες όπως περιγράφηκε παραπάνω. Κατόπιν, το υπερκείμενο αφαιρείται και πάλι, προστίθενται 400 ml H₂O και ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση. Αφαιρείται και πάλι το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλύεται σε 50 ml 10% γλυκερόλη και τα κύτταρα ξαναφυγοκεντρώνονται. Στο τέλος, το ίζημα μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου επαναδιαλύεται σε 10ml 10% γλυκερόλη, φυγοκεντρείται και επαναδιαλύεται σε 2 ml 10% γλυκερόλη. Το διάλυμα διαμοιράζεται σε όγκους των 100μl ανά σωλήνα δοκιμαστικό σωλήνα, και αποθηκεύεται στους -80°C.

4.10. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

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

Μια ποσότητα 200 μl δεκτικών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80°C όπου φυλάσσονται και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 μl της αντίδρασης λιγάσης στα κύτταρα και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Κατόπιν, ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται στον πάγο για 2 λεπτά, ακολουθεί προσθήκη 900 μl θρεπτικού διαλύματος LB (Luria Bertani medium) και επώαση στους 37°C για 1-2 ώρες. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες.

4.10.2. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με τη μέθοδο της ηλεκτρο-διάτρησης

Μια ποσότητα 100 μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων λαμβάνονται από τους -80°C και αφήνονται στον πάγο να ξεπαγώσουν. Κατόπιν, στα κύτταρα προστίθεται 1μl από την αντίδραση λιγάσης και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα κυττάρων-DNA μεταφέρεται με μια πιπέτα σε κατάλληλη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης, η οποία εν συνεχεία τοποθετείται στην κατάλληλη εγκοπή του μηχανήματος ηλεκτροδιάτρησης όπου εφαρμόζεται τάση 2,3 KV, στα 25μF και στα 200Ω. Η εφαρμογή της τάσης έχει ως αποτέλεσμα να διασταλούν οι πόροι της κυτταρικής μεμβράνης των

κυττάρων, μέσω των οποίων εισέρχεται το DNA του μετασχηματισμού. Μετά την εφαρμογή του ηλεκτροσόκ τα κύτταρα μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου προστίθεται 0,9 ml LB, και ακολουθεί επώασή τους για 2 ώρες στους 37°C. Τέλος, τα κύτταρα επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB-άγαρ με το κατάλληλο αντιβιοτικό και τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες.

4.11. Μεταφορά πλασμιδίων μεταξύ βακτηρίων με τριπαραγωγντική σύζευξη

Με τον όρο τριπαραγωγντική σύζευξη εννοούμε τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο-δότη σε ένα βακτήριο-δέκτη που προϋποθέτει επαφή των κυττάρων που γίνεται μέσω ενός αγωγού σύνδεσης. Ο μηχανισμός της μεταφοράς ελέγχεται από ένα πλασμίδιο, με αποτέλεσμα τη μεταφορά πάντα πλασμιδιακού DNA και μερικές φορές, επιπρόσθετα, χρωμοσωμικού DNA. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε ως βακτήριο-δότης το στέλεχος της *E.coli*, HB101 (pRK2013), ενώ η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων έγινε στα κατάλληλα αντιβιοτικά.

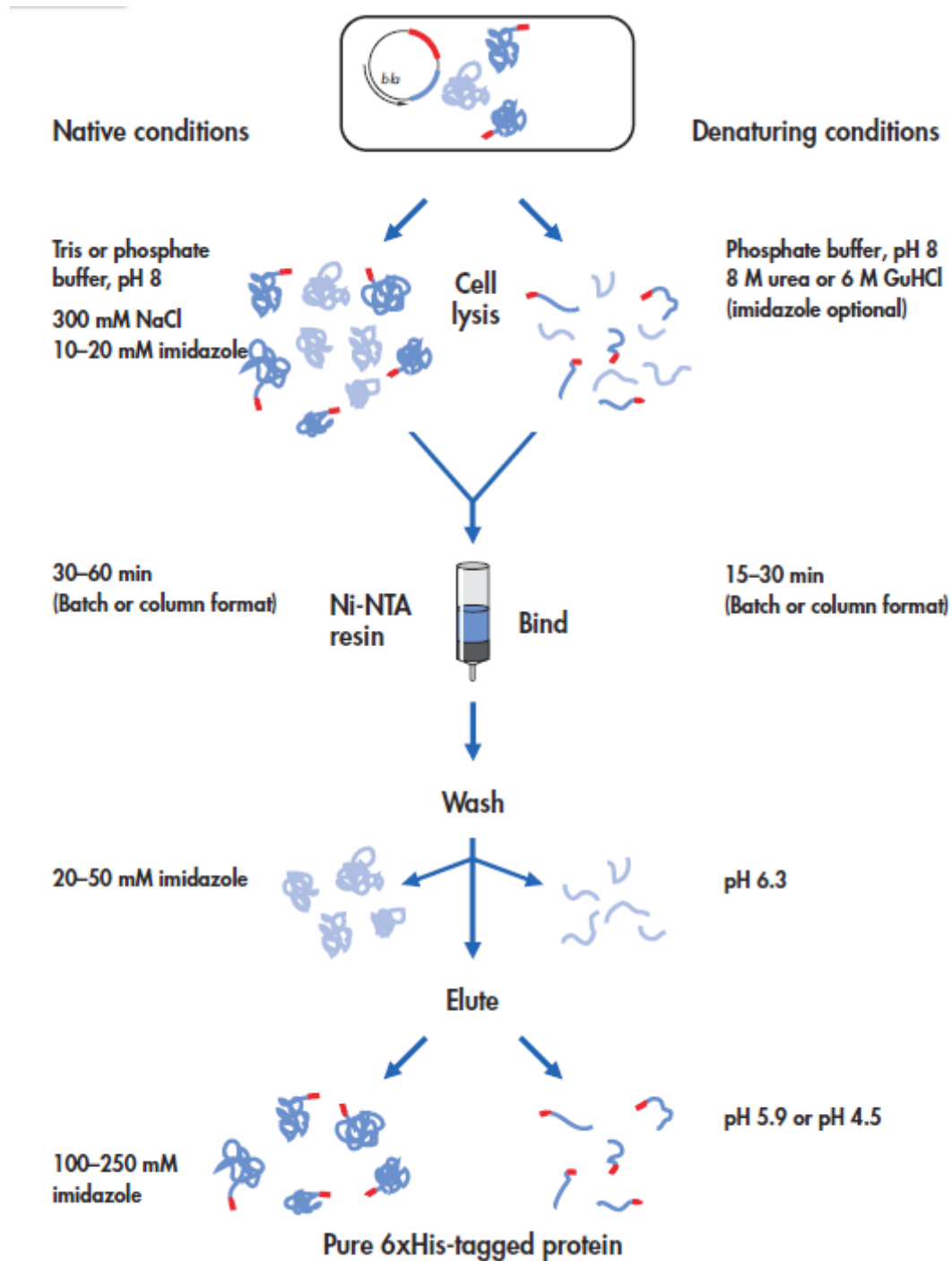
Η διαδικασία έχει ως εξής: Κύτταρα των τριών στελεχών βακτηρίου δότη-δέκτη και pRK2013 επωάζονται σε κατάλληλες θερμοκρασίες σε LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. 100 μl από τη κάθε καλλιέργεια αναμειγνύονται σε σωλήνα errendorf και φυγοκεντρώνται σε χαμηλές στροφές 4000 rpm για 5 λεπτά. Κατόπιν το υπερκείμενο αφαιρείται και επαναδιαλύεται η πελλέτα σε 500 ml LB. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες και τέλος η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 100 ml LB. Σταγόνες όγκου 25 μl ρίχνονται σε τρυβλία με LB. Το τρυβλίο επωάζεται για >12h στους 28°C. Με τη χρήση στείρας στεφάνης συλλέγονται κύτταρα και απλώνονται σε στερεό μέσο LB και με τα αντίστοιχα αντιβιοτικά από το δότη και το δέκτη και επωάζονται για 2 μέρες στους 28°C.

4.12. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Από μια ολονύκτια καλλιέργεια των κυττάρων BL21(DE3) που περιέχουν τον φορέα έκφρασης μαζί με το γονίδιο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, εμβολιάζεται σε αναλογία 1:100 υγρό θρεπτικό μέσο LB, εφοδιασμένο με 100 μg/ml αντιβιοτικού. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37°C με γρήγορη

ανάδευση, έως ότου η τιμή της απορρόφησης στα 600nm της καλλιέργειας να φτάσει μεταξύ 0.6 και 1.0. Ακολουθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Η καλλιέργεια κατόπιν επωάζεται στους 30°C για 4-5 ώρες. Μετά το πέρας της επαγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 5000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και το ίζημα διατηρείται στους - 80°C.

4.13. Καθαρισμός πρωτεΐνης από ρητίνη αγαρόζης Ni-NTA, υπό φυσικές (native) συνθήκες



Εικόνα 10: Διαδικασία καθαρισμού πρωτεϊνών με επίτοπο πολυιστιδινών κάτω από φυσικές και αποδιατακτικές συνθήκες, σε στήλη νικελίου

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

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

Αρχικά, σε μια στήλη χρωματογραφίας κλειστή στο κάτω στόμιό της, φορτώνεται 1ml διαλύματος 50% Ni-NTA αραρόζης σε 30% αιθανόλη και αφήνεται να πακεταρισθεί. Αφού πακεταρισθεί, το κάτω στόμιο ανοίγεται και απομακρύνεται η αιθανόλη. Στη συνέχεια η στήλη ξεπλένεται δύο φορές με 3 ml νερό. Κατόπιν, η στήλη εξισορροπείται με 5 ml του εκάστοτε διαλύματος λύσης που χρησιμοποιείται κατά περίπτωση και το διαυγές διάλυμα λύσης που παρασκευάστηκε υπό φυσικές (native) συνθήκες φορτώνεται στη στήλη. Το διάλυμα περνά από τη στήλη υπό την επίδραση της βαρύτητας και συγκεντρώνεται το έκπλυμα (flowthrough) σε καθαρό σωλήνα. Ακολουθούν τρεις πλύσεις 4 ml η καθεμιά, με διάλυμα πλύσης το οποίο έχει την ίδια σύσταση με το διάλυμα λύσης, αλλά μεταβάλλεται αυξανόμενα η συγκέντρωση ιμιδαζολίου σε αυτό. Τα εκπλύματα συγκεντρώνονται σε ξεχωριστούς σωλήνες. Τέλος, ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης με ποικίλο

αριθμό εκλούσεων, 1ml η καθεμιά με αυξανόμενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου, σε ένα εύρος από 80 έως 250 mM ιμιδαζόλιο. Όλα τα διαλύματα του καθαρισμού, δηλαδή εκπλύσεις και εκλούσματα διατηρούνται βραχυπρόθεσμα στους 4⁰C και μακροπρόθεσμα στους -20⁰C με 20% γλυκερόλη.

4.14. Καθαρισμός πρωτεΐνης από στήλη συγγένειας Ni-NTA αγαρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες

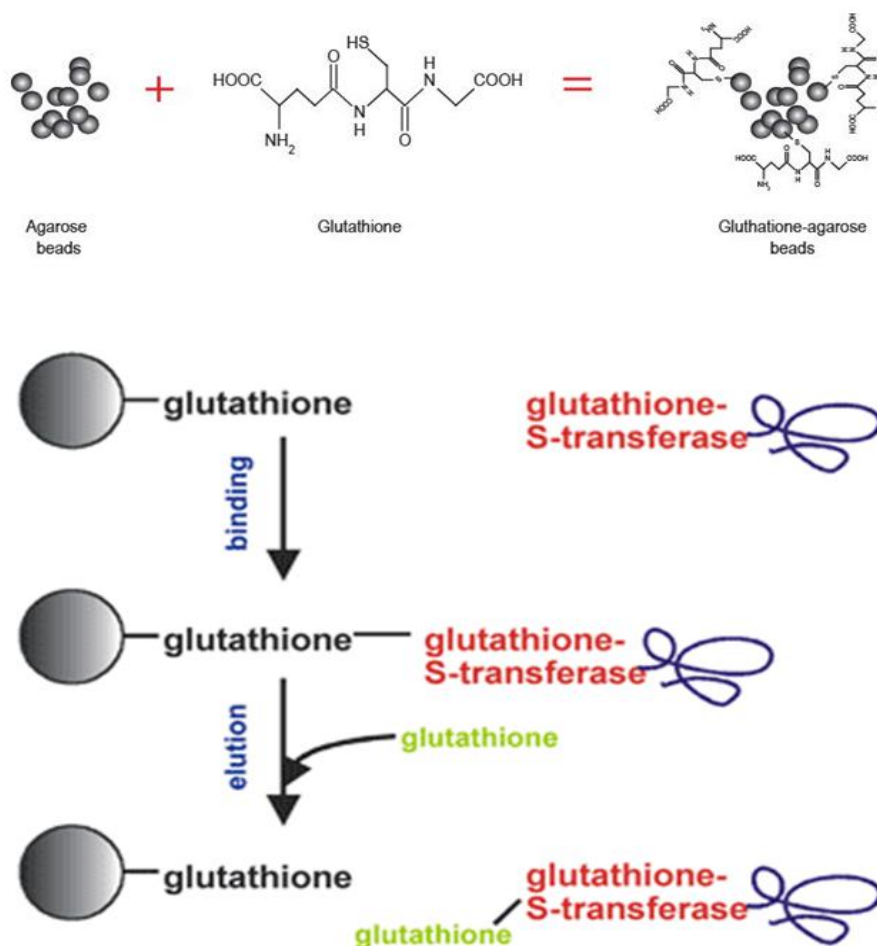
Η στήλη χρωματογραφίας πακετάρεται ως άνωθεν, με τη διαφορά ότι τώρα εξισορροπείται με 5 ml διαλύματος B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ουρία, pH 8.0). Το διαυγές διάλυμα λύσης υπό αποδιατακτικές συνθήκες φορτώνεται ακολούθως στη στήλη. Κατόπιν, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις με διάλυμα που περιέχει: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ουρία, pH 8.0 και η πρωτεΐνη εκλούεται 4x1ml με το διάλυμα που περιέχει: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M ουρία, pH 8.0. Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

4.15. Καθαρισμός πρωτεΐνης από σφαιρίδια συγγένειας τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), υπό φυσικές (native) συνθήκες

Ο επίτοπος ιστιδίνης που βρίσκεται στο αμίνο-τελικό ή καρβόξυ-τελικό άκρο της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης χρησιμοποιείται για την απομόνωση αυτής από το μίγμα του ολικού βακτηριακού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, καθώς προσδένεται στις ομάδες του προσροφητικού υλικού Glutathione Sepharose 4B beads.

Αρχικά γίνεται επαναιώρηση της κυτταρικής πελλέτας, η οποία έχει προκύψει μετά από φυγοκέντρηση της επαγμένης βακτηριακής καλλιέργειας, σε 50 μl/ml καλλιέργειας παγωμένου διαλύματος λύσης (50mM Tris 8.0, 5mM EDTA, 10% glycerol, 0,5 % NP40, 50mM NaCl). Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας λαμβάνεται δείγμα για μελλοντική ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (sample 3).

Προαιρετικά ακολουθεί η προσθήκη λυσοζύμης συγκέντρωσης 1mg/ml, ο αναστολέας πρωτεασών PMSF και DTT σε συγκέντρωση 1mM. Γίνεται επώαση για 30-60 λεπτά στον πάγο. Το επόμενο βήμα που ακολουθεί είναι η ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων στον πάγο μέχρις ότου το διάλυμα να γίνει ρευστό και καθαρό (συνήθως χρειάζονται πολλαπλοί παλμοί από 10 μέχρι 30 δευτερόλεπτα ο καθένας). Ακολουθεί η προσθήκη Triton X-100 σε τελική συγκέντρωση 1% για την λύση των κυττάρων, γίνεται ομαλή ανάδευση για 1 λεπτό και επώαση για 30 λεπτά με συχνές αναδεύσεις. Το επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρηση των παραπάνω διαλυμάτων στις 10,000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά. Γίνεται δειγματοληψία του υπερκλειμένου μετά από την φυγοκέντρηση (sample 4) και μέρος της επαναιωρημένης πελλέτας (sample 5) για ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατόπιν, γίνεται προετοιμασία



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση καθαρισμού πρωτεΐνης από σφαιρίδια συγγένειας τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST) υπό φυσικές συνθήκες

των σφαιριδίων που θα χρησιμοποιηθούν για την δέσμευση των πρωτεϊνών. Λαμβάνεται 1.33 ml 75% σφαιριδίων, αιωρημένων και συντηρημένων σε αιθανόλη, που αντιστοιχούν σε 1 ml πακεταρισμένου όγκου, η αναλογία σφαιριδίων προς τον όγκο της καλλιέργειας πρέπει να είναι 0.5ml/ L επαγμένης καλλιέργειας. Γίνεται φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 2000 rpm και ακολουθούν δύο πλύσεις με 10 όγκους παγωμένου GST διαλύματος λύσης. Μετά τις πλύσεις προστίθεται 1ml διάλυμα λύσης για να δημιουργηθεί 50% διάλυμα σφαιριδίων το οποίο είναι έτοιμο για ανάμιξη με τα σφαιρίδια. Ακολουθεί ανάμιξη του υπερκειμένου με το διάλυμα των σφαιριδίων και γίνεται συνεχή ανάδευση για 1-2 ώρες στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλογή του υπερκειμένου ως δείγμα (flow through), γίνονται 2 πλύσεις με διάλυμα πλύσης, το οποίο διαφοροποιείται από το διάλυμα λύσης ως προς τη συγκέντρωση Triton X-100, από τις οποίες συλλέγουμε τα υπερκείμενα για περαιτέρω ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (W1, W2). Ακολουθούν οι εκλούσεις με το διάλυμα έκλουσης (5mM γλουταθειόνη διαλυμένη σε 50 mM Tris pH 8.0) και τα κλάσματα συγκεντρώνονται για περαιτέρω ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

4.16. Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης κατά Laemmli

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται ως αποτέλεσμα συμπολυμερισμού μονομερούς ακρυλαμιδίου με N,N μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο. Αυτά τα δύο αντιδραστήρια είναι σταθερά έστω και αναμιγμένα αλλά πολυμερίζονται εύκολα με την προσθήκη συστήματος που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες. Το APS (υπερθειικό αμμώνιο) προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών ενώ ο καταλύτης TEMED (N,N, - τετραμεθυλοαιθυλενο-διαμίνη) πετυχαίνει την διάδοση ελευθέρων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού, (Kingsbury & Masters, 1970).

Κατά την μη συνεχή ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ηλεκτροφόρησης. Τα δείγματα εισάγονται στην πάνω στιβάδα που αποτελείται από μια πηκτή χαμηλής συγκέντρωσης (πηκτή συσσώρευσης, stacking gel). Το ρυθμιστικό διάλυμα του συστήματος περιέχει γλυκίνη και είναι ρυθμισμένο σε pH 8.3. Το ρυθμιστικό διάλυμα και τα δείγματα των πρωτεϊνών τιτλοδοτούνται αρχικά εντός της πηκτής συσσώρευσης σε pH 6.8. Ως

αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται μπροστά τους. Ακολούθως εισερχόμενες στην δεύτερη πηκτή (πηκτή διαχωρισμού) με pH 8.8 οι σχηματιζόμενες πλέον ζώνες πρωτεϊνών αρχίζουν να διαχωρίζονται βάση του φορτίου τους και του μεγέθους τους.

Στην ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli έχουμε πολυμερισμό της πηκτής σε μορφή πλάκας που σχηματίζεται από δύο ορθογώνια τζάμια. Ο πολυμερισμός στην πηκτή συσσώρευσης γίνεται παρουσία μιας χτένας που αφήνει κενές αύλακες για την τοποθέτηση των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (Laemmli, 1970). Στην ηλεκτροφόρηση με SDS οι πρωτεΐνες τρέχουν ως αποδιατεταγμένα μονομερή. Αρχικά κατά το παρασκεύασμα του δείγματος χρησιμοποιείται διαλυτή θειόλη για την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών ενώ το απορρυπαντικό SDS (δωδεκανοθειικό νάτριο) ενώνεται σε όλες τις περιοχές της πρωτεΐνης προσδίδοντας έτσι σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα.

Το πρώτο βήμα για την εφαρμογή της μεθόδου είναι η ανάμειξη των υπό μελέτη δειγμάτων σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα φόρτωσης (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% γλυκερόλη, 0.2% Bromophenol blue, 200 mM DTT). Ακολούθησε βρασμός των πρωτεϊνών για 5 λεπτά στους 100°C και γρήγορη περιστροφή στην φυγόκεντρο πριν την φόρτωση τους στην πηκτή.

Για την κατασκευή της πηκτής προετοιμάζεται πρώτα η συσκευή του πολυμερισμού (κατά Laemmli). Ακολούθως παρασκευάζεται η πηκτή διαχωρισμού [30% μείγματος ακρυλαμίδης (29% ακρυλαμίδα, 0.8% N,N' – μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδα), 1 M Tris- HCl pH 8.8, 20% SDS, 10% APS, TEMED] και αφήνεται να πολυμεριστεί. Η πηκτή συσσώρευσης αποτελείται από 5% μείγμα ακρυλαμίδης, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 20% SDS, 10% APS και TEMED. Το ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli αποτελείται από 25 mM Tris base, 192 mM Glycine pH 8.3, 0.1% SDS. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 15mA/gel στην πηκτή συσσώρευσης και στην πηκτή διαχωρισμού στα 30mA/gel.

4.17. Χρώση με μπλε του Coomassie

Μετά την ηλεκτροφόρηση για να γίνουν ορατές οι ζώνες των πρωτεϊνών πρέπει να ακολουθήσει η διαδικασία χρώσης. Κατά αυτήν η πηκτή

τοποθετείται εντός διαλύματος χρώσης (45% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 2.5% w/v Coomassie blue) όπου και αφήνεται για 10 λεπτά σε ήπια ανάδευση. Ακολούθως τοποθετείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (15% αιθανόλη, 10% οξικό οξύ) για 12 ώρες σε ήπια ανάδευση μέχρι να παραμείνουν βαμμένες μόνο οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η χρωστική δεσμεύεται στα βασικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών (κυρίως αργινίνης και αρωματικών αμινοξέων) και έτσι γίνονται ορατές οι ζώνες πάνω στην πηκτή.

4.18. Ανοσοαποτύπωση Western: Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF (Polyvinylidene fluoride)

Μια από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές ανίχνευσης και ταυτοποίησης πρωτεϊνών βασίζεται στην τεχνική ανοσοαποτύπωσης Western. Για να λάβει χώρα η τεχνική αυτή τα προς εξέταση δείγματα των πρωτεϊνών ηλεκτροφορούνται σε πηκτή SDS/πολυακρυλαμίδης και το πρότυπο των πρωτεϊνών μεταφέρετε από την πηκτή σε μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη πλένεται με διάλυμα που περιέχει το ειδικό αντίσωμα και αυτό δεσμεύεται σε αυτή εφόσον υπάρχει το κατάλληλο αντιγόνο. Ακολουθούν πλύσεις της μεμβράνης και επώαση με δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το πρώτο και το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί.

4.18.1. Πρωτόκολλο ανοσοαποτύπωσης Western με το αντίσωμα Ni-NTA AP conjugate

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμίδης και αποτυπώνονται σε μεμβράνη PVDF O/N ως ακολούθως: αρχικά παρασκευάζεται το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη). Μέσα σε αυτό το διάλυμα θα παρασκευαστεί το «σάντουιτς» Western με προσοχή ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων. Για την κατασκευή του «σάντουιτς» τοποθετούνται με κατεύθυνση από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman, ακολούθως η πηκτή, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης PVDF και τέλος 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman. Το «σάντουιτς» τοποθετείται σε ειδικό σύστημα της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται για τουλάχιστον 12 h σε 30 volt, στους 4°C.

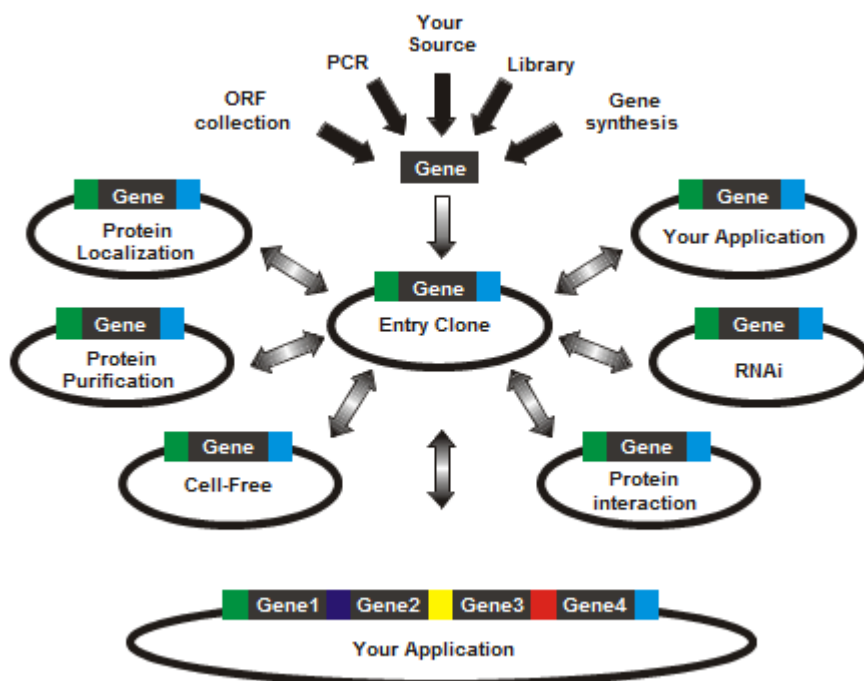
Μετά την αποτύπωση η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.1% της χρωστικής Ponceau S σε 1% CH₃COOH για να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες επί της μεμβράνης και να πιστοποιηθεί η μεταφορά τους. Ο μοριακός μάρτυρας μεγέθους αποκόπτεται από τη μεμβράνη και η τελευταία αποχρωματίζεται με 2-3 πλύσεις με 1x TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl). Η διαδικασία της ανοσοανίχνευσης αρχίζει και όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

Η μεμβράνη αρχικά επωάζεται με παρεμποδιστικό διάλυμα (blocking solution) το οποίο αποτελείται από 5% σκόνη γάλακτος και TBST (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 0.1% Tween 20) με ανάδευση για μία ώρα. Η επώαση με το παρεμποδιστικό διάλυμα πραγματοποιείται για την κάλυψη επί της μεμβράνης όλων των σημείων όπου δεν υπάρχει πρωτεΐνη, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος επί της μεμβράνης. Στη συνέχεια ακολουθούν 3x10 λεπτά πλύσεις της μεμβράνης με TBST και η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα. Για την ανοσοανίχνευση χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα Ni-NTA AP conjugate της εταιρείας QIAGEN σε αραιώση 1:1000 σε TBST. Το σύνθετο αυτό αντίσωμα περιέχει ιόντα νικελίου τα οποία φέρουν προσδεμένη μια ομάδα του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση, οπότε δεν απαιτείται προσθήκη δεύτερου αντισώματος. Η επώαση του αντισώματος αυτού (εν διαλύσει σε κατάλληλα διαλύματα) με μια μεμβράνη PVDF στην οποία έχουν μεταφερθεί οι ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες με τη μέθοδο της ηλεκτρομεταφοράς, επιτρέπει την πρόσδεση των ιόντων νικελίου στα σημεία εκείνα της μεμβράνης όπου υπάρχουν κατάλοιπα ιστιδίνης. Όσο περισσότερα και συγκεντρωμένα είναι τα κατάλοιπα ιστιδίνης, τόσο μεγαλύτερη και πιο ειδική η πρόσδεση του μορίου επ' αυτών. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η ανίχνευση πρωτεϊνών που φέρουν His-tag. Ακολουθούν 3x10 λεπτά πλύσεις της μεμβράνης με TBST και ανάπτυξη του σήματος.

Τελικά ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) και η ανίχνευση του σήματος γίνεται με προσθήκη 10 ml διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης που περιέχει 66 μl NBT (nitro blue tetrazolium), 33 μl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indonylphosphate) της εταιρείας Promega. Επώαση με ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι για 5-30 λεπτά.

4.19. Τεχνολογία Gateway Κλωνοποίησης

Η τεχνολογία Gateway είναι μια μέθοδος κλωνοποίησης που βασίζεται στις ιδιότητες του βακτηριοφάγου λάμβδα για ανασυνδυασμό σε συγκεκριμένες θέσεις του βακτηριακού γονιδιώματος (Landy, 1989). Η τεχνολογία αυτή προσφέρει έναν γρήγορο και υψηλής αποτελεσματικότητας τρόπο, για την ενσωμάτωση αλληλουχιών DNA σε πολλαπλά συστήματα φορέων και την μετέπειτα λειτουργική τους ανάλυση και έκφραση πρωτεϊνών (Hartley et al, 2000).



Εικόνα 12: Εφαρμογές της τεχνολογίας Gateway. Η τεχνολογία Gateway κλωνοποίησης δίνει την δυνατότητα μεταφοράς πολλαπλών αλληλουχιών DNA παράλληλα, σε επιλεγμένο φορέα. Η δυνατότητα γρήγορης και αξιόπιστης μεταφοράς νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ταυτόχρονα σε διαφορετικά συστήματα έκφρασης διευκολύνει την πρωτεϊνική έκφραση και μειώνει τον χρόνο που χρειάζεται για την διερεύνηση και ανίχνευση του κατάλληλου συστήματος έκφρασης (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html>)

Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στο σύστημα ανασυνδυασμού του βακτηριοφάγου λάμβδα, το οποίο διευκολύνει την ενσωμάτωση του λάμβδα στο χρωμόσωμα του *E.coli* και το πέρασμα του από το λυτικό στο λυσιγονικό κύκλο (Ptashne, 1992). Στην τεχνολογία Gateway τα συστατικά του συστήματος ανασυνδυασμού του λάμβδα βακτηριοφάγου έχουν τροποποιηθεί

ώστε να βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία του συστήματος (Bushman et al, 1985) . Η ενσωμάτωση του λάμβδα στο χρωμόσωμα του *E. coli* προκύπτει από ενδομοριακό ανασυνδυασμό DNA που γίνεται μέσω ενός μίγματος πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται τόσο από τον λάμβδα όσο και από το *E. coli*. Ο ανασυνδυασμός είναι συντηρητικός, δηλαδή δεν προκαλεί αλλαγές, προσθήκες ή ελλείψεις νουκλεοτιδίων, και δεν απαιτεί σύνθεση νέας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Πιο συγκεκριμένα ο ανασυνδυασμός συμβαίνει μεταξύ συγκεκριμένων θέσεων πρόσδεσης (*att* sites): *attB* θέση στο χρωμόσωμα του *E. coli* και *attP* στο χρωμόσωμα του λάμβδα βακτηριοφάγου. Οι θέσεις *att* δρουν ως θέσεις αναγνώρισης και πρόσδεσης για τα ένζυμα ομόλογου ανασυνδυασμού (Weisberg & Landy, 1983). Κατά την ενσωμάτωση του λάμβδα βακτηριοφάγου στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, γίνεται ανασυνδυασμός μεταξύ των θέσεων *attB* και *attP* για να δημιουργηθούν οι θέσεις *attL* και *attR*. Στην πραγματικότητα ο επιχιασμός (crossover) γίνεται μεταξύ 2 ομόλογων περιοχών μεγέθους 15 ζευγών βάσεων στις δύο μεριές ωστόσο, οι αλληλουχίες *att* που περιβάλλουν αυτές τις περιοχές είναι απαραίτητες αφού αποτελούν τις περιοχές πρόσδεσης των ενζύμων ανασυνδυασμού.

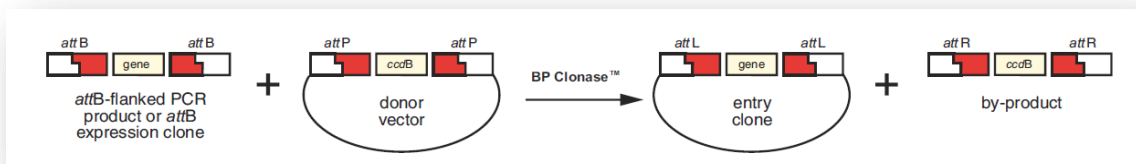
Ο λάμβδα ανασυνδυασμός καταλύεται από ένα μίγμα ενζύμων που προσδένονται σε ειδικές θέσεις (Meinhardt et al., 1993), φέρνοντας κοντά τις θέσεις στόχους, κόβοντας τες και προσδένοντας την ενδιάμεση αλληλουχία DNA. Ο ανασυνδυασμός προκύπτει μετά από ανταλλαγή των δύο αλυσίδων και λιγοποίηση τους σε νέα μορφή. Τα ένζυμα που καταλύουν αυτή την αντίδραση διαφέρουν μεταξύ τους ανάλογα αν ο λάμβδα χρησιμοποιεί τον λυτικό ή τον λυσιγονικό κύκλο.

Στο λυσιγονικό κύκλο η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από την ιντεγκράση (Int) του βακτηριοφάγου λ και παράγοντες του *E. coli* που συμβάλλουν στην ενσωμάτωση στον ξενιστή (Integration host factors), στην συγκεκριμένη περίπτωση τη BP κλωνάση. Στον λυτικό κύκλο η αντίδραση καταλύεται από την ίδια πρωτεΐνη, ιντεγκράση, την εξισιονάση και το ένζυμο LR κλωνάση.

Πίνακας 2: Αντιδράσεις που πραγματοποιούνται από τον λάμβδα βακτηριοφάγου και τα ένζυμα που τις καταλύουν.

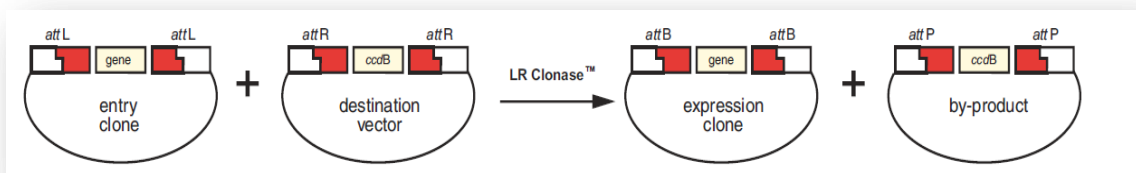
Κύκλος	Αντίδραση	Καταλύεται από...
Λυσιγονικός	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP κλωνάση, ιντεγκράση
Λυτικός	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR κλωνάση, ιντεγκράση, εξισιονάση

Η τεχνολογία Gateway χρησιμοποιεί το σύστημα ανασυνδυασμού του λάμβδα βακτηριοφάγου για να διευκολυνθεί η μεταφορά ετερόλογων αλληλουχιών DNA (οι οποίες βρίσκονται μεταξύ τροποποιημένων θέσεων *att*) μεταξύ διαφορετικών φορέων έκφρασης.



Εικόνα 13: Αντίδραση BP κλωνάσης: Διευκολύνει τον ανασυνδυασμό μεταξύ αλληλουχιών που πλαισιώνονται από τις περιοχές *attB* (συνήθως προϊόν αντίδρασης PCR) με φορείς που χαρακτηρίζονται από μία χαρακτηριστική αλληλουχία (*ccdB*), την οποία και αναγνωρίζει η κλωνάση, που πλαισιώνεται από αλληλουχίες *attP*. Τελικά προκύπτει φορέας με την επιθυμητή αλληλουχία (πλαισιωμένη από της αλληλουχίες *attL*) και ένα επιπλέον γραμμικό προϊόν που περιλαμβάνει την κασέτα *ccdB* μέσα στις χαρακτηριστικές αλληλουχίες *attR*

(<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html>)



Εικόνα 14: Αντίδραση LR κλωνάσης: Διευκολύνει τον ανασυνδυασμό μεταξύ αλληλουχιών που πλαισιώνονται από τις περιοχές *attL* (entry clone) προς δημιουργία πλασμιδίου (expression clone) που περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία πλαισιωμένη από τις *attB* περιοχές. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο LR κλωνάση.

(<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html>)

4.20. Πλασμιδιακές κατασκευές

pET28a/NopT1/GST: Προέκυψε από την γραμμοποίηση του φορέα pET28a/GST (Ταμπακάκη) χρησιμοποιώντας τα ένζυμα NdeI/ EcoRI και υποκλωνοποίηση στην θέση αυτή της κωδικής περιοχής του *nopT1*, μετά την απομόνωση του γονιδίου με την μέθοδο της PCR , χρησιμοποιώντας σαν μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pT7-7/NopT1 και εκκινητές τους *NopT1-F1*, *NopT1-R4* και κατόπιν με πέψη του προϊόντος της PCR με NdeI/EcoRI.

pET26b/ccdB/V5/His: Προέκυψε από την γραμμοποίηση του φορέα pET26b χρησιμοποιώντας τα ένζυμα NdeI/ XhoI και υποκλωνοποίηση στην θέση αυτή της κασέτας *ccdB*, μετά την απομόνωση του γονιδίου με την μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pBBR5-DEST42 και εκκινητές τους *ccdB -F3/ ccdB R5* και κατόπιν με πέψη του προϊόντος της PCR με NdeI/ XhoI.

pET26b/GFP/V5/His: Το γονίδιο GFP υποκλωνοποιήθηκε από το φορέα pDONR221/GFP (entry clone, Ταμπακάκη) στο πλασμίδιο pET26b/ccdB/V5/His (destination clone) με την αντίδραση της LR Κλωνάσης εφαρμόζοντας την τεχνική της Gateway κλωνοποίησης. Επειδή και οι δύο φορείς έχουν ανθεκτικότητα στην καναμικίνη, για να καταστεί εφικτή η επιλογή των μετασχηματισμένων κλώνων, πριν την αντίδραση της LR κλωνάσης προηγήθηκε γραμμοποίηση του pDONR221/GFP χρησιμοποιώντας το ένζυμο EcoRV.

pRH017/CW75: Το γονίδιο CW75 υποκλωνοποιήθηκε από το φορέα pDONR221/CW75 (entry clone, Ταμπακάκη) στο πλασμίδιο pRH017 (destination clone) με την αντίδραση της LR Κλωνάσης εφαρμόζοντας την τεχνική της Gateway κλωνοποίησης.

pRH017/CW108: Το γονίδιο CW108 υποκλωνοποιήθηκε από το φορέα pENTR11/CW108 (entry clone, Ταμπακάκη) στο πλασμίδιο pRH017 (destination clone) με την αντίδραση της LR Κλωνάσης εφαρμόζοντας την τεχνική της Gateway κλωνοποίησης.

pRH020/CW75: Το γονίδιο CW75 υποκλωνοποιήθηκε από το φορέα pDONR221/CW75 (entry clone, Ταμπακάκη) στο πλασμίδιο pRH020 (destination clone) με την αντίδραση της LR Κλωνάσης εφαρμόζοντας την τεχνική της Gateway κλωνοποίησης.

pRH020/CW108: Το γονίδιο CW108 υποκλωνοποιήθηκε από το φορέα pENTR11/CW108 (entry clone, Ταμπακάκη) στο πλασμίδιο pRH020 (destination clone) με την αντίδραση της LR Κλωνάσης εφαρμόζοντας την τεχνική της Gateway κλωνοποίησης.

Πίνακας 3: Εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή των πλασμιακών κατασκευών

Όνομα Εκκινήτη	Ακολουθία 5'-3'
<i>NopT1-F1</i>	GTGAATCCATATGTATGATCGAATCGGTGGC
<i>NopT1-R4</i>	GGCCCGAATTCCTGCATCCTTTGC
<i>ccdB-F3</i>	TGGATCCCATATGACAAGTTTGTACAAAAAAGC
<i>ccdB-R5</i>	CCTCTCGAGCTTTGTTAGCAGCCGGATCAAAC

Πειραματική πορεία

5. Πειραματική πορεία

5.1. Βελτιστοποίηση συνθηκών έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης NorT1

Μία από τις στρατηγικές που έχουν εφαρμοστεί για να αντιμετωπιστούν διάφορα προβλήματα που παρουσιάζονται κατά την έκφραση πρωτεϊνών είναι η παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ως υβριδικές πρωτεΐνες. Οι υβριδικές πρωτεΐνες κατασκευάζονται σε επίπεδο DNA με ένωση τμημάτων της κωδικοποιούσας αλληλουχίας δύο ή περισσότερων γονιδίων στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης ώστε τελικά να παραχθεί ένα πολυπεπτίδιο. Η γνώση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των διαφόρων τμημάτων που συμμετέχουν στην σύντηξη είναι απαραίτητη ώστε να εξασφαλιστεί ότι η σύνδεση δημιουργεί ένα σωστό πλαίσιο ανάγνωσης.

Η δημιουργία υβριδικών πρωτεϊνών μπορεί επίσης να διευκολύνει τον καθαρισμό μιας πρωτεΐνης ή την μελέτη της σε *in vivo* ή *in vitro* συνθήκες. Έτσι έχουν δημιουργηθεί διάφορα συστήματα σύντηξης που διευκολύνουν τον καθαρισμό ετερόλογων πρωτεϊνών που παράγονται σε *E. coli*. Σε περίπτωση καθαρισμού συνήθως χρησιμοποιούνται μικρές αμινοξικές αλληλουχίες οι οποίες αναφέρονται ως επίτοποι (epitope tags). Οι επίτοποι έχουν μέγεθος από 10 ως 15 αμινοξέα και σχεδιάζονται έτσι ώστε να επιτρέπουν το μοριακό χειρισμό της πρωτεΐνης. Ένας επίτοπος μπορεί να τοποθετηθεί οπουδήποτε μέσα στην πρωτεΐνη, αλλά συνήθως τοποθετείται είτε στο αμίνο-τελικό ή στο καρβόξυ-τελικό άκρο για να ελαχιστοποιηθεί τυχόν καταστροφή της τριτοταγούς ή τεταρτοταγούς δομής και λειτουργίας της πρωτεΐνης. Οι επίτοποι μπορεί να αναγνωριστούν από αντισώματα ή να δεσμευτούν σε χημικές ενώσεις που ονομάζονται προσδέτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου πεπτιδίου συνοδού είναι ένα πεππίδιο πολύ-ιστιδινών, το οποίο αποτελείται από 6-10 κατάλοιπα ιστιδίνης και το οποίο μπορεί να δεσμευτεί σε στήλες νικελίου (Ni^{2+}).

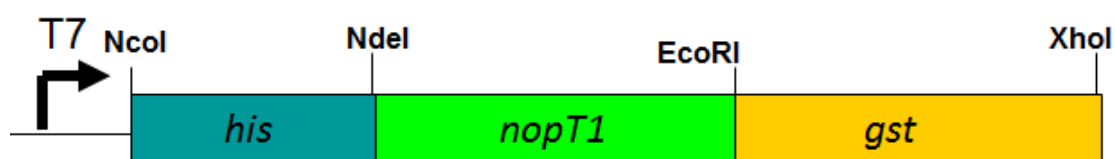
Στο παρελθόν είχαν παρουσιαστεί δυσκολίες στο καθαρισμό της πρωτεΐνης NorT1, υπό φυσικές συνθήκες, μετά από την κλωνοποίησή της σε φορείς έκφρασης που είχαν τον επίτοπο His είτε στο αμίνο-τελικό είτε στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η

έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης κατασκευάστηκε ο φορέας έκφρασης pET28a-GST, ο οποίος διαθέτει ένα αμινοτελικό επίτοπο πολυϊστιδίνης και ένα καρβοξυτελικό επίτοπο GST (Ταμπακάκη, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Ο φορέας αυτός είχε κατασκευαστεί με τρόπο ώστε το εναρκτήριο κωδικόνιο μεθειονίνης που προηγείται του επιτόπου πολυϊστιδίνης να είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *gst*. Έτσι, παρέχεται η δυνατότητα να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του φορέα μέσω έκφρασης και καθαρισμού της πρωτεΐνης GST. Στην παρούσα εργασία, ο φορέας εισήχθη σε κύτταρα BL21 (DE3) προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητά του. Στην εικόνα 16Α παρουσιάζεται πηκτώμα ακρυλαμίδης όπου αναλύονται πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κατά τη διάρκεια έκφρασης της πρωτεΐνης καθώς και κλάσματα από την πορεία καθαρισμού της. Τα κλάσματα S3 και S4 αφορούν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που συλλέχθηκαν πριν και μετά την κατεργασία των κυττάρων με υπερήχους αντίστοιχα. Η παρουσία GST στο κλάσμα S3 υποδηλώνει αν η πρωτεΐνη έχει παραχθεί σε ικανοποιητικά ανιχνεύσιμα επίπεδα, δεδομένου ότι το κλάσμα αυτό αντιπροσωπεύει ένα ακατέργαστο ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων. Το κλάσμα S4 επιτρέπει να ελεγχθεί αν η μέθοδος λύσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποτελεσματική. Το κλάσμα FT αντιπροσωπεύει το κλάσμα που εκλούεται από τη στήλη αμέσως μετά τη διέλευση του ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Η παρουσία GST στο κλάσμα αυτό υποδηλώνει ότι ποσότητα της υπό μελέτη πρωτεΐνης είναι περισσότερη από εκείνη που απαιτείται να προσδεθεί στην ποσότητα της ρητίνης που χρησιμοποιήθηκε. Οι στήλες W1 και W2 αντιπροσωπεύουν τις δύο εκπλύσεις των σφαιριδίων, το βήμα αυτό ακολουθούν οι εκλούσεις. Τυχόν παρουσία GST στις στήλες W1 και W2 είναι ενδεικτική της παρουσίας περίσσειας πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα με αποτέλεσμα η ποσότητα της ρητίνης να μην είναι επαρκής και κατά συνέπεια να γίνεται πρόωρη έκλυση της περίσσειας των πρωτεϊνών. Οι στήλες E1-E3 αντιπροσωπεύουν τις διαδοχικές εκλούσεις του GST. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο φορέας pET28a-GST είναι λειτουργικός αφού παράγεται ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης.

Έχει παρατηρηθεί ότι σε περιπτώσεις δημιουργίας χιμαιρικών πρωτεϊνών με το GST η διαλυτότητα του παραγόμενου πρωτεϊνικού προϊόντος είναι μεγαλύτερη από ότι σε άλλα χιμαιρικά προϊόντα με

διαφορετικούς επιτόπους (Thain et al, 1996). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος του GST (~25 kDa). Σε αυτή την παρατήρηση στηρίχθηκε η στρατηγική που ακολουθήθηκε στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία. Σύμφωνα με αυτή την παρατήρηση, ακολούθησε κλωνοποίηση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας της πρωτεΐνης NopT1 στο φορέα pET28a-GST προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης NopT1 (Εικ. 15). Ο φορέας pET28a-GST χαρακτηρίζεται ως φορέας υψηλού αριθμού αντιγράφων και η έκφραση του γονιδίου *nopT1* έγινε υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7 σε *E. coli* BL21 (DE3). Στο στέλεχος αυτό, το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα και βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο ενός παραγώγου του υποκινητή *lac*, του L8-UV5 *lac*. Ο υποκινητής αυτός περιέχει σημειακές μεταλλάξεις που τον διαφοροποιούν από τον αγρίου τύπου υποκινητή *lac*. Οι δύο σημειακές μεταλλάξεις βρίσκονται στην -10 περιοχή, η οποία αυξάνει την ισχύ του υποκινητή και ελαττώνει την εξάρτηση του από το cAMP και του υποδοχέα του που ονομάζεται CAP.

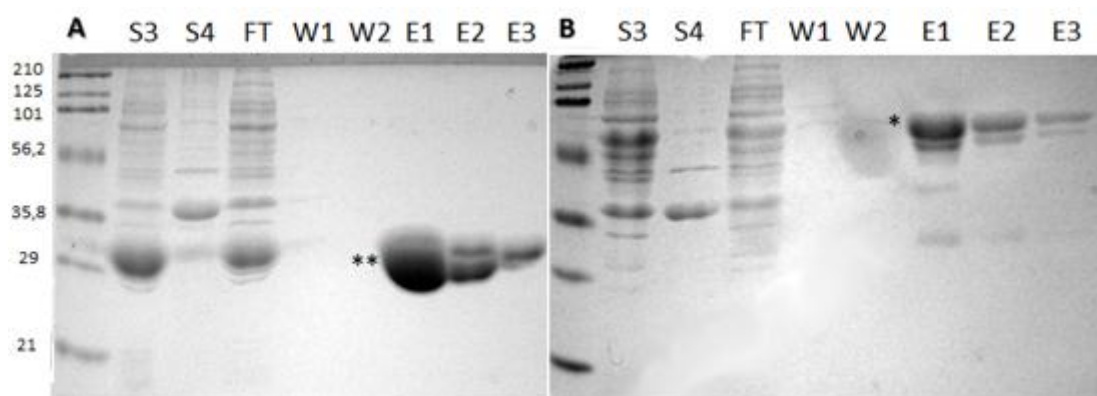
Η κλωνοποίηση έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε η κωδικοποιούσα αλληλουχία της πρωτεΐνης NopT1 να είναι στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης τόσο με το αμινοτελικό επίτοπο His όσο και με τον καρβοξυτελικό επίτοπο GST, ο οποίος έχει μοριακό βάρος 25 kDa και κωδικοποιείται από μία νουκλεοτιδική αλληλουχία μεγέθους 700 βάσεων. Η υβριδική πρωτεΐνη έχει θεωρητικό μοριακό βάρος ~ 60 kDa.



Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου pET28a-BLR2140-GST. Το γονίδιο *nopT1* πλαισιώνεται από τους επιτόπους His (αριστερά) και GST (δεξιά). Στο σχήμα φαίνονται οι θέσεις περιορισμού της συγκεκριμένης αλληλουχίας σύμφωνα με τις οποίες έγινε εφικτή η κλωνοποίηση του γονιδίου *nopT1* στον φορέα pET28a-GST.

Με τον τροποποιημένο φορέα μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli*, στελέχους BL21 (DE3), στα οποία μετά από επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου, έγινε υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης και καθαρισμός της με σφαιρίδια Glutathione Sepharose για δέσμευση του επιτόπου GST. Τα

αποτελέσματα του καθαρισμού της NorT1 αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και παρουσιάζονται στην εικόνα 16B.



Εικόνα 16: Αποτελέσματα καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης NorT1-GST από σφαιρίδια Glutathione Sepharose. Το γονίδιο *norT1* κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET28a-GST και εκφράστηκε σε *E.coli* BL21 (DE3). Έγινε καθαρισμός με σφαιρίδια Glutathione Sepharose για δέσμευση του επιτόπου GST, διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ανιχνεύτηκαν με χρώση Coomassie blue. Στην εικόνα A παρουσιάζεται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης GST (διπλός αστερίσκος) από το φορέα pET28a-GST χωρίς της ένθεση του γονιδίου *norT1*, Στην εικόνα B παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης NorT1 από τον φορέα pET28a-GST. Με μονό αστερίσκο παρουσιάζεται η υβριδική πρωτεΐνη NorT1-GST. Τα μοριακά βάρη του μάρτυρα σε kDa υποδεικνύονται στα αριστερά.

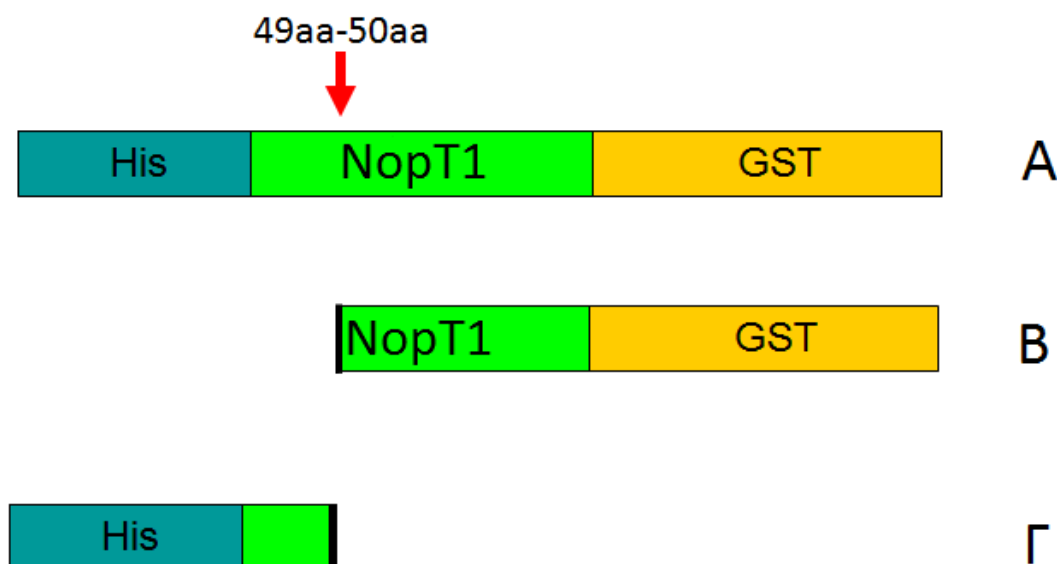
Η παρουσία της υβριδικής πρωτεΐνης NorT1-GST στα κλάσματα έκλουσης E1-E3 (Εικ. 16B) μετά από καθαρισμό υπό φυσικές συνθήκες υποδηλώνει ότι αυξήθηκε η διαλυτότητα της NorT1 μετά από τη σύντηξη της με τον επίτοπο GST. Η υβριδική πρωτεΐνη NorT1-GST αναλύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με το θεωρητικό αναμενόμενο μοριακό βάρος της 60 kDa. Επίσης, παρατηρείται μία δεύτερη ζώνη κάτω από την αναμενόμενη, η οποία είναι προϊόν αυτοπρωτεόλυσης, όπως έχει διαπιστωθεί από προηγούμενη μελέτη (Fotiadis et al., 2011).

5.2. Διερεύνηση δράσης των αρχικών αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης NorT1

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των μελών της οικογένειας YorT είναι η αυτοπρωτεόλυση των 40-50 αμινοτελικών αμινοξικών καταλοίπων. Μέχρι σήμερα δεν έχει εξακριβωθεί ο ρόλος του αμινοτελικού τμήματος που αποκόπτεται. Προηγούμενες μελέτες παρέχουν ενδείξεις που υποστηρίζουν την άποψη ότι η αποκοπή του αμινοτελικού τμήματος πιθανά να σχετίζεται με την έκκριση τους από το εκκριτικό σύστημα τύπου III (Thomassin et al., 2011).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η έκκριση και μεταφορά πολλών πρωτεϊνών-τελεστών μέσω του T3ΕΣ διευκολύνεται με την πρόσδεση τους σε μοριακούς συνοδούς (σαπερόνες) (Parsot et al., 2003). Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί, για κανένα μέλος της οικογένειας YopT, μοριακές συνοδοί που να διευκολύνουν την έκκριση και μεταφορά τους στα ευκαρυωτικά κύτταρα μέσω του T3ΕΣ.

Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο ότι τα 49 αμινοτελικά αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης NopT1, τα οποία αποκόπτονται από το τελικό προϊόν, να λειτουργούν ως σαπερόνη (μοριακή συνοδός) της πρωτεΐνης ακολουθήθηκε η παρακάτω προσέγγιση. Έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης NopT1 σε κύτταρα BL21 (DE3) μέσω του φορέα pET28a-GST και ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη νικελίου.. Το αναμενόμενο προϊόν του καθαρισμού θα ήταν μία ζώνη μεγέθους ~60 kDa η οποία αποτελείται από την πρωτεΐνη NopT1 πλαισιωμένη από τους επιτόπους His στο αμινο-τελικό άκρο και GST στο καρβόξυ-τελικό άκρο (Εικ. 17Α). Τα αποτελέσματα του καθαρισμού παρουσιάζονται στην εικόνα 18. Όπως παρατηρείται, εκτός από την αναμενόμενη πρωτεϊνική ζώνη εμφανίζεται και μία δεύτερη μικρότερου μεγέθους. Η ύπαρξη αυτής της δεύτερης ζώνης θα μπορούσε να δικαιολογηθεί σε περίπτωση δράσης των πρώτων αμινοξικών καταλοίπων της

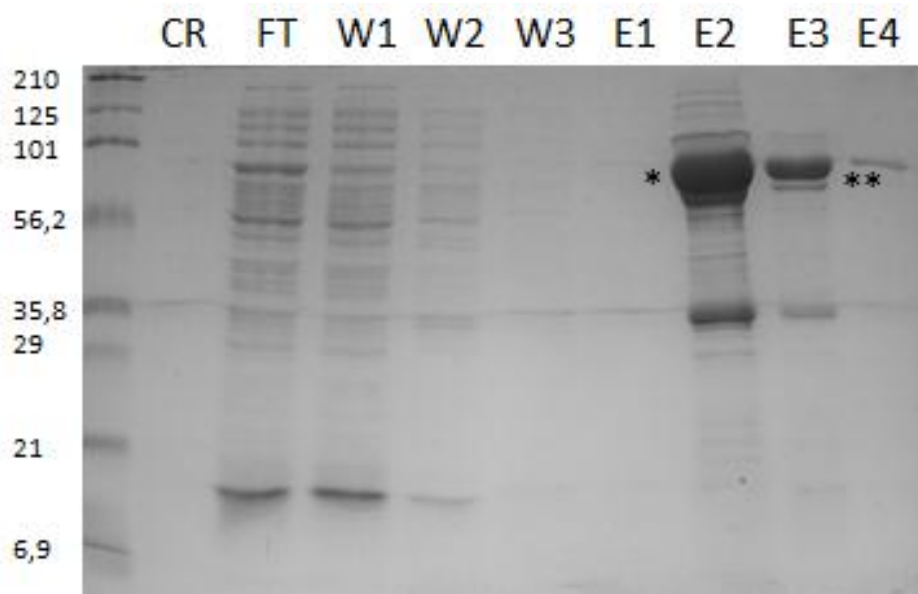


Εικόνα 17: Σχηματική αναπαράσταση προϊόντων υπερέκφρασης της πλασμιδιακής κατασκευής pET28a-BLR2140-GST. Α: Πρωτεϊνικό προϊόν πλήρους μήκους, Β: Πρωτεϊνικό προϊόν μετά την αυτοπρωτεόλυση της πρωτεΐνης NopT1 μεταξύ των καταλοίπων 49 και 50 συνδεδεμένο με τον επίτοπο GST, Γ: Αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που προκύπτει μετά την αυτοπρωτεόλυση συνδεδεμένο με τον επίτοπο His.

πρωτεΐνης NorT1 ως μοριακή συνοδό της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση αυτή θα αναμενόταν αλληλεπίδραση του αμινοτελικού τμήματος, το οποίο είναι προσδεμένο με τον επίτοπο His, με το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης κάτι που θα οδηγούσε στον συγκαθαρισμό του τελευταίου τμήματος (Εικ.17B) μαζί με το πρώτο (Εικ. 17Γ), το οποίο λόγω του επιτόπου His δεσμεύεται στην στήλη νικελίου.

Στην εικόνα 17 παρουσιάζονται πρωτεϊνικές ζώνες που είναι πιθανό να προκύψουν μετά από καθαρισμό της πρωτεΐνης NorT1 σε στήλη νικελίου. Η πρώτη ζώνη αντιστοιχεί σε ολόκληρη την πρωτεΐνη (A) , η δεύτερη ζώνη αντιστοιχεί στην πρωτεολυμένη πρωτεΐνη όπως προκύπτει μετά την αυτοπρωτεόλυση (B), η οποία αναμένεται να καθαριστεί λόγω αλληλεπίδρασης με τα πρώτα 49 αμινοξέα που είναι συνδεδεμένα με τον His-επίτοπο (Γ).

Τα αποτελέσματα του καθαρισμού αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και παρουσιάζονται στην εικόνα 18.

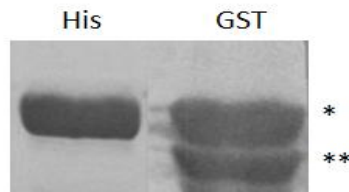


Εικόνα 18: Αποτελέσματα καθαρισμού της χιμαιρικής πρωτεΐνης NorT1-GST από στήλη νικελίου. Όπου, CR: crude extract, FT: flow through, W1: wash 1, W2: wash 2, W3: wash 3, E1,2,3,4: elution 1,2,3,4. Παρατηρείται ότι πρωτεϊνικό προϊόν λαμβάνουμε από την δεύτερη έκλουση και μετά (*). Εμφανής είναι η ύπαρξη δεύτερης ζώνης (**) κάτω από το κύριο προϊόν, η οποία μπορεί να παρατηρηθεί καλύτερα στην τρίτη έκλουση. Η ταυτότητα της δεύτερης ζώνης διερευνήθηκε πειραματικά μέσω ανοσοαποτύπωσης Western.

Όπως παρατηρείται, στην πρώτη έκλουση δεν λήφθηκε πρωτεϊνικό προϊόν, αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην ανεπαρκή ποσότητα του διαλύματος έκλουσης. Στις επόμενες τρεις, και ιδιαιτέρως στην δεύτερη, η ποσότητα πρωτεϊνικού προϊόντος που λήφθηκε ήταν ικανοποιητική. Στις εκλούσεις E2-E3 γίνεται εμφανή η παρουσία, εκτός από την αναμενόμενου μεγέθους ζώνη, και μία δεύτερη ζώνη μικρότερου μεγέθους το οποίο πιθανό να είναι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (Εικ. 17B).

Για να διαπιστωθεί η ταυτότητα της δεύτερης ζώνης που εμφανίζεται στα κλάσματα των εκλούσεων, εφαρμόστηκε η τεχνική Western. Δηλαδή λήφθηκε δείγμα από το κλάσμα της τρίτης έκλουσης το οποίο αναλύθηκε σε δύο πηκτώματα πολυακρυλαμίδης συγκέντρωσης 12%. Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνες PVDF (Polyvinylidene fluoride) και επώαση τους με αντίσωμα anti-His και anti-GST αντίστοιχα. Από αυτή την προσέγγιση αναμενόταν το anti-His να προσδεθεί μόνο στην μεγαλύτερου μεγέθους ζώνη που προκύπτει από τον καθαρισμό (Εικ. 17A) και το anti-GST αντίσωμα να δεσμευτεί τόσο στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη (Εικ. 17A) όσο και στην πρωτεολυμένη μορφή (Εικ. 17B). Με αυτό τον τρόπο θα ήταν εφικτή η απόδειξη του ότι το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με το αμίνο-τελικό της άκρο αφού συγκαθαρίζεται το πρώτο μαζί με το δεύτερο χωρίς να μπορεί να δεσμευτεί από μόνο του στην κολώνα νικελίου. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της ανοσοαποτύπωσης Western παρουσιάζονται στην εικόνα 19.

Στην εικόνα 19 φαίνονται οι δύο χειρισμοί που έγιναν για να διαπιστωθεί η ταυτότητα της μικρότερου μεγέθους ζώνης. Κατά τον πρώτο χειρισμό έγινε επώαση των πρωτεϊνικών δειγμάτων με αντίσωμα anti-His.



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση Western στα προϊόντα του καθαρισμού της πρωτεΐνης NorT1 σε στήλη νικελίου στοχεύοντας τον επίτοπο His και τον επίτοπο GST. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται η ανοσοαποτύπωση με χρήση του αντισώματος anti-His ενώ στην δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η ανοσοαποτύπωση με χρήση του αντισώματος anti-GST. Η διαφορά στις δύο στήλες είναι εμφανής καθώς στη δεύτερη στήλη εμφανίζεται και μία δεύτερη ζώνη (**) η οποία αντιστοιχεί στο προϊόν της εικόνας 17B το οποίο δεν μπορεί να δεσμευτεί στην στήλη νικελίου αλλά συγκαθαρίζεται λόγω αλληλεπίδρασης με τα πρώτα 49 αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης.

Όπως παρατηρείται η δέσμευση έγινε μόνο στην πρώτη ζώνη του κλάσματος, αυτό υποδηλώνει την αναγνώριση και δέσμευση στα κατάλοιπα πολυϊστιδίνης. Αντίθετα στον δεύτερο χειρισμό, δηλαδή κατά την επώαση με το αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και δεσμεύει το GST , έγινε δέσμευση και των δύο ζωνών. Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή τη διαδικασία είναι ότι η δεύτερη ζώνη (Εικ 17B) συγκαθαρίζεται μαζί με την πρώτη (Εικ 17A) και αυτό υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης με το αμινοτελικό της άκρο.

5.3. *In silico* διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης NorT1 με πρωτεΐνες της σόγιας

Το σύστημα PBS1-AnrPphB στο *Arabidopsis* έχει μελετηθεί διεξοδικά και περιγράφεται αναλυτικά στην εισαγωγή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ξενιστής του *Bradyrhizobium japonicum* είναι η σόγια. Η πρωτεΐνη-τελεστής NorT1 που εκκρίνεται από το βακτήριο δρα ως πρωτεάση, έτσι θα πρέπει να έχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες στόχους στο φυτό τις οποίες να πρωτεολύει. Κριτήρια επιλογής των προς μελέτη πρωτεϊνών της σόγιας ήταν το υψηλό ποσοστό ομολογίας με την πρωτεΐνη PBS1 από το *Arabidopsis*, η παρουσία μοτίβου μυριστιλίωσης ή/και παλμιτιλίωσης, του μοτίβου αυτοπρωτεόλυσης GDK καθώς και η έκφραση των γονιδίων τους σε διάφορους ιστούς της σόγιας (Πίνακας 4).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εύρεση πρωτεϊνικών ομολόγων της PBS1 χρησιμοποιώντας την ηλεκτρονική βάση δεδομένων «National

Center for Biotechnology Information» (NCBI) και συγκεκριμένα το εργαλείο «Blast». Σύμφωνα με τη βάση αυτή βρέθηκαν δεκατρείς πρωτεΐνες της σόγιας οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με την πρωτεΐνη PBS1 ενώ παρουσιάζουν και τα χαρακτηριστικά μοτίβα που περιγράφηκαν παραπάνω. Προηγούμενες μελέτες που είχαν διενεργηθεί με την βοήθεια της βιοπληροφορικής είχαν υποδείξει την ύπαρξη τριών εξ αυτών των πρωτεϊνών ως υποψήφιους στόχους της πρωτεΐνης NorT1. Η ταυτότητα και η ομοιότητα αυτών των πρωτεϊνών με την PBS1 όπως και ο ιστός έκφρασης της κάθε μίας παρουσιάζονται στο πίνακα 4.

Πίνακας 4: Σύγκριση ταυτότητας και ομοιότητας των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 στη σόγια με την πρωτεΐνη PBS1 του *Arabidopsis thaliana*

	PBS1		Χαρακτηριστικό Μοτίβο	Ιστός έκφρασης
	Ταυτότητα (Identity)	Ομοιότητα (Similarity)	G ²⁴¹ D ²⁴² K ²⁴³	
CW108	80%	87%	+	βλαστός/φύλλα/ρίζες
CW75	78%	84%	+	βλαστός/φύλλα/ρίζες
CW140	83%	90%	-	βλαστός/φύλλα/

Παρατηρούμε ότι μεγαλύτερη ομοιότητα με την PBS1 παρουσιάζει η πρωτεΐνη CW140 η οποία όμως δεν εκφράζεται στις ρίζες όπου και συμβαίνει η αλληλεπίδραση του *Bradyrhizobium* με τη σόγια και γι' αυτό το λόγο δεν μπορεί να συμπεριληφθεί στις υποψήφιες πρωτεΐνες στόχους της πρωτεΐνης NorT1.

Περαιτέρω *in silico* ανάλυση έδωσε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και αφορούν τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που βρέθηκαν να έχουν υψηλή ομολογία με την PBS1 αλλά και θέσεις μυριστιλίωσης, παλμιτιλίωσης (αλληλεπίδραση με της μεμβράνες) και το χαρακτηριστικό μοτίβο GDK.

Στον πίνακα 5 περιγράφεται το ποσοστό ομολογίας της κάθε πρωτεΐνης, η οποία εμφανίζεται στο πίνακα με την κωδική της ονομασία, με τις πρωτεΐνες PBS1 του *Arabidopsis* και τις πρωτεΐνες CW108 και CW75 της σόγιας.

Πίνακας 5: Ποσοστό ομολογίας των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 με την PBS1 *Arabidopsis thaliana* και τις CW108, CW75 της σόγιας

Πρωτεΐνες		PBS1	CW108	CW75
NP_001235164	PBS1-like	80	100	82
XP_003556585	PBS1-like	76	84	90
NP_001238726		77	82	100
XP_003547213	PBS1-like	64	68	67
XP_003542923	PBS1-like	64	68	66
XP_003554350	PBS1-like	81	76	78
NP_001237717-(CW140)		79	79	75
XP_003521368	PBS1-like	80	76	76
XP_003542489	PBS1-like	79	76	77
XP_003551430	PBS1-like	56	58	59
XP_003518522	PBS1-like	66	66	65
XP_003530878		-	59	58
XP_003545132	PBS1-like	74	-	-

Το επόμενο βήμα ήταν η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα ClustalX. Στο παρακάτω πίνακα παρατηρούμε το χαρακτηριστικό μοτίβο GDK όπως αυτό εμφανίζεται σε μερικές από τις δεκατρείς πρωτεΐνες που αναλύθηκαν παραπάνω. Όπως παρατηρούμε οι πρωτεΐνες XP_003521368, XP_003542489, XP_003554350, NP_001237717 δεν φέρουν το χαρακτηριστικό μοτίβο αυτό.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικό μοτίβο GDK στις πιθανές πρωτεΐνες-στόχους της NorT1

Locus tag πρωτεΐνης	Πρωτεϊνικές αλληλουχίες που περιέχουν την ακολουθία GDK
XP_003556585	217 VIYRDFKSSNILLDEGYHPKLSDFGLAKLGPV GDK SHVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 277
NP_001238726	212 VIYRDFKSSNILLDEGYHPKLSDFGLAKLGPV GDK SHVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 272
NP_001235164	201 VIYRDFKSSNILLDEGYHPKLSDFGLAKLGPV GDK SHVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 261
NP_001237717	199 VIYRDLKCSNILLGEGYHPKLSDFGLAKLGPV GEN THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 259
XP_003542489	199 VIYRDLKCSNILLGEGYHPKLSDFGLAKLGPV GEN THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 259
XP_003554350	195 VIYRDLKCSNILLGEGYHPKLSDFGLAKLGPV GEN THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 255
XP_003521368	195 VIYRDLKCSNILLGEGYHPKLSDFGLAKLGPV GEN THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 255
XP_003547213	288 VIYRDLKSSNILLDEGYHPKLSDFGLAKLGPV GDK THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 348
XP_003542923	215 VIYRDLKSSNILLDEGYHPKLSDFGLAKLGPV GDK THVSTRVMGTYGYCAPEYAMTGQLT 275
XP_003518522	200 VIYRDFKASNILLDENFNPKLSDFGLAKLGP TGDK THVSTRVMGTYGYCAPEYASTGQLT 260
XP_003551430	211 VIYRDLKSSNILLKDFNAKLSDFGLAKLGP TGDK SHVSSRVMGTYGYCAPEYQRTGQLT 271
XP_003530878	214 VIYRDLKSSNILLKDFNAKLSDFGLAKLGP TGDK SHVSSRVMGTYGYCAPEYQRTGQLT 274

Η μελέτη των χαρακτηριστικών των υποψήφιων πρωτεϊνών στόχων συνεχίστηκε με την εύρεση και σήμανση των θέσεων μυριστιλίωσης.

Αρκετές βακτηριακές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III που μεταφέρονται μέσα στα φυτικά κύτταρα διαθέτουν μοτίβα μυριστιλίωσης. Τα μοτίβα μυριστιλίωσης είναι κοινές λιπιδιακές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών σε ευκαρυωτικά κύτταρα, σε ιούς καθώς και σε ορισμένα βακτήρια και θεωρούνται ουσιώδεις για τη λειτουργία αρκετά σημαντικών πρωτεϊνών (όπως οι πρωτεΐνες G, SRC και συναφείς κινάσες, παράγοντες ριβοζυλίωσης ADP, η πρωτεΐνη α του ιού HIV κ.α.). Τα κορεσμένα 14-C λιπαρά οξέα (μυριστικά) προσαρτώνται πιο συχνά συμμεταφραστικά από το ένζυμο MyristoylCoA: Protein N-Myristoyltransferase (NMT) στις N-τελικές γλυκίνες ή στις γλυκίνες που γίνονται N-τελικές μετά από πρωτεόλυση. Η παρουσία των μοτίβων μυριστιλίωσης στις πρωτεΐνες τελεστές των Τ3ΕΣ φαίνεται να διευκολύνει την πρόσδεση τους στη μεμβράνη του φυτικού κυττάρου όπου υπάρχουν οι στόχοι των πρωτεϊνών αυτών. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη AnvPphB διαθέτει ένα μοτίβο μυριστιλίωσης στην θέση G63. Το μοτίβο μυριστιλίωσης είναι εσωτερικό οπότε για να αναγνωρισθεί ως υπόστρωμα του ευκαρυωτικού ενζύμου που εκτελεί τη μυριστιλίωση χρειάζεται να απομακρυνθούν τα 62 αμινοτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης.

Η ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα της ηλεκτρονικής βάσης ExPASy Myristoylator και με το NMT-Myr predictor. Τα αποτελέσματα που αποκομίστηκαν από την ανάλυση παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Παρατηρείται ότι η μόνη πρωτεΐνη που παρουσιάζει μοτίβο μυριστιλίωσης σύμφωνα με τα παραπάνω εργαλεία είναι η CW108.

Πίνακας 7: Παρουσία θέσεων μυριστιλίωσης στις πιθανές πρωτεΐνες στόχους της πρωτεΐνης NorT1

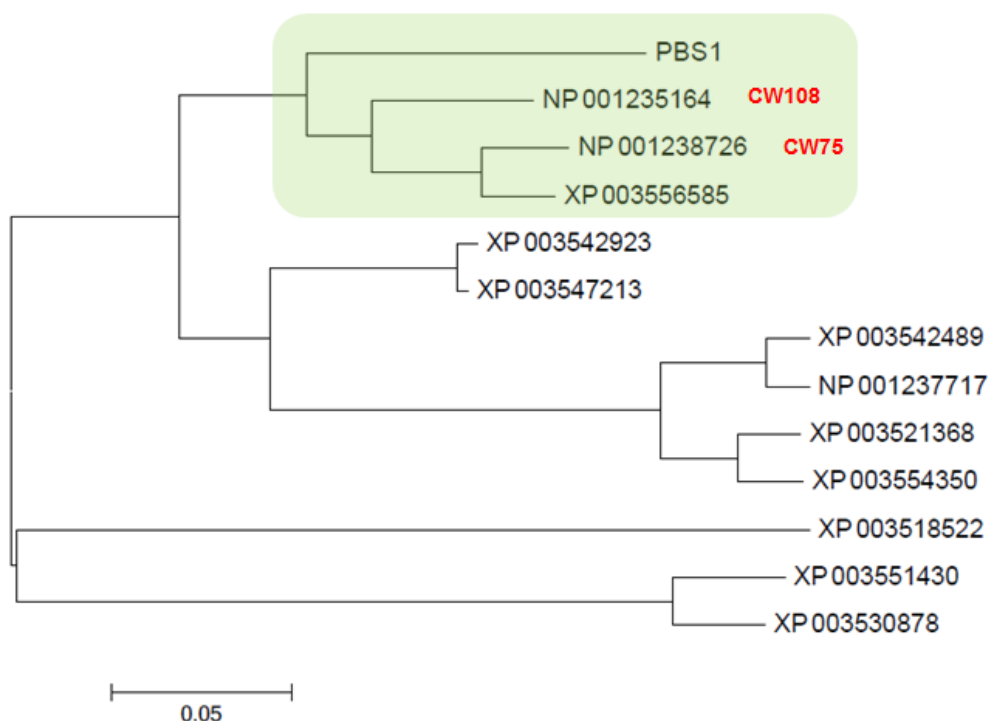
Πρωτεΐνη (κωδικός)	Πρόγραμμα	Θέση	Πεπτίδιο	Score	Cutoff
NP_001235164 - CW108	NMT- Myr predictor	2	MGCFSCFDSSS KEDHNLR	-0,480	8,21e-03
	Myristoylator			0,231175 (low confidence)	

Η παλμιτιλίωση είναι η ομοιοπολική πρόσδεση λιπαρών οξέων, όπως το παλμιτικό, σε κατάλοιπα κυστεϊνών σε πρωτεΐνες, οι οποίες είναι τυπικά μεμβρανικές. Η παλμιτιλίωση ενισχύει την υδροφοβικότητα της πρωτεΐνης και συμβάλλει στην συσχέτιση και αλληλεπίδραση της με τις μεμβράνες. Εμφανίζεται επίσης να έχει κάποιο ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών μεταξύ των μεμβρανικών διαμερισμάτων, όπως επίσης θεωρείται ότι επηρεάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με τη μυριστιλίωση, η παλμιτιλίωση είναι αντιστρεπτή, επειδή ο δεσμός μεταξύ του παλμιτικού οξέος και της πρωτεΐνης είναι θειοεστερικός. Η αντίστροφη αντίδραση καταλύεται από εξειδικευμένα ένζυμα τις θειοεστεράσες. Θέσεις παλμιτιλίωσης βρέθηκαν σε όλες τις υπό μελέτη πρωτεΐνες και παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η ανάλυση και η εύρεση των θέσεων αυτών έγινε *in silico* με το πρόγραμμα C_{ss}-Palm (Prediction of Palmitoylation sites). Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι θέσεις της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης, το τμήμα του πεπτιδίου που περιέχει κυστεΐνη που πιθανά παλμιτιλιώνεται και το ποσοστό εγκυρότητας της πρόβλεψης.

Πίνακας 8: Θέσεις παλμιτιλίωσης πρωτεϊνών-στόχων της NorT1 όπως αυτές εντοπίστηκαν από το πρόγραμμα Css-Palm

Πρωτεΐνη (κωδικός)	Θέση Παλμιτιλίωσης	Πεπτίδιο	Score	Cutoff
NP_001235164	3	MG C FSCFDSS	2,029	0,196
>>	6	MGC F S C FDSSSKE	3,574	0,408
XP_003556585	3	MG C FSCFDSR	2,286	0,308
>>	6	**MGC F S C FDSREDE	1,686	0,308
NP_001238726	3	MG C FSCFDSR	2,129	0,308
>>	6	MGC F S C FDSREDE	1,467	0,308
XP_003547213	5	MV I IC C YQSHQIF	1,224	0,308
>>	49	SFF L KGVCIC C HERH	0,88	0,497
XP_003542923	4	MGG C FPCFGSS	1,048	0,308
>>	7	MGG C FP C FGSSNKE	2,083	0,497
XP_003554350	6	MGW I P C SGYSGTK	2,11	0,308
NP_001237717	6	MGW I P C SGSSNSK	2,343	0,308
XP_003521368	6	MGW I P C SGYSGTK	1,924	0,308
XP_003542489	6	MGW I P C SGSSNTK	2,176	0,308
XP_003551430	3	MS C FSCFLPN	1,819	0,308
>>	6	MSC F S C FLPNEKK	1,79	0,308
XP_003518522	6	MS F F C CTSQEKI	5,648	0,497
>>	7	MS F F C CTSQEKID	4,759	0,497
>>	378	SFF E HG E CS	1,281	1,225
XP_003530878	3	MS C FSCFTSN	2,143	0,308
>>	6	MSC F S C FTSNEKK	2,181	0,308

Επιπλέον δημιουργήθηκε φυλογενετικό δέντρο (Εικ. 20), το οποίο δείχνει παραστατικά την σχέση και την συγγένεια μεταξύ των 13 πρωτεϊνών που επιλέγηκαν για ανάλυση. Σε αυτό παρατηρείται ότι η πρωτεΐνη CW108 βρίσκεται πιο κοντά φυλογενετικά με την PBS1 ενώ παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια με την CW75 και την πρωτεΐνη με τον κωδικό XP_003556585.



Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο που αναπαριστά την σχέση και τη γενετική απόσταση των 13 πρωτεϊνών που υποδείχτηκαν μέσω των μεθόδων βιοπληροφορικής ως πιθανοί στόχοι της πρωτεΐνης NorT1 στα κύτταρα της σόγιας.

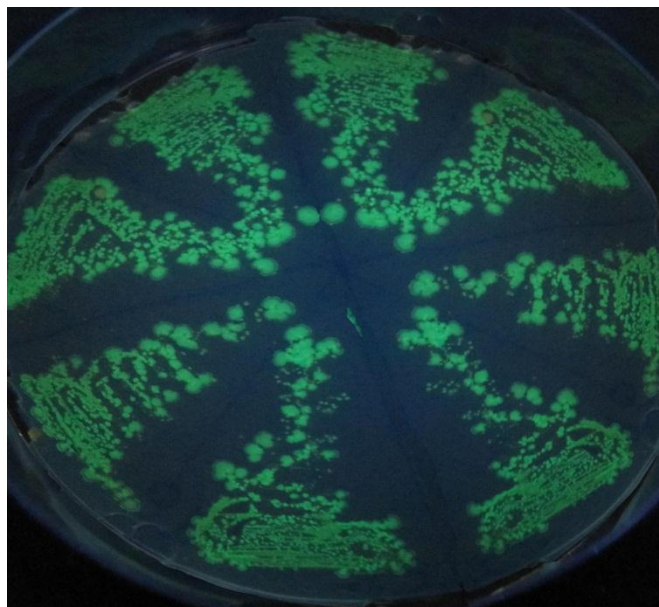
5.4. Κατασκευή πλασμιδιακού φορέα pET26b-ccdB-His

Προκειμένου να διευκολυνθεί η διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης NorT1 με τις πρωτεΐνες της σόγιας κρίθηκε αναγκαία η κατασκευή φορέα έκφρασης με τον οποίο θα μπορούσε : 1) να γίνει γρήγορα και εύκολα η υποκλωνοποίηση του μεγάλου αριθμού των πιθανών πρωτεϊνών-στόχων της σόγιας, 2) θα επέτρεπε τον εύκολο καθαρισμό του πρωτεϊνικού προϊόντος μέσω των επιτόπων και 3) θα επέτρεπε την διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με την βοήθεια των διαφορετικών επιτόπων και χρήση μεθόδων συγκαθαρισμού.

Οι παραπάνω στόχοι επιτεύχθηκαν μέσω της κατασκευής του φορέα pET26b/ccdB-V5-His, πλεονέκτημα του οποίου είναι η αλληλουχία *ccdB* η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή της μεθόδου κλωνοποίησης Gateway. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο είναι εφικτή η γρήγορη και εύκολη υποκλωνοποίηση των γονιδίων του ενδιαφέροντος μας στον φορέα, επιτρέποντας την επαγωγή της έκφρασης τους και τον καθαρισμό τους σε στήλες νικελίου βάση του επιτόπου His. Η έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων στον φορέα pET26b/ccdB-V5-His πραγματοποιείται από τον υποκινητή T7 ο οποίος επάγεται από την προσθήκη IPTG στο μέσο καλλιέργειας και δίνει υψηλό ποσοστό έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου. Τέλος ο καθαρισμός της πρωτεΐνης που θα κλωνοποιηθεί στον φορέα διευκολύνεται από την παρουσία του επιτόπου His στο αμινοτελικό άκρο. Ο φορέας pET26b/ccdB-V5-His προέκυψε από την γραμμοποίηση του φορέα pET26b χρησιμοποιώντας τα ένζυμα NdeI/ XhoI και υποκλωνοποίηση στην θέση αυτή της κασέτας *ccdB*, μετά την απομόνωση του γονιδίου με την μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα τον πλασμιδιακό φορέα pBBR5-DEST42 και εκκινητές τους *ccdB -F3/ ccdB R5* και κατόπιν με πέψη του προϊόντος της PCR με NdeI/ XhoI.

Μετά την κατασκευή του φορέα, απαραίτητος κρίθηκε ο έλεγχος της λειτουργικότητας του. Για να γίνει αυτό, εφαρμόστηκε η μέθοδος Gateway κλωνοποίησης ώστε να αντικατασταθεί η κασέτα *ccdB* με το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας χρωστικής (GFP, **Green Florescence Protein**) μέσω της αντίδρασης της LR κλωνάσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη δοκιμή ήταν ενθαρρυντικά καθώς όλες οι αποικίες που προέκυψαν

από τον μετασχηματισμό παρουσίαζαν φθορισμό κατά την ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία (Εικ. 21).



Εικόνα 21: Καλλιέργειες κυττάρων *E.coli* που προέκυψαν από αντίδραση LR κλωνάσης του φορέα pET26b-ccdB-V5-His με τον φορέα pDONR-GFP. Παρατηρείται φθορισμός στις αποικίες γεγονός που πιστοποιεί την λειτουργικότητα του φορέα.

5.5. Διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης NorT1 με πρωτεΐνες της σόγιας

Μετά από *in silico* ανάλυση που σκοπό είχε την εύρεση πιθανών πρωτεϊνών στόχων της πρωτεΐνης NorT1 στη σόγια, επόμενο βήμα ήταν η πειραματική διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης δύο από αυτών, των πρωτεϊνών CW75 και CW108 με την πρωτεΐνη NorT1 του *B. japonicum*. Αρχικά η στρατηγική που ακολουθήθηκε για να διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση ήταν η συνέκφραση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών της σόγιας (CW75 και CW108) με την βακτηριακή πρωτεΐνη τελεστή NorT1. Ειδικότερα, κύτταρα *E.coli* στελέχους BL21 (DE3) μετασχηματίστηκαν με δύο πλασμίδια. Το ένα πλασμίδιο (pT7-7/norT1) περιείχε το γονίδιο *norT1* και το άλλο (pBBR5DEST42) το γονίδιο *cw75* ή το *cw108*. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος έκφρασης των γονιδίων *cw75* και *cw108* με καθαρισμό των πρωτεϊνών από στήλες νικελίου, αλλά δεν κατέστη εφικτή η ανίχνευσή τους μέσω ανοσοαποτύπωσης western. Η μη ανίχνευση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών θα μπορούσε να οφείλεται στη φύση του φορέα έκφρασή τους

(pBBR5DEST42) ο οποίος χαρακτηρίζεται ως φορέας χαμηλού αριθμού αντιγράφων και αυτό πιθανά να επηρέασε τα επίπεδα παραγωγής των πρωτεϊνών και να μην ήταν εφικτή η ανίχνευση τους. Στη συνέχεια ακολούθησε κλωνοποίηση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των πρωτεϊνών CW75 και CW108 στο φορέα pRH020 προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκφραση και ο καθαρισμός τους. Ο φορέας pRH020 χαρακτηρίζεται ως φορέας υψηλού αριθμού αντιγράφων και επιτρέπει τη σύντηξη του επιτόπου GST στο καρβοξυτελικό άκρο πρωτεϊνών. Η έκφραση των πρωτεϊνών είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lac*. Ακολούθησε υπερέκφραση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) με σκοπό την *in vitro* ανίχνευση μετά από καθαρισμό τους. Τα αποτελέσματα αυτής της προσπάθειας δεν στέφθηκαν με επιτυχία αφού και πάλι δεν επετεύχθη η έκφραση των πρωτεϊνών πιθανόν λόγω του όχι τόσο ισχυρού εκκινητή. Η προσπάθεια έκφρασης των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών συνεχίστηκε με την κλωνοποίηση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας των πρωτεϊνών στον φορέα pRH017 ο οποίος διαφοροποιείται από τον προηγούμενο ως προς τον υποκινητή, ο φορέας αυτός διαθέτει τον ισχυρό υποκινητή T7. Μετά από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών, τον καθαρισμό τους βάση τον επίτοπο GST και την ανάλυση των κλασμάτων που λήφθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των πρωτεϊνών CW75, CW108 δεν ήταν εφικτή.

Συζήτηση- Συμπεράσματα

6. Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η παρουσία και ο ρόλος των εκκριτικών συστημάτων τύπου III έχει διευκρινιστεί και μελετηθεί διεξοδικά στους παθογόνους μικροοργανισμούς κυρίως λόγω της παθογόνου δράσης των πρωτεϊνών τελεστών, που εκκρίνονται από τέτοια συστήματα, στον φυτικό οργανισμό. Είναι λοιπόν γνωστό ότι οι πρωτεΐνες τελεστές έχουν εξειδικευμένα μόρια-στόχους στο φυτικό κύτταρο τα οποία είναι συνήθως μέρος πολύπλοκων βιοχημικών μονοπατιών. Ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών είναι να παρεμβαίνουν σε κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή με αποτέλεσμα να αποδυναμώνουν την άμυνα του φυτού. Εκκριτικά συστήματα τύπου III αλλά και πρωτεΐνες τελεστές αντίστοιχες με αυτές των παθογόνων μικροοργανισμών έχουν βρεθεί και σε συμβιωτικούς οργανισμούς όπως το *Bradyrhizobium japonicum*. Παρόλα αυτά, λίγες μελέτες έχουν γίνει μέχρι σήμερα όσον αφορά το ρόλο των πρωτεϊνών τελεστών στα συμβιωτικά βακτήρια. Όμως είναι πιθανό να επηρεάζουν τη συμβίωση συμμετέχοντας στην διαδικασία αναγνώρισης του βακτηρίου από τον ξενιστή, και σε αναλογία με τα παθογόνα βακτήρια, να καταστέλλουν τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού.

Μία τέτοια πρωτεΐνη τελεστής, η οποία εκκρίνεται από το *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, είναι η πρωτεΐνη NorT1. Η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ομολογία με τις πρωτεΐνες της οικογένειας YopT/AvrPphB της οποίας τα μέλη προέρχονται κυρίως από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αρχικά για τη μελέτη της δράσης της πρωτεΐνης απαραίτητη είναι η αποδοτική έκφραση της αλλά και ο εύκολος καθαρισμός της. Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκφραση και ο καθαρισμός της NorT1 έγινε έκφραση υπό μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης σε σύντηξη με τον επίτοπο GST ο οποίος, όπως έχει αποδειχτεί από προηγούμενες μελέτες, αυξάνει την διαλυτότητα μιας πρωτεΐνης κατά τον καθαρισμό. Μάλιστα πλέον υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμοι φορείς οι οποίοι αυξάνουν την διαλυτότητα της εκάστοτε πρωτεΐνης όταν αυτή κλωνοποιηθεί σε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με τον επίτοπο GST (Hayashi & Kojima, 2008). Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pET28a-GST για την αποτελεσματική έκφραση της πρωτεΐνης NorT1 και το αποτέλεσμα ήταν ενθαρρυντικό καθώς η πρωτεΐνη εκφράστηκε σε μεγάλη ποσότητα, ικανή να ανιχνευθεί στο πήκτωμα αποδιατακτικής πολυακρυλαμίδης όπου έγινε η

ανάλυση των προϊόντων του καθαρισμού της πρωτεΐνης με χρώση Coomassie Blue. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώθηκε ότι η διαλυτότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης αυξάνεται όταν της προστεθεί επίτοπος GST σε αντίθεση με προηγούμενες προσπάθειες για καθαρισμό βασισμένο σε His επίτοπο όπου, ο καθαρισμός της πρωτεΐνης δεν ήταν δυνατός.

Μέσω του καθαρισμού της πρωτεΐνης έγινε αμέσως αντιληπτή η παρουσία μιας δεύτερης ζώνης, μικρότερου μεγέθους. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίζει τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης (Fotiadis et al., 2011), στην οποία διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη NorT1 αυτοπρωτεολύεται. Κατά συνέπεια η δεύτερη ζώνη που παρατηρήθηκε κατά τον καθαρισμό της NorT1 είναι προϊόν αυτοπρωτεόλυσης. Ο ρόλος της αυτοπρωτεόλυσης της NorT1 δεν είναι ακόμα γνωστός. Παρόλα αυτά λόγω του ότι η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του *Pseudomonas syringae* AvrPphB, είναι αναπόφευκτη η συσχέτιση των δύο πρωτεϊνών. Πειράματα που έχουν γίνει για την αξιολόγηση της δράσης της AvrPphB δείχνουν ότι η πρωτεΐνη αυτοπρωτεολύεται και αποτέλεσμα της αυτοπρωτεόλυσης είναι η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας στο *Arabidopsis* εξαρτώμενη από την RPS5- AvrPphB αλληλεπίδραση. Αυτή η δράση της AvrPphB αποδείχτηκε μέσω μεταλλαγών στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης, οι οποίες της στέρησαν τη λειτουργικότητα της. Η μη λειτουργική πρωτεΐνη δεν αυτοπρωτεολυόταν και δεν προκαλούσε αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτικό σύστημα (Hotson & Mudgett, 2004). Στην περίπτωση της υπό μελέτη πρωτεΐνης ο ρόλος των πρώτων αμινοξικών καταλοίπων που αποκόπτονται δεν έχει διευκρινιστεί. Έχει όμως παρατηρηθεί ότι τα πρώτα αμινοξέα αποκόπτονται μετά την είσοδο της πρωτεΐνης στο φυτικό κύτταρο όπου πιθανά να ολοκληρώνουν τον ρόλο τους.

Για να διασφαλιστεί η εξειδικευμένη δράση των πρωτεϊνών τελεστών απαραίτητη είναι η σωστή έκκριση και διαμερισματοποίηση τους. Για να επιτευχθεί αυτό, εκτός από το εκκριτικό σύστημα τύπου III, το οποίο «αναλαμβάνει» την έκκριση τους στο φυτικό σύστημα, απαραίτητοι είναι και μοριακοί συνοδοί, μόρια τα οποία λειτουργούν ως οδηγοί όταν οι πρωτεΐνες εισέλθουν μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, όπου θα εκδηλώσουν την εξειδικευμένη δράση τους και θα αλληλεπιδράσουν με το μόριο-στόχο. Στην πρωτεΐνη NorT1 όπως και σε άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας YopT έχει

παρατηρηθεί αυτοπρωτεόλυση των 40-50 αμνοτελικών αμινοξικών καταλοίπων. Αυτή η αποκοπή του αμνοτελικού άκρου της πρωτεΐνης, όταν αυτή εισέλθει στο κύτταρο του ξενιστή, δίνει ενδείξεις για την πιθανή δράση των πρώτων αμινοξικών καταλοίπων ως συνοδό του λειτουργικού τμήματος της πρωτεΐνης. Για την διαπίστωση της δράσης ενός μορίου ως μοριακό συνοδό, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι μέθοδοι. Ιδιαίτερα διαδεδομένη μέθοδος είναι η εφαρμογή της χημικής δοκιμής με χρήση κιτρικής συνθάσης. Σύμφωνα με αυτή τη δοκιμή, οι πρωτεΐνες των οποίων η δράση σαπερόνης δεν έχει διευκρινιστεί, επωάζονται κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες με αποδιατεταγμένη κιτρική συνθάση και ακολουθεί χημική αξιολόγηση της λειτουργικότητας του ενζύμου (Mishra et al., 2005). Δεδομένου ότι η λειτουργικότητα της κάθε πρωτεΐνης είναι στενά συνδεδεμένη με τη δομή της, η δράση της κιτρικής συνθάσης θα είναι η αναμενόμενη μόνο αν η πρωτεΐνη μεταβεί στη λειτουργική της δομή, δηλαδή στην κατάλληλη τεταρτοταγή δομή, μετά από την δράση της σαπερόνης. Με αυτό τον τρόπο είναι εύκολο να διαπιστωθεί το αν η πρωτεΐνη με την οποία επωάστηκε η κιτρική συνθάση έχει δράση σαπερόνης. Η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν εφαρμόστηκε στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία λόγω του ότι οι σαπερόνες των T3EΣ είναι πολύ εξειδικευμένες ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν. Έτσι είναι πολύ πιθανό, λόγω της θεωρητικά μικρής συγγένειας της πρωτεΐνης τελεστή και συγκεκριμένα των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων με την κιτρική συνθάση, να μην ήταν εφικτή η αξιολόγηση της δράσης των τελευταίων ως μοριακοί συνοδοί. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν ο έλεγχος αλληλεπίδρασης των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης, όπως αυτά προκύπτουν από την αυτοπρωτεόλυση, μέσω μιας σειράς καθαρισμών οι οποίοι βασίζονται στους διαφορετικούς επιτόπους που υπάρχουν στα άκρα της πρωτεΐνης όταν αυτή εκφράζεται από τον φορέα pET28a-GST. Πιο συγκεκριμένα, η κωδικοποιούσα περιοχή της πρωτεΐνης NorT1 κλωνοποιήθηκε σε ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου *gst* ενώ το εναρκτήριο κωδικόνιο της μεθειονίνης προηγείται της αλληλουχίας του επιτόπου πολυϊστιδινών που βρίσκεται στον φορέα πριν από το *norT1*. Αυτή η στρατηγική βοήθησε στο έλεγχο της αλληλεπίδρασης των δύο τμημάτων αφού μετά την αυτοπρωτεόλυση της πρωτεΐνης το αμνοτελικό της άκρο είναι συνδεδεμένο με τον His επίτοπο και

το καρβοξυτελικό της άκρο παραμένει συνδεδεμένο με τον GST επίτοπο. Ένδειξη για την αλληλεπίδραση των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης παρέχεται από την εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης Western σε πρωτεϊνικά κλάσματα που παραλήφθηκαν από τον καθαρισμό της NorT1 σε στήλη νικελίου. Σε αυτόν τον καθαρισμό παρατηρήθηκε εκτός από την αναμενόμενη μεγέθους ζώνη που αντιστοιχεί στην NorT1 και μια δεύτερη μεγέθους ζώνη, μικρότερη από την πρώτη. Η εικασία που προέκυψε από αυτά τα αποτελέσματα ήταν ότι η δεύτερη ζώνη πιθανά να αντιστοιχεί στο πρωτεολυμένο προϊόν, το οποίο στερείται το αμινοτελικό του άκρο και κατά συνέπεια δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με την στήλη νικελίου και να δεσμευτεί. Αν όμως η ζώνη αυτή είναι όντως το καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτό σημαίνει ότι συγκαθαρίζεται με το αμίνο-τελικό άκρο, δίνοντας μας έτσι ένδειξη για την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο τμημάτων. Ο μόνος τρόπος να διαπιστωθεί αυτός ο ισχυρισμός ήταν η εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης Western με την χρήση 2 αντισωμάτων: ενός αντισώματος ικανού να ανιχνεύσει τον επίτοπο GST και ενός δεύτερου ικανού να ανιχνεύσει τον His επίτοπο. Το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος ήταν η εμφάνιση της δεύτερης ζώνης κατά την επώαση με το anti-GST αντίσωμα, η οποία δεν εμφανίστηκε κατά την επώαση του με το anti-His αντίσωμα. Αυτό το πείραμα μας δίνει μια ισχυρή ένδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια μια πρώτη ένδειξη για τον πιθανό ρόλο των πρώτων αμινοξικών καταλοίπων ως σαπερόνη του λειτουργικού της τμήματος.

Με βάση τα πειράματα που διεξήχθησαν στην παρούσα μελέτη και λόγω της αλληλεπίδρασης που παρατηρήθηκε μεταξύ των δύο τμημάτων της πρωτεΐνης λάβαμε μία πρώτη ένδειξη για τον πιθανό ρόλο των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων της ως μοριακό συνοδό του λειτουργικού τμήματος της πρωτεΐνης. Η ένδειξη αυτή γίνεται ισχυρότερη λόγω του ότι, όπως έχει προαναφερθεί, στο φυτικό κύτταρο η πρωτεΐνη βρίσκεται πάντοτε πρωτεολυμένη ενώ στο βακτηριακό κύτταρο πάντα με την παρουσία των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων. Από αυτό συμπεραίνουμε ότι η δράση των 49 αυτών αμινοξέων «τοποθετείται» χρονικά κατά τη μεταφορά της πρωτεΐνης από το βακτηριακό κύτταρο στο κύτταρο του ξενιστή και μετά αποκόπτεται.

Οι πρωτεΐνες τελεστές χαρακτηρίζονται από μία πολύ εξειδικευμένη δράση και στοχεύουν σε συγκεκριμένα μόρια στόχους του ξενιστή, με σκοπό την τροποποίηση πολύπλοκων μηχανισμών του κυττάρου. Το επόμενο βήμα αυτής της μελέτης ήταν η ανίχνευση των πιθανών στόχων της NorT1 στη σόγια που αποτελεί τον ξενιστή του *Bradyrhizobium japonicum*. Για να επιτευχθεί αυτό εφαρμόστηκαν μέθοδοι βιοπληροφορικής για την *in silico* διερεύνηση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα, για την εύρεση των πιθανών στόχων της NorT1 στη σόγια, η μελέτη βασίστηκε στο ομόλογο σύστημα που παρατηρείται στο *Arabidopsis thaliana*, το PBS1-AvrPphB, όπου AvrPphB η εκκρινόμενη πρωτεΐνη τελεστής του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* και για την οποία έχει παρατηρηθεί δομική ομολογία με την NorT1. Κριτήριο επιλογής των πρωτεϊνών της σόγιας με τις οποίες αλληλεπιδρά η NorT1 ήταν το ποσοστό ομολογίας με την PBS1 του *Arabidopsis*, οι ιστοί στους οποίους παρατηρείται έκφραση αυτών των πρωτεϊνών, η παρουσία αμινοξικών μοτίβων παλμιτιλίωσης και μυριστιλίωσης και η παρουσία του μοτίβου αυτοπρωτεόλυσης των τριών αμινοξέων GDK. Το ποσοστό ομολογίας των πρωτεϊνών της σόγιας με την PBS1 του *Arabidopsis* είναι ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την εύρεση των πρωτεϊνών στόχων της NorT1 αφού και η ίδια η NorT1 παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας με την AvrPphB, έτσι περιμένουμε ο αντίστοιχος στόχος της να παρουσιάζει ομολογία με τον αντίστοιχο στόχο της AvrPphB δηλαδή την φυτική πρωτεΐνη PBS1 του *Arabidopsis*. Οι ιστοί στους οποίους παρατηρείται η έκφραση είναι σημαντικός παράγοντας επιλογής των αντίστοιχων πρωτεϊνικών στόχων αφού είναι προφανές ότι η αλληλεπίδραση της βακτηριακής πρωτεΐνης με την φυτική θα γίνεται σε ριζικά κύτταρα του φυτού από όπου και γίνεται η είσοδος του βακτηρίου στο φυτό, με σκοπό την εγκατάσταση της συμβιωτικής σχέσης. Η παρουσία μοτίβων μυριστιλίωσης και παλμιτιλίωσης υποδηλώνουν την πρόσδεση ή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης στην μεμβράνη του κυττάρου. Αυτό συμπίπτει και πάλι με την PBS1 η οποία γνωρίζουμε ότι βρίσκεται σε στενή σχέση με την μεμβράνη, γεγονός που συνδέεται με την δράση της και τις ιδιότητες της και διευκολύνει την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες όπως η NorT1. Τέλος το σημείο πρωτεόλυσης των τριών αμινοξέων GDK είναι σημαντικό χαρακτηριστικό που πρέπει να εξεταστεί αφού αποτελεί το χαρακτηριστικό σημείο πρωτεόλυσης

της πρωτεΐνης PBS1 στην οποία βασίζεται η αντίδραση υπερευαισθησίας που ενεργοποιείται στον φυτικό οργανισμό. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μοτίβο αυτοπρωτεόλυσης GDK το οποίο παρουσιάζεται στην κινάση PBS1 είναι παραπλήσιο του μοτίβου αυτοπρωτεόλυσης GDK της AnrPphB (Shao et al, 2002). Βασιζόμενοι στα παραπάνω κριτήρια, τα αποτελέσματα που λήφθηκαν ήταν 13 πιθανοί στόχοι της πρωτεΐνης NorT1.

Για να προχωρήσουμε στην πειραματική διερεύνηση και στην απόδειξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της NorT1 και των πρωτεϊνών της σόγιας απαραίτητη κρίθηκε η δημιουργία φορέα στον οποίο να υπάρχει δυνατότητα ικανοποιητικής έκφρασης των πρωτεϊνών. Λόγω του μεγάλου αριθμού των υποψήφιων πρωτεϊνών-στόχων αποφασίσαμε να εκμεταλλευτούμε μία καινούργια τεχνολογία κλωνοποίησης, την τεχνολογία gateway κλωνοποίησης. Σύμφωνα με την τελευταία είναι δυνατή η κατασκευή φορέα ο οποίος να διαθέτει ειδική αλληλουχία (ccdB) στην επιθυμητή θέση μεταξύ ειδικών άκρων που επιτρέπουν τον ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ της αλληλουχίας αυτής και της επιθυμητής αλληλουχίας όταν αυτή βρίσκεται ανάμεσα στα αντίστοιχα άκρα. Η αντίδραση καταλύεται από ένα και μόνο ένζυμο, την κλωνάση (LR ή BP, ανάλογα με την εφαρμογή). Η τεχνολογία αυτή πλεονεκτεί έναντι των παραδοσιακών μεθόδων κλωνοποίησης λόγω του ότι επιτρέπει την γρήγορη και εύκολη κλωνοποίηση των κωδικών περιοχών των πρωτεϊνών που μας ενδιαφέρουν, πλεονέκτημα μεγάλο στην συγκεκριμένη περίπτωση όπου σκοπός ήταν η αποδοτική έκφραση και κλωνοποίηση 13 πρωτεϊνών, πιθανών στόχων της NorT1. Με σκοπό την εύκολη και γρήγορη κλωνοποίηση των κωδικών περιοχών των πρωτεϊνών στόχων, τον εύκολο και αποδοτικό καθαρισμό τους μέσω συγκεκριμένων επιτόπων και την διερεύνηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βάση της πρόσδεσης με διαφορετικούς επιτόπους κατασκευάστηκε ο φορέας pET26b-ccdB-His. Παράλληλες δοκιμές έγιναν και για την κατασκευή διαφορετικών φορέων με σκοπό την εκμετάλλευση της τεχνολογίας Gateway και την αξιοποίηση διαφορετικών επιτόπων που θα επέτρεπαν την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μέσω συγκαθαρισμών.

Μετά την κατασκευή του φορέα, το επόμενο βήμα ήταν η κλωνοποίηση πιθανών πρωτεϊνών στόχων της NorT1 στον φορέα έτσι ώστε μέσω συγκαθαρισμών και *in vitro* πειραμάτων αλληλεπίδρασης να διερευνηθεί η

τυχόν αλληλεπίδραση. Η προσπάθεια αυτή δεν επέφερε καρπούς αφού οι πρωτεΐνες της σόγιας δεν ήταν δυνατόν να εκφραστούν σε ικανοποιητικά επίπεδα στο *E.coli*. Πιθανά αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για ευκαρυωτικές πρωτεΐνες οι οποίες δεν είναι δυνατόν να εκφραστούν σε προκαρυωτικό σύστημα λόγω έλλειψης εξειδικευμένων κωδικονίων ή ίσως λόγω του ότι πιθανά να γίνονται στόχος πρωτεασών λόγω του ότι δεν είναι δυνατόν να υποστούν τις απαραίτητες για την σταθερότητα τους μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Μελλοντικές προοπτικές

7. Μελλοντικές προοπτικές

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε εφικτός ο εύκολος καθαρισμός της πρωτεΐνης NorT1 σε υψηλά επίπεδα μέσω σύντηξης της με τον επίτοπο GST ο οποίος αύξησε την διαλυτότητα της. Επιπλέον διερευνήθηκε η δράση των πρώτων 49 αμινοξικών καταλοίπων της πρωτεΐνης παρέχοντάς μας έτσι μια πρώτη ένδειξη για την δράση τους σαν σαπερόνη του λειτουργικού τμήματος της πρωτεΐνης. Μετά από *in silico* ανάλυση βρέθηκαν οι πιθανές πρωτεΐνες-στόχοι της NorT1 στη σόγια και για να επιτευχθεί η έκφραση τους για χρήση σε μετέπειτα πειράματα αλληλεπίδρασης, κατασκευάστηκε ο φορέας pET26b-ccdb-His. Η λειτουργικότητα του φορέα αυτού εξετάστηκε μέσω κλωνοποίησης και έκφρασης της κωδικής περιοχής της GFP ενώ ακολούθησε η κλωνοποίηση των πρωτεϊνών της σόγιας CW75, CW108. Η έκφραση των δύο τελευταίων δεν ήταν επιτυχημένη λόγω των λόγων που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επόμενα στάδια της μελέτης αυτής θα ήταν η βελτιστοποίηση της έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών σε προκαρυωτικό σύστημα. Αυτό πιθανά να επιτευχθεί με χρήση διαφορετικών σειρών *E.coli* οι οποίες είναι βελτιστοποιημένες ως προς τα κωδικόνια που διαθέτουν και ευνοούν την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών σε προκαρυωτικά συστήματα. Μία άλλη προσέγγιση θα ήταν να τροποποιηθεί η αλληλουχία της ευκαρυωτικής πρωτεΐνης ανάλογα, με επιλογή συνωνύμων κωδικονίων ώστε να βελτιστοποιηθεί η έκφραση της στο προκαρυωτικό σύστημα. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο υπάρχουν διαθέσιμες υπηρεσίες υπολογισμού της συμβατότητας έκφρασης της υπό μελέτης πρωτεΐνης σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης. Τέτοιες παροχές παρέχονται από εταιρείες όπως η Genscript, η οποία μάλιστα παρέχει τα αντίστοιχα εργαλεία βιοπληροφορικής που βοηθάνε στη πρόβλεψη της συμβατότητας έκφρασης. Παραδείγματος χάριν, όταν αυτό το εργαλείο χρησιμοποιηθεί για να προβλεφθεί η συμβατότητα έκφρασης της πρωτεΐνης CW108 στο *E.coli* το αποτέλεσμα που λαμβάνουμε είναι ένας δείκτης συμβατότητας κωδικονίων (codon adaptation index) της τάξεως του 0,58 όταν αυτός ο δείκτης πρέπει να είναι πάνω από 0,8 για να επιτύχουμε ικανοποιητική έκφραση. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, ένας άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης και στον

οποίο θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή είναι η χρήση ισχυρού προαγωγέα ο οποίος να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης.

Όταν γίνει εφικτή η ικανοποιητική έκφραση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, σειρά έχουν μια σειρά πειραμάτων που σκοπό θα έχουν την διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και της NopT1 . Τέτοια πειράματα θα ήταν συγκαθαρισμοί που να βασίζονται στην χρήση διαφορετικών επιτόπων, υβριδικό σύστημα δύο συστατικών ζύμης, ανοσοκατακρήμνιση και απλούστερες τεχνικές που βασίζονται στο διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο της κάθε πρωτεΐνης όπως η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή αγαρόζης (Kim et al., 2000).

Βιβλιογραφία

8. Βιβλιογραφία

- Albus, U., R. Baier, O. Holst, A. Pühler & K. Niehaus, (2001) Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol* 151: 597-606.
- Alouf, J. E., (2000) Bacterial protein toxins. An overview. *Methods Mol Biol* 145: 1-26.
- Aslam, S. N., M. A. Newman, G. Erbs, K. L. Morrissey, D. Chinchilla, T. Boller, T. T. Jensen, C. De Castro, T. Ierano, A. Molinaro, R. W. Jackson, M. R. Knight & R. M. Cooper, (2008) Bacterial polysaccharides suppress induced innate immunity by calcium chelation. *Curr Biol* 18: 1078-1083.
- Badri, D. V. & J. M. Vivanco, (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 32: 666-681.
- Bellato, C., H. B. Krishnan, T. Cubo, F. Temprano & S. G. Pueppke, (1997) The soybean cultivar specificity gene *nolX* is present, expressed in a *nodD*-dependent manner, and of symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of *Rhizobium (Sinorhizobium) fredii*. *Microbiology* 143 (Pt 4): 1381-1388.
- Blocker, A., P. Gounon, E. Larquet, K. Niebuhr, V. Cabiaux, C. Parsot & P. Sansonetti, (1999) The tripartite type III secretin of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. *J Cell Biol* 147: 683-693.
- Boller, T. & G. Felix, (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60: 379-406.
- Bushman, W., J. F. Thompson, L. Vargas & A. Landy, (1985) Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science* 230: 906-911.
- Buttner, D. & U. Bonas, (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 6: 312-319.
- Buttner, D. & U. Bonas, (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* 9: 193-200.

- Chang, J. H., J. M. Urbach, T. F. Law, L. W. Arnold, A. Hu, S. Gombar, S. R. Grant, F. M. Ausubel & J. L. Dangl, (2005) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae* Proc Nat Acad Sci USA 102: 2549-2554.
- Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski & E. Cascales, (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. Annu Rev Microbiol 59: 451-485.
- Cooper, J. E., (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. J Appl Microbiol 103: 1355-1365.
- Dangl, J. L. & J. D. Jones, (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826-833.
- De Vleeschauwer, D. & M. Höfte, (2009) Rhizobacteria-induced systemic resistance. Adv Bot Res 51: 223-281.
- Deakin, W. J. & W. J. Broughton, (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. Nature Rev Microbiol 7: 312-320.
- Dean, P., (2011) Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. FEMS Microbiol Rev 35: 1100-1125.
- Deslandes, L., J. Olivier, N. Peeters, D. X. Feng, M. Khounlotham, C. Boucher, I. Somssich, S. Genin & Y. Marco, (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus Proc Nat Acad Sci USA 100: 8024-8029.
- El Yahyaoui, F., H. Küster, B. Ben Amor, N. Hohnjec, A. Pühler, A. Becker, J. Gouzy, T. Vernié, C. Gough, A. Niebel, L. Godiard & P. Gamas, (2004) Expression Profiling in *Medicago truncatula* Identifies More Than 750 Genes Differentially Expressed during Nodulation, Including Many Potential Regulators of the Symbiotic Program. Plant Physiol 136: 3159-3176.
- Felix, G., J. D. Duran, S. Volko & T. Boller, (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. The Plant J 18: 265-276.

- Fotiadis, C. T., M. Dimou, D. G. Georgakopoulos, P. Katinakis & A. P. Tampakaki, (2012) Functional characterization of NopT1 and NopT2, two type III effectors of *Bradyrhizobium japonicum*. FEMS microbiol lett 327: 66-77.
- Galan, J. E., (2009) Common themes in the design and function of bacterial effectors. Cell host microbe 5: 571-579.
- Ghosh, P., (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. Microbiol Mol Biol R : MMBR 68: 771-795.
- Gottfert, M., S. Rothlisberger, C. Kundig, C. Beck, R. Marty & H. Hennecke, (2001) Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. J Bacteriol 183: 1405-1412.
- Harrison, M. J., (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu Rev Microbiol 59: 19-42.
- Hartley, J. L., G. F. Temple & M. A. Brasch, (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Res 10: 1788-1795.
- Hayashi, K. & C. Kojima, (2008) pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. Protein Expres Purif 62: 120-127.
- He, S. Y. & Q. Jin, (2003) The Hrp pilus: learning from flagella. Curr Opin Microbiol 6: 15-19.
- Hotson, A. & M. B. Mudgett, (2004) Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. Curr Opin Plant Biol 7: 384-390.
- Jin, Q., W. Hu, I. Brown, G. McGhee, P. Hart, A. L. Jones & S. Y. He, (2001) Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. Mol Microbiol 40: 1129-1139.
- Jones, J. D. & J. L. Dangl, (2006) The plant immune system. Nature 444: 323-329.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada & S. Tabata, (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing

- symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (supplement). DNA Res: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 9: 225-256.
- Kim, R., H. Yokota & S. H. Kim, (2000) Electrophoresis of proteins and protein-protein complexes in a native agarose gel. Anal Biochem 282: 147-149.
- Kingsbury, N. & C. J. Masters, (1970) On the determination of component molecular weights in complex protein mixtures by means of disc electrophoresis. Anal Biochem 36: 144-158.
- Krause, A., A. Doerfel & M. Gottfert, (2002) Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol Plant Microbe In: MPMI 15: 1228-1235.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan & S. I. Aizawa, (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. Science 280: 602-605.
- Landy, A., (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. Annu Rev Biochem 58: 913-949.
- Lewis, J. D., D. S. Guttman & D. Desveaux, (2009) The targeting of plant cellular systems by injected type III effector proteins. Semin Cell Dev Biol 20: 1055-1063.
- Losada, L. C. & S. W. Hutcheson, (2005) Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. Mol Microbiol 55: 941-953.
- Mackey, D. & A. J. McFall, (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. Mol Microbiol 61: 1365-1371.
- Madigan M. T., Martinko J. M., and Perker J. 2005. Βιολογία των μικροοργανισμών. Πανεπ. εκδόσεις. Κρήτης.
- Marie, C., W. J. Broughton & W. J. Deakin, (2001) Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmers? Cur Opin Plant Biol 4: 336-342.
- Marie, C., W. J. Deakin, V. Viprey, J. Kopcinska, W. Golinowski, H. B. Krishnan, X. Perret & W. J. Broughton, (2003) Characterization of

- Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol Plant Microbe In* 16: 743-751.
- McCann, H. C. & D. S. Guttman, (2008) Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol* 177: 33-47.
- Meinhardt, L. W., H. B. Krishnan, P. A. Balatti & S. G. Pueppke, (1993) Molecular cloning and characterization of a sym plasmid locus that regulates cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* USDA257. *Mol Microbiol* 9: 17-29.
- Millet, Y. A., C. H. Danna, N. K. Clay, W. Songnuan, M. D. Simon, D. Werck-Reichhart & F. M. Ausubel, (2010) Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns. *The Plant Cell* 22: 973-990.
- Mishra, R., R. Seckler & R. Bhat, (2005) Efficient refolding of aggregation-prone citrate synthase by polyol osmolytes: how well are protein folding and stability aspects coupled? *J Biol Chem* 280: 15553-15560.
- Mota, L. J. & G. R. Cornelis, (2005) The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37: 234-249.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B. F. Holt, 3rd & J. L. Dangl, (2003) Recognition and response in the plant immune system. *Annu Rev Genet* 37: 579-609.
- Nimchuk, Z., E. Marois, S. Kjemtrup, R. T. Leister, F. Katagiri & J. L. Dangl, (2000) Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* 101: 353-363.
- Oldroyd, G. E. & J. A. Downie, (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Ann Rev Plant Biol* 59: 519-546.
- Oldroyd, G. E., J. D. Murray, P. S. Poole & J. A. Downie, (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Ann Rev Genet* 45: 119-144.
- Page, A. L., P. Sansonetti & C. Parsot, (2002) Spa15 of *Shigella flexneri*, a third type of chaperone in the type III secretion pathway. *Mol Microbiol* 43: 1533-1542.
- Parsot, C., E. Ageron, C. Penno, M. Mavris, K. Jamoussi, H. d'Hauteville, P. Sansonetti & B. Demers, (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and

- its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 56: 1627-1635.
- Parsot, C., C. Hamiaux & A. L. Page, (2003) The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6: 7-14.
- Peleg-Grossman, S., Y. Golani, Y. Kaye, N. Melamed-Book & A. Levine, (2009) NPR1 protein regulates pathogenic and symbiotic interactions between *Rhizobium* and legumes and non-legumes. *PLoS ONE* 4: e8399.
- Preston, G., W. L. Deng, H. C. Huang & A. Collmer, (1998) Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* 180: 4532-4537.
- Ptashne, M., (1992) *A Genetic Switch: Phage [lambda] and Higher Organisms*. Blackwell Publishers.
- Puri, N., C. Jenner, M. Bennett, R. Stewart, J. Mansfield, N. Lyons & J. Taylor, (1997) Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 247-256.
- Sanchez, L., S. Weidmann, C. Arnould, A. R. Bernard, S. Gianinazzi & V. Gianinazzi-Pearson, (2005) *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 139: 1065-1077.
- Scheel, D., (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 305-310.
- Schirromeister, J., L. Friedrich, M. Wenzel, M. Hoppe, C. Wolf, M. Gottfert & S. Zehner, (2011) Characterization of the self-cleaving effector protein NopE1 of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 193: 3733-3739.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa & A. Abe, (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11638-11643.

- Shao, F., C. Golstein, J. Ade, M. Stoutemyer, J. E. Dixon & R. W. Innes, (2003) Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* 301: 1230-1233.
- Shao, F., P. M. Merritt, Z. Bao, R. W. Innes & J. E. Dixon, (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell* 109: 575-588.
- Spaink, H. P., (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann Rev Microbiol* 54: 257-288.
- Staelin, C., L. S. Forsberg, W. D'Haese, M. Y. Gao, R. W. Carlson, Z. P. Xie, B. J. Pellock, K. M. Jones, G. C. Walker, W. R. Streit & W. J. Broughton, (2006) Exo-oligosaccharides of *Rhizobium* sp. strain NGR234 are required for symbiosis with various legumes. *J Bacteriology* 188: 6168-6178.
- Suss, C., J. Hempel, S. Zehner, A. Krause, T. Patschkowski & M. Gottfert, (2006) Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* 126: 69-77.
- Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai & C. Sasakawa, (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* 19: 3876-3887.
- Tampakaki, A. P., M. Bastaki, J. W. Mansfield & N. J. Panopoulos, (2002) Molecular determinants required for the avirulence function of AvrPphB in bean and other plants. *Mol Plant Microbe In* 15: 292-300.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos & M. Kokkinidis, (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiology* 6: 805-816.
- Thain, A., K. Gaston, O. Jenkins & A. R. Clarke, (1996) A method for the separation of GST fusion proteins from co-purifying GroEL. *Trends Genet* : TIG 12: 209-210.
- Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka & B. B. Finlay, (2005) CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both

- LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57: 1762-1779.
- Thomassin, J. L., X. He & N. A. Thomas, (2011) Role of EscU auto-cleavage in promoting type III effector translocation into host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 11: 205.
- Tseng, T. T., B. M. Tyler & J. C. Setubal, (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 9: S2.
- Wattiau, P., S. Woestyn & G. R. Cornelis, (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 20: 255-262.
- Wei, C. F., W. L. Deng & H. C. Huang, (2005) A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol Microbiol* 57: 520-536.
- Weisberg, R. A. & A. Landy, (1983) Site-specific recombination in phage lambda. *Cold Spring Harbor M* 13: 211-250.
- Wenzel, M., L. Friedrich, M. Gottfert & S. Zehner, (2010) The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Mol Plant Microbe In* 23: 124-129.
- Zeidler, D., U. Zahring, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler & J. Durner, (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *P Nat Acad Sci USA* 101: 15811-15816.
- Zhu, M., F. Shao, R. W. Innes, J. E. Dixon & Z. Xu, (2004) The crystal structure of *Pseudomonas* avirulence protein AvrPphB: a papain-like fold with a distinct substrate-binding site. *P Nat Acad Sci USA* 101: 302-307.