



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*Escherichia coli* ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ  
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.**

**ΓΙΑΛΑΜΑ Δ. ΔΗΜΗΤΡΑ**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Φ. Κολίσης**

**Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

**Αθήνα 2017**

**ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
*Escherichia coli* ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ  
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.**

**ΓΙΑΛΑΜΑ Δ. ΔΗΜΗΤΡΑ**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Φ. Κολίσης**

**Σχολή Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας**

**Αθήνα 2017**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).*

*Στους γονείς μου,  
Διονύση και Μαρία*

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ομότιμος καθηγητής	Κολίσης Φραγκίσκος (Επιβλέπων)
Ερευνητής Γ	Σκρέτας Γεώργιος
Επίκουρος καθηγητής	Χατζηνικολάου Δημήτρης

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ομότιμος καθηγητής	Κολίσης Φραγκίσκος
Επίκουρος καθηγητής	Χατζηνικολάου Δημήτρης
Ερευνητής Γ	Σκρέτας Γεώργιος
Καθηγητής	Κέκος Δημήτριος
Επίκουρος καθηγητής	Τόπακας Ευάγγελος
Καθηγητής ΕΜΠ	Λυμπεράτος Γεράσιμος
Ερευνητής Β	Ζωγράφος Σπύρος

## Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας & Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείου και χρηματοδοτήθηκε από την επιχορήγηση «Συνεργασία» 09ΣΥΝ-21-1078 από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας.

Θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Ομ. Καθ. Φραγκίσκο Κολίση και τον συνεπιβλέποντα στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών Ερευνητή Γ Γεώργιο Σκρέτα για την ανάθεση της διατριβής με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Ευχαριστώ επίσης τον Ομ. Καθ. Φραγκίσκο Κολίση για την εμπιστοσύνη του και τις συμβουλές του, όταν χρειάστηκαν. Τον ερευνητή Γ Γεώργιο Σκρέτα ευχαριστώ θερμά και για τις πολύτιμες συμβουλές του, τις εύστοχες παρατηρήσεις του και το συνεχές ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και της συγγραφής και τέλος, την εμπιστοσύνη του. Ευχαριστώ επίσης το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής, τον Επικ. Καθ. Δημήτρη Χατζηνικολάου, για τη διάθεση του εξοπλισμού του εργαστηρίου του για πειράματα χρωματογραφίας και την πολύτιμη βοήθειά του.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ για την ουσιαστική βοήθεια στα πειράματα RT-PCR την Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών Όλγα Παπαδόδημα και τον Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών Αλέξανδρο Πίντζα για τη διάθεση του εξοπλισμού.

Για τη συμμετοχή στα πειράματα ενδοπηκτικού φθορισμού και κυτταρομετρίας ροής ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Δάφνη Δεληβοριά, την υποψήφια διδάκτορα Μυρτώ Μίχου για τη συμμετοχή της στις συγκρίσεις φθορισμού στελεχών που παράγουν διάφορες μεμβρανικές πρωτεΐνες και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Καλλιόπη Κωστελίδου για την κατασκευή πλασμιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η συμβολή τους σε αυτή τη διατριβή ήταν ουσιαστική. Για τεχνική υποστήριξη ευχαριστώ πολύ την Αθηνά Σταυρίδου, τον Κωνσταντίνο Ασημακόπουλο και την Κλεοπάτρα Αβράμπου.

Ευχαριστώ και όλα τα μέλη που βρίσκονται ή πέρασαν από το εργαστήριο Ενζυμικής και Συνθετικής Βιοτεχνολογίας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών για την ομαλή συνεργασία και το όμορφο κλίμα. Ήταν πραγματικά ευχαρίστησή μου να δουλεύω με αυτά τα άτομα, που ήταν πολύτιμοι συνεργάτες.

Τέλος, ευχαριστώ όλους μου τους φίλους, είτε ήταν μέλη του εργαστηρίου είτε όχι, και την οικογένεια μου για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς εκείνους δεν θα ήταν εφικτό να φτάσω μέχρι εδώ.

## Περίληψη

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν σημαντικές πρωτεϊνικές οικογένειες, όπως υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G, μεταφορείς και κανάλια. Το επιστημονικό ενδιαφέρον για αυτές είναι ιδιαίτερα αυξημένο και καθώς είναι εξαιρετικά σημαντικοί στόχοι για φάρμακα, προσελκύουν το ενδιαφέρον και της φαρμακοβιομηχανίας. Ενδιαφέρον υπάρχει για το χαρακτηρισμό των μεμβρανικών πρωτεϊνών όπως και για την απόκτηση πληροφοριών για τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων. Για αυτούς τους σκοπούς απαιτούνται μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης, οι οποίες συνήθως παράγονται από υπερέκφραση σε ετερόλογους οργανισμούς. Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι το πιο δημοφιλές μέσο υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών, όμως, ακόμη και η ανασυνδυασμένη παραγωγή με αυτό το βακτήριο είναι πολλές φορές προβληματική. Οι αποδόσεις ανά κύτταρο είναι συνήθως μικρές και η παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι συχνά τοξική για τα κύτταρα με αποτέλεσμα τη χαμηλή συνολική παραγωγικότητα. Οι στόχοι της παρούσας εργασίας ήταν να κατασκευαστούν στελέχη *Escherichia coli* ικανά να ανθίστανται στην τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών, αλλά και να διερευνηθούν στοιχεία του μηχανισμού της παρατηρούμενης κυτταροτοξικότητας. Έτσι, κατασκευάστηκαν βιβλιοθήκες από μεταλλαγμένα βακτήρια που έφεραν διαφορετικές γενετικές τροποποιήσεις και χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες γενετικές αναλύσεις για την απομόνωση των επιθυμητών κλώνων. Οι αναλύσεις κατέληξαν στον εντοπισμό δύο νέων παραγόντων που κατά τη συνέκφρασή τους βελτιώνουν την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών, τα γονίδια *djlA* και *rraA*. Η *DjlA* είναι ένας ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού DnaK, ενσωματωμένος στη μεμβράνη και είναι παρόμοιος με τη DnaJ, και η *RraA* είναι αναστολέας της ριβονουκλεάσης RNάσης E. Έτσι, κατασκευάστηκαν δύο στελέχη *E. coli* που υπερεκφράζουν το γονίδιο *djlA* ή *rraA* και ονομάστηκαν SuptoxD και SuptoxR, αντίστοιχα. Κατά την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών η ανάπτυξη των στελεχών αυτών είναι δραματικά βελτιωμένη σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα έκφρασης των μεμβρανικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο είναι σημαντικά βελτιωμένα. Η εφαρμογή των στελεχών βρέθηκε να είναι γενική καθώς βελτιώνουν την υπερέκφραση πολλών ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών



σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα και με τα εμπορικά στελέχη που θεωρούνται κατάλληλα για την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ανάμεσα σε αυτές τις πρωτεΐνες ήταν και ο υποδοχέας νευροτενσίνης 1, του οποίου η λειτουργικότητα εξετάστηκε και βρέθηκε ότι η επιπλέον παραγόμενη πρωτεΐνη είναι λειτουργική. Κατόπιν, διερευνήθηκαν στοιχεία του μηχανισμού λειτουργίας των δύο καταστολέων της τοξικότητας. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε ο ρόλος των διαφορετικών υπομονάδων της DjIA στην επίδραση της υπερπαραγωγής του υποδοχέα βραδυκινίνης 2 (BR2) και βρέθηκε ότι ολόκληρο το μόριο της DjIA απαιτείται για την καταστολή της τοξικότητάς του. Επίσης, η ευεργετική επίδραση της DjIA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών ήταν εξειδικευμένη, ενώ η εξειδίκευση της J υπομονάδας της DjIA ήταν περιορισμένη. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μοριακή συνοδος DnaK παίζει κρίσιμο ρόλο, καθώς η αλληλεπίδραση με την DjIA είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της υπερπαραγωγής του BR2. Η DjIA και η RraA βρέθηκαν να δρουν με ανεξάρτητο μηχανισμό η μία από την άλλη στη βελτίωση της υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης BR2, με μη προσθετικό όμως τρόπο. Τέλος, όσον αφορά στο μηχανισμό λειτουργίας του RraA βρέθηκε ότι η υπερέκφραση του BR2 βελτιώνεται χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου του κατά την υπερέκφραση του *rraA*. Αναμένεται ότι τα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR* θα χρησιμοποιηθούν ευρέως από την επιστημονική κοινότητα και θα διευκολύνουν τη διαλεύκανση του μηχανισμού της εν λόγω κυτταροτοξικότητας.

## Abstract

Membrane proteins include protein families such as G protein-coupled receptors, channels and transporters. Currently, there is increasing scientific interest in the field and as membrane proteins are extremely important drug targets they attract the attention of the pharmaceutical industry. For characterization of membrane proteins and acquisition of information for the rational design of drugs large amounts of protein are required. As their natural abundance is usually very low, membrane proteins are produced by overexpression in heterologous hosts. *Escherichia coli* is the most popular overexpression vehicle, however, overexpression in this bacterium can be problematic. Their yields per cell are typically low and membrane protein production is highly toxic to cells. The aim of the present work is to engineer *Escherichia coli* strains that overcome MP-overexpression toxicity and, also, to investigate aspects of the mechanism behind the observed cytotoxicity. For this purpose we have generated libraries of mutant bacteria carrying different types of genetic modifications and used appropriate genetic screens to isolate the desired clones. The screens resulted in the identification of two new factors that upon coexpression enhance membrane protein overexpression. DjIA is a membrane-embedded cochaperone of DnaK, similar to DnaJ, and RraA is an inhibitor of the ribonuclease RNase E. In this way, two *E. coli* strains were engineered, SuptoxD and SuptoxR, whose growth is dramatically improved during membrane protein overexpression compared to wild-type cells. Additionally, the expression levels of membrane proteins per cell are significantly improved. Importantly, the strains can be generally used for membrane proteins as they were shown to improve the overexpression of a number of toxic eukaryotic and prokaryotic membrane proteins compared to not only wild type cells, but also commercial strains that are suitable for this purpose. Neurotensin receptor 1 was one of these proteins and apart from the increase in its expression levels it was shown that the extra produced protein is functional. Then, aspects of the mechanism of function of the two suppressors of toxicity were investigated. Specifically, the role that the DjIA subunits play in the effect on overexpression of bradykinin receptor 2 (BR2) was examined and it was found that full-length DjIA was required for the suppression of its toxicity. Also, the beneficial

effect of DjIA in the overexpression of membrane proteins was highly specific, whereas the specificity of the J domain of DjIA was found to be restricted. Additionally, the molecular chaperone DnaK plays a crucial role as its interaction with DjIA is required for the improvement of BR2 overproduction. DjIA and RraA were found to act independently, though their effects were not additive. Finally, regarding the mechanism of function of RraA it was found that BR2 overexpression is improved without affecting the levels of the transcription of its gene upon *rraA* coexpression. It is anticipated that the strains SuptoxD and SuptoxR will be used extensively by the scientific community and will facilitate the elucidation of the mechanism of membrane protein overexpression cytotoxicity.

### **Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά**

Gialama, D., Kostelidou, K., Michou, M., Delivoria, D.C., Kolisis, F.N., Skretas, G. 2017. Development of *Escherichia coli* strains that withstand membrane protein-induced toxicity and achieve high-level recombinant membrane protein production. *ACS Synthetic Biology*. 6(2):284-300. doi: 10.1021/acssynbio.6b00174.

Gialama, D., Delivoria, D.C., Skretas, G. Functional requirements for DjlA- and RraA-mediated enhancement of recombinant membrane protein production in the engineered *Escherichia coli* strains SuptoxD and SuptoxR. *Journal of Molecular Biology*, υπό αναθεώρηση.

### **Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά βιβλία**

Gialama D., Kolisis F. and Skretas G. Novel Processing Technology for Production of Biopharmaceuticals and Bioproducts, Chapter 16, New Expression Systems for GPCRs. Zhou W. and Komives C., 2014, John Wiley & Sons, υπό έκδοση.

### **Συμμετοχή σε συνέδρια**

Gialama, D., Kostelidou, K., Kolisis, F. N., Skretas, G. 2015. Making life better for *Escherichia coli* cells that produce toxic membrane proteins. 6th Mikrobiokosmos Conference, Αθήνα, Ελλάδα. 3-5 Απριλίου 2015.

Gialama, D., Kolisis, F. N., Skretas, G. 2015. Making life better for *Escherichia coli* cells that produce toxic membrane proteins. Mechanisms and regulation of protein translocation, EMBO conference, Ντουμπρόβνικ, Κροατία. 21-25 Μαρτίου 2015.

Gialama, D., Kolisis, F. N., Skretas, G. 2014. Making life better for *Escherichia coli* cells that produce toxic membrane proteins. (Oral) 16<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Εδιμβούργο, Ηνωμένο Βασίλειο. 13-16 Ιουλίου 2014.

Gialama, D., Kolisis, F., and Skretas, G. 2013. Engineering *Escherichia coli* strains that suppress the toxicity of membrane protein overexpression. 64th Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology. Αθήνα, Ελλάδα. 6-8 Δεκεμβρίου 2013.

Gialama, D., Kolisis, F., and Skretas, G. 2013. Modification and study of bacterial strains of *Escherichia coli* with the aim to produce membrane proteins using methods of Systems Biology. 9th Panhellenic Scientific Chemical Engineering Congress. Αθήνα, Ελλάδα. 23-25 Μαΐου 2013.

Gialama, D., Kolisis, F., and Skretas, G. 2012. Overcoming the toxicity of membrane proteins in *Escherichia coli*. (Oral) Food, Health and well-being, Belgrade Food International Conference, Βελιγράδι, Σερβία. 26-28 Νοεμβρίου 2012.

### **Διπλώματα ευρεσιτεχνίας**

Skretas, G. and Gialama, D. Systems for recombinant protein production, PCT/EP2016/001019.

## Περιεχόμενα

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1 Η βιολογική μεμβράνη.....	1
1.2 Λιπιδική διπλοστιβάδα .....	1
1.3 Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες.....	1
1.4 Βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω συν-μεταφραστικής στόχευσης .....	5
1.5 Σχέση μεμβρανικών πρωτεϊνών με ασθένειες και ορθολογικός σχεδιασμός νέων φαρμάκων .....	8
1.6 Υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών .....	10
1.7 Υπερπαραγωγή πρωτεϊνών στο μικροοργανισμό <i>E. coli</i> και το σύστημα έκφρασης T7 .....	13
1.8 Υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στο μικροοργανισμό <i>E. coli</i> .....	16
1.9 Τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο <i>E. coli</i> .....	22
1.10 Προτάσεις για την αιτία του άγνωστου μηχανισμού της τοξικότητας της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο <i>E. coli</i> και εξειδικευμένα στελέχη για την περιορισμένη αντιμετώπιση της .....	23
1.11 Ανάστροφη μηχανική και συστημική βιοτεχνολογία.....	28
1.12 Στόχος.....	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1 Όργανα – Συσκευές .....	30
2.2 Βακτηριακά στελέχη.....	31
2.3 Χημικά και ένζυμα.....	33
2.4 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας .....	33
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια <i>E. coli</i> .....	34
2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) .....	34
2.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	37
2.8 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....	39
2.9 Αντίδραση λιγάσης.....	39
2.10 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για χημικό μετασχηματισμό.....	39
2.11 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με θερμικό σοκ (heat shock transformation) .....	40
2.12 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση .....	40
2.13 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i> με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) .....	41
2.14 Πλασμιδιακοί Φορείς.....	41
2.15 Κατασκευή πλασμιδίων .....	43

2.16 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	52
2.17 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot).....	53
2.18 Ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού.....	54
2.19 Ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA.....	54
2.20 Υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε υγρές καλλιέργειες.....	54
2.21 Απομόνωση μεμβρανών.....	55
2.22 Προετοιμασία και σήμανση σφαιροπλαστών.....	55
2.23 Μετρήσεις φθορισμού σε πιάτα 96 πηγαδιών.....	56
2.24 Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και Annexin V.....	56
2.25 Προετοιμασία σφαιροπλαστών και ανάλυση πρόσδεσης προσδέτη (ligand) για τον υποδοχέα NTR1(D03).....	57
2.26 PCR στον πραγματικό χρόνο.....	57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
3.1 Κατευθυνόμενη εξέλιξη <i>E. coli</i> MC1061 στελεχών για τη βελτιωμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	59
3.2. Εντοπισμός καταστολέων τοξικότητας παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	67
3.2.1 Γενετική ανάλυση για τον εντοπισμό παραγόντων που καταστέλλουν την κυτταροτοξικότητα που προκύπτει από την υπερπαραγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες.....	67
3.2.2. Στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης BR2 σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη με τη σωστή N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup> τοπολογία σε σχέση με τα AT κύτταρα.....	80
3.2.3. Τα γονίδια <i>djlA</i> και <i>rraA</i> είναι γενικοί καταστολείς της κυτταροτοξικότητας που προκύπτει από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών και επομένως στα SuptoxD και SuptoxR βελτιώνεται ευρέως η ανασυνδυασμένη υπερέκφραση ενός σημαντικού αριθμού μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	85
3.2.4. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	91
3.2.5. Στο SuptoxD βελτιώνεται η λειτουργική υπερέκφραση του υποδοχέα νευροτενσίνης 1 στο βακτήριο <i>E. coli</i> .....	94
3.3. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης σε σχέση με τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που θεωρούνται κατάλληλα για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	97
3.4. Διερεύνηση στοιχείων του μηχανισμού της καταστολής της τοξικότητας υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω των <i>DjlA</i> και <i>RraA</i> .....	102
3.4.1. Οι πρωτεΐνες <i>DjlA</i> and <i>RraA</i> είναι μοναδικές ανάμεσα στις J πρωτεΐνες και στους αναστολείς της RNάσης E στην ικανότητά τους να βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	106

3.4.2. Οι πρωτεΐνες DjlA και RraA λειτουργούν ανεξάρτητα η μία από την άλλη και με μη προσθετικό τρόπο στην βελτίωση της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών.....	110
3.4.3. Οι πρωτεΐνη RraA δεν επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 .....	113
3.4.4. Για την ευεργετική επίδραση της DjlA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών απαραίτητη είναι η ενσωμάτωση πλήρους μήκους DjlA στη μεμβράνη..	114
3.4.5. Επιβεβαίωση του κρίσιμου ρόλου της DnaK για την ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης του γονιδίου <i>djlA</i> στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών .....	118
3.4.6. Η ευεργετική επίδραση της DjlA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν εξαρτάται από τη ενεργοποίηση της αντίδρασης στρες Rcs .....	119
3.4.7. Η υπερέκφραση του BR2 προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη του AT <i>E. coli</i> , η οποία μειώνεται σημαντικά στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR .....	121
4. Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	123
5. Συμπεράσματα-Μελλοντικές προτάσεις.....	135
6. Βιβλιογραφία.....	139

## Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1. Η βιολογική μεμβράνη και το κοινό λιπίδιο φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. ....	2
Σχήμα 2. Χάρτης ηλεκτροστατικού δυναμικού ενός μεταφορέα λευκίνης. ....	2
Σχήμα 3. Παραδείγματα μεμβρανικής πρωτεΐνης β-βαρελιού στην εξωτερική μεμβράνη του <i>E. coli</i> και α-ελικοειδούς μεμβρανικής πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του <i>E. coli</i> . ....	4
Σχήμα 4. Μοντέλο βιογένεσης πρωτεϊνών μέσω συν-μεταφραστικής στόχευσης. ....	7
Σχήμα 5. Μοντέλο του N-τελικού σήματος μιας νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης που βρίσκεται στο όριο μεταξύ του καναλιού και της μεμβράνης, στην εντελώς ανοιχτή πλευρική πύλη του τρανσλοκονίου. ....	9
Σχήμα 6. Δίκτυο φαρμάκων-στόχων. ....	10
Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση των στελεχών BL21(DE3) <i>rLysS</i> ή <i>rLysE</i> . ....	15
Σχήμα 8. Πρόσδος στον καθορισμό δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	18
Σχήμα 9. Τρόποι αντιμετώπισης για τη χαμηλή κυτταρική παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο <i>E. coli</i> μέσω τροποποίησης του ξενιστή με τη χρήση γενετικής μηχανικής. ....	21
Σχήμα 10. Τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικής πρωτεΐνης σε στερεό θρεπτικό υλικό. ....	22
Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση του στελέχους Lemo21(DE3). ....	25
Σχήμα 12. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος της «συγκρατημένης έκφρασης»....	27
Σχήμα 13. Η τεχνική PCR επικάλυψης επέκτασης (Overlap extension PCR). ....	38
Σχήμα 14. Προσδιορισμός κατάλληλων συνθηκών για την κατευθυνόμενη εξέλιξη των κυττάρων MC1061 για βελτιωμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	63
Σχήμα 15. Σχεδιάγραμμα της διαδικασίας επιλογής εξελιγμένων κυττάρων MC1061 για βελτιωμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	64
Σχήμα 16. Τα εξελιγμένα στελέχη εν. 1, 4 βελτιώνουν την υπερπαραγωγή της BR2 σε σχέση με τα αγρίου τύπου MC1061 κύτταρα ανεξάρτητα από το φορέα έκφρασης που χρησιμοποιείται, ενώ δεν καταστέλλουν την τοξικότητα κατά την υπερπαραγωγή του υποδοχέα CB1. ....	65
Σχήμα 17. Τοξικότητα υποδοχέα BR2. Ανάπτυξη κυττάρων <i>E. coli</i> MC1061 που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από τον φορέα έκφρασης <i>pBAD33</i> . ....	68
Σχήμα 18. Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης της βιβλιοθήκης ASKA για τον εντοπισμό καταστολέων της τοξικότητας υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. ....	70
Σχήμα 19. Ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA για καταστολείς της τοξικότητας υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. ....	70
Σχήμα 20. Ανάπτυξη και επίπεδα έκφρασης κυττάρων <i>E. coli</i> MC1061 που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP και τους πρώτους απομονωμένους 18 κλώνους ASKA. ....	73
Σχήμα 21. Η συνέκφραση των γονιδίων <i>djlA</i> και <i>rraA</i> καταστέλει την τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2. ....	74
Σχήμα 22. Η ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης του <i>djlA</i> και του <i>rraA</i> στην ανάπτυξη κυττάρων <i>E. coli</i> MC1061 που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP σε LB καλλιέργειες. ....	76
Σχήμα 23. Η βελτιωμένη ανάπτυξη των κυττάρων <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> σε σχέση με τα κύτταρα <i>E. coli</i> MC1061 κατά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2 σε LB καλλιέργειες. ....	78



Σχήμα 24. Η ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης της <i>DjlA</i> και της <i>RraA</i> στην ανάπτυξη κυττάρων <i>E. coli</i> BL21(DE3) που υπερεκφράζουν τη χημιαϊκή πρωτεΐνη BR2-GFP σε LB καλλιέργειες. ....	79
Σχήμα 25. Τα στελέχη <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> συσσωρεύουν βελτιωμένα επίπεδα του υποδοχέα BR2 ενσωματωμένου στη μεμβράνη. ....	81
Σχήμα 26. Στα κύτταρα <i>SuptoxD</i> ή <i>SuptoxR</i> αυξάνεται δραματικά σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα η ποσότητα του BR2 ανά κύτταρο σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη με τη σωστή $N^{out}$ τοπολογία. ....	84
Σχήμα 27. Βελτίωση της παραγωγής άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών στα <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> . ....	90
Σχήμα 28. Τα στελέχη <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	93
Σχήμα 29. Βελτίωση της παραγωγής λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης κατά τη συνέκφραση του γονιδίου <i>djlA</i> . ....	96
Σχήμα 30. Σύγκριση των επιδόσεων των <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> με αυτές στελεχών <i>E. coli</i> που τυπικά χρησιμοποιούνται στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	99
Σχήμα 31. Σύγκριση των <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> με στελέχη <i>E. coli</i> που τυπικά χρησιμοποιούνται στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	101
Σχήμα 32. Κανονικό μοντέλο του τρόπου δράσης του πυρήνα του μηχανισμού Hsp70 στην πρωτεϊνική αναδίπλωση βασισμένο σε <i>in vitro</i> μελέτες αναδίπλωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών. ....	103
Σχήμα 33. Η <i>DjlA</i> είναι μοναδική ανάμεσα στις ομόλογες πρωτεΐνες στην ικανότητά της να ξεπερνά την κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών και να βελτιώνει την ανασυνδυασμένη συσσώρευση μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	107
Σχήμα 34. Η <i>RraA</i> είναι μοναδική ανάμεσα στους αναστολείς της RNάσης E στην ικανότητά της να ξεπερνά την κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών και να βελτιώνει την ανασυνδυασμένη συσσώρευση μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	109
Σχήμα 35. Η <i>DjlA</i> και <i>RraA</i> δρουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη. ....	111
Σχήμα 36. Ταυτόχρονη συνέκφραση των γονιδίων <i>djlA</i> και <i>rfaA</i> ( <i>SuptoxDR</i> ) και η επίδρασή τους την υπερέκφραση της BR2-GFP σε κύτταρα <i>E. coli</i> MC1061. ....	112
Σχήμα 37. Πλήρους μήκους <i>DjlA</i> προσδεδεμένη στη μεμβράνη, ικανή να αλληλεπιδρά με την <i>DnaK</i> είναι απαραίτητη για την ευεργετική επίδραση στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	117
Σχήμα 38. Η <i>DnaK</i> είναι απαραίτητη για την επιθυμητή δράση της συνέκφρασης του <i>djlA</i> στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. ....	119
Σχήμα 39. Η ευεργετική επίδραση της <i>DjlA</i> στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν εξαρτάται από τη ενεργοποίηση της αντίδρασης στρες Rcs. ....	120
Σχήμα 40. Η υπερέκφραση του BR2 προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη αγρίου τύπου <i>E. coli</i> MC1061, η οποία μειώνεται σημαντικά στα στελέχη <i>SuptoxD</i> και <i>SuptoxR</i> . ....	122
Σχήμα 41. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου <i>DjlA</i> - <i>DnaK</i> με τη μεμβρανική πρωτεΐνη – στόχο. ....	132

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1. Στελέχη <i>E. coli</i> που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.....	31
Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία. ....	34
Πίνακας 3. Υλικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης όγκου 50 $\mu$ L.....	37
Πίνακας 4. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.....	43
Πίνακας 5. Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.....	48
Πίνακας 6. Υλικά και ποσότητες για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης και των πηκτών διαχωρισμού. ....	52
Πίνακας 7. Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR.....	87
Πίνακας 8. Ποσοτικοποίηση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 με PCR στον πραγματικό χρόνο σε κύτταρα <i>E. coli</i> MC1061 με το πλασμίδιο pASKBR2-GFP και τα πλασμίδια pBAD33 ή pBAD33RraA παρουσία 0.2 $\mu$ g/mL ανυδροτετρακυκλίνης και 0.2% αραβινόζης για 4 ώρες στους 25 $^{\circ}$ C.....	114

## Συντμήσεις

AT	: αγρίου τύπου
ΟΠ	: οπτική πυκνότητα
BR2	: bradykinin receptor 2, υποδοχέας βραδυκινίνης 2
EDTA	: αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGFP	: βελτιωμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GFP	: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
GPCR	: G-protein-coupled receptor, υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες G
IPTG	: isopropyl-β-D-thiogalactoside
KanR	: aminoglycoside 3'-phosphotransferase
LB	: Luria Bertani
NTR1	: Υποδοχέας νευροτενσίνης 1
NTR1(D03)	: Υποδοχέας νευροτενσίνης 1 παραλλαγή D03
PEG	: PolyEthyleneGlycol, πολυαιθυλαινογλυκόλη
PDB	: Protein Data Bank, Πρωτεϊνική βάση δεδομένων
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Αλυσωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
SDS	: Sodium dodecyl sulphate, δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane, τρεις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθανιο
TrxA	: Θειορεδοξίνη 1
VKORc1	: Αναγωγάση του εποξειδίου της βιταμίνης K

# 1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1.1 Η βιολογική μεμβράνη

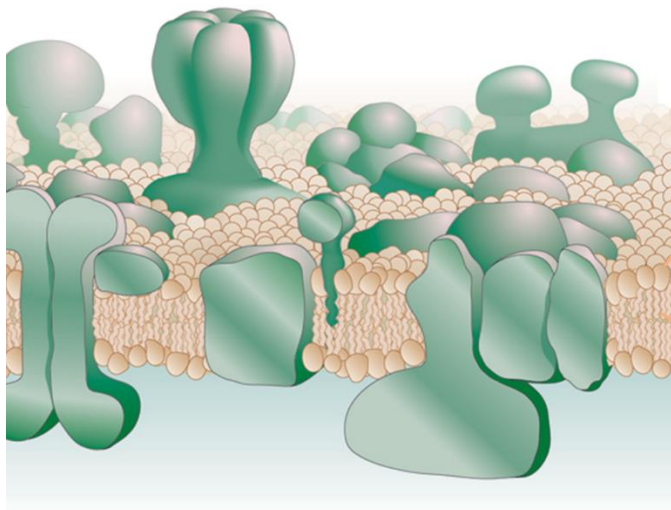
Η βιολογική μεμβράνη αποτελεί το όριο ενός κυττάρου ή ενός κυτταρικού οργανιδίου. Αποτελείται από μια δυναμική διπλοστιβάδα αμφιπαθών λιπιδίων, στην οποία βρίσκονται ενσωματωμένες πρωτεΐνες με διάφορες λειτουργίες. Αυτές οι πρωτεΐνες ονομάζονται μεμβρανικές πρωτεΐνες.

## 1.2 Λιπιδική διπλοστιβάδα

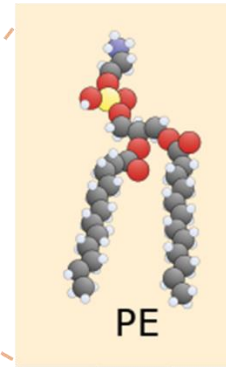
Τα μεμβρανικά λιπίδια είναι αμφιπαθή μόρια αποτελούμενα από μια υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά (Σχήμα 1). Λόγω θερμοδυναμικών περιορισμών σε υδατικό περιβάλλον, οι υδρόφοβες ουρές είναι προσανατολισμένες προς το κέντρο της μεμβράνης, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές εκτίθενται στο εξωτερικό της μεμβράνης στις δύο πλευρές της. Με αυτόν τον τρόπο τα λιπίδια σχηματίζουν μια διπλοστιβάδα. Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούνται από διάφορα λιπίδια, για παράδειγμα φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, χοληστερόλη και άλλα. Ανάλογα με τη σύστασή τους σε λιπίδια, οι μεμβράνες έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, όπως ρευστότητα και καμπυλότητα (Engelman 2005).

## 1.3 Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι μόρια αμφιπαθή που βρίσκονται ενσωματωμένα στις μεμβράνες και έχουν διάφορες λειτουργίες. Έχουν πολικές επιφάνειες που αλληλεπιδρούν με το υδατικό περιβάλλον και με τις υδρόφιλες κεφαλές των λιπιδίων, ενώ οι μη πολικές επιφάνειες αλληλεπιδρούν με το υδρόφοβο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας. Αυτό είναι εμφανές στο παράδειγμα μεμβρανικής πρωτεΐνης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 2, στο οποίο φαίνεται ο χάρτης ηλεκτροστατικού δυναμικού ενός μεταφορέα λευκίνης.

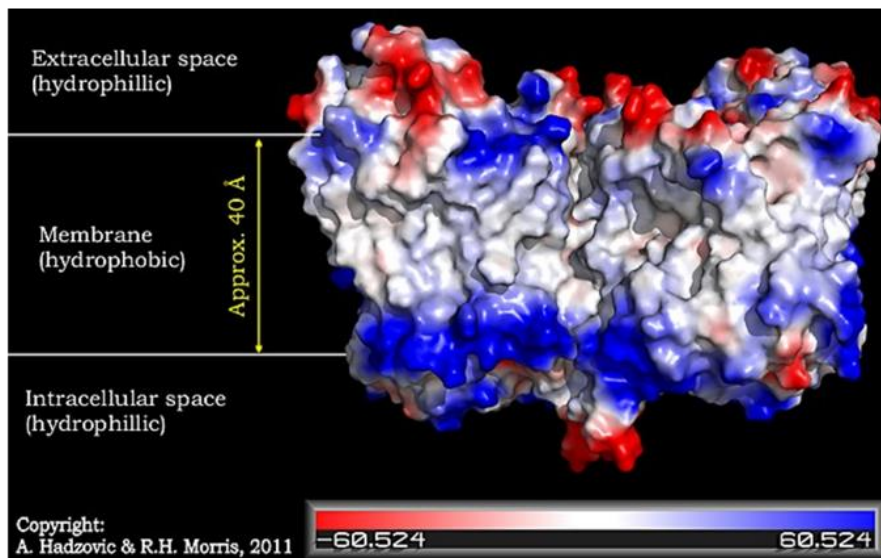
**A**

Engelman, Nature (2005).

**B**

Wikipedia

Σχήμα 1. Η βιολογική μεμβράνη και το κοινό λιπίδιο φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. (A) Γενικό μοντέλο για τη δομή της μεμβράνης. Ένα τροποποιημένο και επικαιροποιημένο Singer-Nicholson «ρευστό μωσαϊκό μοντέλο». (B) Μοντέλο φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) είναι ένα κοινό λιπίδιο της βιολογικής μεμβράνης.



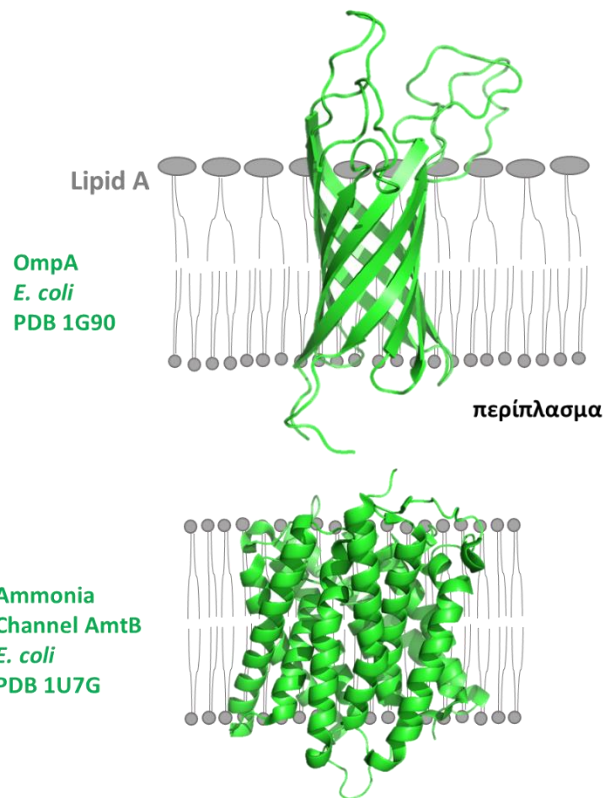
<http://www.chem.utoronto.ca/coursenotes/GTM/JM/LeuT/start.htm>

Σχήμα 2. Χάρτης ηλεκτροστατικού δυναμικού ενός μεταφορέα λευκίνης. Τα χρώματα υποδηλώνουν τις περιοχές που είναι πλούσιες σε ηλεκτρόνια (κόκκινο) και αυτές που είναι φτωχές σε  $e^-$  (μπλέ), ενώ το λευκό χρώμα υποδηλώνει τις υδρόφοβες περιοχές.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, στις διαμεμβρανικές και στις περιφερειακές. Οι περιφερειακές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων και μπορούν να απομονωθούν με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος που επαναιωρούνται οι μεμβράνες. Αντίθετα, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες διαπερνούν τη μεμβράνη. Στο εσωτερικό της, όπου δεν υπάρχουν διαθέσιμα μόρια νερού προκειμένου να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο ή με το άζωτο της αμινομάδας, η πιο σταθερή διαμόρφωση προκύπτει από  $\alpha$ -έλικες ενωμένες με δεσμούς υδρογόνου (Hermansson and von Heijne 2003). Άλλη διαμόρφωση που μπορούν να πάρουν υδρόφοβες αλληλουχίες στη μεμβράνη είναι η διαμόρφωση του  $\beta$ -βαρελιού, το οποίο σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα σε αντιπαράλληλα  $\beta$ -πτυχωτά φύλλα. Έτσι, οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε  $\alpha$ -ελικοειδείς και  $\beta$ -βαρέλια (Σχήμα 3). Τα  $\beta$ -βαρέλια βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη Gram-αρνητικών βακτηρίων ή στην εξωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών (Fairman, Noiraj et al. 2011). Αντίθετα, οι  $\alpha$ -ελικοειδείς μεμβρανικές πρωτεΐνες στους προκαρυωτικούς οργανισμούς βρίσκονται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με κάποιες εξαιρέσεις (Dong, Beis et al. 2006, Chandran, Fronzes et al. 2009).

Συχνά τα  $\beta$ -βαρέλια μπορούν να εκφραστούν στη μορφή συσσωματωμάτων στο βακτήριο *E. coli* από όπου μπορούν να απομονωθούν και να αναδιπλωθούν στη φυσική τους διαμόρφωση (Bannwarth and Schulz 2003). Δεν αποτελούν, όμως, αντικείμενο του ενδιαφέροντος σε αυτή την εργασία. Αντίθετα, θα ασχοληθούμε με τις  $\alpha$ -ελικοειδείς μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες στο εξής θα αναφέρονται ως μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να έχουν πολλές σημαντικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, μπορούν να λειτουργούν ως αισθητήρες (π.χ. υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G), κανάλια ιόντων, νερού, μεταφορείς, ένζυμα (π.χ. ATP-συνθάση). Αποτελούν μια πολύ μεγάλη πρωτεϊνική οικογένεια, καθώς σύμφωνα με την ανάλυση του γονιδιώματος διάφορων οργανισμών, τέτοιες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το 20-30% όλων των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (Krogg, Larsson et al. 2001).



Σχήμα 3. Παραδείγματα μεμβρανικής πρωτεΐνης β-βαρελιού στην εξωτερική μεμβράνη του *E. coli* και α-ελικοειδούς μεμβρανικής πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli*. (Πάνω) Μοντέλο της πρωτεΐνης OmpA (PDB 1G90) σε σχηματική αναπαράσταση της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου *E. coli*. (Κάτω) Μοντέλο του καναλιού αμμωνίας AmtB (PDB 1U7G) σε σχηματική αναπαράσταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του βακτηρίου *E. coli*.

#### 1.4 Βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω συν-μεταφραστικής στόχευσης

Η πρωτεϊνική σύνθεση ως γνωστό λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα (Nelson, Lehninger et al. 2008). Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες τόσο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli* όσο και στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου παράγονται με ένα παρόμοιο μηχανισμό συν-μεταφραστικής στόχευσης (Σχήμα 4) (Luirink, von Heijne et al. 2005, von Heijne 2007). Η βιοσύνθεση τέτοιων πρωτεϊνών ξεκινά στο κυτταρόπλασμα. Τόσο οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες όσο και οι μεμβρανικές περιέχουν στην αρχή της αλληλουχίας τους, όπως αυτή παράγεται από το ριβόσωμα, δηλαδή στο Ν τελικό άκρο της, μια αλληλουχία-σήμα που προωθεί την πρωτεΐνη είτε για να ακολουθήσει τα μονοπάτια της έκκρισης (Rapoport 2007) είτε της ένταξης στη μεμβράνη (von Heijne and Gavel 1988), αντίστοιχα. Για τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες η αλληλουχία-σήμα συνήθως αποκόπτεται μετά την έκκριση (Rapoport 2007), ενώ για τις μεμβρανικές συνήθως το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα λειτουργεί ως αλληλουχία-σήμα (von Heijne and Gavel 1988). Διαφορετικοί παράγοντες συμμετέχουν στην αναγνώριση των πρωτεϊνών στη μία και στην άλλη περίπτωση (Tsirigotaki, De Geyter et al. 2017). Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, οι οποίες ακολουθούν τη μετα-μεταφραστική στόχευση, δηλαδή παράγονται πρώτα στο κυτταρόπλασμα και μετά κατευθύνονται με διάφορους μηχανισμούς στη μεμβράνη για μετατόπιση (Rapoport 2007), οι μεμβρανικές πρωτεΐνες δε μπορούν να παραχθούν στο κυτταρόπλασμα λόγω της υδρόφοβης φύσης τους. Επομένως ακολουθούν τη συν-μεταφραστική στόχευση.

Η βακτηριακή συν-μεταφραστική στόχευση περιλαμβάνει τις εξής διαδικασίες. Αρχικά βιοσυντίθεται ένα μικρό συνήθως μέρος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και έτσι παράγεται το σήμα στόχευσης στη μεμβράνη. Πλέον έχει αποδειχθεί ότι για τις περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες το πρώτο διαμεμβρανικό τμήμα ξεκινά τη συν-μεταφραστική στόχευση στη μεμβράνη καθώς εξέρχεται από το τούνελ εξόδου του ριβοσώματος χρησιμοποιώντας δύο GTPασες, το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος (SRP) και τον αντίστοιχο υποδοχέα του (FtsY) όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4 (Luirink, von Heijne et al. 2005). Το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος SRP προσδένεται στο ριβόσωμα και ανιχνεύει επιπρόσθετες αλληλεπιδράσεις. Απομακρύνεται από ριβοσώματα που δεν μεταφράζουν ή μεταφράζουν γονίδια που

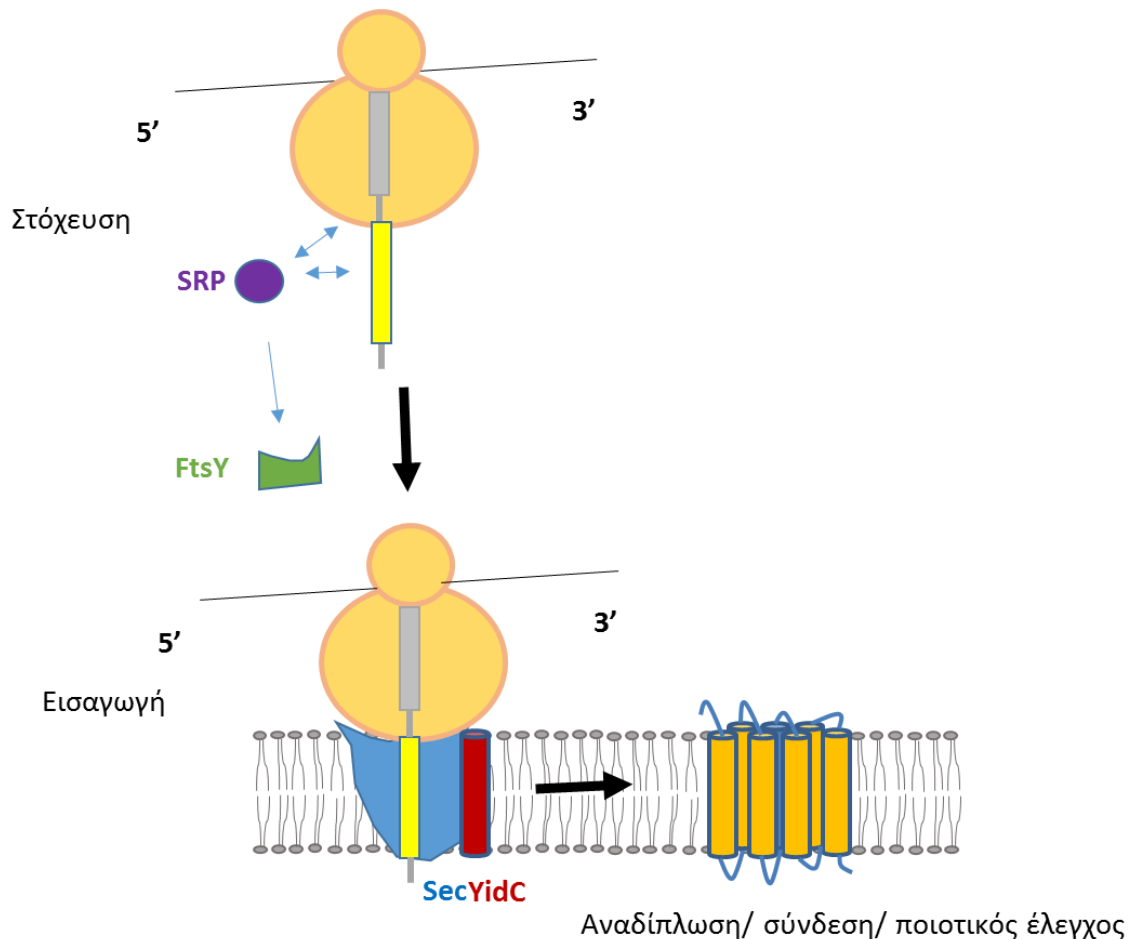


δεν κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες, ενώ σταθεροποιείται μόνο σε ριβοσώματα που έχουν ξεκινήσει να μεταφράζουν γονίδια που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες (Holtkamp, Lee et al. 2012). Κατόπιν, σχηματίζεται το σύμπλοκο σωματιδίου αναγνώρισης σήματος και του υποδοχέα του, ενώ και οι δύο πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ενεργότητα GTPάσης η μία της άλλης (Powers and Walter 1995).

Στο μονοπάτι συμμετέχει και το Sec τρανσλοκόνιο, ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που λειτουργεί ως κανάλι στη μεμβράνη. Ο ρόλος του είναι είτε να μεταφέρει τις περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες στην άλλη πλευρά της μεμβράνης είτε στην περίπτωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών να τις εντάσσει σε αυτή. Ο ρόλος του είναι κρίσιμος, καθώς το μονοπάτι Sec είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα και βρίσκεται σε όλα τα βασιλεία της ζωής (Tsirigotaki, De Geyter et al. 2017). Στο βακτήριο *E. coli* αυτό το τρανσλοκόνιο είναι το σύμπλοκο SecYEG (Driessen and Nouwen 2008) και αντίστοιχα στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων το Sec61 (Raporport 2007, Nyathi, Wilkinson et al. 2013). Αφού παραδοθεί η νέα συντιθέμενη πεπτιδική αλυσίδα στο τρανσλοκόνιο προκαλείται υδρόλυση GTP και ακολουθεί αποσύνδεση του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος και του υποδοχέα του από αυτή. Έτσι, επιτρέπεται στο ριβόσωμα να συνεχίσει τη μετάφραση καθώς η πεπτιδική αλυσίδα εντάσσεται στη μεμβράνη με τη βοήθεια του τρανσλοκονίου (Driessen and Nouwen 2008). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζεται ένα μοντέλο του N-τελικού σήματος μιας νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης που βρίσκεται στο όριο μεταξύ του καναλιού και της μεμβράνης, στην εντελώς ανοιχτή πλευρική πύλη του τρανσλοκονίου.

Εκτός από το σύμπλοκο SecYEG, υπάρχουν και βοηθητικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ένα τέτοιο παράδειγμα στο βακτήριο *E. coli* είναι η μεμβρανική πρωτεΐνη YidC, η οποία συμμετέχει στο μηχανισμό βιογένεσης ενός αριθμού μεμβρανικών πρωτεϊνών (Dalbey, Kuhn et al. 2014). Ομόλογες πρωτεΐνες της YidC έχουν βρεθεί στη μιτοχονδριακή εσωτερική μεμβράνη με την ονομασία Oxa1 και στη θυλακοειδή μεμβράνη των χλωροπλαστών με την ονομασία Alb3 (Hennon, Soman et al. 2015). Όλα τα μέλη αυτή της οικογένειας διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή που αποτελείται από πέντε διαμεμβρανικά τμήματα. Ενδιαφέρον είναι ότι η πρωτεΐνη YidC έχει βρεθεί να λειτουργεί και

ανεξάρτητα από το SecYEG τρανσλοκόνιο στη βιογένεση μερικών μικρών μεμβρανικών πρωτεϊνών (Hennon, Soman et al. 2015).



Σχήμα 4. Μοντέλο βιογένεσης πρωτεϊνών μέσω συν-μεταφραστικής στόχευσης. Το σχήμα αφορά στο βακτήριο *E. coli* και είναι προσαρμοσμένο από τη βιβλιογραφία (Luirink, von Heijne et al. 2005). Πρωτεϊνική στόχευση μέσω σωματιδίου αναγνώρισης σήματος και ένταξη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli* μέσω του Sec/YidC τρανσλοκονίου. Βήμα 1: Το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος προσδένεται σε μια ιδιαίτερα υδρόφοβη αλληλουχία στόχευσης στις νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες κοντά στο σημείο εξόδου της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος. Βήμα 2: Ο υποδοχέας του σωματιδίου αναγνώρισης σήματος FtsY προσδένεται στο σύμπλοκο ριβοσώματος-σωματιδίου αναγνώρισης σήματος και υποστηρίζει τη στόχευση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω της συγγένειάς του με τα λιπίδια και πιθανώς με την πρωτεΐνη του τρανσλοκονίου SecY. Η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη μεταφέρεται είτε στο Sec/YidC τρανσλοκόνιο είτε στην πρωτεΐνη YidC. Βήμα 3: Τα διαμεμβρανικά τμήματα της μεμβρανικής πρωτεΐνης κινούνται πλάγια στη λιπιδική διπλοστιβάδα και η μεμβρανική πρωτεΐνη αναδιπλώνεται και συναθροίζεται στη δομή της που είναι

συχνά ολιγομερής. Οι πρωτεΐνες που δεν αναδιπλώνονται σωστά εντοπίζονται και διασπώνται (ποιοτικός έλεγχος).

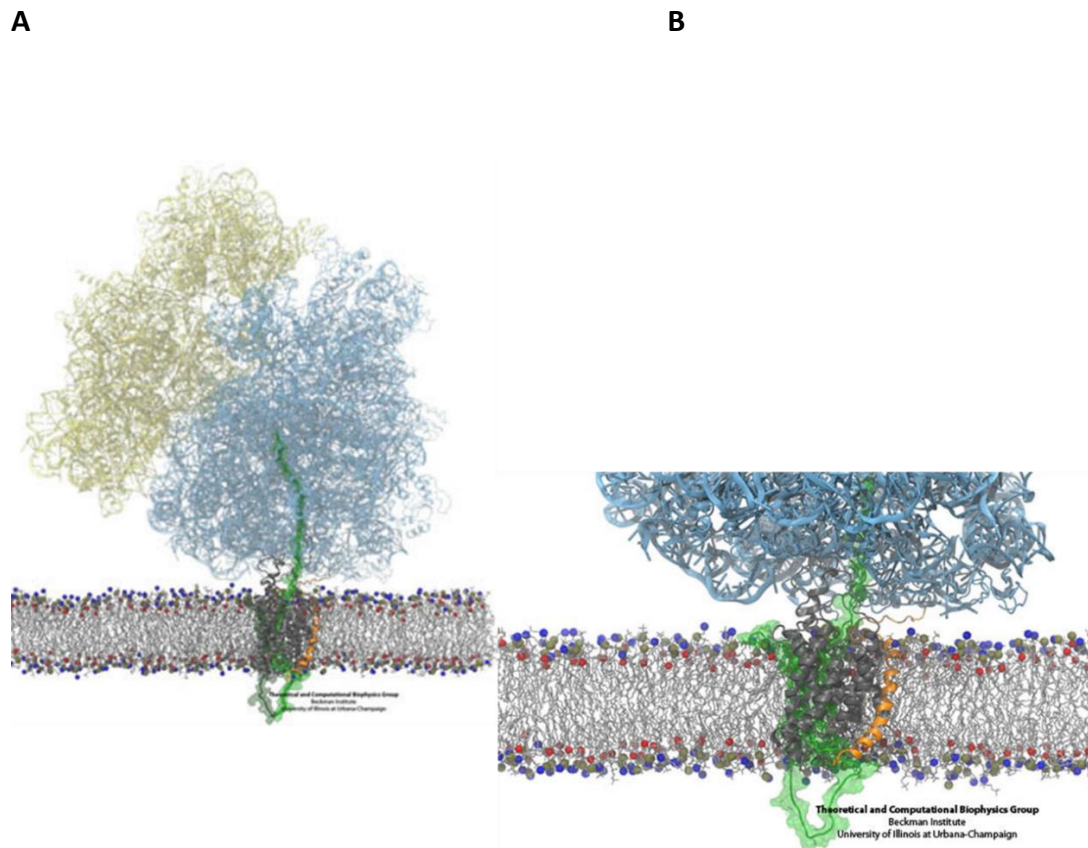
## 1.5 Σχέση μεμβρανικών πρωτεϊνών με ασθένειες και ορθολογικός σχεδιασμός νέων φαρμάκων

Όταν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες δε λειτουργούν φυσιολογικά μπορούν να προκύψουν διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, όπως νευρολογικές, για παράδειγμα η νόσος Alzheimer (Suzuki, Araki et al. 2006), καρδιακές (Liu, Chen et al. 2016), κυστική ίνωση (Vankeerberghen, Cuppens et al. 2002), λιποδυστροφία (Sim, Dennis et al. 2012), καρκίνος (Bennasroune, Fickova et al. 2004), υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός (Beranova, Oliveira et al. 2001) και άλλες (Ng, Poulsen et al. 2012). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6 περισσότεροι από τους μισούς γνωστούς στόχους για φάρμακα είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες (Yildirim, Goh et al. 2007, Bakheet and Doig 2009) καθώς προσελκύουν το ενδιαφέρον της φαρμακευτικής βιομηχανίας για χρόνια. Παραδείγματα φαρμάκων που εμπορικά είχαν μεγάλη επιτυχία και δρουν σε υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G περιλαμβάνουν το Zyrgeca που χρησιμοποιείται ως αντιψυχωτικό, το Zoloft που χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό, το Advair Diskus που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του άσθματος, και το Plavix που χρησιμοποιείται ως αντιθρομβωτικό. Αντίστοιχα το Norvasc που χρησιμοποιείται στην αγωγή της ιδιοπαθούς υπέρτασης, δρα σε ένα κανάλι ασβεστίου (Schlyer and Horuk 2006).

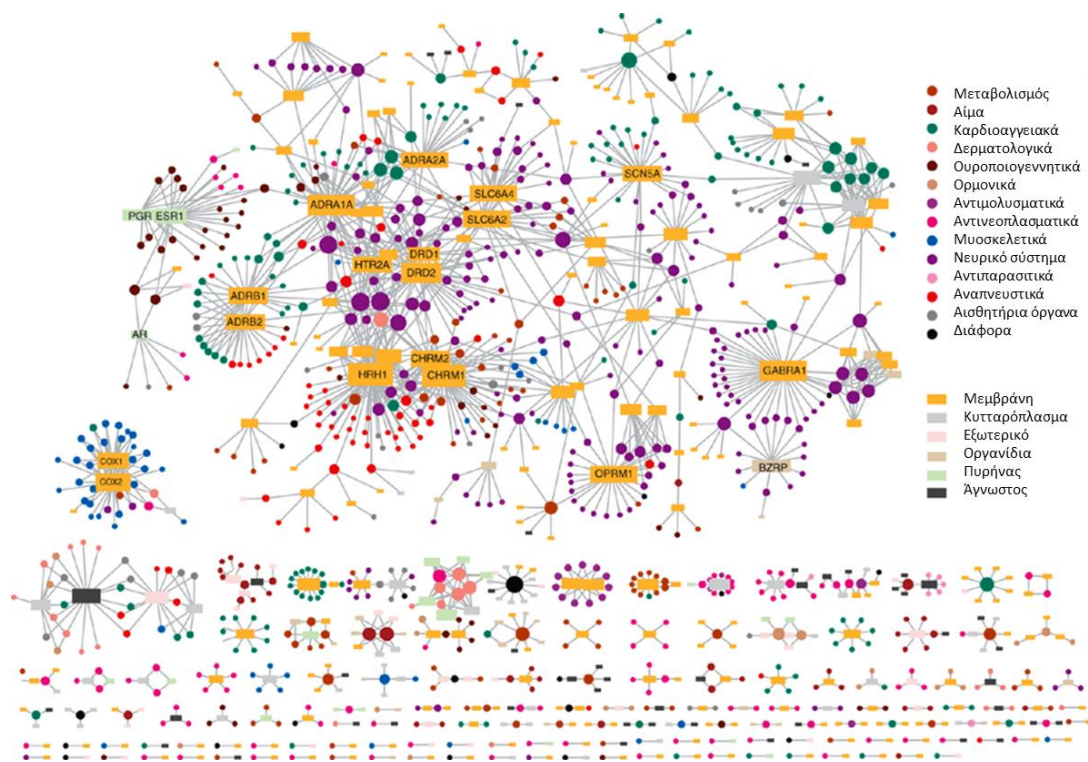
Ένας τρόπος για να παραχθούν καινούρια φάρμακα είναι ο λογικός σχεδιασμός φαρμάκων (rational drug design). Περιλαμβάνει το σχηματισμό νέων μικρών μορίων που στοχεύουν βιομόρια, των οποίων γνωρίζουμε τόσο τους λειτουργικούς ρόλους στις κυτταρικές λειτουργίες όσο και τις τρισδιάστατες δομικές πληροφορίες. Αυτή η προσέγγιση στο σχεδιασμό φαρμάκων είναι καθιερωμένη και έχει εφαρμοστεί εκτενώς από τις φαρμακοβιομηχανίες (Mandal, Moudgil et al. 2009). Επομένως, για το λογικό σχεδιασμό νέων φαρμάκων απαραίτητη είναι η ενδελεχής κατανόηση της δομής και λειτουργίας μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Για τις βιοχημικές μελέτες και τον καθορισμό της δομής τέτοιων πρωτεϊνών μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ ή άλλων αντίστοιχων μεθόδων απαιτούνται να

είναι διαθέσιμες σημαντικές ποσότητες πρωτεΐνης (Wagner, Bader et al. 2006, Schlegel, Klepsch et al. 2010, Bill, Henderson et al. 2011).



Σχήμα 5. Μοντέλο του N-τελικού σήματος μιας νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης που βρίσκεται στο όριο μεταξύ του καναλιού και της μεμβράνης, στην εντελώς ανοιχτή πλευρική πύλη του τρανσλοκονίου. Με πράσινο φαίνεται η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα και με πορτοκαλί το N-τελικό σήμα. Αρχικά με cryo-electron μικροσκοπία λύθηκε η δομή ενός ριβοσώματος κατά την είσοδο μιας νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης στο τρανσλοκόνιο. Κατόπιν, το κανάλι σταθεροποιήθηκε μέσα σε μια αυτό-συγκρατούμενη λιπιδική μεμβράνη, στον λεγόμενο νανοδίσκο, παρέχοντας ένα πιο φυσικό περιβάλλον από τα απορρυπαντικά που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν σε προηγούμενους χάρτες (Frauenfeld, Gumbart et al. 2011). Συνδυάζοντας αυτό το χάρτη με υψηλής ανάλυσης κρυσταλλογραφικές δομές του ριβοσώματος, του καναλιού και της νεοσυντιθέμενης πεπτιδικής αλυσίδας ξεχωριστά προέκυψε μια υψηλής ανάλυσης δομή του συμπλόκου. Αυτός ο συνδυασμός δεδομένων από διαφορετικές τεχνικές επετεύχθη με τη χρήση προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής ευέλικτης τοποθέτησης (molecular dynamics flexible fitting), που αποτελεί μια προσφάτως ανεπτυγμένη μέθοδο και οδηγεί μια ατομική δομή σε μια καινούρια διαμόρφωση (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/mdff/>).



Yildirim et al., Nat Biotechnol (2007).

Σχήμα 6. Δίκτυο φαρμάκων-στόχων. Το δίκτυο φαρμάκων-στόχων παράγεται χρησιμοποιώντας τις γνωστές συσχετίσεις μεταξύ FDA-εγκεκριμένων φαρμάκων και των πρωτεϊνικών τους στόχων. Οι κύκλοι και τα ορθογώνια αντιστοιχούν σε φάρμακα και πρωτεΐνες στόχους, αντίστοιχα. Ένας σύνδεσμος τοποθετείται μεταξύ ενός κόμβου-φαρμάκου και ενός κόμβου-πρωτεΐνης, αν η πρωτεΐνη είναι γνωστός στόχος αυτού του φαρμάκου. Η επιφάνεια του κάθε κόμβου-φαρμάκου είναι ανάλογη του αριθμού των στόχων που έχει το φάρμακο και η επιφάνεια κάθε κόμβου-πρωτεΐνης είναι ανάλογη του αριθμού των φαρμάκων που στοχεύουν την πρωτεΐνη. Οι κωδικοί των χρωμάτων δίνονται στο υπόμνημα.

### 1.6 Υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών

Οι περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες χρειάζεται να παραχθούν με ανασυνδυασμένη έκφραση σε ομόλογους ή ετερόλογους ξενιστές, όπως βακτήρια, ζύμες, κύτταρα εντόμων, ευκαρυωτικά κύτταρα ή ακόμη διαγονιδιακά ζώα ή με cell-free παραγωγή (Sarramegna, Talmont et al. 2003, Houdebine 2009, He, Wang et al. 2014), επειδή συνήθως στη φύση η ποσότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι

πολύ χαμηλή ανά κύτταρο (Wagner, Bader et al. 2006). Προς το παρόν, δεν υπάρχει τρόπος να προβλεφθεί ο βέλτιστος ξενιστής για μια δεδομένη μεμβρανική πρωτεΐνη (Sarramegna, Talmont et al. 2003). Κάθε σύστημα έχει τα δικά του πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα διαγονιδικά ζώα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή πρωτεϊνών από την αρχή της δεκαετίας του 1980 (Houdebine 2009). Την τελευταία δεκαετία αυτά τα συστήματα έχουν προσαρμοστεί για την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, όμως η χρησιμοποίησή τους για καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας έχει δυσκολίες. Η cell-free πρωτεϊνική σύνθεση περιλαμβάνει την παραγωγή πρωτεϊνών σε ανοιχτά συστήματα χρησιμοποιώντας κυτταρικά συστατικά από διαφορετικούς οργανισμούς, όπως έντομα, λαγούς, βακτήρια και άλλα αντί των κυττάρων. Σε αυτά τα συστήματα δεν υπάρχει τοξικότητα από την παραγωγή πρωτεϊνών. Η παραγωγή μπορεί να φτάσει επίπεδα mg/mL [160]. Όμως η παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα είναι πρακτικά αδύνατη προς το παρόν λόγω των μειώσεων σε πρωτεϊνικές αποδόσεις σε μεγαλύτερους όγκους αντίδρασης και του υψηλού κόστους, ειδικά όταν τα κυτταρικά συστατικά προέρχονται από ανώτερους οργανισμούς (McCusker, Bane et al. 2007). Η cell-free παραγωγή είναι γενικά περίπλοκη και η τυποποίηση της μπορεί να είναι δύσκολη λόγω του μεγάλου αριθμού συστατικών της αντίδρασης (Gialama, Kolisis et al. 2017). Τα κύτταρα θηλαστικών έχουν τη δυνατότητα για το σχηματισμό περίπλοκης μετα-μεταφραστικής επεξεργασίας των πρωτεϊνών (Perrakis and Romier 2008), όμως υπάρχουν περιορισμοί και σε αυτό το σύστημα. Αυτοί περιλαμβάνουν το χρόνο και την προσπάθεια που απαιτείται για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών, την ανάγκη για πιο σύνθετα και ακριβά θρεπτικά μέσα και, τέλος, τις δυσκολίες που σχετίζονται με την καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα (Andrell and Tate 2012). Τα κύτταρα εντόμων είναι ένα επιτυχημένο σύστημα υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών. Απόδειξη της επιτυχίας του είναι ο μεγάλος αριθμός δομικών μελετών των υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G, καθώς η πλειοψηφία των μοναδικών καθορισμένων δομών αντιστοιχούν σε πρωτεΐνη που έχει απομονωθεί από τέτοια πηγή (Venkatakrisnan, Deuri et al. 2013). Το πλεονέκτημα αυτού του συστήματος για την παραγωγή πρωτεϊνών θηλαστικών είναι ότι προσφέρει ένα σχετικά κοντινό περιβάλλον σε σχέση με τα βακτήρια και τις ζύμες. Επιπλέον, τα κύτταρα εντόμων έχουν το μηχανισμό αναδίπλωσης/ποιοτικού ελέγχου ενός ανώτερου ευκαρυωτικού οργανισμού και η πλασματική μεμβράνη τους περιέχει

χοληστερόλη. Παράλληλα, τα κύτταρα εντόμων είναι πιο εύκολο να καλλιεργηθούν από τα κύτταρα θηλαστικών, καθώς απαιτούνται πιο απλά μέσα ανάπτυξης. Επίσης, μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα σε καλλιέργειες εναιωρήματος με αποτέλεσμα να είναι πιο εύκολη η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα. Όμως, υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα, όπως ότι το κόστος του θρεπτικού μέσου είναι υψηλό (He, Wang et al. 2014). Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις δεν παράγονται αρκετές ποσότητες μεμβρανικών πρωτεϊνών που να επαρκούν για δομικές μελέτες. Παραδείγματα αποτελούν ορισμένοι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (Akerroun, Koglin et al. 2005, Bernaudat, Frelet-Barrand et al. 2011). Οι ζύμες έχουν επίσης αρκετά πλεονεκτήματα ως οργανισμοί για την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς συνδυάζουν την απλότητα, το χαμηλό κόστος σε σχέση με τα παραπάνω συστήματα και τη δυνατότητα για καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας που προσφέρεται από ένα μικροβιακό οργανισμό με την βιολογική πολυπλοκότητα που προσφέρει ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Ανάμεσα στα μεγάλα πλεονεκτήματα των ζυμών είναι η ικανότητα για πολύπλοκες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, οι ζύμες προσφέρουν ένα ίσως πιο κατάλληλο περιβάλλον λιπιδίων στη μεμβράνη για πρωτεΐνες θηλαστικών που περιέχει στερόλες, αν και περιέχεται εργοστερόλη, ενώ οι μεμβράνες των κυττάρων θηλαστικών περιέχουν χοληστερόλη (Gialama, Kolis et al. 2017). Βέβαια, έχουν κατασκευαστεί και στελέχη *S. cerevisiae* που συνθέτουν χοληστερόλη ή λιπίδια τύπου χοληστερόλης αντί της εργοστερόλης (Kitson, Mullen et al. 2011, Souza, Schwabe et al. 2011). Όμως, παρά τα τόσο ενθαρρυντικά στοιχεία, οι ζύμες δεν συσσωρεύουν πάντα ανασυνδυασμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως για παράδειγμα υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G, σε επίπεδα αρκετά για δομικές μελέτες (Sarramegna, Talmont et al. 2003). Τα βακτήρια και συγκεκριμένα το βακτήριο *E. coli* χαρακτηρίζεται από απλότητα, ευκολία, χαμηλό κόστος και επιτυχία σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων (Perrakis and Romier 2008). Μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών στελεχών, φορέων έκφρασης και υποκινητών που επάγονται είναι διαθέσιμη για αυτά τα συστήματα, που έχουν επιτρέψει την παραγωγή μιας πληθώρας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων φυσικά και των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα απλοποιείται σημαντικά με τη χρήση του βακτηρίου *E. coli*, το οποίο είναι εύκολο να τροποποιηθεί γενετικά. Βέβαια,

υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί συγκεκριμένα για τις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων.

### 1.7 Υπερπαραγωγή πρωτεϊνών στο μικροοργανισμό *E. coli* και το σύστημα έκφρασης T7

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκε η κατασκευή στελέχους *E. coli* που ανθίσταται στην τοξικότητα της ετερόλογης ή ομόλογης υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το βακτήριο *E. coli* όπως έχει αναφερθεί είναι Gram-αρνητικό, που σημαίνει ότι έχει τόσο κυτταροπλασματική όσο και εξωτερική μεμβράνη. Ανάμεσα στις δύο μεμβράνες βρίσκεται το περίπλασμα (Σχήμα 3). Τα λιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης είναι κυρίως φωσφατιδυλαιθανολαμίνη που παρουσιάζεται στο Σχήμα 1 (περίπου 75%), φωσφατιδυλογλυκερόλη (περίπου 20%) και καρδιολιπίνη (περίπου 5%) (Dowhan 1997).

Στη φύση το βακτήριο αυτό βρίσκεται συνήθως στο γαστρεντερικό σύστημα, όπου τις περισσότερες φορές είναι ακίνδυνο. Υπάρχουν βέβαια και παθογόνα στελέχη που προκαλούν ασθένειες. Τα μη παθογόνα στελέχη του χρησιμοποιούνται ευρέως για υπερέκφραση πρωτεϊνών. Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στο γεγονός ότι μεγαλώνουν γρήγορα, ότι η καλλιέργειά τους είναι απλή και φθηνή και ότι τα στελέχη αυτά τροποποιούνται εύκολα γενετικά. Στην έρευνα κυρίως χρησιμοποιούνται παράγωγα των εργαστηριακών στελεχών K-12 και B και παίζουν σημαντικό ρόλο στη βασική βιολογία, στην ιατρική και τη βιοτεχνολογία (Daegelen, Studier et al. 2009). Πλεονέκτημα είναι ότι ολόκληρα τα γονιδιώματα κάποιων στελεχών *E. coli* B (Jeong, Barbe et al. 2009) και *E. coli* K-12 (Blattner, Plunkett et al. 1997) έχουν αλληλουχηθεί παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες, όπως για παράδειγμα την απουσία ή παρουσία κάποιων γονιδίων και την ακριβή θέση τους στο γονιδίωμα.

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος *E. coli* είναι το BL21(DE3) (Wagner, Bader et al. 2006). Από το στέλεχος BL21 λείπουν δύο πρωτεάσες, η OmpT που είναι μία πρωτεάση της εξωτερικής μεμβράνης και η Lon που είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεάση (Ratelade, Miot et al. 2009). Το στέλεχος BL21(DE3) αναπτύχθηκε για χρήση με το T7 σύστημα, που περιγράφεται παρακάτω (Studier and Moffatt 1986, Rosenberg, Lade et al. 1987).



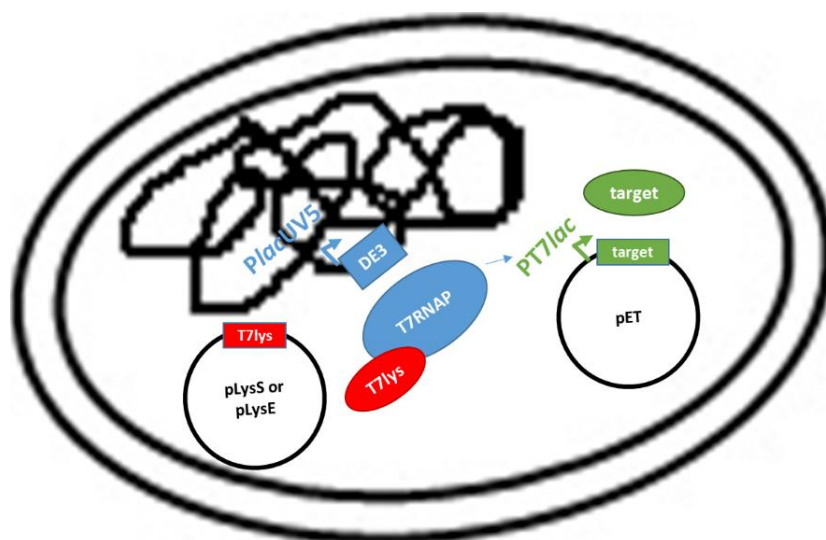
Για να ξεκινήσει η σύνθεση του RNA, απαραίτητος είναι ο υποκινητής, ο οποίος είναι τμήμα DNA που βρίσκεται ή τοποθετείται πριν το γονίδιο του ενδιαφέροντος και κατευθύνει τη μεταγραφή του. Σε αυτόν προσδένεται η RNA πολυμεράση και με τους κατάλληλους μεταγραφικούς παράγοντες ξεκινά η μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Στο βακτήριο *E. coli* οι υποκινητές περιλαμβάνουν περίπου 100 ζεύγη βάσεων (Nelson, Lehninger et al. 2008).

Για την αυξημένη παραγωγή ανασυνδυασμένων υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, κατασκευάστηκε το σύστημα T7. Η αρχή λειτουργίας είναι απλή. Η αυξημένη μεταγραφή οδηγεί σε αυξημένη μετάφραση, δηλαδή σε αυξημένη παραγωγή πρωτεΐνης. Η λειτουργία του συστήματος στηρίζεται στο γεγονός ότι η RNA πολυμεράση του φάγου T7 είναι ένα εξειδικευμένο ένζυμο με ιδιαίτερα ταχεία και αποτελεσματική δράση, η οποία μεταγράφει οκτώ φορές γρηγορότερα σε σύγκριση με την *E. coli* RNA πολυμεράση (Iost, Guillerez et al. 1992). Για να αξιοποιηθεί αυτό το χαρακτηριστικό, κατασκευάστηκαν πλασμιδιακοί φορείς για την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων γονιδίων υπό τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης, τα ευρέως χρησιμοποιούμενα πλασμίδια pET. Ταυτόχρονα, αναπτύχθηκαν τα κύτταρα BL21(DE3) που περιέχουν στο χρωμόσωμά τους αντίγραφο της RNA πολυμεράσης του φάγου T7. Ο συνδυασμός χρήσης κυττάρων BL21(DE3) με πλασμίδια pET καθιστά δυνατή την αξιοποίηση της αποτελεσματικότητας της T7 RNA πολυμεράσης στην υπερπαραγωγή πρωτεϊνών.

Συγκεκριμένα, στα κύτταρα BL21(DE3) η T7 RNA πολυμεράση βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός μεταλλαγμένου ισχυρού *lac* υποκινητή, του υποκινητή *lacUV5* (Arditti, Scaife et al. 1968). Επομένως, όπως και στην περίπτωση του *lac* υποκινητή, απουσία του επαγωγέα η πρωτεΐνη καταστολέας LacI προσδένεται στον *lacUV5* υποκινητή εμποδίζοντας την RNA πολυμεράση του *E. coli* να μεταγράψει την T7 RNA πολυμεράση. Με την προσθήκη του επαγωγέα, δηλαδή της λακτόζης ή του μη υδρολυόμενου αναλόγου της isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) απελευθερώνεται ο υποκινητής *lacUV5* και επιτρέπεται η μεταγραφή του γονιδίου που ελέγχεται από τον υποκινητή (Lewis 2005). Έτσι, γίνεται η μεταγραφή του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, η οποία με τη σειρά της μεταγράφει εξειδικευμένα το γονίδιο – στόχο (Σχήμα 7). Ο συνδυασμός του ισχυρού *lacUV5* υποκινητή και της T7 RNA

πολυμεράσης, η οποία μεταγράφει μόνο το γονίδιο – στόχο ταχύτατα, καθιστά τα κύτταρα BL21(DE3) ένα πολύ αποδοτικό εργαλείο για την παραγωγή πρωτεϊνών.

Σημαντικό μειονέκτημα του συστήματος αυτού, ιδιαίτερα για την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών για τον ξενιστή, είναι η μεταγραφή του γονιδίου - στόχου σε κάποιο βαθμό ακόμα και απουσία επαγωγής. Η έκφραση πρωτεΐνης που προκύπτει με αυτόν τον τρόπο ονομάζεται διαρρέουσα έκφραση. Για να ελεγχθεί αυτό το φαινόμενο, έχει αξιοποιηθεί η ιδιότητα της T7 λυσοζύμης να λειτουργεί ως φυσικός αναστολέας της T7 RNA πολυμεράσης. Έτσι, κάποια ποσότητα συμπαραγόμενης T7 λυσοζύμης εμποδίζει τη μεταγραφή του γονιδίου – στόχου σε μικρό βαθμό και κατ' επέκταση τη διαρρέουσα έκφραση. Επομένως, σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται εκτός από το πλασμίδιο με το γονίδιο – στόχο και ένα δεύτερο πλασμίδιο που κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη. Για αυτό το σκοπό υπάρχουν δύο πλασμίδια, τα pLysS, που παράγουν μικρή ποσότητα T7 λυσοζύμης, και pLysE, που παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα (Σχήμα 7).



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση των στελεχών BL21(DE3) pLysS ή pLysE. Η έκφραση του χρωμοσωμικού γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση ελέγχεται από τον *lacUV5* υποκινητή, ο οποίος επάγεται από το IPTG. Ταυτόχρονα σε μικρή (pLysS) ή μεγαλύτερη ποσότητα (pLysE) εκφράζεται το γονίδιο που κωδικοποιεί το φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης, την T7 λυσοζύμη, η οποία εμποδίζει τη μεταγραφή του γονιδίου - στόχου σε μικρό βαθμό και κατ' επέκταση τη διαρρέουσα έκφραση.

## 1.8 Υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στο μικροοργανισμό *E. coli*

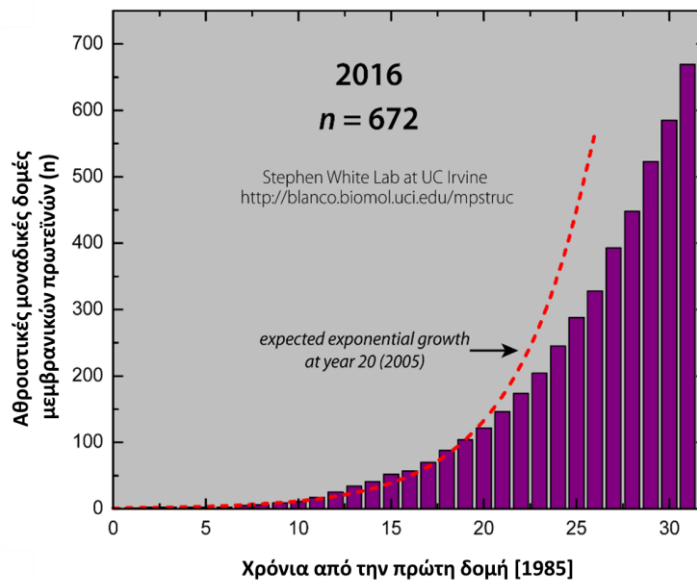
Λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων του το βακτήριο *E. coli* είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος οργανισμός και για την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, παρόλο που, προφανώς, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης δεν υπήρξε επιλεκτική πίεση για το βακτήριο *E. coli* προς την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών (Schlegel, Klepsch et al. 2010).

Το στέλεχος BL21 έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα σε κάποιες περιπτώσεις για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών και την επίλυση των τρισδιάστατων δομών τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ένας ευκαρυωτικός υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνη G, ο υποδοχέας χημειοκίνης CXCR1, για την επίλυση της δομής του οποίου χρησιμοποιήθηκε πρωτεΐνη που είχε παραχθεί σε *E. coli* BL21 κύτταρα. Το γονίδιο – στόχος ήταν υπό τον έλεγχο του *lac* υποκινητή. Σε αυτή την περίπτωση, η πρωτεΐνη παράχθηκε σε μορφή συσσωματωμάτων και κατόπιν αναδιπλώθηκε στη φυσική της διαμόρφωση σε πρωτεολιποσώματα 1,2-διμυριστοϋλ-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλοχολίνης με διαπήδηση σε διάλυμα με επιφανειοενεργές ουσίες (Park, Das et al. 2012). Άλλο παράδειγμα χρήσης του στελέχους BL21 για παραγωγή πρωτεΐνης της οποίας η δομή επιλύθηκε είναι η περίπτωση ενός ευκαρυωτικού υποδοχέα συζευγμένου με πρωτεΐνη G, μιας παραλλαγής του υποδοχέα νευροτενσίνης 1 (NTR1). Για την ομοιόμορφη κατανομή του επαγωγέα IPTG σε όλο τον κυτταρικό πληθυσμό έχει διαγραφεί ο υποδοχέας της λακτόζης από αυτά τα κύτταρα. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η πρωτεΐνη ενσωματώθηκε στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου κατά την παραγωγή της (Egloff, Hillenbrand et al. 2014). Στο εξής, ως παραγωγή μεμβρανικής πρωτεΐνης σε αυτή την εργασία ορίζουμε την παραγωγή πρωτεΐνης ενσωματωμένης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Πέρα από κάποιες επιτυχίες, όμως, η παραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών τόσο γενικά, αλλά και ειδικά στα βακτήρια, παραμένει υπερβολικά δύσκολη και η επιτυχία της είναι περιορισμένη. Αυτό αντανακλάται από το γεγονός ότι λιγότερο από 2% των συνολικών αναφορών μοναδικών πρωτεϊνικών δομών που έχουν καταχωρηθεί στην κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων για τα τρισδιάστατα δομικά δεδομένα μεγάλων βιολογικών μορίων (Protein Data Bank),

αντιστοιχούν σε μεμβρανικές πρωτεΐνες. Το ποσοστό είναι πολύ μικρό, καθώς υπάρχουν δυσκολίες σε σχέση με τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες και σε όλα τα στάδια της παραγωγής μιας δομής, όπως στην παραγωγή, στον καθαρισμό και στην κρυστάλλωση. Παρά τις μεγάλες δυσκολίες, όμως, οι λυμένες δομές μεμβρανικών πρωτεϊνών έχουν αρχίσει να αυξάνονται τα τελευταία χρόνια (Σχήμα 8) λόγω της ουσιαστικής προσπάθειας που γίνεται και οφείλεται στο τεράστιο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Ενδεικτικό της δυσκολίας της μελέτης και της παραγωγής μιας δομής μεμβρανικής πρωτεΐνης είναι το γεγονός ότι το βραβείο Νόμπελ Χημείας δόθηκε για την κρυστάλλωση της πρώτης μεμβρανικής πρωτεΐνης το 1988, το 2003 για την ανακάλυψη των καναλιών νερού και για δομικές και μηχανιστικές μελέτες καναλιών ιόντων και το 2012 για μελέτες σε υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνες G. Επομένως, το επιστημονικό ενδιαφέρον για την επίλυση των προβλημάτων της ανασυνδυασμένης παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι πολύ μεγάλο.

Παρά τον περιορισμένο αριθμό των επιτυχιών, η βακτηριακή ανασυνδυασμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών παραμένει σε μεγάλο βαθμό ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα, ειδικά για μεμβρανικές πρωτεΐνες ευκαρυωτικής προέλευσης (Andrell and Tate 2013). Εντοπίζονται κυρίως τρία προβλήματα. Πρώτον, συνήθως ανά κύτταρο ενσωματώνεται μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στη μεμβράνη, δεύτερον σε περιπτώσεις που συσσωρεύεται όντως πρωτεΐνη στη μεμβράνη σε υπολογίσιμα επίπεδα η ποσότητα που παράγεται σε σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική μορφή είναι πολύ μικρή και τρίτον, η υπερέκφραση συχνά σχετίζεται με δριμεία κυτταρική τοξικότητα που μειώνει περαιτέρω την πρωτεϊνική απόδοση ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας (Wagner, Bader et al. 2006, Wagner, Baars et al. 2007).



Σχήμα 8. Πρόοδος στον καθορισμό δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Γραφική παράσταση των συνολικών μοναδικών δομών μεμβρανικών πρωτεϊνών σε συνάρτηση με το χρόνο. Η πρώτη δομή λύθηκε το 1985, ενώ συνολικά μέχρι και το 2016 έχουν επιλυθεί 672 μοναδικές δομές μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Για τη βελτίωση των προβλημάτων της χαμηλής κυτταρικής παραγωγικότητας υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις, όπως η τροποποίηση της ίδιας της πρωτεΐνης - στόχου μέσω, για παράδειγμα κατευθυνόμενης εξέλιξης, χωρίς φυσικά την απώλεια της λειτουργίας της (Sarkar, Dodevski et al. 2008, Dodevski and Pluckthun 2011, Egloff, Hillenbrand et al. 2014) ή τροποποίηση του ξενιστή μέσω, για παράδειγμα γενετικής μηχανικής (Σχήμα 9).

Η τροποποίηση του ξενιστή μέσω γενετικής μηχανικής μπορεί να γίνει μέσω συμπαραγωγής άλλων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η παραγωγή μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης, του κύριου μεταφορέα μαγνησίου από τη βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη, CorA, στο βακτήριο *E. coli* βελτιώθηκε σημαντικά από τη συνέκφραση των μοριακών συνοδών του *E. coli* DnaK/DnaJ (Chen, Song et al. 2003). Ένα άλλο τέτοιο παράδειγμα που οδήγησε στην αύξηση της κυτταρικής παραγωγικότητας τεσσάρων διαφορετικών υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G

στο βακτήριο *E. coli* αποτελεί παραδόξως η συνέκφραση της μεμβρανικής πρωτεάσης FtsH (Link, Skretas et al. 2008).

Σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν και άλλα γονίδια που κατά τη συνέκφρασή τους βελτιώνουν την κυτταρική απόδοση της παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E. coli* αναπτύχθηκε ένα σύστημα γενετικής επιλογής που περιλαμβάνει τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της μεμβρανικής πρωτεΐνης με την ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη μέσω της υπερέκφρασης μιας χιμαιρικής πρωτεΐνης ενός υποδοχέα συζευγμένου με πρωτεΐνη G και της πρωτεΐνης που προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, της β-λακταμάσης. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν εύκολα να επιλεχθούν στελέχη με υψηλή παραγωγικότητα σε μεμβρανική πρωτεΐνη σε μέσο που περιέχει αμπικιλίνη. Με αυτό το σύστημα δοκιμάστηκε η επιλογή γονιδίων από μια βιβλιοθήκη πλασμιδίων που κωδικοποιεί όλα τα γνωστά ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης του βακτηρίου *E. coli*. Επιλέχθηκαν διάφορα γονίδια κατά την συνέκφραση των οποίων αυξάνεται η κυτταρική παραγωγικότητα σε μεμβρανικές πρωτεΐνες με σημαντικότερο το γονίδιο *ybaB*, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μία υποθετική πρωτεΐνη που προβλέπεται να προσδέεται στο DNA, άγνωστης, όμως, λειτουργίας (Skretas and Georgiou 2010).

Με ένα αντίστοιχο σύστημα αναζητήθηκαν σε βιβλιοθήκες χρωμοσωμικών τμημάτων DNA του *E. coli* γονίδια ή μέρη γονιδίων, η παρουσία των οποίων σε πλασμίδιο, χωρίς όμως επαγωγή, αυξάνει την κυτταρική παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε χιμαιρική πρωτεΐνη υποδοχέα συζευγμένου με πρωτεΐνη G και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) με αποτέλεσμα να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του φθορισμού των κυττάρων και της παραγόμενης πρωτεΐνης που έχει ενσωματωθεί στη μεμβράνη (Drew, von Heijne et al. 2001, Drew, Lerch et al. 2006). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και ένα συμπληρωματικό σύστημα με το οποίο ανιχνευόταν και η λειτουργικότητα της μεμβρανικής πρωτεΐνης, καθώς με τη μεμβρανική πρωτεΐνη αλληλεπίδρασε προσδέτης επισημασμένος με ένα φθοροφόρο. Στις προαναφερθείσες βιβλιοθήκες εντοπίστηκαν τα γονίδια ή τμήματα γονιδίων στα οποία οφειλόταν ο αυξημένος κυτταρικός φθορισμός με κυτταρομετρητή ροής διαλογής κυττάρων. Η αύξηση του φθορισμού των κυττάρων οφειλόταν στην αυξημένη πρόσδεση φθορίζοντα προσδέτη λόγω είτε βελτιωμένης έκφρασης υποδοχέα ανά κύτταρο είτε λόγω

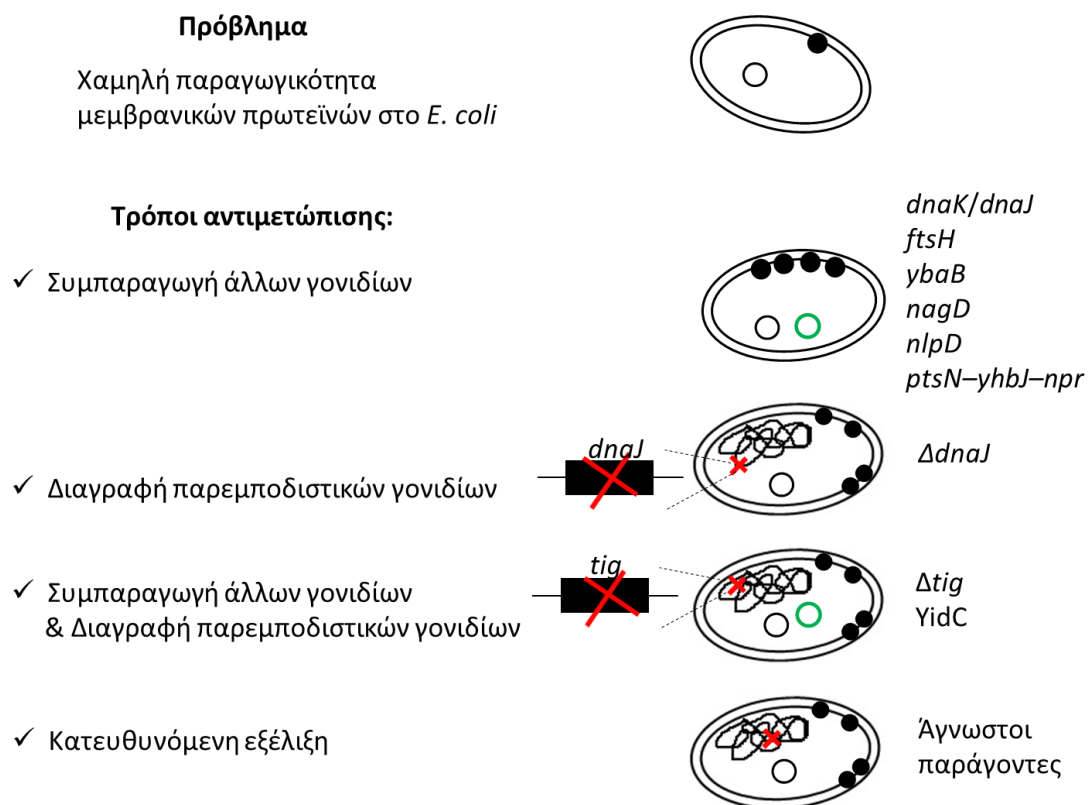
παραγωγής περισσότερου ενεργού υποδοχέα στα κύτταρα. Τα γονίδια αυτά ήταν το *nagD*, που κωδικοποιεί τη ριβονουκλεοφωσφατάση NagD, ένα τμήμα του γονιδίου *nlpD*, που κωδικοποιεί ένα μέρος της προβλεπόμενης λιποπρωτεΐνης NlpD, και τα γονίδια *ptsN-yhbJ-npr*, που κωδικοποιούν τρεις πρωτεΐνες από το σύστημα φωσφοτρανσφοράς αζώτου (Skretas, Makino et al. 2012).

Εκτός όμως από τις πρωτεΐνες, των οποίων η συνέκφραση βελτιώνει την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, υπάρχουν και πρωτεΐνες η παραγωγή των οποίων, την εμποδίζει. Για να βρεθούν γονίδια που κωδικοποιούν τέτοιες πρωτεΐνες, αναλύθηκε μια βιβλιοθήκη στελεχών του *E. coli*, που είχαν μεταλλαχθεί με τη χρήση μεταθετών στοιχείων. Ως μεμβρανική πρωτεΐνη-μοντέλο χρησιμοποιήθηκε μια χιμαιρική πρωτεΐνη που περιλαμβάνει τον υποδοχέα κανναβινοειδών 1 και την GFP. Με τη διαλογή των πιο φθορίζοντων κυττάρων με κυτταρομετρητή ροής εντοπίστηκε ότι μια μετάλλαξη στο γονίδιο *dnaJ* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγόμενης πρωτεΐνης ανά κύτταρο. Ο ρόλος της DnaJ στην παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών τουλάχιστον σε αυτή την περίπτωση είναι παρεμποδιστικός (Skretas and Georgiou 2009).

Δυνατός, όμως, είναι και ο συνδυασμός συμπαραγωγής και διαγραφής γονιδίων με αποτέλεσμα τη βελτίωση υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνες-στόχοι δύο επταελικοειδείς ροδοψίνες και μία διτοπική κινάση ιστιδίνης. Με τη διαγραφή της πρωτεΐνης trigger factor, που ανταγωνίζεται το σωματίδιο αναγνώρισης σήματος για την πρόσδεση νεοσυντιθέμενων πεπτιδικών αλληλουχιών κοντά στην κύρια διόδο εξόδου από το ριβόσωμα, και υπερέκφραση της πρωτεΐνης YidC, που όπως αναφέρθηκε συμμετέχει στη βιογένεση αρκετών μεμβρανικών πρωτεϊνών, βρέθηκε ότι αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών-στόχων (Nannenga and Baneyx 2011).

Μία διαφορετική προσέγγιση από τη συμπαραγωγή ή διαγραφή άλλων γονιδίων περιλαμβάνει την απομόνωση μεταλλαγμένων στελεχών που παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Για να απομονωθούν τέτοια στελέχη, γίνεται συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας παραγόμενης πρωτεΐνης και της ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό, καθώς η

πρωτεΐνη που υπερπαράγεται είναι χιμαιρική και αποτελείται από τη μεμβρανική πρωτεΐνη και την πρωτεΐνη που προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό στο C τελικό άκρο της. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, η μεμβρανική πρωτεΐνη Rv1337 από το μικροοργανισμό *Mycobacterium tuberculosis* που υπερπαράγεται στο βακτήριο *E. coli* προέρχεται από δύο διαφορετικά πλασμίδια με πρωτεΐνες με ανθεκτικότητα σε δύο διαφορετικά αντιβιοτικά. Το δεύτερο αντιβιοτικό λειτουργεί σαν δικλείδα ασφαλείας ώστε να μην προκύψουν μεταλλάξεις που επιτρέπουν την ανάπτυξη αποικιών χωρίς την συνεπαγόμενη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Έτσι, κύτταρα που περιέχουν και τις δύο χιμαιρικές πρωτεΐνες εκτέθηκαν σε παράγοντες που προκαλούν τυχαίες μεταλλάξεις και κατόπιν χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλέχθηκαν κλώνοι με τις επιθυμητές ιδιότητες (Massey-Gendel, Zhao et al. 2009).

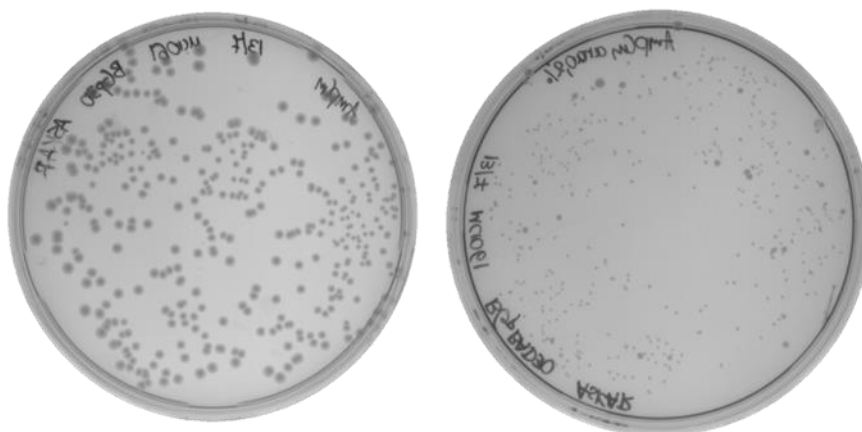


Σχήμα 9. Τρόποι αντιμετώπισης για τη χαμηλή κυτταρική παραγωγικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli* μέσω τροποποίησης του ξενιστή με τη χρήση γενετικής μηχανικής. *tig*: trigger factor.



## 1.9 Τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli*

Αντίθετα από το πρόβλημα χαμηλής κυτταρικής παραγωγικότητας, το πρόβλημα της τοξικότητας της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν έχει αντιμετωπιστεί συστηματικά ακόμη. Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα καθώς η τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι σε πολλές περιπτώσεις δριμεία. Πολλές φορές οδηγεί σε ολοκληρωτική παύση του πολλαπλασιασμού της βακτηριακής καλλιέργειας (Wagner, Baars et al. 2007, Gubellini, Verdon et al. 2011), κατ' επέκταση σε πολύ χαμηλά επίπεδα τελικής βιομάζας και επομένως σημαντική μείωση της συνολικής ογκομετρικής πρωτεϊνικής απόδοσης. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται αποικίες του βακτηρίου *E. coli* είτε αγρίου τύπου (αριστερά) είτε αποικίες που υπερπαραγάγουν μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η υπερπαραγωγή της οποίας είναι πολύ τοξική για το βακτήριο (δεξιά). Είναι προφανές ότι υπάρχει δραματική μείωση του μεγέθους των αποικιών κατά την υπερέκφραση μεμβρανικής πρωτεΐνης, καθώς υπάρχει έντονη τοξικότητα.



Σχήμα 10. Τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικής πρωτεΐνης σε στερεό θρεπτικό υλικό. *E. coli* MC1061 κύτταρα με το πλασμίδιο pBAD30BR2 ανεπτυγμένα σε τρυβλία LB άγαρ χωρίς (αριστερά) και με (δεξιά) 0.2 % αραβινόζη, που επάγει την υπερπαραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2.

### 1.10 Προτάσεις για την αιτία του άγνωστου μηχανισμού της τοξικότητας της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli* και εξειδικευμένα στελέχη για την περιορισμένη αντιμετώπιση της

Ενώ, όπως αναφέρθηκε, το φαινόμενο της τοξικότητας υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις, ο μηχανισμός του παραμένει άγνωστος. Μέχρι τώρα υπάρχουν διάφορες προτάσεις χωρίς, όμως, ξεκάθαρες αποδείξεις. Γνωρίζουμε κάποιες από τις συνέπειες υπερέκφρασης προκαρυωτικών (Wagner, Baars et al. 2007, Wagner, Klepsch et al. 2008) και ευκαρυωτικών (Klepsch, Persson et al. 2011) μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες είναι κοινές και περιλαμβάνουν τη δυσλειτουργία του κυτταρικού φακέλου, την προβληματική κυτταρική διαίρεση, τη μειωμένη ικανότητα του αναπνευστικού μηχανισμού, τη μη αποδοτική παραγωγή ενέργειας και τη συσσώρευση συσσωματωμένων κυτταροπλασμικών και περιπλασμικών πρωτεϊνών λόγω διαταραχής της ομοιόστασης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Μία πρόταση για εξήγηση των συνεπειών της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών στο βακτήριο *E. coli* αποτελεί η υπερφόρτωση και ο κορεσμός του SecYEG τρανσλοκονίου. Όμως, αυτές οι προτάσεις δεν έχουν αποδειχθεί και θα μπορούσαν να αποτελούν απλά συμπτώματα του προβλήματος και όχι την αιτία του.

Εναλλακτικά, έχει προταθεί ότι η κυτταροτοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών προέρχεται κυρίως από τις ιδιότητες της ίδιας της υπερπαραγόμενης μεμβρανικής πρωτεΐνης. Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να είναι είτε βιοχημικές είτε διαμορφωτικές (Gubellini, Verdon et al. 2011). Άλλη μια ένδειξη ότι οι ιδιότητες της ίδιας της πρωτεΐνης ευθύνονται για την τοξικότητά της είναι ότι συγκεκριμένες μόνο μεταλλάξεις στη μεμβρανική πρωτεΐνη περμεάση της λακτόζης προκαλούν τοξικότητα στα βακτηριακά κύτταρα (Stewart, Bailey et al. 1998).

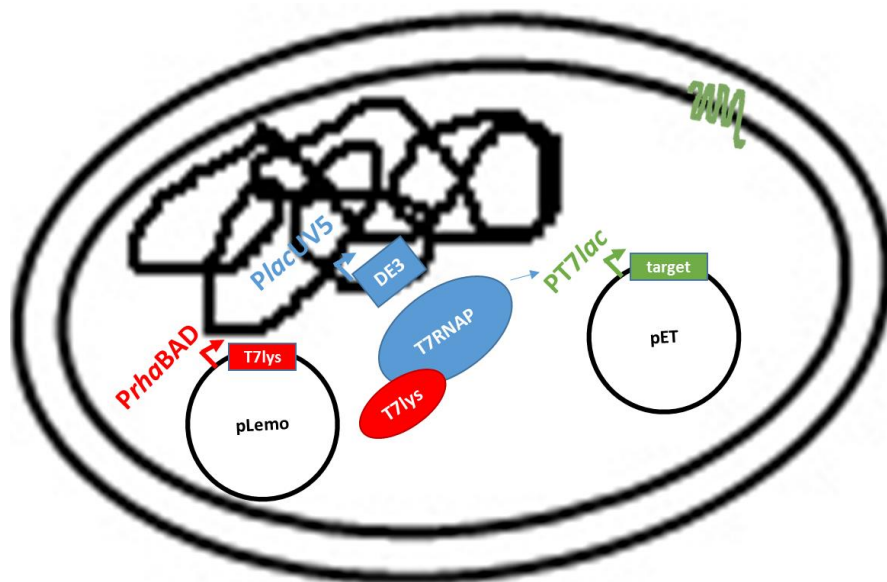
Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.7, το στέλεχος BL21(DE3) παράχθηκε για την βελτιωμένη υπερέκφραση υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Πριν από περίπου δύο δεκαετίες χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος αυτό ως αφετηρία για την κατασκευή καταλληλότερων στελεχών για την βελτιωμένη υπερέκφραση τοξικών πρωτεϊνών (Miroux and Walker 1996). Ως πρωτεΐνη – μοντέλο χρησιμοποιήθηκε μια τοξική μιτοχονδριακή μεμβρανική πρωτεΐνη (oxoglutarate malate carrier protein), η οποία τέθηκε υπό τον έλεγχο του ισχυρού T7 υποκινητή. Μετά από άσκηση εξελικτικής

πίεσης σε κύτταρα BL21(DE3) που υπερπαρήγαγαν την τοξική πρωτεΐνη απομονώθηκε μεταλλαγμένο στέλεχος *E. coli* BL21(DE3) με αυθόρμητες μεταλλάξεις που καταστέλλουν την τοξικότητά της. Το στέλεχος αυτό ονομάστηκε C41(DE3) και χρησιμοποιήθηκε ως αφετηρία για την περαιτέρω εξέλιξη του *E. coli* για την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Ασκήθηκε και πάλι εξελικτική πίεση στο καινούριο στέλεχος και η πρωτεΐνη μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ξανά μια μεμβρανική πρωτεΐνη, η b υπομονάδα της *E. coli* F-ATPάσης. Με την ίδια διαδικασία απομονώθηκε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος *E. coli* C41(DE3), το οποίο ονομάστηκε C43(DE3).

Καθώς οι μεταλλάξεις των C41(DE3) και C43(DE3) προέκυψαν αυθόρμητα με την εφαρμογή εξελικτικής πίεσης σε αυτά, για πολλά χρόνια ο μηχανισμός δράσης τους παρέμενε μυστήριο. Πολλά χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι, όπως σωστά είχε υποθέσει ο Walker στην αρχική δημοσίευση (Miroux and Walker 1996), η ποσότητα της παραγόμενης T7 RNA πολυμεράσης είναι μειωμένη σε αυτά τα στελέχη (Wagner, Klepsch et al. 2008), καθώς οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την κατεσταλμένη τοξικότητα βρίσκονταν στην αλληλουχία του *lacUV5* υποκινητή. Κάποιες από αυτές αναστρέφουν τον ισχυρό *lacUV5* υποκινητή στον ασθενέστερο αγρίου τύπου *lac* υποκινητή (Arditti, Scaife et al. 1968). Έτσι, μειώνονται τα επίπεδα του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη – στόχο (Wagner, Klepsch et al. 2008) και εξασφαλίζεται ότι οι μηχανισμοί μετάφρασης και βιογένεσης εναρμονίζονται, επιτρέποντας έτσι την ένταξη των υπερπαραγόμενων πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου (Schlegel, Klepsch et al. 2010).

Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στη ιδέα ότι πιθανώς για κάθε πρωτεΐνη – στόχο υπάρχει ένα βέλτιστο επίπεδο mRNA που την κωδικοποιεί, το οποίο επιφέρει τη μέγιστη υπερπαραγωγή της. Πέρα από αυτό το επίπεδο η κυτταρική φυσιολογία διαταράσσεται και η υπερπαραγωγή ανασυνδυασμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης γίνεται τοξική οδηγώντας σε πολύ χαμηλή ποσότητα βιομάζας. Έτσι, σχεδιάστηκε ένα νέο σύστημα, το Lemo21(DE3), στο οποίο ρυθμίζονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου – στόχου στο κύτταρο (Wagner, Klepsch et al. 2008). Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας BL21(DE3) κύτταρα, στα οποία ένα δεύτερο πλασμίδιο που κωδικοποιεί την T7 λυσοζύμη, τον φυσικό παρεμποδιστή της T7 RNA πολυμεράσης, όπως στο σύστημα pLysS και pLysE. Η διαφορά είναι ότι η παραγωγή της T7

λυσοζύμης δεν είναι διαρκής και σε συγκεκριμένη μικρή ποσότητα, αλλά το γονίδιο της T7 λυσοζύμης είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή της ραμνόζης, ενός υποκινητή, του οποίου τα επίπεδα μεταγραφής στο κύτταρο ρυθμίζονται με ακρίβεια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 11 (Wagner, Klepsch et al. 2008, Schlegel, Lofblom et al. 2012). Με διαφορετικές ποσότητες ραμνόζης μπορούν να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής, ώστε η απόδοση μεμβρανικής πρωτεΐνης να γίνει μέγιστη. Ύστερα, σε αυτές τις βέλτιστες συνθήκες μπορεί να γίνει η υπερέκφραση της μεμβρανικής πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα για την μετέπειτα απομόνωσή της.

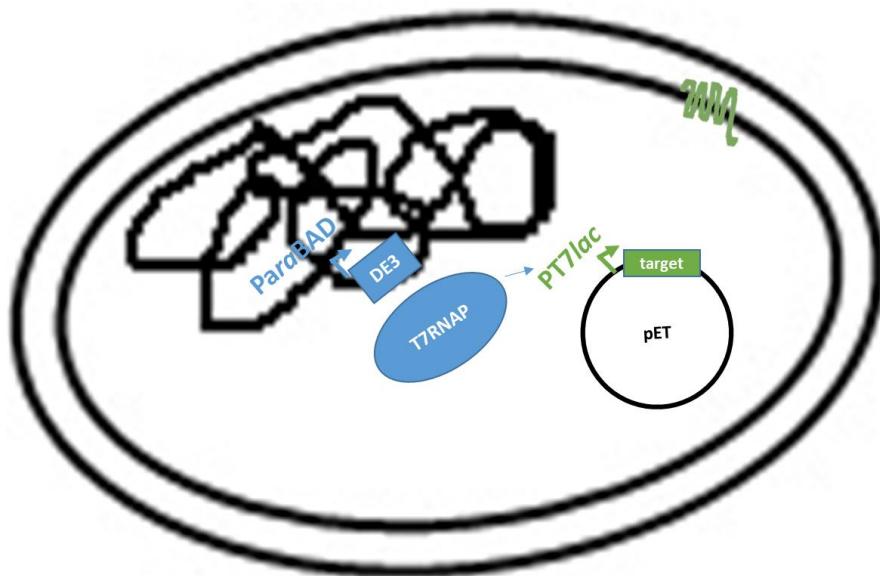


Σχήμα 11. Σχηματική αναπαράσταση του στελεχούς Lemo21(DE3). Η έκφραση του χρωμοσωμικού γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση ελέγχεται από τον lacUV5 υποκινητή, ο οποίος επάγεται από το IPTG. Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί το φυσικό αναστολέα της T7 RNA πολυμεράσης, την T7 λυσοζύμη, ελέγχεται από τον υποκινητή ραμνόζης στο pLemo πλασμίδιο. Τα επίπεδα μεταγραφής του υποκινητή ραμνόζης στο κύτταρο ρυθμίζονται με ακρίβεια χρησιμοποιώντας τον επαγωγέα ραμνόζη και κατ' επέκταση τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου – στόχου που κωδικοποιεί τη μεμβρανική πρωτεΐνη ρυθμίζονται και αυτά με ακρίβεια (Schlegel, Lofblom et al. 2012).

Η χρησιμότητα των στελεχών C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) περιορίζεται στο σύστημα με T7 υποκινητή και T7 RNA πολυμεράση για την έκφραση

του γονιδίου – στόχου. Επίσης, ενώ τα στελέχη C41(DE3) και C43(DE3) χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή τοξικών πρωτεϊνών, δεν παρουσιάζουν βελτιωμένες αποδόσεις σε όλες τις περιπτώσεις (Schlegel, Klepsch et al. 2010), αλλά και το Lemo21(DE3) συχνά έχει αποδόσεις ίσες με τα C41(DE3) και C43(DE3) στελέχη (Wagner, Klepsch et al. 2008). Ακόμη και όταν οι αποδόσεις του Lemo21(DE3) σε σχέση με τα C41(DE3) και C43(DE3) είναι μεγαλύτερες, οι αυξήσεις δεν ξεπερνούν το 50% (Wagner, Klepsch et al. 2008).

Ένα σύστημα που λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με το Lemo21(DE3) είναι το σύστημα της «συγκρατημένης έκφρασης» (Σχήμα 12 Σχήμα 12). Σε αυτό το σύστημα η T7 RNA πολυμεράση βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή αραβινόζης στο χρωμόσωμα και το γονίδιο – στόχος ελέγχεται από τον ισχυρό T7/*lac* υποκινητή. Έχει προταθεί ότι με αυτό το σύστημα υπάρχουν τρεις τρόποι έκφρασης, ο «συγκρατημένος», ο «γρήγορος» ή ο «βασικός». Ο «βασικός» τρόπος έκφρασης χαρακτηρίζεται από την μικρή παραγωγή που προκύπτει ακόμη και απουσία επαγωγέα, ενώ στον «γρήγορο» τρόπο έκφρασης χρησιμοποιούνται και οι δύο επαγωγείς (IPTG και αραβινόζη). Κατά τον «συγκρατημένο» τρόπο έκφρασης, που προτείνεται και ότι είναι ο κατάλληλος για την υπερέκφραση τοξικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιούνται πολύ μικρές ποσότητες αραβινόζης για την παραγωγή χαμηλών επιπέδων T7 RNA πολυμεράσης χωρίς IPTG για την παραγωγή χαμηλών επιπέδων του mRNA – στόχου (Narayanan, Ridilla et al. 2011).



Σχήμα 12. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος της «συγκρατημένης έκφρασης». Η έκφραση του χρωμοσωμικού γονιδίου που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση ελέγχεται από τον *araBAD* υποκινητή, ο οποίος επάγεται από μικρή ποσότητα της αραβινόζης. Η έκφραση του γονιδίου – στόχου ελέγχεται από τον *T7lac* υποκινητή χωρίς όμως να επάγεται με IPTG.

Μια άλλη προσέγγιση που έδωσε στοιχεία για το μηχανισμό της τοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών, προέκυψε από την προσπάθεια υπερέκφρασης της μεμβρανικής πρωτεΐνης αναγωγάσης του εποξειδίου της βιταμίνης K (VKORc1) από κύτταρα θηλαστικών στο βακτήριο *E. coli*. Το αγρίου τύπου ένζυμο εκφράζεται σε πολύ μικρό βαθμό από το βακτήριο, ενώ μεταλλάξεις τόσο στην αλληλουχία του ενζύμου όσο και στο γονιδίωμα του βακτηρίου επιτρέπουν την δραματική αύξηση της παραγωγής του. Οι μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του βακτηρίου βρέθηκαν στη μεμβρανική πρωτεΐνη YidC και στην πεπτιδάση HslV. Επομένως, η τοξικότητα που προκύπτει από την υπερπαραγωγή της VKORc1 οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στη δυσκολία αναγνώρισης από την YidC, παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη-στόχος συσσωρεύεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Μεταλλάξεις στο ένζυμο ή στη YidC βρέθηκαν να βελτιώνουν την «επικοινωνία» των μορίων αυτών οδηγώντας σε μείωση της τοξικότητας και σε δραματική αύξηση της παραγόμενης ποσότητας του ενζύμου (Hatahet, Blazyk et al. 2015). Βέβαια, η προσέγγιση αυτή αφορά μόνο τις πρωτεΐνες που είναι υποστρώματα της YidC.

### 1.11 Ανάστροφη μηχανική και συστημική βιοτεχνολογία

Ανάστροφη μηχανική είναι η διαδικασία απόκτησης γνώσης από οτιδήποτε τεχνητό. Η έννοια αυτή υπάρχει πριν τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές ή τη μοντέρνα τεχνολογία και πιθανώς ξεκίνησε να υφίσταται τον καιρό της βιομηχανικής επανάστασης. Η διαφορά με τη συμβατική επιστημονική έρευνα είναι ότι το αντικείμενο που ερευνάται είναι κατασκευασμένο από τον άνθρωπο, ενώ στην κλασική επιστημονική έρευνα μελετάται ένα φυσικό φαινόμενο (Eilam 2005). Αρχικά οι ιδέες αυτές αναπτύχθηκαν για τη μελέτη ηλεκτρονικών κυκλωμάτων, όμως σε πολλές περιπτώσεις η αντίστροφη μηχανική έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη βιολογία (Bennett, Pang et al. 2008, Mettetal, Muzzey et al. 2008, Friedel, Usadel et al. 2012). Στην παρούσα εργασία δεν ξεκίνησε η έρευνα από μία υπόθεση, αλλά με την κατασκευή βακτηριακών στελεχών, στα οποία η τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών καταστέλλεται. Αυτά τα νέα στελέχη μετέπειτα μελετήθηκαν με σκοπό να διερευνηθούν στοιχεία του μηχανισμού αυτής της τοξικότητας.

Βέβαια, όπως αναφέρθηκε στην περίπτωση του στελέχους Lemo (Wagner, Klepsch et al. 2008), για την βελτίωση της επίδοσης στελεχών έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχημένα και προσεγγίσεις λογικής μεταβολικής μηχανικής. Όμως, αυτές οι προσπάθειες είναι περιορισμένες και για την πραγματοποίησή τους απαραίτητη καθίσταται η σε βάθος γνώση του συστήματος του ενδιαφέροντος, η οποία δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμη.

Η συστημική βιολογία είναι η μελέτη συστημάτων βιολογικών μορίων, κυττάρων, οργανισμών ή ολόκληρων ειδών. Είναι μια ολιστική προσέγγιση που αποκρυπτογραφεί την πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων και βασίζεται στην κατανόηση ότι το σύνολο είναι πιο σημαντικό από το άθροισμα των επιμέρους στοιχείων. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία αντί να μελετάται ο ρόλος ενός συγκεκριμένου γονιδίου μελετάται το σύνολο – σύστημα όλων των γνωστών ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης του βακτηρίου *E. coli* και ο ρόλος που παίζει η συνέκφρασή τους στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Έτσι, μια αρχική υπόθεση δεν είναι η αφετηρία της πειραματικής διαδικασίας και δεν χρειάζεται

γνώση της διεργασίας που μελετάται. Αντίθετα, ένα μη αναμενόμενο αποτέλεσμα, για το οποίο δεν θα μπορούσε να έχει γίνει πρόβλεψη, πιθανώς να οδηγήσει και στη διαλεύκανση μοριακών μηχανισμών της διεργασίας του ενδιαφέροντος.

### 1.12 Στόχος

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να κατασκευαστούν βακτηριακά στελέχη ικανά να ανθίστανται στην τοξικότητα που συνοδεύει η διαδικασία υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στα βακτήρια και επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και κατ' επέκταση τη συσσώρευση βιομάζας χρησιμοποιώντας μεθόδους αντίστροφης μηχανικής και συστημικής βιοτεχνολογίας. Κατόπιν, στόχος ήταν η μελέτη στοιχείων του μηχανισμού της κυτταροτοξικότητας, οπότε και ο χαρακτηρισμός των νέων βακτηριακών στελεχών που ξεπερνούν την τοξικότητα από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Απώτερος στόχος είναι η περαιτέρω βελτίωση της παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών, ώστε να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες. Έτσι, αυξάνονται οι πιθανότητες να επιτευχθεί ο βιοχημικός χαρακτηρισμός τους και να επιλυθούν περισσότερες δομές τους και κατ' επέκταση να σχεδιαστούν νέα και καλύτερα φάρμακα.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Όργανα – Συσκευές

Για τα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν τα όργανα:

- Επωαστήρας GFL 3033
- Φυγόκεντρος Kubota 7780
- Μικροφυγόκεντρος Eppendorf Mini Spin
- Συσκευή ηλεκτροδιάτρησης Biorad Micropulser
- Συσκευή απεικονίσεων UVP Chemidoc – It2 Imager
- Κλίβανος αποστείρωσης Raypa AES steam sterilizer
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Biorad Mini PROTEANS System
- Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτή σε μεμβράνη Thermoscientific Owl HEP με παροχή από Consort EV231 Electrophoresis power supply
- Θερμοκυκλοποιητής MS Research PTC – 200 (Pelter Thermal Cycler)
- Συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας UVP UV Transilluminator
- Συσκευή ανάδευσης FINE PCR Compact Rocker CR300t
- pH – μετρο MeterLab PHM201 portable pH meter
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Millipore Milli-Q plus
- Φωτόμετρο με χρήση κυψελίδας Hitachi UV 2000
- Φωτόμετρο/Φθορισμόμετρο συμβατό με πιάτα 96 πηγαδιών, Tecan Safire2 με λογισμικό Maggellan v6.00
- Κυτταρόμετρο ροής FACscanto II (Beckton Dickinson)
- Υπερφυγόκεντρος Optima LE-80K Ultracentrifuge (Beckman-Coulter Inc.)

## 2.2 Βακτηριακά στελέχη

Το στέλεχος *E. coli* MC1061 χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται διαφορετικά. Όλα τα *E. coli* στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και οι γονότυποί τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Τα στελέχη *E. coli* W3110 and *dnaK*<sup>-</sup> μας παραχωρήθηκαν ευγενικά από τον Dr. P. Genevaux (Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier). Τα στελέχη *E. coli* BW25113 *djlA*<sup>-</sup>, *rraA*<sup>-</sup>, *rscB*<sup>-</sup> and *rscC*<sup>-</sup> ήταν από την Συλλογή Keio, η οποία αποτελείται από περίπου 4,000 μεταλλαγμένα στελέχη του *E. coli* BW25113. Κάθε στέλεχος περιλαμβάνει μια διαγραφή ενός διαφορετικού γονιδίου που προφανώς δεν είναι απαραίτητο για την επιβίωση του βακτηρίου (Baba, Ara et al. 2006). Τα στελέχη C41(DE3) και C43(DE3) αγοράστηκαν από τη Lucigen, ενώ το στέλεχος Lemo21(DE3) αγοράστηκε από την εταιρεία New England Biolabs.

Πίνακας 1. Στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

<i>E. coli</i> Στέλεχος	Γονότυπος	Αναφορά
MC1061	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 [ <i>araD139</i> ]B/r Δ( <i>codB-lacI</i> )3 <i>galK16 galE15 e14<sup>-</sup> mcrA0 relA1 rpsL150(Str<sup>R</sup>) spoT1</i> <i>mcrB1 hsdR2(r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>)</i>	(Casadaban and Cohen 1980)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-)</i> λ(DE3 [ <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ])	(Studier and Moffatt 1986)

Lemo21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) pLemo	New England Biolabs
C41(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) with modifications described by Kwon et al. (Kwon, Kim et al. 2015) and Schlegel et al. (Schlegel, Genevoux et al. 2015).	Lucigen
C43(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB- mB-) λ(DE3 [ <i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i> ]) with modifications described by Kwon et al. (Kwon, Kim et al. 2015).	Lucigen
BW25113	F <sup>-</sup> , Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
BW25113 <i>djlA</i> <sup>-</sup> (JW0054)	F <sup>-</sup> , Δ <i>djlA</i> 766::kan, Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
BW25113 <i>rraA</i> <sup>-</sup> (JW3900)	F <sup>-</sup> , Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, Δ <i>rraA</i> 788::kan, <i>hsdR514</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
BW25113 <i>rcsB</i> <sup>-</sup> (JW2205)	F <sup>-</sup> , Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(::rrnB-3), λ <sup>-</sup> , Δ <i>rcsB</i> 770::kan, <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR514</i>	(Baba, Ara et al. 2006)

BW25113 <i>rcsC</i> (JW5917)	F <sup>-</sup> , $\Delta(araD-araB)567$ , $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ , $\lambda^-$ , $\Delta rcsC771::kan$ , <i>rph-1</i> , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , <i>hsdR514</i>	(Baba, Ara et al. 2006)
SuptoxD	F <sup>-</sup> $\lambda^-$ $\Delta(ara-leu)7697$ [ <i>araD139</i> ]B/r $\Delta(codB-lacI)3$ <i>galK16 galE15 e14<sup>-</sup> mcrA0 relA1 rpsL150(Str<sup>R</sup>) spoT1</i> <i>mcrB1 hsdR2(r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>)</i> pSuptoxD	Παρούσα εργασία
SuptoxR	F <sup>-</sup> $\lambda^-$ $\Delta(ara-leu)7697$ [ <i>araD139</i> ]B/r $\Delta(codB-lacI)3$ <i>galK16 galE15 e14<sup>-</sup> mcrA0 relA1 rpsL150(Str<sup>R</sup>) spoT1</i> <i>mcrB1 hsdR2(r<sup>-</sup>m<sup>+</sup>)</i> pSuptoxR	Παρούσα εργασία
W3110	F <sup>-</sup> $\lambda^-$ <i>rph-1 INV(rrnD, rrnE)</i>	(Bachmann 1972)
$\Delta DnaK$	W3110 $\Delta DnaK52::CmR$	(Perrody, Cirinesi et al. 2012)

### 2.3 Χημικά και ένζυμα

Η τρυπτόνη, το εκχύλισμα ζύμης, το άγαρ, το χλωριούχο νάτριο και τα αντιβιοτικά αγοράστηκαν από τη Sigma. Η πολυμεράση Q5, η λιγάση T4 και όλα τα περιοριστικά ένζυμα αγοράστηκαν από την εταιρεία New England Biolabs.

### 2.4 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani) που αποτελείται από 1% τρυπτόνη (w/v), 0.5% εκχύλισμα ζύμης (w/v), 1% NaCl (w/v), pH= 7.0. Για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου γινόταν και προσθήκη 1.5% (w/v) άγαρ. Το θρεπτικό μέσο αποστειρωνόταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 λεπτά και υπό πίεση 0.1 MPa. Τα αντιβιοτικά αποστειρώνονταν μέσω

διήθησης σε φίλτρα με πόρους διαμέτρου 0.2 μm. Προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών στα θρεπτικά μέσα γινόταν μετά την πτώση της θερμοκρασίας των τελευταίων κάτω από τους 60 °C.

## 2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από καλλιέργεια *E. coli*

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το κατάλληλο κιτ (NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## 2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκυκλωτή και με τελικό όγκο 50 μL. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι ποσότητες των αντιδρώντων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Η πολυμεράση Q5 χρησιμοποιήθηκε λόγω της διορθωτικής δράσης της (proofreading), προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανότητα εισαγωγής κάποιας ανεπιθύμητης μετάλλαξης κατά την αντιγραφή.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης για κάποιες περιπτώσεις η τεχνική PCR επικάλυψης επέκτασης (Overlap extension PCR). Με αυτή την τεχνική μπορούν να ενσωματωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία όπως φαίνεται στο Σχήμα 13 ή απλά χωρίς να υπάρξει μετάλλαξη να συνενωθούν δύο τμήματα DNA που δεν είναι αρχικά παρακείμενα το ένα στο άλλο.

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή 5'-3'
Kanfor	AAAAAACTGCAGATGAGCCATATTCAACGGG
Kanrev	TTTTTTAAGCTTTTAGAAAACTCATCGAGC
DjIAFLfor	AAAAAATCTAGAAGGAGGAAACGATGCAGTATTGGGGAAAAATC

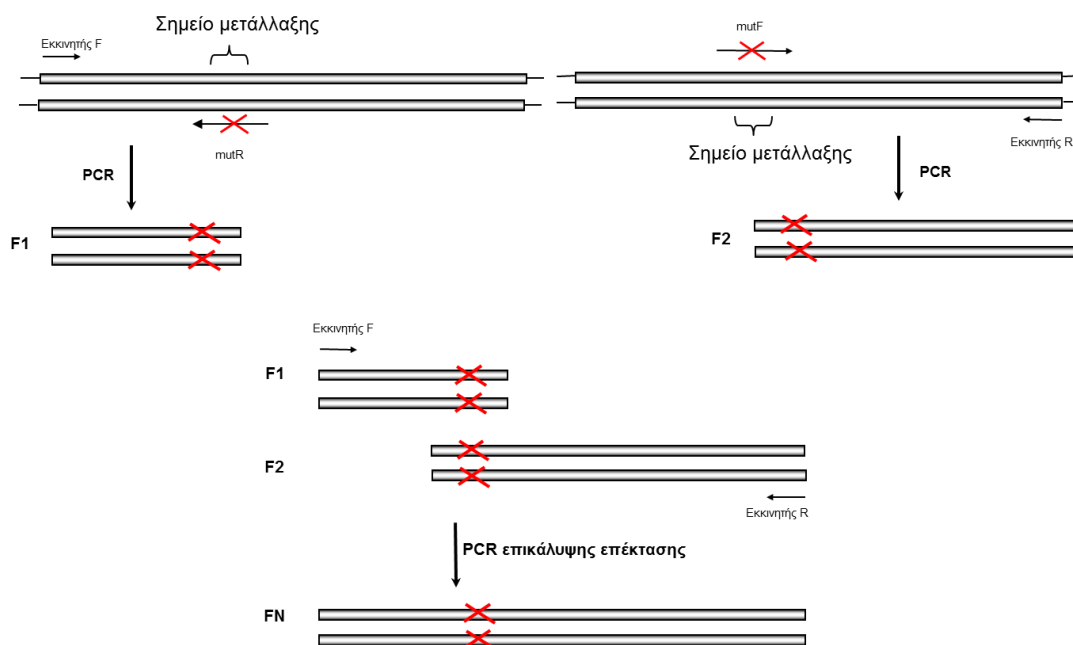








διαλύματος TAE για την φόρτωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα έξι φορές πιο πυκνό από την τελική συγκέντρωση (30% glycerol (v/v), 0.25% bromophenol blue (w/v) σε υπερκάθαρο νερό). Για την εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν 5 μL από πρότυπα δείγματα μορίων DNA, 1kb ladder (New England Biolabs). Κάθε ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 V για 40 λεπτά και κατόπιν τα διαχωρισμένα τμήματα DNA φωτογραφήθηκαν με χρήση της συσκευής UVP. Ειδικά για κάθε απομόνωση τμημάτων DNA αποκόπηκε η κατάλληλη ζώνη του πηκτώματος χρησιμοποιώντας μια αποστειρωμένη λεπίδα και το DNA καθαρίστηκε με το κιτ Nucleospin Gel Clean-up (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.



Σχήμα 13. Η τεχνική PCR επικάλυψης επέκτασης (Overlap extension PCR). Με αυτή την τεχνική μπορούν να ενσωματωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα σημεία σε μια νουκλεοτιδική αλληλουχία. Με κόκκινο x επισημαίνεται η μετάλλαξη στους εκκινητές που εισάγεται στο γονίδιο. Αρχικά, ενισχύεται με PCR το πρώτο τμήμα DNA μέχρι το σημείο της μετάλλαξης (F1) με τους κατάλληλους εκκινητές. Κατόπιν, ενισχύεται με PCR το δεύτερο τμήμα DNA από το σημείο της μετάλλαξης μέχρι το τέλος (F2) με τους κατάλληλους εκκινητές. Με μια τρίτη αντίδραση PCR που περιλαμβάνει τα δύο μεταλλαγμένα τμήματα DNA F1 και F2 και τους εξωτερικούς εκκινητές F και R ενισχύεται το τελικό μεταλλαγμένο τμήμα DNA (FN).

## 2.8 Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Κάθε αντίδραση πέψης πλασμιδιακού DNA ή προϊόντος αντίδρασης PCR με περιοριστικές ενδονουκλεάσες είχε όγκο 40  $\mu\text{L}$  και περιελάμβανε 1  $\mu\text{g}$  πλασμιδιακού DNA ή προϊόντος αντίδρασης PCR, 5-20 units κάθε περιοριστικής ενδονουκλεάσης, 4  $\mu\text{L}$  καταλλήλου ρυθμιστικού διαλύματος για τη δράση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης (διατίθεται από την εταιρία New England Biolabs) και, αν ήταν απαραίτητο, αποστειρωμένο υπερκάρθρο νερό. Το κάθε δείγμα επώαστηκε στους 37  $^{\circ}\text{C}$  για δύο ώρες. Για την περίπτωση που το δείγμα προοριζόταν για αντίδραση δεσμάσης, καθαριζόταν με το κιτ Nucleospin PCR Clean-up (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και εκλουόταν με 30  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένο υπερκάρθρο νερό.

## 2.9 Αντίδραση λιγάσης

Για την κλωνοποίηση κάθε καθαρού τμήματος DNA με μονόκλιωνα κολλώδη άκρα σε πλασμιδιακό φορέα μετά από αντίδραση πέψης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμάσης. Κάθε τέτοια αντίδραση είχε όγκο 15  $\mu\text{L}$  και περιελάμβανε 6  $\mu\text{L}$  πλασμιδιακού φορέα, 6  $\mu\text{L}$  καθαρού τμήματος DNA, 0.6  $\mu\text{L}$  T4 DNA δεσμάσης, 1.5  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος της T4 DNA δεσμάσης (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5) και αποστειρωμένο υπερκάρθρο νερό. Και τα δύο τμήματα DNA είχαν επωαστεί με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα και καθαριστεί με κιτ Nucleospin PCR ή Gel Clean-up και εκλουστεί σε 30  $\mu\text{L}$  αποστειρωμένου υπερκάρθρου νερού. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλωτή στους 16  $^{\circ}\text{C}$  για 4 ώρες και ύστερα για απενεργοποίηση της λιγάσης στους 65  $^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά.

## 2.10 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* για χημικό μετασχηματισμό

Τα κύτταρα προετοιμάστηκαν όπως έχει περιγραφεί προηγούμενα (Chung, Niemela et al. 1989). Συνοπτικά, κάθε φορά καλλιεργήθηκαν 100 mL κύτταρα *E. coli* μέχρι οπτική πυκνότητα (ΟΠ) στα 600 nm περίπου ίση με 0.4 και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 4000 x g, στους 4  $^{\circ}\text{C}$  επί 10 λεπτά. Τέλος, επαναιωρήθηκαν με ήπια

ανάμιξη σε 5 mL διαλύματος TSS (10% PEG8000, 5% DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.5 σε LB) στους 4 °C και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

### 2.11 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* με θερμικό σοκ (heat shock transformation)

Για κάθε μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* μετά από επώαση 100 μL επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* στον πάγο και προσθήκη σε αυτά περίπου 100 ng πλασμιδίου ή 7.5 μL της αντίδρασης της δεσμάσης το δείγμα αναμιγνυόταν προσεκτικά. Το δείγμα κατόπιν επωαζόταν στον πάγο για 10 λεπτά, μετά στους 42 °C για 45 δευτερόλεπτα και ξανά στον πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό. Μετά την προσθήκη 900 μL θρεπτικού μέσου LB γινόταν επώαση στους 37 °C για 1 ώρα με ανάδευση στα 220 rpm για αποτελεσματικό αερισμό. Ακολουθούσε είτε στην περίπτωση του πλασμιδίου εμβολιασμός περίπου 200 μL από την καλλιέργεια σε πλάκα θρεπτικού-άγαρ, παρουσία του καταλλήλου αντιβιοτικού είτε στην περίπτωση της αντίδρασης της δεσμάσης φυγοκέντρηση στα 6000 x g για 2 λεπτά, απόρριψη του 800 μL υπερκειμένου, επαναιώρηση και εμβολιασμός περίπου 200 μL από την καλλιέργεια σε πλάκα θρεπτικού-άγαρ. Τα τριβλία επωάζονταν στους 37 °C για 16 ώρες.

### 2.12 Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση

Κάθε φορά καλλιεργήθηκαν 100 mL κύτταρα *E. coli* μέχρι ΟΠ στα 600 rpm περίπου ίση με 0.4 και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 4000 x g, στους 4 °C επί 10 λεπτά. Ακολούθησε επαναιώρηση σε 100 mL κρύο αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό με ήπια ανάμιξη στους 4 °C. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε και ακολούθησε επαναιώρηση σε 50 mL κρύο αποστειρωμένο υπερκάθαρο νερό με ήπια ανάμιξη στους 4 °C. Μετά από ακόμη ένα βήμα φυγοκέντρησης και επαναιώρησης σε 2 mL κρύα γλυκερόλη 15% (v/v) ακολούθησε ένα τελευταίο βήμα φυγοκέντρησης και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0.5 mL κρύα γλυκερόλη 15% (v/v) και αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

## 2.13 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Για κάθε μετασχηματισμό επιδεκτικών κυττάρων *E.coli* μετά από επώαση 100 μL επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* στον πάγο και προσθήκη σε αυτά περίπου 3 μL της αντίδρασης της δεσμάσης το δείγμα αναμίχθηκε. Το δείγμα κατόπιν επώαστηκε στον πάγο για 10 λεπτά και μεταφέρθηκε σε ψυγμένη κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης 1 mm, όπου και πραγματοποιήθηκε η ηλεκτροδιάτρηση στο κατάλληλο πρόγραμμα για *E.coli*. Μετά την προσθήκη 900 μL θρεπτικού μέσου LB επώαστηκε το δείγμα στους 37 °C για 1 ώρα με ανάδευση στα 220 rpm για αποτελεσματικό αερισμό. Ακολουθούσε εμβολιασμός περίπου 200 μL από την καλλιέργεια σε πλάκα θρεπτικού-άγαρ, παρουσία του καταλλήλου αντιβιοτικού. Τα τριβλία επωάζονταν στους 37 °C για 16 ώρες.

## 2.14 Πλασμιδιακοί Φορείς

Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Εκτός από το σύστημα T7 που έχει περιγραφεί στην εισαγωγή χρησιμοποιήθηκαν και οι υποκινητές T5lac, αραβινόζης και τετρακυκλίνης.

### **T5lac υποκινητής**

Ο υποκινητής T5-lac είναι ένας υβριδικός υποκινητής από τον πρώιμο υποκινητή του φάγου T5 και το lac οπερόνιο. Περιέχει τρία σημεία πρόσδεσης του καταστολέα LacI και παραμένει κατεσταλμένος σε στελέχη όπου εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Επάγεται με IPTG και, σε αντίθεση με τον T7 υποκινητή, αναγνωρίζεται από την RNA πολυμεράση του *E. coli* (Gentz and Bujard 1985).

### **Υποκινητής Αραβινόζης και φορείς έκφρασης pBAD**

Οι φορείς έκφρασης pBAD κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τον pBAD υποκινητή από το οπερόνιο της αραβινόζης και το ρυθμιστικό του γονίδιο *araC* (Guzman, Belin et al. 1995). Η πρωτεΐνη AraC είναι ταυτόχρονα ένας θετικός και αρνητικός ρυθμιστής, που σημαίνει ότι παρουσία αραβινόζης η μεταγραφή από τον pBAD υποκινητή ενεργοποιείται, ενώ κατά την απουσία του η μεταγραφή λαμβάνει χώρα σε πολύ

χαμηλά επίπεδα. Η διαρρέουσα έκφραση μπορεί να μειωθεί περαιτέρω με ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία γλυκόζης. Η γλυκόζη μειώνει το επίπεδα του cyclic AMP, επομένως μειώνει την έκφραση από τον κατεσταλμένο από το καταβολικό γονίδιο ρBAD υποκινητή. Οι ιδιότητες του μηχανισμού έκφρασης και καταστολής του ρBAD από την πρωτεΐνη AraC έχουν μελετηθεί εκτενώς και οι αλληλεπιδράσεις τους είναι γνωστές στο μοριακό επίπεδο. Περιγράφονται από τον Schleif (Schleif 1992).

#### **Υποκινητής τετρακυκλίνης και φορέας έκφρασης ρASK75**

Το πλασμίδιο ρASK75 (Skerra 1994) είναι ένας φορέας έκφρασης με τον *tetA* υποκινητή και με το γονίδιο που κωδικοποιεί τον *tet* καταστολέα (*tetR*). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην έκφραση της Tn10 κωδικοποιούμενης ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη περιγράφονται από τους Hillen and Berens (Hillen and Berens 1994).

Πίνακας 4. Πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη.

Φορέας έκφρασης	Αφετηρία αντιγραφής (ori)	Υποκινητής	Ανθεκτικότητα	Αναφορά
<b>pBAD30</b>	p15A	Αραβινόζης	Αμπικιλίνη	(Guzman, Belin et al. 1995)
<b>pBAD33</b>	p15A	Αραβινόζης	Χλωραμφαινικόλη	(Guzman, Belin et al. 1995)
<b>ASKA (modified pQE31)</b>	ColE1	T5lac	Χλωραμφαινικόλη	(Kitagawa, Ara et al. 2005)
<b>pASK75</b>	ColE1	Τετρακυκλίνης	Αμπικιλίνη	(Skerra 1994)
<b>pASK75KanR</b>	ColE1	Τετρακυκλίνης	Καναμυκίνη	-
<b>pET28a(+)</b>	ColE1	T7	Καναμυκίνη	Novagen

## 2.15 Κατασκευή πλασμιδίων

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 και όλα τα πλασμίδια παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Το πλασμίδιο pBAD30BR2-KanR κατασκευάστηκε ενισχύοντας την αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο aminoglycoside 3'-phosphotransferase (KanR) με PCR από τον φορέα έκφρασης pET28a(+) (Novagen) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Kanfor και Kanrev, μετά από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PstI και HindIII, κλωνοποίηση σε παρόμοια κομμένο πλασμίδιο pBAD33BR2-GFP (Skretas, Makino et al. 2012) με αντικατάσταση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

(GFP), και κατόπιν υποκλωνοποίηση ολόκληρου του DNA τμήματος FLAG-BR2-TEV-KanR στο pBAD30 μετά από πέψη με XbaI και HindIII.

Για την ενίσχυση του γονιδίου SCD, το οποίο κωδικοποιεί την ανθρώπινη πρωτεΐνη Stearoyl-CoA desaturase (αμινοξέα 1-355) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR επικάλυψης επέκτασης, για να εισαχθεί μια σιωπηλή μετάλλαξη σε μία εσωτερική θέση που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση PstI. Οι εκκινητές SCDAafor, SCDAaPstI mutrev, SCDAaPstI mutfor and SCDAarev χρησιμοποιήθηκαν, για να ενισχυθεί και μεταλλαχθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SCD από το πλασμίδιο pBADSCD-GFP (Skretas and Georgiou 2010). Ύστερα, το εν λόγω γονίδιο κόπηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και PstI και με αντίδραση δεσμάσης εισήχθη στη θέση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 σε παρόμοια κομμένο pASKBR2-GFP (Link, Skretas et al. 2008). Για την κατασκευή των πλασμιδίων pASKYidC-GFP και pASKCstA-GFP τα τμήματα DNA που κωδικοποιούν τις πρωτεϊνικές χίμαιρες της μεμβρανικής πρωτεΐνης με την GFP αποκόπηκαν από το πλασμίδιο pBADYidC-GFP (Skretas and Georgiou 2010) και pBADCstA-GFP (Skretas and Georgiou 2010), αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας XbaI και HindIII και ύστερα με αντίδραση δεσμάσης συνενώθηκαν με παρόμοια κομμένο φορέα έκφρασης pASK75. Για την ενίσχυση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του βακτηρίου *E. coli* SapC, GarP (YhaU), TcyL (YecS), GsiC (YliC), ArtM, MdfA (Cmr) και MotA, χρησιμοποιήθηκαν, αντίστοιχα, οι εκκινητές SapCEcoRIfor, SapCPstIrev, YhaUEcoRIfor, YhaUPstIrev, YecSEcoRIfor, YecSPstIrev, YliCEcoRIfor, YliCPstIrev, ArtMEcoRIfor, ArtMPstIrev, MdfAEcoRIfor, MdfAPstIrev, MotAEcoRIfor και MotAPstIrev. Αυτά τα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν σε έναν τροποποιημένο pASK75 φορέα έκφρασης. Αυτός ο τροποποιημένος pASK75 φορέας έκφρασης κατασκευάστηκε με ενίσχυση με PCR του pASK75 φορέα χρησιμοποιώντας τους εκκινητές FLAGpASKEcoRIrev και GFPm2PstIfor προκειμένου να ενταχθεί μια βελτιστοποιημένη Shine-Dalgarno αλληλουχία, το κωδικόνιο έναρξης, το επίτοπο FLAG και η αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI μετά από την αλληλουχία DNA που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση XbaI. Έγινε πέψη και του προϊόντος PCR του τροποποιημένου φορέα έκφρασης pASK75-GFP και του προϊόντος PCR που κωδικοποιεί τη μεμβρανική πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI and PstI και με αντίδραση

δεσμάσης προέκυψαν τα πλασμίδια pASKSapC-GFP, pASKGarP-GFP, pASKTcyL-GFP, pASKGsiC-GFP, pASKArtM-GFP, pASKMdfA-GFP και pASKMotA-GFP. Για την κατασκευή του πλασμιδίου pASKD03-TrxA, που κωδικοποιεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη υποδοχέα νευροτενσίνης 1 παραλλαγή D03 (NTR1(D03)) και της πρωτεΐνης θειορεδοξίνης 1 (TrxA) το PCR προϊόν που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη D03-TrxA-His<sub>6</sub> ενισχύθηκε από το πλασμίδιο pBADSmRNTR1(D03) (Skretas, Makino et al. 2012) χρησιμοποιώντας τους εκκινητές D03Xbalfor και TrxAHisHindIIIrev, οι οποίοι προσάρτησαν στα άκρα του προϊόντος τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και HindIII. Μετά από την πέψη του PCR προϊόντος και του φορέα έκφρασης pASK75 με XbaI και HindIII πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμάσης και κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pASKD03-TrxA. Για την κατασκευή του πλασμιδίου pASKNTR1(D03)-GFP, το τμήμα DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη NTR1(D03) προέκυψε με πέψη του πλασμιδίου pASKD03-TrxA χρησιμοποιώντας τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και PstI και χρησιμοποιήθηκε, για να αντικαταστήσει την παρόμοια κομμένη αλληλουχία DNA του TcyL στο pASKTcyL-GFP. Τα πλασμίδια pETBR2-GFP, pETCB2-GFP, pETMotA-GFP, and pETSapC-GFP κατασκευάστηκαν με υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες BR2-GFP, CB2-GFP, MotA-GFP, και SapC-GFP από τα πλασμίδια pASKBR2-GFP, pASKCB2-GFP, pASKMotA-GFP και pASKSapC-GFP, αντίστοιχα, στο pET28a(+) χρησιμοποιώντας τα ένζυμα XbaI και HindIII. Για την κατασκευή των πλασμιδίων pASKBR2-EGFP, pASKNTR1(D03)-EGFP και pASKSapC-EGFP, η αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη EGFP ενισχύθηκε με PCR από το πλασμίδιο pETAβ-GFP (Wurth, Guimard et al. 2002) (ευγενική χορηγία του Καθηγητή Michael Hecht, Princeton University) και κλωνοποιήθηκε στη θέση του γονιδίου που κωδικοποιεί την GFPmut2 των πλασμιδίων pASKBR2-GFP, pASKNTR1(D03)-GFP, και pASKSapC-GFP, αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PstI και HindIII. Για να κατασκευαστεί το πλασμίδιο pASKKanR-BR2-GFP, αρχικά κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pASKKanR. Με PCR ενισχύθηκε η αλληλουχία που κωδικοποιεί το ένζυμο aminoglycoside 3'-phosphotransferase (KanR) από το πλασμίδιο pET28a(+). Και στα δύο άκρα του προσετάρτηθηκε η αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση BglII, η οποία βρίσκεται και εντός του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που προσδίδει ανθεκτικότητα στο



αντιβιοτικό αμπικιλίνη στο pASK75. Έτσι, με την περιοριστική ενδονουκλεάση BglI έγινε πέψη τόσο του πλασμιδίου pASK75 όσο και του προϊόντος PCR KanR και με αντίδραση δεσμάσης κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pASKKanR. Ύστερα, το BR2-GFP τμήμα αποκόπηκε από το πλασμίδιο pASKBR2-GFP με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και HindIII και συνενώθηκε με αντίδραση δεσμάσης με παρόμοια κομμένο πλασμίδιο pASKKanR.

Για την κατασκευή των πλασμιδίων pBAD33DjlA (SuptoxD), pBAD33CbpA, pBAD33DjlB, pBAD33DjlC, pBAD33RraA (SuptoxR), and pBAD33RraB, τα γονίδια *djlA*, *cbpA*, *djlB*, *djlC*, *rraA*, and *rraB* ενισχύθηκαν από το γονιδιωματικό DNA του *E. coli* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DjlAFLfor-DjlAFLrev, CbpAfor-CbpArev, DjlBfor-DjlBrev, DjlCfor-DjlCrev, RraAfor-RraArev και RraBfor-RraBrev, αντίστοιχα. Τα προϊόντα PCR περιείχαν μία βελτιστοποιημένη Shine-Dalgarno αλληλουχία και εισήχθησαν στις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και HindIII παρόμοια κομμένου πλασμιδίου pBAD33 (Guzman, Belin et al. 1995). Η ίδια βελτιστοποιημένη Shine-Dalgarno αλληλουχία εισήχθη σε όλα τα μετέπειτα pBAD33 πλασμίδια. Για την κατασκευή του pBAD33HscB, το *hscB* γονίδιο ενισχύθηκε με PCR από το γονιδιωματικό DNA του *E. coli*, καθώς μία εσωτερική αλληλουχία που αναγνωρίζει η περιοριστική ενδονουκλεάση HindIII απομακρύνθηκε με σιωπηλή μετάλλαξη με PCR επικάλυψης επέκτασης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές HscBfor, HscBrev, HscBmutfor και HscBmutrev. Το PCR προϊόν που προέκυψε κλωνοποιήθηκε στις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και HindIII του pBAD33. Το πλασμίδιο pBAD33-DnaJ κατασκευάστηκε με ενίσχυση του γονιδίου *dnaJ* από το γονιδιωματικό DNA του *E. coli* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DnaJXbaIfor-DnaJHisPstIrev και κλωνοποιώντας στις θέσεις PstI και HindIII του pBAD33. Για την κατασκευή της χίμαιρας DjlA JDnaJ, χρησιμοποιήθηκε PCR επικάλυψης επέκτασης. Αρχικά οι εκκινητές DjlAFLfor και DjlAΔJrev χρησιμοποιήθηκαν, για να ενισχυθεί το τμήμα DjlAΔJ (που κωδικοποιεί τα αμινοξέα της πρωτεΐνης DjlA 1-200) από το πλασμίδιο pBAD33DjlA και οι εκκινητές JDnaJfor και JDnaJPstIrev, για να ενισχυθεί η αλληλουχία που κωδικοποιεί την J υπομονάδα της πρωτεΐνης DnaJ, από το γονίδιο *dnaJ* (που κωδικοποιεί τα αμινοξέα 1-70 της DnaJ) από το πλασμίδιο pBAD33DnaJ. Η πλήρους μήκους αλληλουχία ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους εξωτερικούς εκκινητές DjlAFLfor και JDnaJPstIrev, η οποία

κλωνοποιήθηκε στις θέσεις XbaI και PstI του pBAD33. Η πρωτεΐνη DjIAΔTM προέκυψε αντικαθιστώντας τα πρώτα 33 αμινοξέα της DjIA με μια μεθειονίνη. Το αντίστοιχο γονίδιο ενισχύθηκε από το γονιδιωματικό DNA του *E. coli* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DjIAΔTMfor και DjIAFLrev και ύστερα κλωνοποιήθηκε στις θέσεις XbaI και PstI του pBAD33. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη DjIA-Δcentral προέκυψε με PCR επικάλυψης επέκτασης χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DjIAJΔStF-DjIAFLrev για την ενίσχυση του τμήματος DNA που κωδικοποιεί την J υπομονάδα της πρωτεΐνης DjIA (αμινοξέα 201-271) και τους εκκινητές DjIAFLfor και DjIATMΔStrev για την ενίσχυση του τμήματος DNA που κωδικοποιεί την διαμεμβρανική υπομονάδα της DjIA (αμινοξέα 1-33). Η πλήρους μήκους αλληλουχία ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τους εξωτερικούς εκκινητές DjIAFLfor-DjIAFLrev, η οποία κλωνοποιήθηκε στις θέσεις XbaI και PstI του pBAD33. Για την κατασκευή του πλασμιδίου pBAD33DjIA(H233Q), χρησιμοποιήθηκε PCR επικάλυψης επέκτασης με τους εκκινητές DjIAFLfor, DjIAFLrev, DjIAH233Qfor, και DjIAH233Qrev και το προϊόν συνενώθηκε με αντίδραση δεσμάσης στις θέσεις XbaI και HindIII του pBAD33. Το πλασμίδιο pBAD33DjIA(M16R) κατασκευάστηκε με ανάλογο τρόπο χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DjIAFLfor, DjIAFLrev, DjIAM16Rfor and DjIAM16Rrev. Για την κατασκευή του πλασμιδίου pBAD30DjIA το πλασμίδιο pBAD33DjIA επώαστηκε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XbaI και HindIII και το γονίδιο *djIA* συνενώθηκε με αντίδραση δεσμάσης με παρόμοια επωασμένο φορέα έκφρασης pBAD30. Για την κατασκευή του δισιστρονικού φορέα pBAD33DjIA-RraA (pSuptoxDR) τα γονίδια *djIA* και *rraA* ενισχύθηκαν από το γονιδίωμα του *E. coli* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DjIAFLfor-DjIAFLPstIrev και RraAPstIfor-RraArev, αντίστοιχα. Τα PCR προϊόντα που προέκυψαν περιείχαν τη βελτιστοποιημένη Shine-Dalgarno αλληλουχία. Αρχικά έγινε πέψη του γονιδίου *djIA* με τα ένζυμα XbaI και PstI και εισήχθη σε παρόμοια κομμένο pBAD33 πλασμίδιο με αποτέλεσμα να κατασκευαστεί το πλασμίδιο pBAD33DjIAPstI. Κατόπιν, έγινε πέψη του γονιδίου *rraA* με τα ένζυμα PstI και HindIII και εισήχθη σε παρόμοια κομμένο pBAD33DjIAPstI πλασμίδιο με αποτέλεσμα να παραχθεί το πλασμίδιο pSuptoxDR. Οι σωστές αλληλουχίες για όλα τα κατασκευασμένα πλασμίδια επαληθεύτηκαν με αλληλούχιση DNA.

Πίνακας 5. Πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

Πλασμίδιο	Πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται	Ανθεκτικότητα	Αφετηρία αντιγραφής (ori)	Πηγή
pBAD30BR2-KanR	FLAG-BR2-TEV-KanR	Amp <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBADBR2-GFP	FLAG-BR2-TEV-GFP-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ACYC	Skretas <i>et al.</i> (Skretas and Georgiou 2010)
pASKBR2-GFP	FLAG-BR2-TEV-GFP-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Link <i>et al.</i> (Link, Skretas <i>et al.</i> 2008)
pASKKanR-BR2-GFP	FLAG-BR2-TEV-GFP-His <sub>8</sub>	Kan <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKBR2	FLAG-BR2-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Link <i>et al.</i> (Link, Skretas <i>et al.</i> 2008)
ASKA library	All known <i>E. coli</i> proteins	Cm <sup>R</sup>	ColE1	Kitagawa <i>et al.</i> (Kitagawa,

				Ara et al. 2005)
pBAD33DjIA	DjIA-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD30DjIA	DjIA-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33RraA	RraA-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pASKCB1-GFP	FLAG-CB1-TEV- GFP-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Link et al. (Link, Skretas et al. 2008)
pASKCB2-GFP	FLAG-CB2-TEV- GFP-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Link et al. (Link, Skretas et al. 2008)
pASKNKR1-GFP	FLAG-NKR1-TEV- GFP-His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Link et al. (Link, Skretas et al. 2008)
pASKMotA-GFP	FLAG-MotA-GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία

pASKSapC-GFP	FLAG-SapC-GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKYhaU-GFP	FLAG-YhaU-GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKYecS-GFP	FLAG-YecS-GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKCstA-GFP	FLAG-CstA-TEV- GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Skretas <i>et al.</i> (Skretas, Makino <i>et al.</i> 2012)
pASKYidC-GFP	FLAG-YidC-TEV- GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKSCD-GFP	FLAG-SCD-GFP- His <sub>8</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pASKD03-TrxA	FLAG-NTR1D03- TrxA-His <sub>6</sub>	Amp <sup>R</sup>	ColE1	Παρούσα εργασία
pBAD33RraB	RraB-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DnaJ	DnaJ-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33CbpA	CbpA-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία

pBAD33HscB	HscB-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIB	DjIB-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIC	DjIC-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIA(M16R)	DjIAM16R-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIA(H233Q)	DjIAH233Q-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIAΔJ	DjIAΔJ-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIAΔcentral	DjIAΔcentral-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIAΔTM	DjIAΔTM-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία
pBAD33DjIA JDnaJ	DjIA JDnaJ-His <sub>8</sub>	Cm <sup>R</sup>	ACYC	Παρούσα εργασία

## 2.16 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η κάθε πηκτή αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτές με διαφορετική σύσταση. Η πρώτη είναι η πηκτή επιστοίβασης, στην οποία αρχικά φορτώνεται το δείγμα, ενώ ο διαχωρισμός γίνεται στην πηκτή διαχωρισμού. Οι πηκτές που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 10, 12 ή 15 % v/v σε πολυακρυλαμίδιο ανάλογα με το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Υλικά και ποσότητες για την παρασκευή της πηκτής επιστοίβασης και των πηκτών διαχωρισμού.

	Πηκτή επιστοίβασης	Πηκτή διαχωρισμού 10%	Πηκτή διαχωρισμού 12%	Πηκτή διαχωρισμού 15%
dH <sub>2</sub> O (mL)	5.4	4	3.3	2.3
acrylamide – bisacrylamide 30% (mL)	1.3	3.3	4	5
1 M Tris-HCl pH 6,8 (mL)	1	-	-	-
1.5 M M Tris- HCl pH 8,8 (mL)	-	2.5	2.5	2.5
10% SDS (w/v) (μL)	80	100	100	100
10% APS (w/v) (μL)	80	100	100	100
TEMED (μL)	8	4	4	4

Μετά την τοποθέτηση κάθε πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης γινόταν προσθήκη του διαλύματος ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris, 250 mM γλυκίνη (pH 8.3), 0.1% (w/v) SDS) στη συσκευή. Τα δείγματα πριν φορτωθούν στην πηκτή αναμιγνύονταν με διάλυμα φόρτωσης (τελική συγκέντρωση 50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 233 mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 2% (w/v) SDS, 0.1 % (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, 10% (v/v) γλυκερόλη) και θερμαίνονταν, αν ήταν σκόπιμο, στους 95 °C για 10min.

Φορτωνόταν και διάλυμα πρότυπων πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Prestained Protein Marker, Broad Range της NEB) ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών στο δείγμα. Κάθε ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 200 V σταθερά για 45 λεπτά. Ακολούθως η πηκτή μεταφέρθηκε σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου για Western Blot ανάλογα με το στόχο της ανάλυσης.

## 2.17 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot)

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην ιδιότητα των αντισωμάτων να προσδένονται σε συγκεκριμένο επίτοπο εξειδικευμένα. Αρχικά, για κάθε μεταφορά της πηκτής σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου, η πρώτη εμβαπτίζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά. Παράλληλα, η μεμβράνη τοποθετείται σε μεθανόλη για 15 δευτερόλεπτα, σε υπερκάθαρο νερό για 2 λεπτά και τέλος σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς για 15 λεπτά. Ύστερα, σε semi-dry συσκευή μεταφοράς τοποθετούνται τρία ειδικά χαρτιά εμβαπτισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, η πηκτή, η μεμβράνη και τέλος άλλα τρία ειδικά χαρτιά εμβαπτισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Η μεταφορά πραγματοποιείται στα 12V για 55 λεπτά και αφού ολοκληρωθεί, τοποθετείται και ανακινείται η μεμβράνη σε διάλυμα γάλακτος 5% σε Tris-buffered saline με 0.1% Tween-20 για μία ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε οι πρωτεΐνες του γάλακτος να προσδεθούν στην υπόλοιπη επιφάνεια της μεμβράνης και να εμποδίσουν την μετέπειτα πρόσδεση του αντισώματος στη μεμβράνη. Κατόπιν, η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές με Tris-buffered saline με 0.1% Tween-20, τοποθετείται και ανακινείται στο κατάλληλο αντίσωμα για 1h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα μονοκλωνικό αντι-πολυιστιδινικό αντίσωμα επιμύος (Sigma) σε αραιώση 1:2,500, ένα αντι-FLAG αντίσωμα επιμύος (Sigma) σε αραιώση 1:1,000, ένα αντι-GFP αντίσωμα επιμύος σε αραιώση 1:20,000 (Clontech) και ένα αντι-MBP αντίσωμα επιμύος (New England Biolabs) σε αραιώση 1:2,500, όλα συζευγμένα με υπεροξειδάση χρένου (HRP). Μετά από πεντάλεπτες πλύσεις με Tris-buffered saline με 0.1% Tween-20 τρεις φορές απλώνονται στην μεμβράνη 1mL λουμινόλη και 1mL υπεροξειδίου του υδρογόνου (SuperSignal West Pico



chemiluminescent substrate (Pierce)). Οι πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν είτε σε X-ray φιλμ είτε με τη συσκευή UVP UV Transilluminator.

### 2.18 Ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό ημιαποδιατακτικές συνθήκες πραγματοποιήθηκε όπως η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) με τη διαφορά ότι τα δείγματα πριν τη φόρτωση δεν θερμάνθηκαν στους 95 °C. Κατόπιν, ακολούθησε ανάλυση ενδοπηκτικού φθορισμού στο σύστημα UVP ChemiDoc-It2 Imaging System, το οποίο διαθέτει CCD camera και φίλτρο GFP.

### 2.19 Ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA

Κύτταρα *E. coli* MC1061 μετασχηματίστηκαν διπλά με pBAD30BR2-KanR και την βιβλιοθήκη ASKA με ηλεκτροδιάτρηση και απλώθηκαν σε μεγάλα LB αγαρ πιάτα, τα οποία περιείχαν 100 µg/mL αμπικιλίνη, 40 µg/mL χλωραμφαινικόλη, 10 µg/mL καναμυκίνη, 0.2% αραβινόζη, και διάφορες συγκεντρώσεις isopropyl-D thiogalactopyranoside (IPTG) (MP Biomedicals) (0, 0.01 or 0.1 mM). Ύστερα, τα πιάτα επωάστηκαν στους 30 °C για περίπου 2 μέρες και σε αυτό το στάδιο οι μεγάλες αποικίες καλλιεργήθηκαν για να αναλυθούν περαιτέρω.

### 2.20 Υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε υγρές καλλιέργειες

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E. coli* μετά από φρέσκο μετασχηματισμό με κατάλληλα πλασμίδια για όλα τα πειράματα υπερπαραγωγής μεμβρανικής πρωτεΐνης. Μεμονωμένες βακτηριακές αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό υγρών καλλιεργειών LB με τον κατάλληλο συνδυασμό αντιβιοτικών (100 µg/mL αμπικιλίνη, 40 µg/mL χλωραμφαινικόλη ή 50 µg/mL καναμυκίνη). Αυτές οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν με αραιώση 1:50, για να εμβολιαστούν φρέσκες LB υγρές καλλιέργειες που περιείχαν 0.01% ή 0.2% αραβινόζη (Sigma), οι οποίες αναπτύχθηκαν με ανάδευση στους 30 °C μέχρι η ΟΠ στα 600 nm (ΟΠ<sub>600</sub>) να φτάσει περίπου 0.3-0.5. Ύστερα, η θερμοκρασία μειώθηκε στους 25 °C και μετά από μια

μικρή περίοδο σταθεροποίησής της (10-20 λεπτών), έγινε επαγωγή της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών με την προσθήκη 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης (aTc) (Sigma) για περίπου 16 ώρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία (Gubellini, Verdon et al. 2011, Schlegel, Lofblom et al. 2012), η συμπεριφορά ανάπτυξης και έκφρασης των στελεχών *E. coli* ενίοτε ήταν προβληματική ειδικά χωρίς τους καταστολείς, καθώς ορισμένες φορές μεταλλαγμένα βακτηριακά κύτταρα που δεν εξέφραζαν την πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος κατάφερναν να ξεπεράσουν την ανάπτυξη των κυττάρων που την εξέφραζαν. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα οι καλλιέργειες αυτές να αναπτύσσονται υπερβολικά και τα δείγματα αυτά απορρίπτονταν.

## 2.21 Απομόνωση μεμβρανών

Απομονώθηκαν συνολικά μεμβρανικά κλάσματα από 500 mL καλλιέργειες σε LB. 150 ΟΠ<sub>600</sub> κυτταρικές μονάδες χρησιμοποιήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 10 mL κρύο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15% γλυκερόλη, 5 mM διθειοθρεϊτόλη, pH 7.5). Τα κύτταρα λύθηκαν με τη χρήση υπερήχων σε πάγο και οι αδιάλυτες σε νερό ουσίες απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση στα 10,000 x g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό που περιείχε τις μεμβράνες υπερφυγοκεντρήθηκε σε ένα ρότορα Beckman 70Ti rotor στα 42,000 rpm (130,000 x g) για 1 ώρα στους 4 °C. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και οι μεμβράνες τελικά επαναιωρήθηκαν σε 10 mL κρύου ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και ομογενοποιήθηκαν.

## 2.22 Προετοιμασία και σήμανση σφαιροπλαστών

Κύτταρα που αντιστοιχούσαν σε 3 mL καλλιέργειας με ΟΠ<sub>600</sub> ίση με 1 επαναιωρήθηκαν σε 350 μL ενός υδατικού διαλύματος που περιείχε 0.75 M σουκρόζη, 0.1 M Tris, pH 8. Το δείγμα αναμίχθηκε έντονα καθώς 700 μL από 1 mM EDTA, pH 8 προστίθενταν στάγδην, και επώαστηκε για 4 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. 35 μL από 20 mg/mL λυσοζύμη σε phosphate buffered saline προστέθηκαν και το δείγμα αναμίχθηκε με αργή περιστροφή σε περιστρεφόμενη ρόδα για 20 λεπτά. Μετά από προσθήκη 50 μL 0.5 M MgCl<sub>2</sub>, το δείγμα παρέμεινε στον

πάγο για 10 λεπτά. Τελικά, φυγοκεντρήθηκε στα 10,000 x g για 10 λεπτά στους 4 °C, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και οι σφαιροπλάστες επαναιωρήθηκαν σε 0.5 mL phosphate buffered saline. 167 µL δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10,000 x g για 10 min στους 4 °C, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και οι σφαιροπλάστες επαναιωρήθηκαν σε 200 µL α-FLAG συζευγμένο με Alexa647 (Cell Signaling Technology) σε αραιώση 1:400 σε phosphate buffered saline και περιστράφηκαν σε περιστρεφόμενη ρόδα για 3 ώρες. Ύστερα, έγινε πλύση με 500 µL phosphate buffered saline, φυγοκέντρωση σε 10,000 x g για 10 min στους 4 °C και επαναιώρηση σε 100 µL phosphate buffered saline. Τέλος, το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρθηκε σε ένα μαύρο πιάτο 96 πηγαδιών και μετρήθηκε ο φθορισμός όπως περιγράφεται παρακάτω.

### 2.23 Μετρήσεις φθορισμού σε πιάτα 96 πηγαδιών

Κύτταρα που αντιστοιχούν σε 0.25 μονάδες ΟΠ<sub>600</sub> επαναιωρήθηκαν σε 100 µL phosphate buffered saline. Το κυτταρικό αιώρημα μεταφέρθηκε σε ένα μαύρο πιάτο 96-πηγαδιών και ακολούθησε διέγερση του φθοροφόρου (488 nm για την GFP και 647 nm για το AlexaFluor 647) και μετρήθηκε ο φθορισμός (στα 510 nm για την GFP και 670 nm για το AlexaFluor 647) χρησιμοποιώντας ένα TECAN SAFIRE2 φθορισμόμετρο συμβατό με πιάτα 96 πηγαδιών.

### 2.24 Χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και Annexin V

Μετά την υπερπαραγωγή μεμβρανικής πρωτεΐνης συλλέχθηκαν 0.125 ΟΠ<sub>600</sub> μονάδες βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολούθησε πλύση με 500 µL phosphate buffered saline και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 50 µL phosphate buffered saline. Σε 4 µL από αυτά προστέθηκαν 996 µL από 1x ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης από το CF488A Annexin V and PI Apoptosis Kit (Biotium) και έγινε χρώση σε 100 µL από αυτά με 5 µL αννεξίνη V-CF488 και 1 µL ιωδιούχο προπίδιο συγκέντρωσης 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά απουσία φωτός. Μετά από αραιώση με 1x binding buffer 5 φορές μετρήθηκε ο φθορισμός των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής με την κατάλληλη αντιστάθμιση φθορισμών.

## 2.25 Προετοιμασία σφαιροπλαστών και ανάλυση πρόσδεσης προσδέτη (ligand) για τον υποδοχέα NTR1(D03)

Προετοιμάστηκαν σφαιροπλάστες όπως περιγράφηκε παραπάνω χρησιμοποιώντας το 1/3 των κυττάρων και των ποσοτήτων των διαλυμάτων. Για την προετοιμασία σφαιροπλαστών η λυσοζύμη (20 mg/mL) διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-KCl (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM KCl) αντί του phosphate buffered saline. Έγινε χρώση των σφαιροπλαστών που αντιστοιχούσαν σε  $10^7$  κύτταρα με 500 nM BODIPY-neurotensin(8-13) (Innovagen) σε 20  $\mu$ L κρύου Tris-KCl ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM KCl) για 1 ώρα με ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απουσία φωτός. Ύστερα, τα δείγματα επαναιωρήθηκαν σε 300  $\mu$ L phosphate buffered saline και ο φθορισμός τους μετρήθηκε με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας το όργανο FACSCanto II (BD Biosciences).

## 2.26 PCR στον πραγματικό χρόνο

Η υπερέκφραση μεμβρανικής πρωτεΐνης με και χωρίς συμπαράγωγή καταστολέα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω με κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί στους 30 °C και μετά από μια περίοδο επαγωγής 4 ωρών στους 25 °C. Για την απομόνωση συνολικού RNA, μία ΟΠ<sub>600</sub> μονάδα βακτηριακής καλλιέργειας αναμίχθηκε με δύο φορές τον όγκο του αντιδραστηρίου RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN). Το δείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στα 19,000 x g για 10 λεπτά. Χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin RNA (Macherey Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή τα βακτήρια λύθηκαν και εξήχθη το συνολικό RNA. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα των νουκλεϊκών οξέων μετρήθηκε με φασματοφωτομετρία. Ύστερα, έγινε πέψη του υπολειμματικού DNA καθώς τα δείγματα επώαστηκαν με δύο units TURBO DNase (Ambion). Μετά από απομάκρυνση του ενζύμου DNάση από τα δείγματα χρησιμοποιώντας το κιτ NucleoSpin RNA (Macherey Nagel), το RNA ποσοτικοποιήθηκε και 250 ng μεταγράφηκαν αντίστροφα χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση Superscript III (Invitrogen) και τυχαίους εξαμερείς εκκινητές σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πραγματοποιήθηκε PCR στον πραγματικό χρόνο με τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών

(BR2RTfor, BR200RTrev ή S1for, S1200rev) που παρουσιάζονται στον Πίνακας 2 και ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας SYBR Green I (iQ SYBR Green Supermix, Biorad) σε ένα σύστημα ανίχνευσης iQ5 Real-Time PCR (Biorad) χρησιμοποιώντας το mRNA που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S1 σαν εσωτερικό μάρτυρα για συγκριτική ποσοτική ανάλυση. Η πρωτεΐνη S1 χρησιμοποιήθηκε σαν αναφορά, καθώς έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα έκφρασής της παραμένουν σταθερά κατά την υπερπαραγωγή του γονιδίου *rraA* (Lee, Zhan et al. 2003). Όλες οι αναλύσεις έγιναν τριπλά σε αντιδράσεις των 11  $\mu$ L. Για να εξεταστεί αν το προϊόν PCR είναι ειδικό, αναλύθηκε η καμπύλη τήξης καθώς και μία μικρή ποσότητα της αντίδρασης αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης και με χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Διαδοχικές αραιώσεις συνολικού RNA προετοιμάστηκαν και ετοιμάστηκε η καμπύλη αναφοράς για κάθε σετ qPCR αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Relative Standard Curve, η οποία περιγράφεται στις τεχνικές σημειώσεις που παρέχονται από την εταιρεία Applied Biosystems.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Κατευθυνόμενη εξέλιξη *E. coli* MC1061 στελεχών για τη βελτιωμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών

Η εξέλιξη είναι μία διαρκής διαδικασία που ορίζεται ως η αλλαγή των βιολογικών πληθυσμών σε κληρονομικά χαρακτηριστικά μεταξύ διαδοχικών γενεών. Βασίζεται στις μεταλλάξεις, οι οποίες είναι μόνιμες αλλαγές στη DNA αλληλουχία που μπορούν να αναπαραχθούν πιστά και κατ' επέκταση κληρονομούνται. Η βακτηριακή δε εξέλιξη αναφέρεται στις κληρονομικές γενετικές αλλαγές που συσσωρεύει το βακτήριο κατά τη διάρκεια της ζωής του, που προκύπτουν από προσαρμογές σε απόκριση των περιβαλλοντικών αλλαγών ή του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή του. Εξαιτίας των σύντομων χρόνων αναδιπλασιασμού τους και των μεγάλων μεγεθών των πληθυσμών τους, τα βακτήρια μπορούν να εξελίσσονται ταχύτατα (Schlegel, Genevaux et al. 2016).

Για την κατασκευή στελεχών *E. coli* με βελτιωμένες ιδιότητες στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε αρχικά μια μέθοδος απομόνωσης μεταλλαγμένων στελεχών με κατευθυνόμενη εξέλιξη.

Ως μεμβρανική πρωτεΐνη – μοντέλο επιλέχθηκε ο υποδοχέας βραδυκινίνης 2 (BR2), ένας ανθρώπινος υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες G (GPCR), του οποίου η υπερέκφραση στο βακτήριο *E. coli* έχει βρεθεί να είναι πολύ τοξική παρά το γεγονός ότι συσσωρεύεται μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη (Link, Skretas et al. 2008). Ο υποδοχέας αυτός είναι πολύ σημαντικός για την ανθρώπινη παθοφυσιολογία, γεγονός που τον κάνει έναν πιθανό στόχο για την θεραπεία καρδιαγγειακών διαταραχών, του πόνου και της φλεγμονής (Camponona, Baud et al. 2007).

Για την απομόνωση μεταλλαγμένων στελεχών μετά από πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης κατασκευάστηκε το πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR, το οποίο κωδικοποιεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη BR2 με έναν επίτοπο FLAG στο N-τελικό της άκρο και το ένζυμο aminoglycoside 3'-phosphotransferase (KanR), που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη, στο C-τελικό άκρο της (Σχήμα 14A). Η πρωτεΐνη που προσδίδει

ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη στο C-τελικό άκρο του υποδοχέα ήταν απαραίτητη, για να βεβαιωθεί ότι παρουσία του αντιβιοτικού παράγεται ο πλήρους μήκους υποδοχέας, καθώς όπως έχει αναφερθεί οι περισσότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες ακολουθούν το μονοπάτι της συν-μεταφραστικής στόχευσης.

Κατ' αρχήν πραγματοποιήθηκαν πειράματα, για να εντοπιστεί η συγκέντρωση επαγωγέα (αραβινόζης) και καναμυκίνης που είναι κατάλληλη για την εκκίνηση του πειράματος κατευθυνόμενης εξέλιξης. Εντοπίστηκε η συγκέντρωση 0.0025% αραβινόζης ως η συγκέντρωση που αρχίζει να διακρίνεται η τοξικότητα (Σχήμα 14B) χωρίς όμως να φτάνει στα επίπεδα μέγιστης τοξικότητας μετά από 2 ώρες επαγωγής. Ύστερα, εντοπίστηκε η συγκέντρωση των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  καναμυκίνης (Σχήμα 14Γ) ως η συγκέντρωση στην οποία δεν επηρεάζεται η ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας παραμένει σταθερή απουσία και παρουσία αυτής της συγκέντρωσης αντιβιοτικού.

Μετά τον καθορισμό των αρχικών συγκεντρώσεων καναμυκίνης και αραβινόζης ξεκίνησαν τα πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης για την κατασκευή στελεχών του βακτηρίου *E. coli* που ανθίστανται στην τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας με προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων αραβινόζης και καναμυκίνης και μετά από 4 ώρες επαγωγής της έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-KanR καταγράφηκε η τελική ΟΠ της καλλιέργειας στα 600 nm, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 15. Παρατηρήθηκε ότι τελικά με προσθήκη 0.1% αραβινόζης και 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  καναμυκίνης η ΟΠ στα 600 nm της καλλιέργειας έφτασε την τιμή 1.5, δηλαδή διπλασιάστηκε σε σχέση με την ΟΠ στα 600 nm της αρχικής καλλιέργειας, η οποία είχε μετρηθεί μετά την υπερέκφραση της ίδιας πρωτεΐνης στις ίδιες συνθήκες από τα βακτήρια. Για απομόνωση των μεταλλαγμένων στελεχών από την τελική αυτή καλλιέργεια των πειραμάτων μεταλλαξιγένεσης απλώθηκαν τα κύτταρα σε στερεό μέσο και καλλιεργήθηκαν αποικίες, από τις οποίες προέκυψαν εξελιγμένοι βακτηριακοί κλώνοι τους οποίους ονομάζουμε εξελιγμένους (ev.).

Στο παρελθόν η καταστολή της τοξικότητας μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει αποδοθεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης λόγω μείωσης του αριθμού αντιγράφων πλασμιδίου στα κύτταρα (Massey-Gendel, Zhao et al. 2009). Για να ελεγχθεί αν η

αυξημένη ΟΠ της τελικής καλλιέργειας οφείλεται σε μειωμένη ποσότητα του πλασμιδίου στα κύτταρα, δέκα εξελιγμένες αποικίες, αλλά και μια αποικία μάρτυρας (αγρίου τύπου κύτταρα με το πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR) καλλιεργήθηκαν και απομονώθηκε το πλασμίδιο που έφεραν. Όλοι οι κλώνοι είχαν παρόμοια ποσότητα πλασμιδίου, όπως παρατηρήθηκε με ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, επομένως η αυξημένη ΟΠ της τελικής καλλιέργειας δεν οφείλεται σε μειωμένη ποσότητα του πλασμιδίου στα κύτταρα.

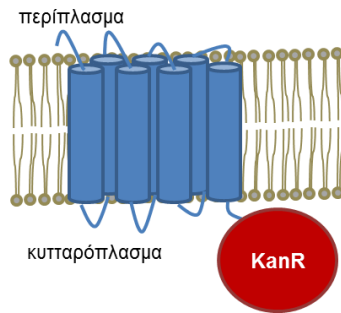
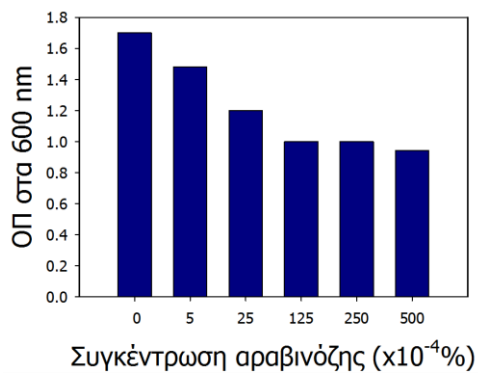
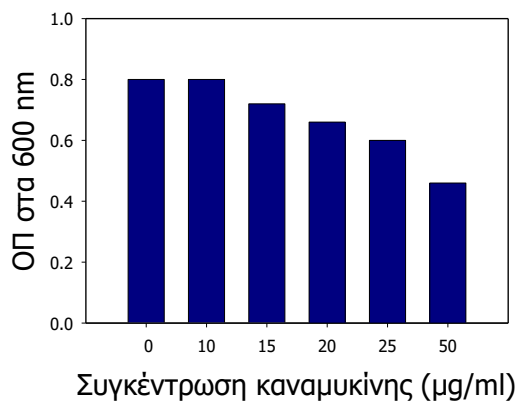
Για να διαπιστωθεί, εάν η μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις που περιείχαν οι κλώνοι που απομονώθηκαν βρίσκονταν στο πλασμίδιο ή στο γονιδίωμα των κυττάρων, αγρίου τύπου κύτταρα MC1061 μετασχηματίστηκαν με τους δέκα κλώνους pBAD33BR2-KanR που απομονώθηκαν και δοκιμάστηκε, εάν η υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2-KanR εξακολουθούσε να είναι τοξική. Για τους κλώνους 1, 4 και 7 (ev. 1, 4 και 7) εμφανίστηκε τοξικότητα, που σημαίνει ότι κάποιες μεταλλάξεις βρίσκονταν στο γονιδίωμα αυτών των κλώνων και όχι στο πλασμίδιο, όπως ήταν επιθυμητό. Επομένως, από αυτά τα εξελιγμένα στελέχη απομακρύνθηκαν τα πλασμίδια με πολλές διαδοχικές αραιώσεις σε θρεπτικό μέσο και καλλιέργεια χωρίς την παρουσία αντιβιοτικού.

Μετά την απομάκρυνση του πλασμιδίου τα κύτταρα μετασχηματίστηκαν με νέο πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR και δοκιμάστηκε εκ νέου η υπερπαραγωγή της BR2-KanR παρουσία 0.1% αραβινόζης και καναμυκίνης 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  καλλιέργειας για 3 ώρες στους 37 °C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 16A. Τα εξελιγμένα στελέχη έχουν όντως βελτιωμένη ΟΠ στα 600 nm μετά την υπερπαραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-KanR. Για να επιβεβαιωθεί ότι και η αύξηση της ανάπτυξης των κυττάρων δεν οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή πρωτεΐνης ανά κύτταρο, αλλά και ότι δεν είναι εξειδικευμένη για τον συγκεκριμένο φορέα έκφρασης pBAD33, χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος pASKBR2-GFP. Ένας απλός και γρήγορος τρόπος για την ανίχνευση της συσσώρευσης μεμβρανικής πρωτεΐνης που βρίσκεται ενσωματωμένη στη μεμβράνη είναι να υπερπαραχθεί χιμαιρική πρωτεΐνη που περιλαμβάνει την μεμβρανική πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος και την GFP και να μετρηθεί ο φθορισμός της (Σχήμα 16Γ). Έχει βρεθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του φθορισμού των κυττάρων *E. coli* που υπερεκφράζουν τέτοιες χιμαιρικές πρωτεΐνες και της ποσότητας



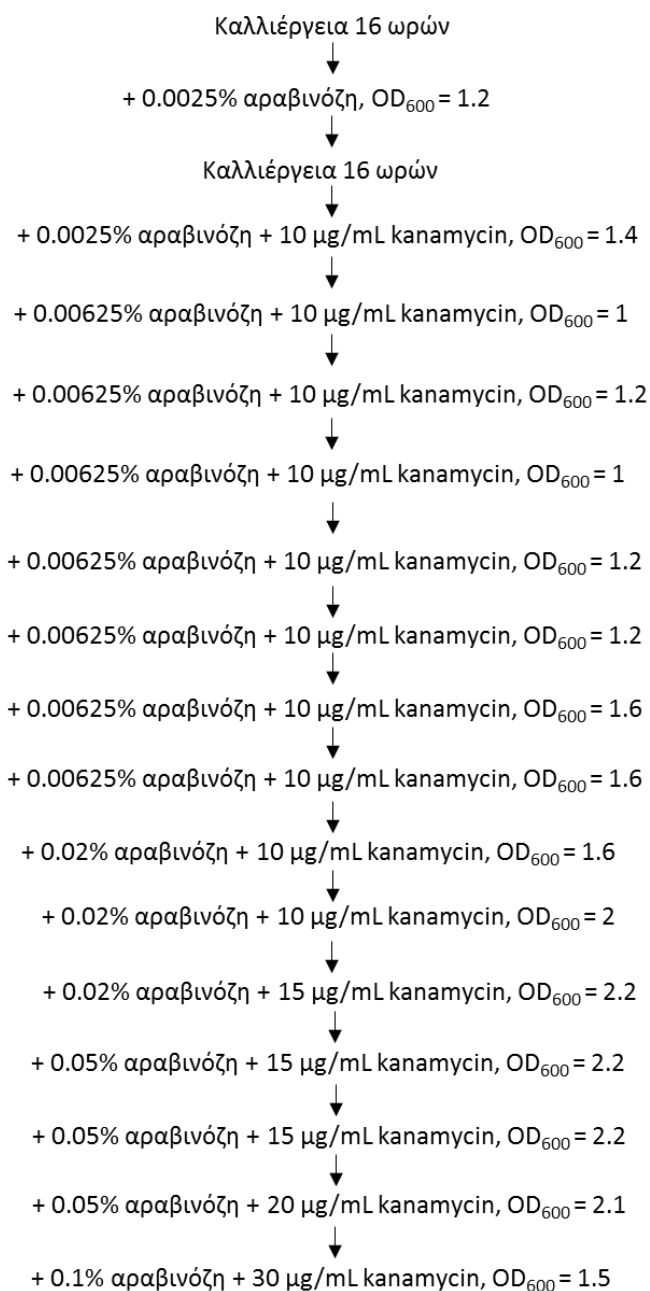
της ανασυνδυσασμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης που βρίσκεται ενσωματωμένη στη μεμβράνη (Drew, von Heijne et al. 2001, Drew, Lerch et al. 2006). Έτσι, δοκιμάστηκε η υπερπαραγωγή της BR2-GFP παρουσία 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανυδροτετρακυκλίνης για 3 ώρες στους 30 °C. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 16B και Δ. Κυρίως για τα εξελιγμένα κύτταρα για τον κλώνο 4 (εν. 4) το αποτέλεσμα είναι θετικό, καθώς υπάρχει αύξηση τόσο στην ανάπτυξη των κυττάρων όσο και στην παραγωγή πρωτεΐνης ανά κύτταρο σε σχέση με τα αγρίου τύπου MC1061 κύτταρα.

Ύστερα, για να εξεταστεί αν τα στελέχη έχουν γενική εφαρμογή ή είναι μόνο εξειδικευμένα στην υπερπαραγωγή της BR2, δοκιμάστηκαν τα στελέχη εν. 1, 4 και 7 στην υπερέκφραση μιας άλλης μεμβρανικής πρωτεΐνης, της CB1-GFP. Η αύξηση στην ΟΠ στα 600 nm, όμως, ήταν μόνο 30% σε σχέση με τα αγρίου τύπου MC1061 κύτταρα (Σχήμα 16E), διαφορά που κρίθηκε μικρή, με αποτέλεσμα να μην συνεχιστεί η αξιολόγηση των μεταλλαγμένων στελεχών.

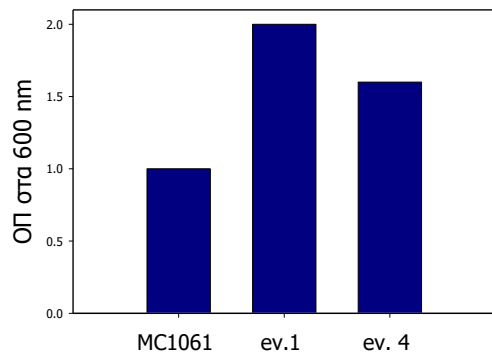
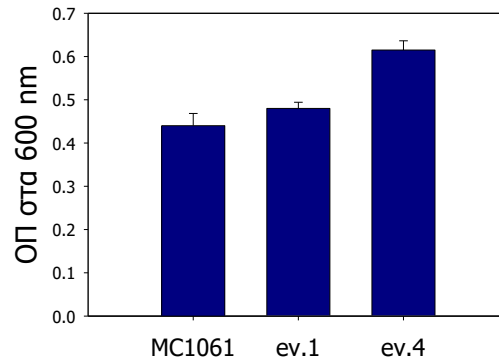
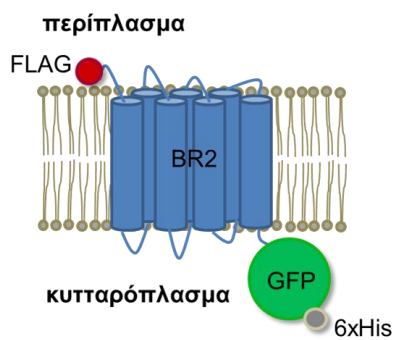
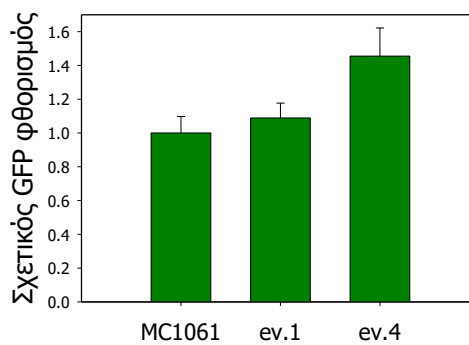
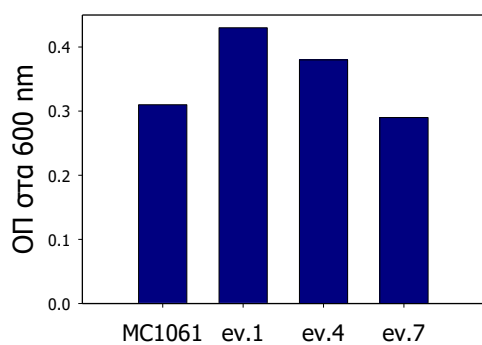
**A****B****Γ**

Σχήμα 14. Προσδιορισμός κατάλληλων συνθηκών για την κατευθυνόμενη εξέλιξη των κυττάρων MC1061 για βελτιωμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A). Σχηματική αναπαράσταση της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-KanR. Η πρωτεΐνη KanR είναι προσδεσμένη στο C-τελικό άκρο της BR2, που αναμένεται να βρίσκεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Ο επίτοπος FLAG που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της χιμαιρικής πρωτεΐνης έχει παραλειφθεί για απλοποίηση (B). Ανάπτυξη κυττάρων E.

*coli* MC1061 που υπερεκφράζουν την BR2-KanR με διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα. (Γ). Ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερεκφράζουν την BR2-KanR με 0.0025% αραβινόζη με διαφορετικές συγκεντρώσεις καναμυκίνης.



Σχήμα 15. Σχεδιάγραμμα της διαδικασίας επιλογής εξελιγμένων κυττάρων MC1061 για βελτιωμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. 15 διαδοχικές αραιώσεις σε σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις επαγωγέα (αραβινόζης) και αντιβιοτικού (καναμυκίνης) προετοιμάστηκαν, για να επιλεγθούν μεταλλαγμένοι κλώνοι κυττάρων *E. coli* MC1061 με το πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR. Για την επιλογή ο τελικός όγκος των καλλιιεργειών ήταν 5 mL και ο χρόνος επαγωγής 4 ώρες. Για τη διατήρηση του pBAD33BR2-KanR πλασμιδίου απαραίτητη ήταν η παρουσία 40 μg/mL χλωραμφαινικόλης σε όλη τη διαδικασία.

**A****B****Γ****Δ****Ε**

Σχήμα 16. Τα εξελιγμένα στελέχη ev. 1, 4 βελτιώνουν την υπερπαραγωγή της BR2 σε σχέση με τα αγρίου τύπου MC1061 κύτταρα ανεξάρτητα από το φορέα έκφρασης που χρησιμοποιείται, ενώ δεν καταστέλλουν την τοξικότητα κατά την υπερπαραγωγή του υποδοχέα CB1. (A). Ανάπτυξη κυττάρων αγρίου τύπου MC1061 και εξελιγμένων ev.1,

και 4 με το πλασμίδιο pBAD33BR2-KanR παρουσία 0.1% αραβινόζης και καναμικίνης 30 μg/mL καλλιέργειας για 3 ώρες στους 37 °C. (B). Ανάπτυξη κυττάρων αγρίου τύπου MC1061 και εξελιγμένων εν. 1, και 4 με το πλασμίδιο pASKBR2-GFP παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης για 3 ώρες στους 30 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα διπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. (Γ). Σχηματική αναπαράσταση της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP. Η πρωτεΐνη GFP είναι προσδεσμένη στο C-τελικό άκρο της BR2, που αναμένεται να βρίσκεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Οι επίτοποι FLAG and ιστοιδινών έχουν προστεθεί στο N- και C-τελικό άκρο της χιμαιρικής πρωτεΐνης, αντίστοιχα. (Δ). Φθορισμός κυττάρων *E. coli* αγρίου τύπου MC1061 και εξελιγμένων εν. 1, και 4 με το πλασμίδιο pASKBR2-GFP παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης για 3 ώρες στους 30 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα ανεξάρτητο πείραμα διπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. (E). Ανάπτυξη κυττάρων αγρίου τύπου MC1061 και εξελιγμένων εν. 1, 4 και 7 με το πλασμίδιο pASKCB1-GFP παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης για 3 ώρες στους 30 °C.

## 3.2. Εντοπισμός καταστολέων τοξικότητας παραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών

3.2.1 Γενετική ανάλυση για τον εντοπισμό παραγόντων που καταστέλλουν την κυτταροτοξικότητα που προκύπτει από την υπερπαραγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν μεμβρανικές πρωτεΐνες

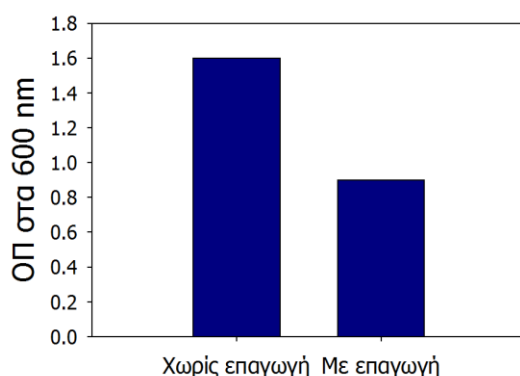
Η υπερέκφραση γονιδίων χρησιμοποιείται με ποικίλους τρόπους, καθώς σε πολλές περιπτώσεις οι συνέπειες της υπερπαραγωγής ενός γονιδίου είναι ευεργετικές. Η υπερέκφραση γονιδίων σε έναν οργανισμό μπορεί να καταστείλει ή να βελτιώσει ένα φαινότυπο προϋπάρχουσων μεταλλάξεων. Επομένως, οι φαινότυποι που προκαλούνται από την υπερέκφραση γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις τροποποίησης των βακτηρίων και αυτός είναι ένας τρόπος που επιτρέπει να προσδίδονται νέες ιδιότητες σε αυτά (Prelich 2012).

Όπως αναφέρθηκε, ο αρχικός στόχος στην παρούσα εργασία ήταν να κατασκευαστούν βακτηριακά στελέχη ικανά να αντέξουν την τοξικότητα που προκύπτει από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών και επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και κατ' επέκταση τη συσσώρευση βιομάζας. Για το σκοπό αυτό, αναζητήθηκαν μεμονωμένα γονίδια του βακτηρίου *E. coli*, η υπερέκφραση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή αυτής της κυτταροτοξικότητας. Αναλύθηκε μία βιβλιοθήκη πλασμιδίων, η βιβλιοθήκη ASKA (A Complete Set of Escherichia coli K-12 ORF Archive) (Kitagawa, Ara et al. 2005), η οποία περιλαμβάνει περίπου 4,000 πλασμίδια, όσα δηλαδή και τα γνωστά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης του *E. coli*. Κάθε πλασμίδιο περιέχει ένα διαφορετικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του *E. coli* υπό τον T5lac υποκινητή.

Όπως και στα πειράματα κατευθυνόμενης εξέλιξης ως μεμβρανική πρωτεΐνη – μοντέλο επιλέχθηκε ο υποδοχέας BR2, ο οποίος όπως αναφέρθηκε και παραπάνω είναι ένας ανθρώπινος υποδοχέας συζευγμένος με πρωτεΐνες G (GPCR), του οποίου η υπερέκφραση στο βακτήριο *E. coli* έχει βρεθεί να είναι πολύ τοξική παρά το γεγονός ότι συσσωρεύεται μόνο σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη (Link, Skretas et al. 2008). Ο υποδοχέας αυτός είναι πολύ σημαντικός για την ανθρώπινη παθοφυσιολογία, γεγονός που τον κάνει έναν πιθανό στόχο για την

θεραπεία καρδιαγγειακών διαταραχών, του πόνου και της φλεγμονής (Camrpona, Baud et al. 2007).

Αρχικά, για να εξετάσουμε το φαινότυπο της κυτταροτοξικότητας της πρωτεΐνης BR2, μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* MC1061 με το πλασμίδιο ρBAD30BR2-KanR, το οποίο κωδικοποιεί την ίδια χιμαιρική πρωτεΐνη που περιγράφηκε στο ρBAD33BR2-KanR (Παράγραφος 3.1). Το γονίδιο βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή (Πίνακας 4) και ο FLAG επίτοπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανοσοεντοπισμό και μπορεί να διευκολύνει τον πρωτεϊνικό καθαρισμό, ενώ η πρωτεΐνη KanR επιτρέπει εύκολη ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του BR2 καταγράφοντας τα επίπεδα της βακτηριακής ανάπτυξης παρουσία καναμυκίνης (Massey-Gendel, Zhao et al. 2009). Για να εξετάσουμε, αν η πρωτεΐνη BR2 έχει εμφανή φαινότυπο κυτταροτοξικότητας σε στερεό μέσο, τα κύτταρα *E. coli* MC1061 με το πλασμίδιο ρBAD30BR2-KanR επώαστηκαν σε πιάτα LB άγαρ παρουσία και απουσία αραβινόζης, του επαγωγέα της υπερέκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2. Από το μέγεθος των μετασχηματισμένων αποικιών, που μειωνόταν δραματικά παρουσία αραβινόζης στο θρεπτικό μέσο (Σχήμα 21A), ήταν φανερό η κυτταροτοξικότητα που οφείλεται στην πρωτεΐνη BR2 σε στερεό θρεπτικό υλικό ακόμη και από πλασμίδιο χαμηλού αριθμού αντιγράφων (ρBAD φορέας έκφρασης, Πίνακας 4). Ο φαινότυπος της τοξικότητας ήταν προφανής και σε υγρό θρεπτικό υλικό και ήταν ανεξάρτητος της παρουσίας της πρωτεΐνης KanR (Σχήμα 17).

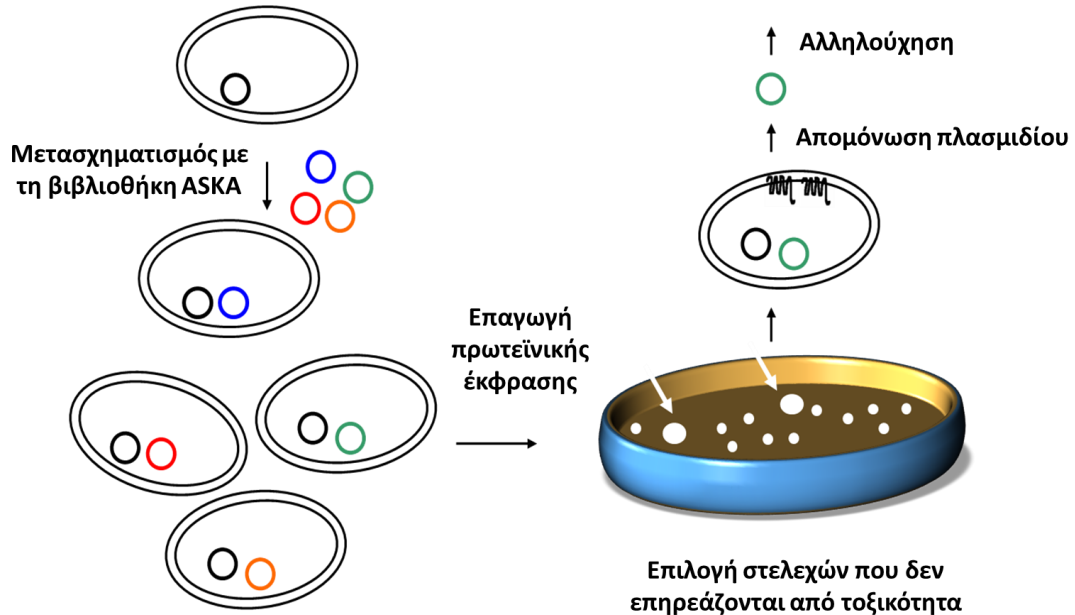


Σχήμα 17. Τοξικότητα υποδοχέα BR2. Ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* MC1061 με και χωρίς επαγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP από τον φορέα έκφρασης ρBAD33 στους 37 °C για 2 ώρες.

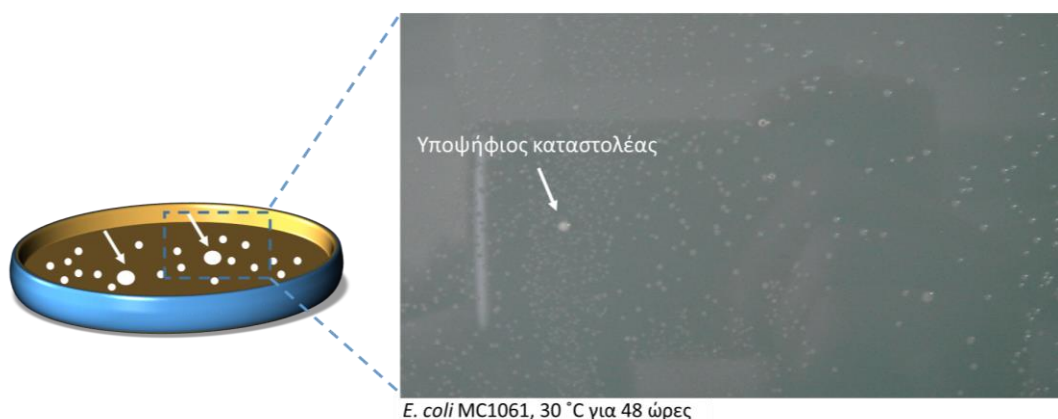
Προκειμένου να εντοπιστούν γονίδια – καταστολείς της κυτταροτοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών στη βιβλιοθήκη ASKA, επιδεικτικά *E. coli* MC1061 κύτταρα με το πλασμίδιο pBAD30BR2-KanR μετασηματίστηκαν με την εν λόγω βιβλιοθήκη. Συνολικά, 120,000 μετασηματισμένες αποικίες απλώθηκαν σε τέσσερα διαφορετικά μεγάλα πιάτα LB άγαρ που περιείχαν τα κατάλληλα αντιβιοτικά για τη διατήρηση των πλασμιδίων, επαγωγέα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης BR2 (0.2% αραβινόζη), μια χαμηλή συγκέντρωση καναμυκίνης (10 µg/mL) που εξασφάλιζε ότι ο πλήρους μήκους υποδοχέας παράγεται χωρίς να συσσωρεύονται γονιδιακές ή πλασμιδιακές μεταλλάξεις που τερματίζουν την παραγωγή πρόωρα, και, τέλος, τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις επαγωγέα για την υπερέκφραση των γονιδίων της βιβλιοθήκης ASKA (0, 0.01 και 0.1 mM IPTG), στην οποία βρίσκεται το κάθε γονίδιο κάτω από τον έλεγχο του T5lac υποκινητή. Μεταλλάξεις μπορούν να προκύψουν, καθώς τα βακτήρια εξελίσσονται και ενδεχομένως καταφέρνουν να αναπτύσσονται μετά την παράκαμψη της τοξικής για εκείνα διεργασίας. Χαμηλές προς μεσαίες συγκεντρώσεις επαγωγέα για τη βιβλιοθήκη ASKA προτιμήθηκαν καθώς έχει βρεθεί ότι υψηλού επιπέδου επαγωγή (1 mM IPTG) οδηγεί σε δραματικό περιορισμό της ανάπτυξης των κυττάρων για πάνω από τα μισά γονίδια που περιέχονται σε αυτή τη βιβλιοθήκη (Soo, Hanson-Manful et al. 2011). Μετά από επώαση για περίπου 48 ώρες στους 30 °C οι περισσότερες αποικίες που καλλιεργήθηκαν ήταν σχετικά μικρές σε διάμετρο, ενώ υπήρξαν και κάποιες που ήταν σαφώς πολύ μεγαλύτερες και στα τρία πιάτα, εμφανίζοντας πιθανώς κατεσταλμένη τοξικότητα. 140 τέτοιες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο και από τις καλλιέργειες απομονώθηκαν τα αντίστοιχα ASKA πλασμίδια. Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης της βιβλιοθήκης ASKA για τον εντοπισμό καταστολέων της τοξικότητας υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2 παρουσιάζεται στο Σχήμα 18 και φωτογραφία μέρους ενός τριβλίου μιας τέτοιας ανάλυσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 19.



*E. coli* MC1061 με πλασμίδιο που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο υποδοχέα BR2



Σχήμα 18. Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης της βιβλιοθήκης ASKA για τον εντοπισμό καταστολέων της τοξικότητας υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. Επιδεκτικά *E. coli* MC1061 κύτταρα με το πλασμίδιο ρBAD30BR2-KanR μετασηματίστηκαν με τη βιβλιοθήκη ASKA. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τριβλίο με LB παρουσία 0.2% αραβινόζης, 10 μg/mL καναμυκίνης και διαφόρων συγκεντρώσεων IPTG. Οι μεγάλες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε υγρό μέσο, το πλασμίδιο ASKA απομονώθηκε και αλληλουχήθηκε με αποτέλεσμα τον εντοπισμό των γονιδίων καταστολέων. Για απλοποίηση του σχήματος έχει παραλειφθεί η KanR.



Σχήμα 19. Ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA για καταστολείς της τοξικότητας υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης BR2. Τα κύτταρα *E. coli* MC1061 αναπτύχθηκαν στους 30 °C για 48 ώρες παρουσία 0.2% αραβινόζης, 10 μg/mL

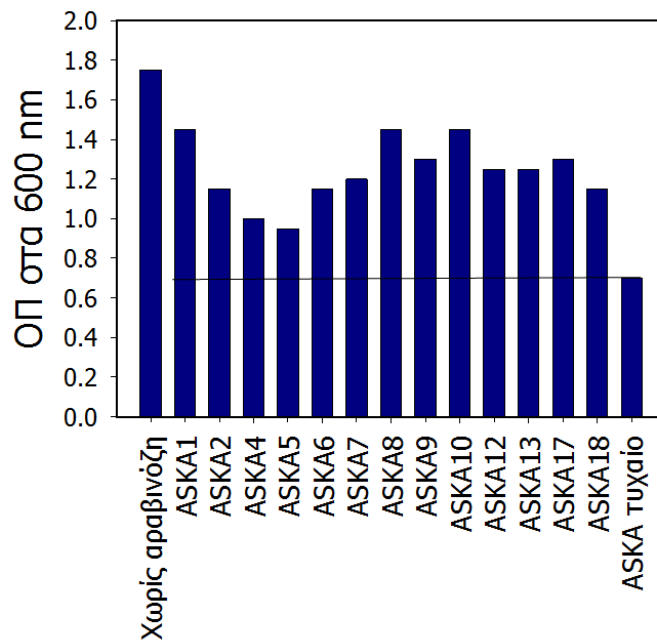
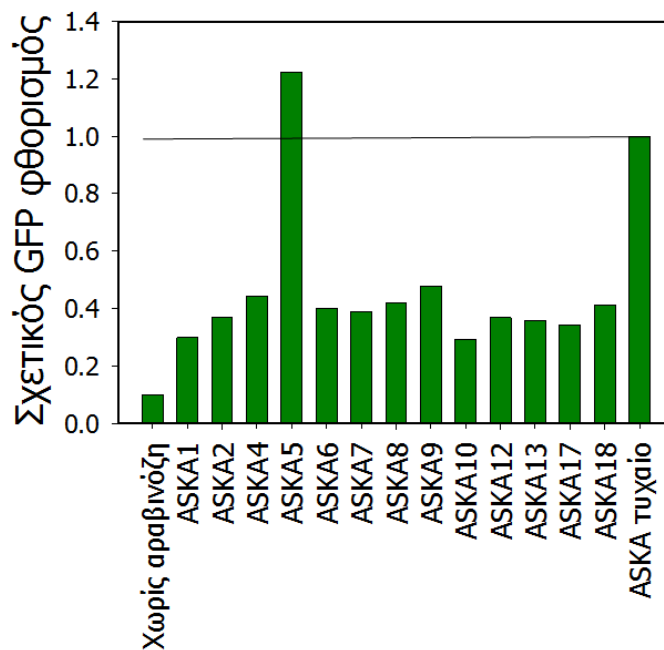
καναμυκίνης και 0.01 mM IPTG. Κάθε αποικία περιέχει ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-KanR και ένα πλασμίδιο που κωδικοποιεί έναν κλώνο της βιβλιοθήκης ASKA. Υποδεικνύεται με βέλος μία μεγάλη αποικία που περιέχει έναν υποψήφιο καταστολέα της τοξικότητας υπερπαραγωγής του υποδοχέα.

Για να επιβεβαιωθεί ότι ο παρατηρούμενος κατεσταλμένος τοξικός φαινότυπος όντως οφείλεται στα απομονωμένα ASKA πλασμίδια και όχι σε κάποια μετάλλαξη στο πλασμίδιο που κωδικοποιεί τη μεμβρανική πρωτεΐνη ή στο χρωμόσωμα των κυττάρων, MC1061 κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pBAD30BR2-KanR και τα ASKA πλασμίδια που είχαν απομονωθεί από τις εν λόγω μεγάλες αποικίες. Η ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων αξιολογήθηκε σε υγρές καλλιέργειες LB κάτω από συνθήκες, στις οποίες η υπερπαραγωγή του υποδοχέα BR2 είναι τοξική. Από τις 140 καλλιέργειες για περίπου 100 από αυτές καταγράφηκαν αυξημένες κυτταρικές πυκνότητες σε σύγκριση με τις καλλιέργειες – μάρτυρες που έφεραν τυχαία επιλεγμένα ASKA πλασμίδια (παράδειγμα για τους πρώτους 18 κλώνους παρουσιάζεται στο Σχήμα 20), δείχνοντας ότι η αυξημένη ανάπτυξη λαμβάνει χώρα όντως λόγω της παρουσίας των συγκεκριμένων ASKA πλασμιδίων που εξέφραζαν τα επιλεγμένα γονίδια.

Καθώς τα επιλεγμένα γονίδια καταστέλλουν την κυτταροτοξικότητα πιθανώς λόγω μειωμένων επιπέδων μεταγραφής ή/και μετάφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2, ήταν απαραίτητη η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα στα κύτταρα παρουσία και απουσία των υποψήφιων γονιδίων – καταστολέων. Έτσι, μετασχηματίστηκαν κύτταρα με το πλασμίδιο pBAD30BR2-GFP και με τα 100 πλασμίδια ASKA αλλά και με πλασμίδια – μάρτυρες που ήταν τυχαία επιλεγμένα από τη βιβλιοθήκη, οι πρωτεΐνες υπερπαραράχθηκαν και μετρήθηκε ο φθορισμός των κυττάρων. Από τους 100 κλώνους που δοκιμάστηκαν οι 15 επέδειξαν κυτταρικό φθορισμό, ο οποίος ήταν τουλάχιστον ίσος με αυτόν από τα κύτταρα με τα τυχαία επιλεγμένα πλασμίδια – μάρτυρες από τη βιβλιοθήκη (Σχήμα 20B). Επομένως, για αυτούς τους κλώνους η καταστολή της τοξικότητας κατά την υπερπαραγωγή του υποδοχέα δεν προκύπτει από αναστολή της υπερπαραγωγής της πρωτεΐνης BR2. Ακολούθησε DNA αλληλούχιση των ASKA πλασμιδίων για αυτούς

τους 15 κλώνους, η οποία αποκάλυψε δύο γονίδια ως πιθανούς καταστολείς της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το πρώτο ήταν το γονίδιο *djlA*, το οποίο κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη που ενεργοποιεί τη μοριακή συνοδό DnaK του *E. coli* (Clarke, Jacq et al. 1996) και το δεύτερο ήταν το *rraA*, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RraA, έναν αναστολέα της mRNA-αποδομικής ενεργότητας της ριβονουκλεάσης E του *E. coli* (Lee, Zhan et al. 2003). Το γονίδιο *djlA* αντιστοιχούσε στους 4 από τους 15 κλώνους και βρέθηκε σε τρεις ανεξάρτητες αναλύσεις με 0 και 0.01 mM συγκεντρώσεις IPTG, ενώ το γονίδιο *rraA* αντιστοιχούσε στους υπόλοιπους 11 κλώνους και βρέθηκε στην ανάλυση με 0.1 mM συγκεντρώση IPTG.

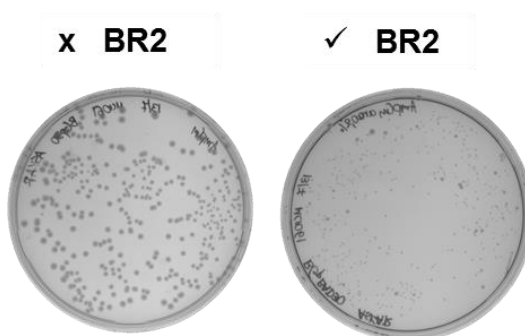
Εκτός από τις υγρές καλλιέργειες, και σε στερεό θρεπτικό μέσο η συνέκφραση των *djlA* και *rraA* με την πρωτεΐνη BR2 στο βακτήριο *E. coli* είχε ως αποτέλεσμα τη βελτιωμένη ανάπτυξη των κυττάρων καθώς επέτρεπε το σχηματισμό αποικιών με δραματικά αυξημένο μέγεθος σε σχέση με αποικίες που υπερέκφραζαν τη μεμβρανική πρωτεΐνη και ένα τυχαίο κλώνο από τη βιβλιοθήκη ASKA (Σχήμα 21B), δείχνοντας έτσι ότι αυτοί οι κλώνοι όντως αποτελούν καταστολείς της κυτταροτοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών.

**A****B**

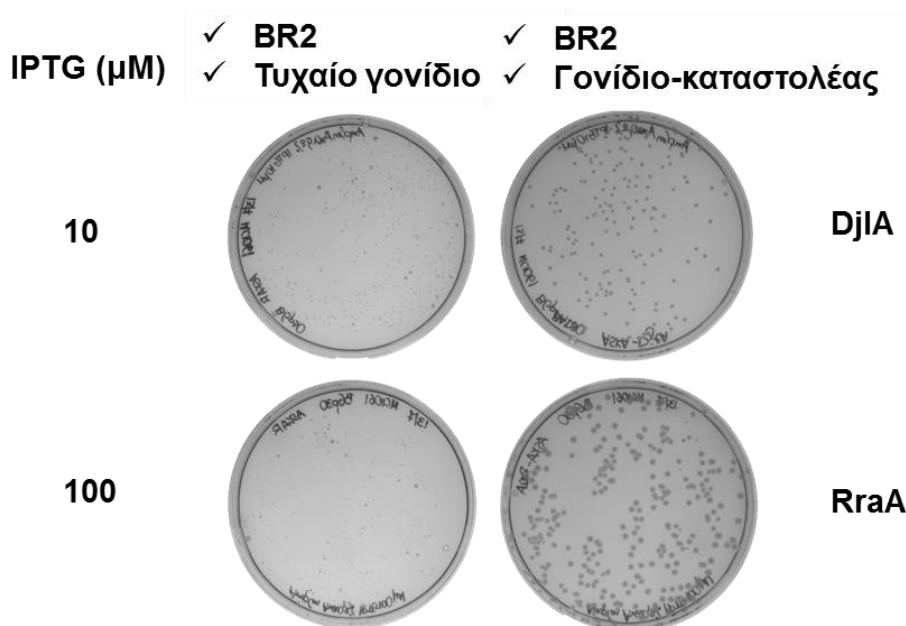
Σχήμα 20. Ανάπτυξη και επίπεδα έκφρασης κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP και τους πρώτους απομονωμένους 18 κλώνους ASKA. (A). Ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερεκφράζουν τη BR2-GFP και τους πρώτους απομονωμένους 18 ASKA κλώνους και ένα τυχαίο κλώνο ASKA. Η παραγωγή πρωτεΐνης από τις καλλιέργειες επήχθη στους 37 °C για 3 ώρες. (B). Ο φθορισμός της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP μετρήθηκε για κύτταρα *E. coli*

MC1061 που συνεκφράζουν τους πρώτους 18 κλώνους ASKA που απομονώθηκαν. Ένας από τους κλώνους που δοκιμάστηκε (ASKA5) επέδειξε φθορισμό της BR2-GFP που ήταν τουλάχιστον ίσος με αυτόν που επέδειξαν κύτταρα που συνέκφραζαν τον τυχαίο κλώνο ASKA.

**A.**



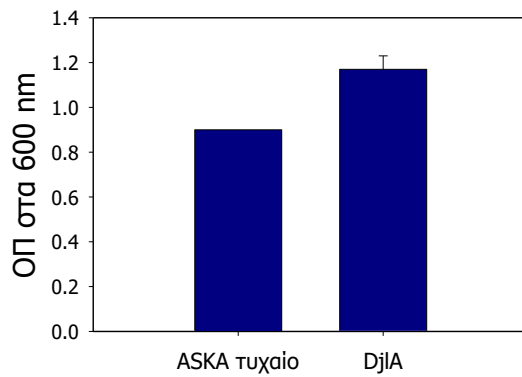
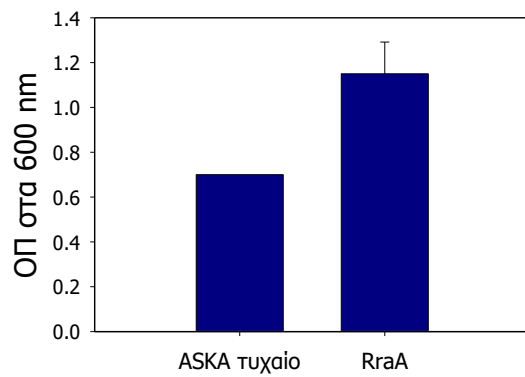
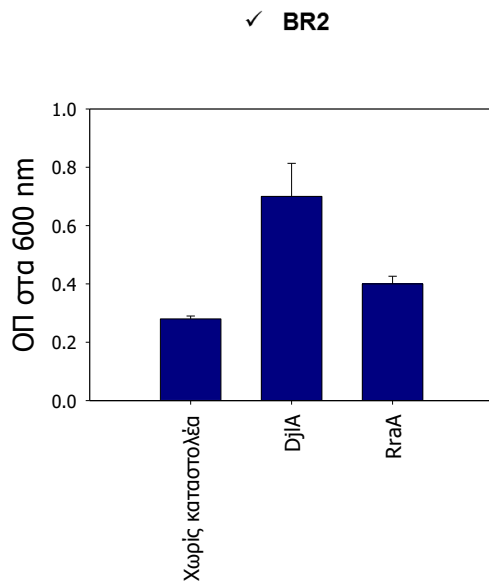
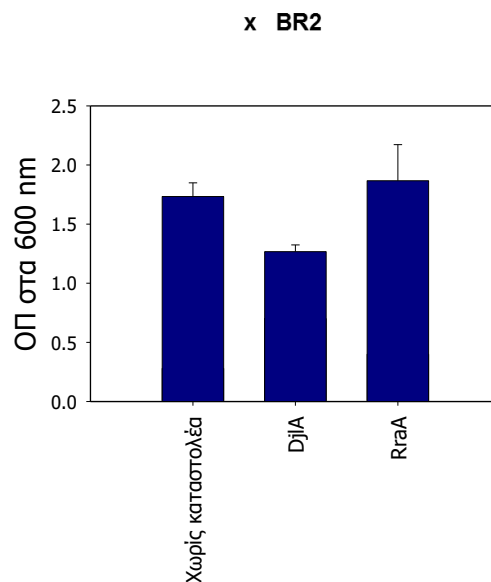
**B.**



Σχήμα 21. Η συνέκφραση των γονιδίων *djIA* και *rraA* καταστέλει την τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2. (A). *E. coli* MC1061 κύτταρα με το πλασμίδιο pBAD30BR2-GFP ανεπτυγμένα σε τριβλία LB άγαρ χωρίς (αριστερά) και με (δεξιά) 0.2 % αραβινόζη, που επάγει την υπερπαραγωγή BR2-GFP. Το ιδιαίτερα μειωμένο μέγεθος των βακτηριακών αποικιών ανεπτυγμένων παρουσία αραβινόζης δείχνει τη δριμυία τοξικότητα που προκαλείται από την υπερέκφραση της BR2. (B). *E. coli* MC1061 κύτταρα που υπερεκφράζουν την BR2-GFP όπως παραπάνω, ενώ ταυτόχρονα συνεκφράζουν τα γονίδια *djIA*, *rraA*, ή ένα τυχαία επιλεγμένο γονίδιο από τη βιβλιοθήκη ASKA, το γονίδιο *yghS*. Το ιδιαίτερα βελτιωμένο μέγεθος των αποικιών των βακτηριακών κλώνων που συνεκφράζουν τα γονίδια *djIA* και *rraA* δείχνει ότι η τοξικότητα υπερπαραγωγής της BR2 καταστέλλεται. Μετά από το

μετασχηματισμό των βακτηρίων με τα κατάλληλα πλασμίδια, τα τριβλία επώαστηκαν στους 25 °C για 3 μέρες.

Σε υγρές καλλιέργειες η υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2 και η συνέκφραση των *djlA* και *rraA* είχαν ως αποτέλεσμα 30 με 50% αύξηση στην τελική ΟΠ της καλλιέργειας στις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν (Σχήμα 22Α και Β). Ιδιαίτερης σημασίας ήταν το γεγονός ότι η επίδραση της συνέκφρασης των γονιδίων *djlA* και *rraA* στην τοξικότητα της υπερέκφρασης του υποδοχέα βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη της επιλογής υποκινητή και πλασμιδίου που χρησιμοποιούνται για την υπερπαραγωγή των BR2, DjlA και RraA. Συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 τοποθετήθηκε κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή Tet στον φορέα έκφρασης με αντίγραφα υψηλού αριθμού pASK75 (Πίνακας 4) και τα γονίδια *djlA* και *rraA* τοποθετήθηκαν κάτω από τον έλεγχο του *araBAD* υποκινητή στον φορέα έκφρασης με αντίγραφα χαμηλού αριθμού pBAD33 (Guzman, Belin et al. 1995). Με αυτά τα πλασμίδια παρατηρήθηκε μια πολύ μεγάλη αύξηση περίπου 150 και 50% στην τελική κυτταρική πυκνότητα κατά την συνέκφραση του γονιδίου *djlA* και *rraA*, αντίστοιχα, στους 25 °C για 16 ώρες (Σχήμα 22Γ). Ονομάζουμε τα στελέχη *E. coli* που συνεκφράζουν τα γονίδια *djlA* ή *rraA* *E. coli* SuptoxD και SuptoxR, αντίστοιχα.

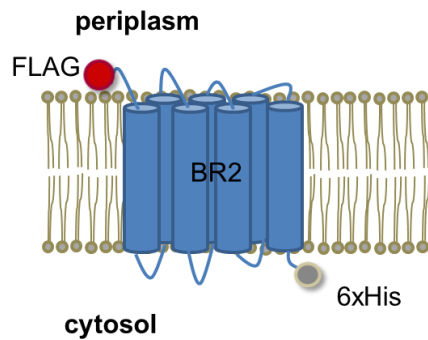
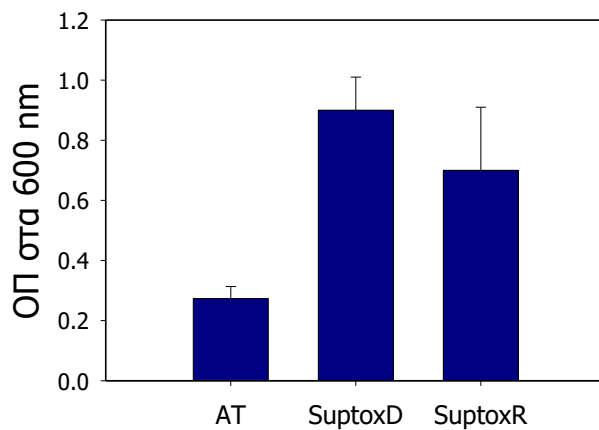
**A****B****Γ****Δ**

Σχήμα 22. Η ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης του *djlA* και του *rraA* στην ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερεκφράζουν τη χημειοκίνητη πρωτεΐνη BR2-GFP σε LB καλλιέργειες. Η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* ή *rraA* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση κατά περίπου 30 (A) ή 50 (B) % στην τελική πυκνότητα της καλλιέργειας, αντίστοιχα, για LB καλλιέργειες με ανάπτυξη και επαγωγή των πλασμιδίων pBAD30BR2-GFP και ASKA-DjIA ή ASKA-RraA και ASKA τυχαίο στους 37 °C. Η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* ή *rraA* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση κατά περίπου 150 ή 50 (Γ) % στην τελική πυκνότητα της καλλιέργειας, αντίστοιχα, για LB καλλιέργειες με ανάπτυξη στους 30 °C και επαγωγή των πλασμιδίων pASKBR2-GFP και pBAD33DjIA ή pBAD33RraA και pBAD33 στους 25 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Η υπερπαραγωγή των γονιδίων *djlA* ή *rraA* δεν ευνοεί γενικά την ανάπτυξη αγρίου-τύπου (AT) κυττάρων *E. coli*. Επομένως, οι βελτιωμένοι παρατηρούμενοι φαινότυποι δεν οφείλονται σε μια γενική επίδραση της υπερέκφρασης των γονιδίων *djlA* ή *rraA*. Αντίθετα, υπερέκφραση του γονιδίου *djlA*, που είναι μεμβρανική πρωτεΐνη όπως αναφέρθηκε, έχει βρεθεί να είναι τοξική για το *E. coli* όταν επάγεται με μεγάλη ποσότητα επαγωγέα (Clarke, Jacq et al. 1996, Kelley and Georgopoulos 1997), ένα φαινόμενο που και στη δική μας περίπτωση παρατηρήθηκε σε κάποιο βαθμό (Σχήμα 22Δ).

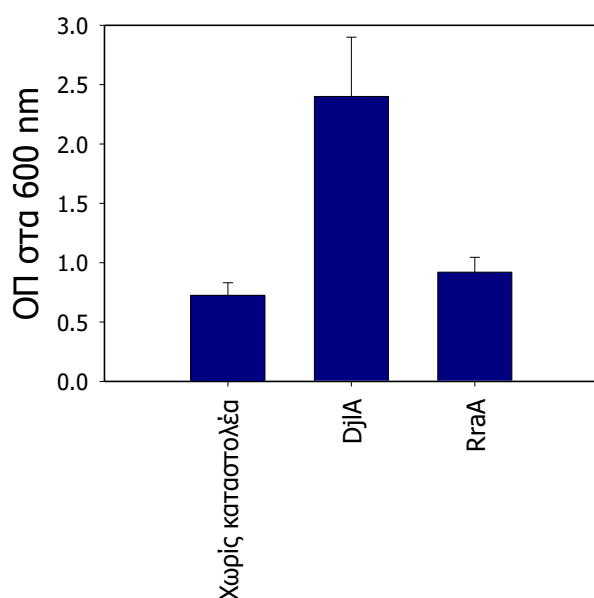
Επιπλέον, με την αντικατάσταση της πρωτεΐνης GFP στη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP από τον επίτοπο ιστιδίνης (Σχήμα 23Α) και την παραγωγή του κλώνου με συμπαραγωγή των *djlA* και *rraA* έγινε σαφές ότι η παρατηρούμενη καταστολή της τοξικότητας λαμβάνει χώρα ανεξάρτητα από την παρουσία πρωτεϊνών στο C-τελικό άκρο της BR2, καθώς οι βελτιώσεις των τελικών κυτταρικών πυκνοτήτων ήταν παρεμφερείς παρουσία και απουσία της GFP και της KanR (Σχήμα 23Β).



**A****B**

Σχήμα 23. Η βελτιωμένη ανάπτυξη των κυττάρων SuptoxD και SuptoxR σε σχέση με τα κύτταρα *E. coli* MC1061 κατά την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2 σε LB καλλιέργειες. (Α). Σχηματική αναπαράσταση της χμαιρικής πρωτεΐνης BR2. Η πρωτεΐνη GFP είναι προσδεδεμένη στο C-τελικό άκρο της BR2, που αναμένεται να βρίσκεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Οι επίτοποι FLAG and ιστιδινών έχουν προστεθεί στο N και C τελικό άκρο της χμαιρικής πρωτεΐνης, αντίστοιχα. (Β). Η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* (SuptoxD) ή *rraA* (SuptoxR) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην τελική πυκνότητα της καλλιέργειας, αντίστοιχα, για LB καλλιέργειες με ανάπτυξη στους 30 °C και επαγωγή των πλασμιδίων pASKBR2 και pBAD33DjIA ή pBAD33RraA και pBAD33 στους 25 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Τέλος, η καταστολή της τοξικότητας υπερπαραγωγής της BR2 από την συνέκφραση των *djlA* και *rraA* βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη και από το στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται ως ξενιστής για την υπερπαραγωγή της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Και οι δύο παράγοντες βρέθηκαν να λειτουργούν ως καταστολείς της κυτταροτοξικότητας στα στελέχη MC1061 (Σχήμα 22Γ), BW25113 (*E. coli* K-12 στελέχη) (Σχήμα 39 για *djlA*) και BL21(DE3), που είναι *E. coli* B στέλεχος (Σχήμα 24).

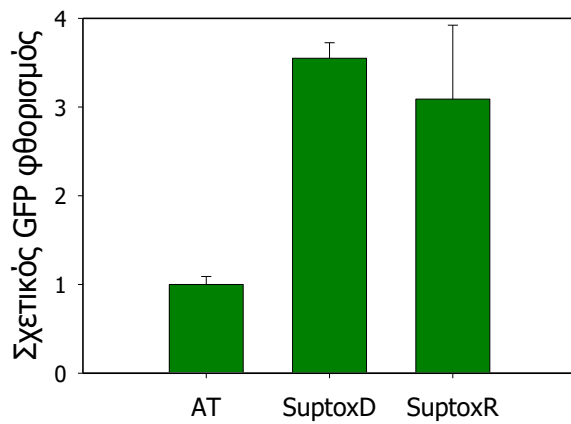
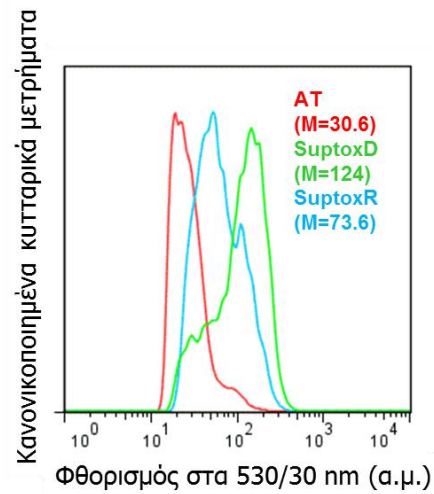
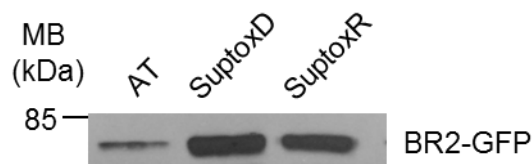
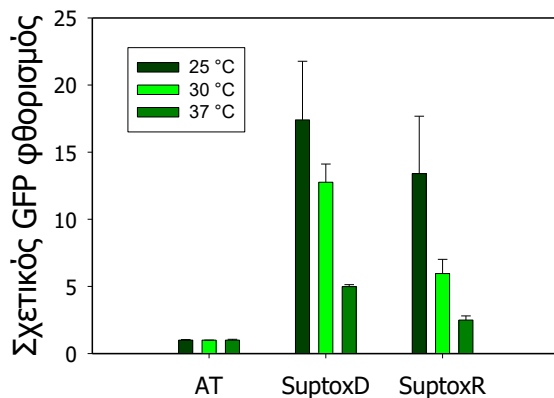


Σχήμα 24. Η ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης της *DjlA* και της *RraA* στην ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* BL21(DE3) που υπερεκφράζουν τη χημειοκίνητη πρωτεΐνη BR2-GFP σε LB καλλιέργειες. Η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* ή *rraA* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση στην τελική πυκνότητα της καλλιέργειας, για LB καλλιέργειες με ανάπτυξη στους 30 °C και επαγωγή των πλασμιδίων pASKBR2-GFP και pBAD33DjlA ή pBAD33RraA και pBAD33 στους 25 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

3.2.2. Στα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR* αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης BR2 σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη με τη σωστή N<sup>out</sup>-C<sup>in</sup> τοπολογία σε σχέση με τα AT κύτταρα

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε σχέση με τα AT κύτταρα στα *SuptoxD* και *SuptoxR* υπάρχει επίσης δραματική αύξηση στο φθορισμό ανά κύτταρο *E. coli* που υπερπαραγάγει την πρωτεΐνη BR2-GFP, κατ' επέκταση και στην ποσότητα του υποδοχέα ενσωματωμένου στη μεμβράνη (Σχήμα 25A και B), παρόλο που οι δύο καταστολείς δεν επιλέχθηκαν άμεσα με κριτήριο να βελτιώνουν την ικανότητα κάθε βακτηριακού κυττάρου να παράγει τον υποδοχέα.

Για να εξεταστεί αυτή η ιδιότητα των καταστολέων περαιτέρω, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση ανοσοαποτυπώματος. Για αυτό το σκοπό, AT, *SuptoxD* και *SuptoxR* κύτταρα που υπερέκφραζαν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP λύθηκαν και συλλέχθηκε το υδατοδιαλυτό κλάσμα τους. Ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτυπώματος που επιβεβαίωσε το αποτέλεσμα των μετρήσεων φθορισμού, δηλαδή ότι η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* ή *rraA* έχει ως αποτέλεσμα μεγάλη αύξηση στα επίπεδα έκφρασης BR2-GFP ανά κύτταρο (Σχήμα 25Γ). Ενδιαφέρον είναι ότι η υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών στα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR* δεν είναι βελτιωμένη μόνο όταν η υπερέκφραση λαμβάνει χώρα στους 25 °C, αλλά και στους 30 και 37 °C με πιο μέτριες, όμως, αυξήσεις για τις συγκεκριμένες τουλάχιστον συνθήκες έκφρασης (Σχήμα 25Δ).

**A****B****Γ****Δ**

Σχήμα 25. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR συσσωρεύουν βελτιωμένα επίπεδα του υποδοχέα BR2 ενσωματωμένου στη μεμβράνη. Ο φθορισμός κυττάρων *E. coli* MC1061 με τα πλασμίδια pASKBR2-GFP και pBAD33, pBAD33DjlA, ή pBAD33RraA παρουσία 0.01 % αραβινόζης για τα pBAD33 και pBAD33DjlA και 0.2% αραβινόζης για το pBAD33RraA παρουσία και απουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης. (A). Μετρήσεις κυτταρικού φθορισμού σε φθορισμόμετρο συμβατό με πιάτα 96-πηγαδιών μετά από επαγωγή 16 ωρών στους 25 °C. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν σε ίδιο

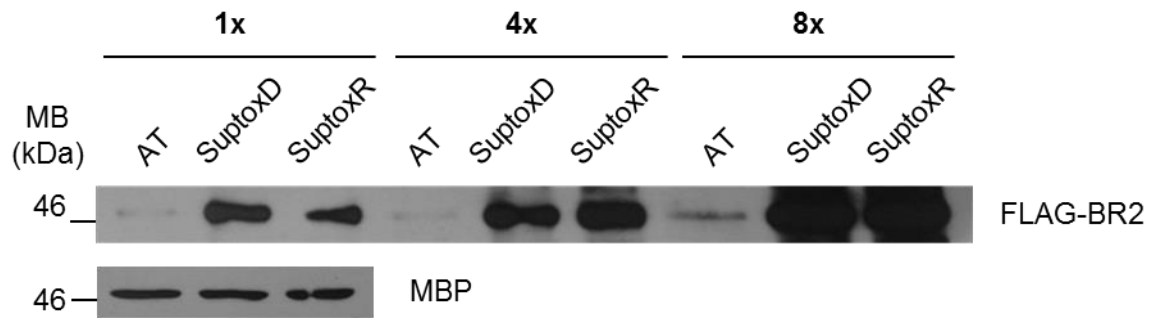
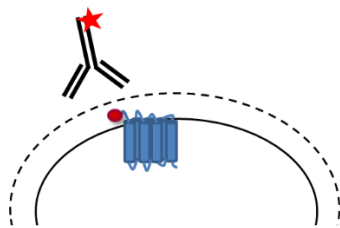
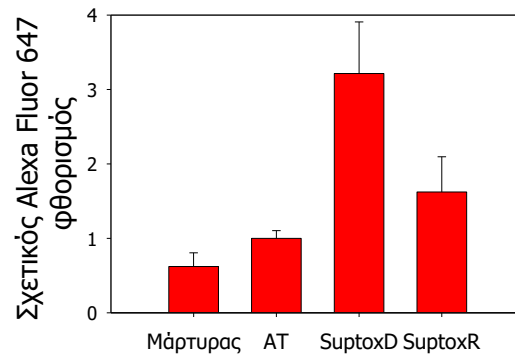
αριθμό κυττάρων. Οι αναφερόμενες τιμές φθορισμού αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα την τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. (B). Επίπεδα μεμονωμένου κυτταρικού φθορισμού όπως μετρήθηκαν από την κυτταρομετρία ροής μετά από επαγωγή για 4 ώρες στους 25 °C. (Γ). SDS-PAGE ανάλυση/ ανάλυση ανοσοαποτυπώματος στο υδατοδιαλυτό κλάσμα λυμένων *E. coli* MC1061 κυττάρων που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP με ή χωρίς συνέκφραση των *djlA* ή *rraA* χρησιμοποιώντας ένα αντι-GFP αντίσωμα. Κανονικοποιημένα κύτταρα σύμφωνα με την ΟΠ των καλλιιεργειών στα 600 nm. (Δ). Σύγκριση φθορισμού των κυττάρων *E. coli* MC1061 (AT), SuptoxD και SuptoxR μετά την υπερπαραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης BR2-GFP στους 25 °C για 16 ώρες, 30 °C για 3 ώρες και 37 °C για 2 ώρες. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν σε κύτταρα που προέρχονται από ίσο όγκο βακτηριακών καλλιιεργειών για το κάθε στέλεχος. Σε όλες τις μετρήσεις του σχετικού φθορισμού, ο φθορισμός των κυττάρων MC1061 που υπερπαραγωγή την BR2-GFP τέθηκε αυθαίρετα στη μονάδα. Σε όλα τα πάνελ, διεξήχθησαν τριπλά πειράματα και τα σφάλματα αναπαριστούν μια τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Προκειμένου να εξεταστεί, εάν τα γονίδια *djlA* και *rraA* βελτιώνουν τη συσσώρευση της πρωτεΐνης BR2 σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη στη βακτηριακή μεμβράνη, κύτταρα *E. coli* μετασχηματίστηκαν διπλά με το πλασμίδιο pASKBR2, το οποίο κωδικοποιεί τον υποδοχέα BR2 με έναν επίτοπο FLAG στο N-τελικό άκρο του και έναν επίτοπο 6xHis στο C-τελικό άκρο του (Σχήμα 23A), και με καθένα από τα πλασμίδια pBAD33, pBAD33DjlA ή pBAD33RraA. Κατόπιν, έγινε επαγωγή της παραγωγής πρωτεΐνης και από τα δύο πλασμίδια, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Παρά την απουσία της πρωτεΐνης GFP η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* ή *rraA* κατέστειλε την τοξικότητα που προκύπτει από την υπερπαραγωγή του υποδοχέα (Σχήμα 23B). Έπειτα, τα κύτταρα λύθηκαν, απομονώθηκαν οι μεμβράνες τους και χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανοσοαποτυπώματος με anti-FLAG αντίσωμα. Η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* ή *rraA* αύξησε δραματικά την ποσότητα της BR2 ανά κύτταρο σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη (Σχήμα 26A).

Οι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G έχουν χαρακτηριστική N<sup>out</sup>-C<sup>in</sup> τοπολογία (Wistrand, Kall et al. 2006). Για να εξεταστεί, αν η πρωτεΐνη BR2 ενσωματώνεται στη μεμβράνη με τη σωστή N<sup>out</sup>-C<sup>in</sup> τοπολογία, κύτταρα *E. coli* μετασχηματίστηκαν διπλά με το πλασμίδιο pASKBR2 και καθένα από τα πλασμίδια

pBAD33, pBAD33DjIA ή pBAD33RraA και έγινε επαγωγή της παραγωγής πρωτεϊνών. Για να απομακρυνθεί η εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων, υπέστησαν ωσμωτικό σοκ και επώαστηκαν με ένα διάλυμα λυσοζύμης σε κατάλληλη συγκέντρωση που δεν οδηγεί στη λύση τους. Οι σφαιροπλάστες που προέκυψαν επώαστηκαν με anti-FLAG αντίσωμα συζευγμένο με το φθοροφόρο Alexa Fluor 647 (Σχήμα 26B) και ο φθορισμός τους μετρήθηκε. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26Γ ο κόκκινος φθορισμός βελτιώθηκε σημαντικά όταν τα γονίδια *djIA* ή *rraA* συνεκφράστηκαν, δείχνοντας ότι περισσότερη πρωτεΐνη BR2 με τη σωστή N<sup>out</sup> τοπολογία συσσωρεύεται κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Για να εξεταστεί αν η παραγόμενη πρωτεΐνη BR2 παρουσιάζει τη σωστή C<sup>in</sup> τοπολογία, χρησιμοποιήθηκε η χμιαϊκή πρωτεΐνη BR2-GFP. Οι χμιαϊκές πρωτεΐνες που αποτελούνται από μεμβρανικές πρωτεΐνες και GFP έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς, για να μελετηθεί η τοπολογία τους (Drew, Sjostrand et al. 2002, Daley, Rapp et al. 2005). Καθώς η πρωτεΐνη GFP δεν μπορεί να αναδιπλωθεί σωστά στο βακτηριακό περίπλασμα και παραμένει μη φθορίζουσα (Dinh and Bernhardt 2011), τα κύτταρα *E. coli* που υπερεκφράζουν χμιαϊκές πρωτεΐνες μεμβρανικών πρωτεϊνών με GFP και φθορίζουν διατηρούν το C-τελικό άκρο της μεμβρανικής πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα. Εάν δεν υπάρχει φθορισμός, το C τελικό άκρο της μεμβρανικής πρωτεΐνης βρίσκεται στο βακτηριακό περίπλασμα. Όπως αναφέρθηκε, η χμιαϊκή πρωτεΐνη BR2-GFP είναι φθορίζουσα. Επομένως, το C τελικό άκρο της βρίσκεται, όπως προβλέπεται, στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, εφόσον με την αύξηση της ποσότητας της χμιαϊκής πρωτεΐνης κατά την συμπαραγωγή των *djIA* και *rraA* υπάρχει αύξηση του φθορισμού και η επιπλέον παραγόμενη πρωτεΐνη BR2 έχει την κατάλληλη τοπολογία (Σχήμα 25A και B).

**A****B****Γ**

Σχήμα 26. Στα κύτταρα SuptoxD ή SuptoxR αυξάνεται δραματικά σε σχέση με τα αγρίου τύπου κύτταρα η ποσότητα του BR2 ανά κύτταρο σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη με τη σωστή  $N^{out}$  τοπολογία. (A). SDS-PAGE ανάλυση/ ανάλυση ανοσοαποτυπώματος σε απομονωμένες συνολικές μεμβράνες κυττάρων *E. coli* MC1061 ή SuptoxD ή SuptoxR που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη FLAG-BR2 χρησιμοποιώντας ένα αντι-FLAG αντίσωμα (πάνω). Για κάθε δείγμα οι συνολικές μεμβράνες προετοιμάστηκαν από λυμένα κύτταρα που αντιστοιχούσαν σε ίσο αριθμό κυττάρων, το οποίο επαληθεύτηκε χρησιμοποιώντας ένα αντι-MBP αντίσωμα (κάτω). (B). Ο φθορισμός σφαιροπλαστών από *E. coli* MC1061 ή SuptoxD ή SuptoxR κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη FLAG-BR2 και επώαση με ένα Alexa647-συζευγμένο αντι-FLAG αντίσωμα. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν σφαιροπλάστες βακτηριακών κυττάρων που υπερεκφράζουν μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με τον επίτοπο FLAG στο N τελικό της άκρο (την υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA της ανθρώπινης πρωτεΐνης p53). Οι μετρήσεις αντιστοιχούν σε ίσο αριθμό κυττάρων σε κάθε δείγμα. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι στα *SuptoxD* και *SuptoxR* υπάρχει σαφώς βελτίωση της ποσότητας της πρωτεΐνης BR2 σε μορφή σωστά ενσωματωμένη στη μεμβράνη στο βακτηριακό κύτταρο.

3.2.3. Τα γονίδια *djlA* και *rraA* είναι γενικοί καταστολείς της κυτταροτοξικότητας που προκύπτει από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών και επομένως στα *SuptoxD* και *SuptoxR* βελτιώνεται ευρέως η ανασυνδυασμένη υπερέκφραση ενός σημαντικού αριθμού μεμβρανικών πρωτεϊνών

Για να εξεταστεί αν στα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR* οι ιδιότητες να καταστέλεται η κυτταροτοξικότητα και να βελτιώνεται η παραγωγικότητα ανά κύτταρο είναι ειδικές για την υπερέκφραση της BR2 ή γενικές και μπορούν να εφαρμοστούν και σε άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες, εξετάστηκε η επίδραση της συνέκφρασης των γονιδίων *djlA* (*SuptoxD*) ή *rraA* (*SuptoxR*) στη βακτηριακή παραγωγή και άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών βακτηριακής ή ευκαρυωτικής προέλευσης. Οι μεμβρανικές αυτές πρωτεΐνες είχαν διαφορετικά μεγέθη, αριθμούς διαμεμβρανικών ελίκων, τοπολογίες και βιοχημικές ιδιότητες (Πίνακας 7). Όλες οι πρωτεΐνες είχαν το C τελικό άκρο στο κυτταρόπλασμα και επομένως ήταν δυνατή η κατασκευή φθορίζουσων χιμαιρικών πρωτεϊνών με την πρωτεΐνη GFP σε αυτό το άκρο. Αρχικά δοκιμάστηκαν δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες και οι δύο ήταν υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G, οι NKR1 και CB2 (Πίνακας 7). Βρέθηκε ότι στα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR* καταστέλλεται η κυτταροτοξικότητα παραγωγής των δύο αυτών μεμβρανικών πρωτεϊνών ή/και αυξάνεται η παραγωγικότητα ανά κύτταρο σε σχέση με τα αγρίου τύπου MC1061 κύτταρα (Σχήμα 27A). Η συνολική συσσώρευση μεμβρανικής πρωτεΐνης ανιχνεύτηκε με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος τόσο στο υδατοδιαλυτό κλάσμα των κυττάρων όσο και στις συνολικές απομονωμένες μεμβράνες των κυττάρων χρησιμοποιώντας τον FLAG επίτοπο που βρίσκεται στο N-τελικό άκρο της χιμαιρικής πρωτεΐνης ή την πρωτεΐνη GFP που βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Βρέθηκε ότι, όπως ήταν αναμενόμενο από τα προαναφερθέντα αποτελέσματα (Σχήμα 27A), η συνολική συσσώρευση μεμβρανικής πρωτεΐνης για τις NKR1 και CB2 ήταν αυξημένη στην περίπτωση των *SuptoxD* και *SuptoxR* σε σχέση με τα AT κύτταρα MC1061 (Σχήμα 27B).



Κατόπιν, για όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που αναφέρει ο Πίνακας 7 η συνολική συσσώρευση μεμβρανικής πρωτεΐνης που οφείλεται τόσο σε καταστολή της τοξικότητας και επομένως αύξηση του αριθμού των κυττάρων ανά μονάδα όγκου όσο και σε αύξηση της ποσότητας της υπερπαραγόμενης πρωτεΐνης ανά κύτταρο ανιχνεύτηκε με μέτρηση του φθορισμού ίσων όγκων καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27Γ η παραγωγή στα SurtoxD ή SurtoxR είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη συνολική απόδοση για όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που δοκιμάστηκαν. Έπομένως, τα SurtoxD και SurtoxR είναι στελέχη που βελτιώνουν σημαντικά την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών γενικά και αποτελούν πολύτιμα βιοτεχνολογικά εργαλεία.

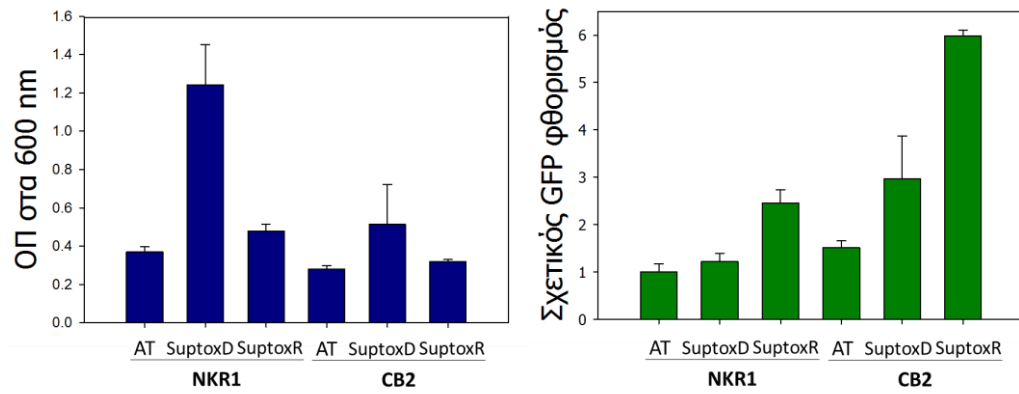
Πίνακας 7. Μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των στελεχών SurtoxD και SurtoXR.

Μεμβρανική πρωτεΐνη	Οργανισμός προέλευσης	Λειτουργία	Αριθμός διαμεμβρανικών ελίκων	Τοπολογία	ΜΒ (kDa)
BR2	<i>Homo sapiens</i>	Υποδοχέας βραδυκινίνης 2 (GPCR)	7	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	44.5
CB1	<i>H. sapiens</i>	Κεντρικός υποδοχέας κανναβινοειδών(GPCR)	7	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	52.9
CB2	<i>H. sapiens</i>	Περιφερικός υποδοχέας κανναβινοειδών (GPCR)	7	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	39.7
NKR1	<i>H. sapiens</i>	Υποδοχέας νευροκινίνης 1 (ουσίας Π) (GPCR)	7	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	46.3
NTR1(D03)	<i>Mus musculus</i>	Υποδοχέας νευροτενσίνης 1 παραλαγή D03 (GPCR)	7	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	44.6
SCD	<i>H. sapiens</i>	Στεαροϋλική-CoA αποκορεσμάτωση	4	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	41.1
MotA	<i>E. coli</i>	Σταθερό στοιχείο του συμπλόκου του μηχανισμού των μαστιγίων	4	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	32.0
SapC	<i>E. coli</i>	Στοιχείο από θεωρούμενο ABC μεταφορέα SapABCDF	5	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	31.5

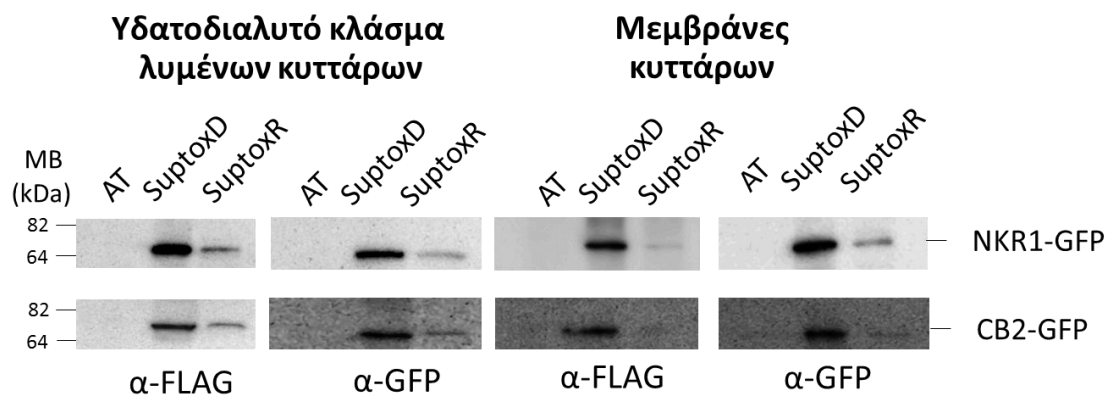
GarP	<i>E. coli</i>	Μεταφορέας γαλακταρικού/γλουκαρικού/γλυκερικού οξέος	11	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	49.0
TcyL	<i>E. coli</i>	Προβλεπόμενη μεμβρανική υπομονάδα ενός ABC μεταφορέα L-κυστίνης	3	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	24.8
GsiC	<i>E. coli</i>	Περμεάση συστήματος μεταφοράς γλουταθειόνης	6	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	34.1
ArtM	<i>E. coli</i>	Περμεάση ABC μεταφορέα αργινίνης	5	N <sup>out</sup> -C <sup>in</sup>	24.9
MdfA	<i>E. coli</i>	Αντλία ενεργητικής εκροής (Multidrug efflux transporter)	12	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	44.3
CstA	<i>E. coli</i>	Μεταφορέας πεπτιδίων επαγόμενος από έλλειψη άνθρακα	18	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	75.1
YidC	<i>E. coli</i>	Ιντεγκράση μεμβρανικών πρωτεϊνών	6	N <sup>in</sup> -C <sup>in</sup>	61.5

---

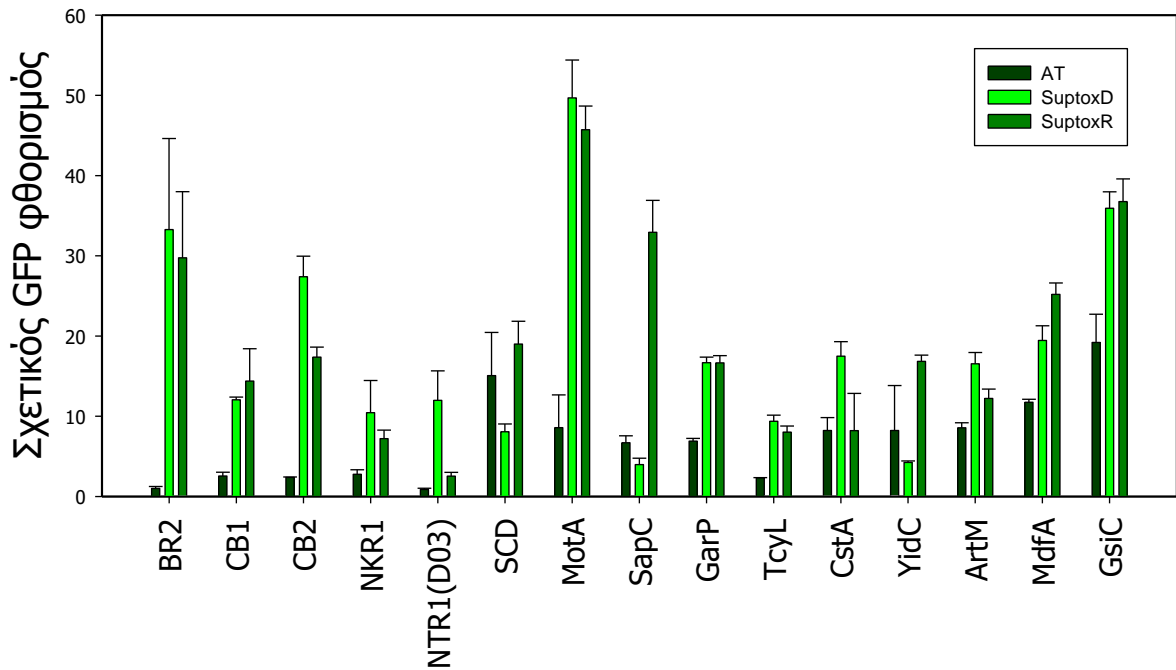
**A**



**B**



Γ



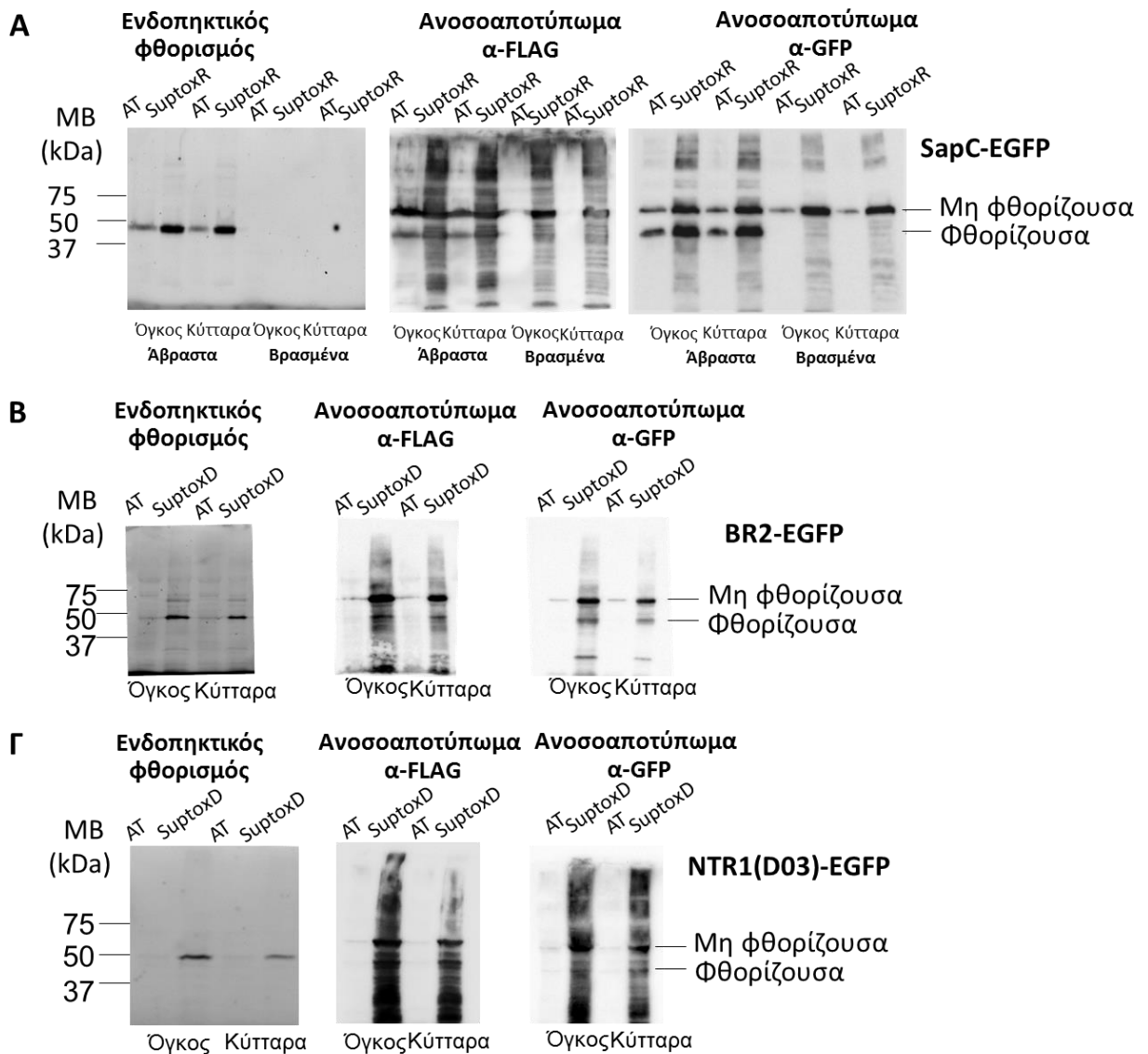
Σχήμα 27. Βελτίωση της παραγωγής άλλων μεμβρανικών πρωτεϊνών στα SuptoxD και SuptoxR. (A). (Αριστερά) Ανάπτυξη *E. coli* MC1061, SuptoxD και SuptoxR κυττάρων που υπερπαράγουν είτε NKR1-GFP είτε CB2-GFP από τον φορέα έκφρασης pASK75 με την προσθήκη 0.2 μg/mL aTc για 16 ώρες στους 25 °C. (Δεξιά) Φθορισμός ίσου αριθμού κυττάρων *E. coli* MC1061, SuptoxD και SuptoxR που υπερπαράγουν είτε την χιμαιρική πρωτεΐνη NKR1-GFP είτε την CB2-GFP όπως στο (A) (αριστερά). Ο φθορισμός των MC1061 κυττάρων που παράγουν την NKR1-GFP πρωτεΐνη τέθηκε αυθαίρετα στη μονάδα. (B) Ανάλυση SDS-PAGE/ανοσοαποτυπώματος με αντι-FLAG και αντι-GFP αντισώματα σε υδατοδιαλυτά κλάσματα λυμένων κυττάρων (αριστερά) και απομονωμένες συνολικές μεμβράνες (δεξιά) ίσων όγκων καλλιέργειας *E. coli* MC1061 (AT), SuptoxD και SuptoxR κυττάρων που υπερπαράγουν NKR1-GFP (πάνω) ή CB2-GFP (κάτω) από το φορέα έκφρασης pASK75, όπως στο (A). (Γ) Φθορισμός ίσων όγκων καλλιέργειας *E. coli* MC1061, SuptoxD και SuptoxR κυττάρων που υπερεκφράζουν διαφορετικές χιμαιρικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν μεμβρανικές πρωτεΐνες με GFP από τον φορέα έκφρασης pASK75 όπως στο (A). Ο φθορισμός MC1061 κυττάρων που υπερπαράγουν την πρωτεΐνη BR2-GFP τέθηκε αυθαίρετα στη μονάδα. Σε όλα τα πάνελ, τα πειράματα διεξήχθησαν σε τριπλές καλλιέργειες και τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν μία τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

### 3.2.4. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών

Αφού επιβεβαιώθηκε η ικανότητα των στελεχών SuptoxD και SuptoxR να βελτιώνουν την υπερπαραγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών γενικά, το επόμενο ερώτημα ήταν εάν η επιπλέον υπερπαραγόμενη πρωτεΐνη ήταν και σωστά αναδιπλωμένη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Geertsma, Groeneveld et al. 2008) με την κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με την βελτιωμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP), με την υπερπαραγωγή της στο *E. coli* και τέλος με την ανάλυση του ενδοπηκτικού της φθορισμού και ανοσοαποτυπώματος υπό ημι-αποδιατακτικές συνθήκες μπορεί να εξακριβωθεί τι ποσοστό μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης είναι σωστά αναδιπλωμένο στη μεμβράνη. Συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση τέτοιων πρωτεϊνών, βακτηριακά εκφρασμένων, χωρίς προηγούμενο βρασμό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση δύο ζωνών της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης στην πηκτή. Και οι δύο ζώνες περιλαμβάνουν πλήρους μήκους πρωτεΐνη, όμως μόνο η ζώνη που διατρέχει πιο γρήγορα την πηκτή είναι σωστά αναδιπλωμένη και φθορίζουσα, ενώ η ζώνη που διατρέχει πιο αργά την πηκτή αντιστοιχεί σε εσφαλμένα αναδιπλωμένη πρωτεΐνη και δεν φθορίζει. Ο βρασμός των δειγμάτων πριν την ανάλυση καταλήγει σε πλήρη μετουσίωση της χιμαιρικής πρωτεΐνης, που κάτω από αυτές τις συνθήκες μετατοπίζεται ως μία ζώνη στην πηκτή και φυσικά δεν φθορίζει. Με ενδοπηκτικό φθορισμό αποκαλύπτονται οι φθορίζουσες ζώνες, ενώ με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος με το κατάλληλο αντίσωμα αποκαλύπτονται όλες οι ζώνες που αντιστοιχούν στην χιμαιρική πρωτεΐνη είτε είναι σωστά αναδιπλωμένη είτε όχι.

Για να πραγματοποιηθεί μια τέτοια ανάλυση κατασκευάστηκαν τρεις χιμαιρικές πρωτεΐνες που περιλάμβαναν τρεις πρωτεΐνες από τον Πίνακα 7, δύο ευκαρυωτικές πρωτεΐνες (BR2, NTR1(D03)) ή μία προκαρυωτική (SapC), και την βελτιωμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (EGFP). Οι πρωτεΐνες αυτές παράχθηκαν σε AT, SuptoxD ή SuptoxR κύτταρα, ανάλογα με το στέλεχος που βρέθηκε να είναι το πιο αποτελεσματικό για την κάθε πρωτεΐνη (Σχήμα 27Γ). Ακολούθησε SDS-PAGE ανάλυση, ανάλυση ανοσοαποτυπώματος και ενδοπηκτικού φθορισμού της παραγωγής των τριών χιμαιρικών πρωτεϊνών. Όπως ήταν αναμενόμενο, όλες οι προς εξέταση χιμαιρικές πρωτεΐνες μετατοπίστηκαν στην πηκτή ως δύο ξεχωριστές πλήρους μήκους ζώνες, από τις οποίες μόνο όσες είχαν την υψηλότερη

ηλεκτροφορητική κινητικότητα παρουσίασαν υψηλά επίπεδα φθορισμού (Σχήμα 28A, B και Γ). Αυτό σημαίνει ότι όλες οι εξεταζόμενες μεμβρανικές πρωτεΐνες που υπερπαραγονται στα κατασκευασμένα στελέχη έχουν μια σωστά αναδιπλωμένη διαμόρφωση. Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις η παραγωγή φθορίζουσας, σωστά αναδιπλωμένης χιμαιρικής πρωτεΐνης που αποτελείται από μεμβρανική πρωτεΐνη και EGFP ήταν ξεκάθαρα βελτιωμένη στα στελέχη SurtoxD ή SurtoxR σε σχέση με τα AT κύτταρα (Σχήμα 28A, B και Γ). Επομένως, τα στελέχη SurtoxD και SurtoxR όχι μόνο βελτιώνουν τη συνολική συσσώρευση μεμβρανικών πρωτεϊνών, αλλά επίσης βοηθούν το μονοπάτι αναδίπλωσης των ανασυνδυασμένα παραγόμενων μεμβρανικών πρωτεϊνών.



Σχήμα 28. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη παραγωγή σωστά αναδιπλωμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A) SDS-PAGE ανάλυση απομονωμένων συνολικών μεμβρανικών κλασμάτων από κύτταρα MC1061 (AT) και SuptoxR που υπερπαράγουν SapC-EGFP με την προσθήκη 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανυδροτετρακυκλίνης στους 25 °C για 16 ώρες. Οπτικοποίηση της παραγόμενης χημεικής πρωτεΐνης με ενδοπηκτικό φθορισμό (αριστερά) και ανάλυση ανοσοαποτυπώματος χρησιμοποιώντας ένα αντι-FLAG (κέντρο) και ένα αντι-GFP αντίσωμα (δεξιά), που στοχεύουν στο N και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, χωρίς (άβραστα) και με (βρασμένα) βρασμό των δειγμάτων πριν την ανάλυση. (B) Ημιμετουσιωτική ανάλυση SDS-PAGE απομονωμένων συνολικών μεμβρανικών κλασμάτων από κύτταρα MC1061 (AT) και SuptoxD που υπερπαράγουν BR2-EGFP όπως στο (A). Οπτικοποίηση της παραγόμενης χημεικής πρωτεΐνης με ενδοπηκτικό φθορισμό (αριστερά) και ανάλυση ανοσοαποτυπώματος χρησιμοποιώντας ένα αντι-FLAG (κέντρο) και ένα αντι-GFP αντίσωμα (δεξιά), που στοχεύουν στο N- και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, χωρίς βρασμό των δειγμάτων πριν την SDS-PAGE ανάλυση. (C) Ημιμετουσιωτική ανάλυση SDS-PAGE απομονωμένων συνολικών



μεμβρανικών κλασμάτων από κύτταρα MC1061 (AT) και SuptoxD που υπερπαράγουν NTR1(D03)-EGFP όπως περιγράφεται στο (A). Οπτικοποίηση της παραγόμενης χιμαιρικής πρωτεΐνης με ενδοπηκτικό φθορισμό (αριστερά) και ανάλυση ανοσοαποτυπώματος χρησιμοποιώντας ένα αντι-FLAG (κέντρο) και ένα αντι-GFP αντίσωμα (δεξιά), που στοχεύουν στο N και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, αντίστοιχα, χωρίς βρασμό των δειγμάτων πριν την SDS-PAGE ανάλυση. Για σύγκριση μεταξύ κυττάρων AT και SuptoxD/SuptoxR, τα δείγματα που αντιστοιχούν στον ίδιο όγκο καλλιέργειας (όγκος) ή στον ίδιο αριθμό κυττάρων (κύτταρα) φορτώθηκαν σε κάθε τμήμα της πηκτής.

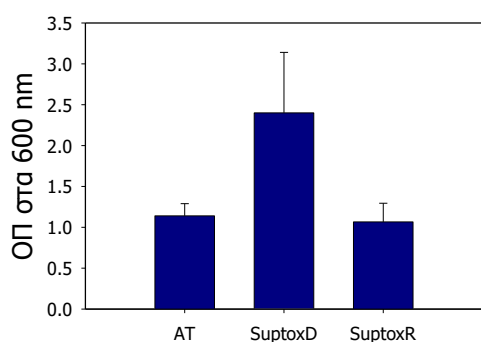
### 3.2.5. Στο SuptoxD βελτιώνεται η λειτουργική υπερέκφραση του υποδοχέα νευροτενσίνης 1 στο βακτήριο *E. coli*

Για να εξεταστεί, αν η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* (SuptoxD) αυξάνει την υπερπαραγωγή μεμβρανικής πρωτεΐνης σε μορφή σωστά αναδιπλωμένη και λειτουργική ή οδηγεί στην παραγωγή επιπλέον πρωτεΐνης που είναι όμως μη λειτουργική, μελετήθηκε η επίδρασή της στην υπερπαραγωγή της ευκαρυωτικής μεμβρανικής πρωτεΐνης υποδοχέα νευροτενσίνης 1 (NTR1) στο *E. coli*. Αυτή η μεμβρανική πρωτεΐνη επιλέχθηκε, καθώς υπάρχει καθιερωμένο τεστ για τη λειτουργικότητά της στη βιβλιογραφία (Sarkar, Dodevski et al. 2008). Χρησιμοποιήθηκε η παραλλαγή D03 (NTR1(D03)) που δείχνει αυξημένη λειτουργική έκφραση σε σχέση με την AT πρωτεΐνη (Sarkar, Dodevski et al. 2008).

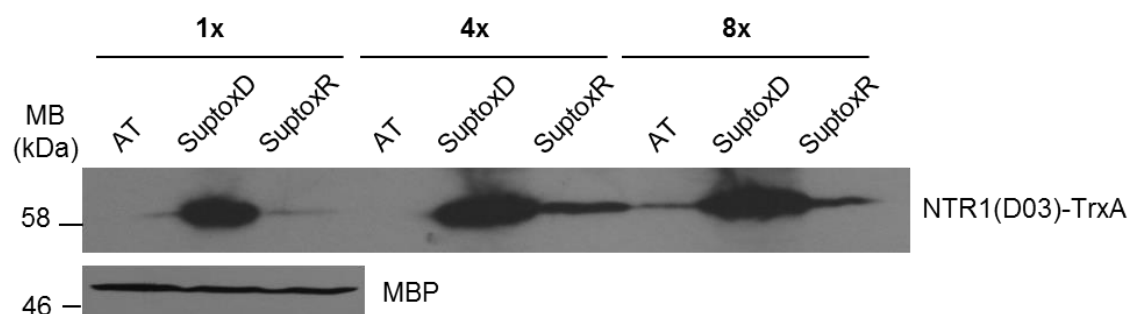
Αρχικά, δοκιμάστηκε η ικανότητα των γονιδίων-καταστολέων να βελτιώνουν την υπερπαραγωγή της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με την GFP (Σχήμα 27Γ) και βρέθηκε ότι στα κύτταρα SuptoxD υπάρχει σημαντική αύξηση της συνολικής παραγωγής. Ύστερα, δοκιμάστηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη NTR1(D03)-TrxA και παρατηρήθηκε επίσης καταστολή της κυτταροτοξικότητας (Σχήμα 29Α) και κατόπιν με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος ανιχνεύτηκε αυξημένη υπερπαραγωγή NTR1(D03)-TrxA κατά τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* (Σχήμα 29Β). Για να μελετηθεί η επίδραση στη λειτουργική έκφραση της πρωτεΐνης NTR1(D03)-TrxA, προσαρμόστηκε το τεστ λειτουργικότητας που περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Sarkar, Dodevski et al. 2008, Skretas, Makino et al. 2012). Σφαιροπλάστες από βακτηριακά κύτταρα που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη NTR1(D03)-TrxA με και χωρίς τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* προετοιμάστηκαν και επωάστηκαν με τον αγωνιστή

νευροτενσίνης (αμινοξέα 8-13) του υποδοχέα NTR1(D03) συζευγμένο με το φθοροφόρο BODIPY σε κρύο ρυθμιστικό διάλυμα Tris-KCl που επιτρέπει την πρόσδεση του αγωνιστή. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 29Γ, η υπερέκφραση στο SuptoxD οδηγεί σε σημαντική αύξηση του σήματος φθορισμού, το οποίο σημαίνει ότι η λειτουργική έκφραση του υποδοχέα NTR1-παραλλαγή D03 είναι σχεδόν 5 φορές περισσότερη ανά κύτταρο. Επομένως, παράγεται και περισσότερη σε ποσότητα, αλλά και περισσότερη λειτουργική πρωτεΐνη NTR1(D03) κατά τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* στο στέλεχος SuptoxD.

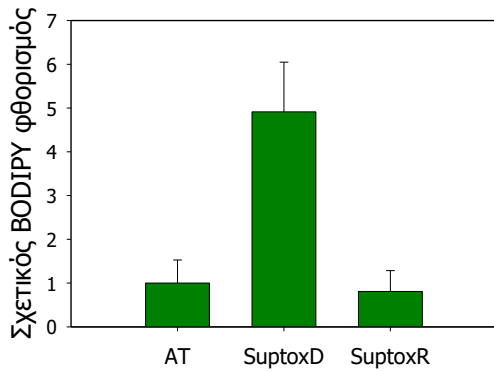
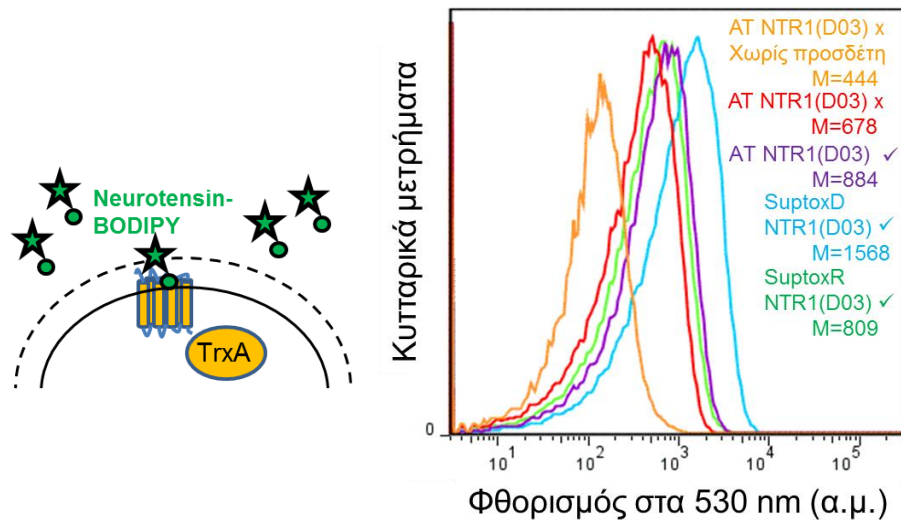
**A**



**B**



Γ



Σχήμα 29. Βελτίωση της παραγωγής λειτουργικής μεμβρανικής πρωτεΐνης κατά τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA*. (Α). Επίδραση της συνέκφρασης των *djlA* ή *rraA* στην ανάπτυξη των κυττάρων που υπερεκφράζουν την NTR1-D03. (Β). Επίδραση της συνέκφρασης των *djlA* ή *rraA* στα επίπεδα έκφρασης ανά κύτταρο των κυττάρων που υπερεκφράζουν την NTR1-D03. αντι-FLAG και αντι-Mbr ανοσοαποτυπώματα του υδατοδιαλυτού κλάσματος κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερεκφράζουν την NTR1-D03 με και χωρίς συνέκφραση των *djlA* ή *rraA*. (Γ). Αυξημένη λειτουργικότητα της NTR1-D03 κατά τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA*. Κυτταρομετρία ροής σε σφαιροπλάστες που υπερπαραγωγή την πρωτεΐνη NTR1-D03 με ή χωρίς τη συνέκφραση του γονιδίου *djlA* ή *rraA* (Αριστερά). Μέσος όρος φθορισμού κυτταρομετρίας ροής. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν σε ίσο αριθμό κυττάρων σε κάθε δείγμα. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τις μέσες τιμές από ένα πείραμα διπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (Δεξιά).

### 3.3. Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα συνολικής πρωτεΐνης σε σχέση με τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη που θεωρούνται κατάλληλα για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών

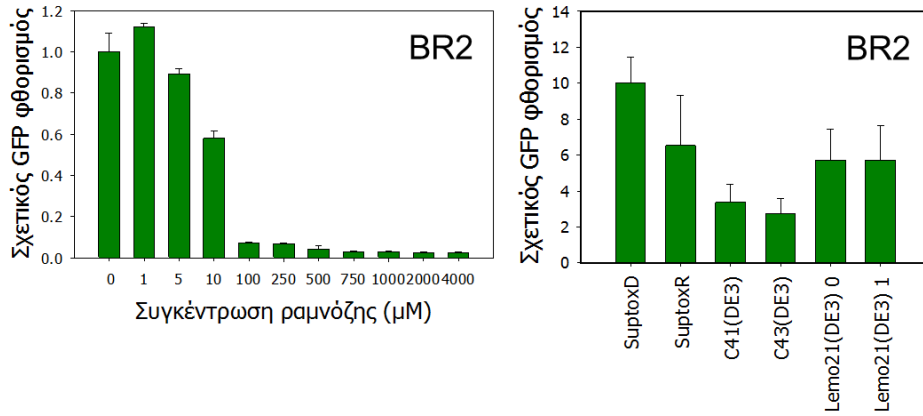
Για τη σύγκριση των στελεχών SuptoxD και SuptoxR με άλλα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη *E. coli* που εξειδικεύονται στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα με τα στελέχη *E. coli* C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3), κατασκευάστηκαν τα πλασμίδια pETBR2GFP, pETCB2GFP, pETNTR1(D03)GFP, pETMotAGFP και pETSapCGFP και μετρήθηκε ο σχετικός κυτταρικός φθορισμός για ίσο όγκο καλλιεργειών. Αρχικά καθορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση ραμνόζης για κάθε μεμβρανική πρωτεΐνη, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για το στέλεχος Lemo21(DE3). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 30, αριστερά. Κατόπιν, οι αποδόσεις για κάθε πρωτεΐνη σε διαφορετικά στελέχη συγκρίθηκαν με βάση αυτές τις βέλτιστες συνθήκες που εντοπίστηκαν, αλλά και για μηδενική ραμνόζη με τα Lemo21(DE3) (Σχήμα 30, δεξιά). Για όλες τις μεμβρανικές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν, οι καλύτερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στο στέλεχος SuptoxD ή το στέλεχος SuptoxR. Επομένως, και τα δύο αυτά στελέχη είναι κατάλληλα για υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών και με καλύτερες αποδόσεις έκφρασης από τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη, τουλάχιστον για τις συγκεκριμένες περιπτώσεις ανασυνδυασμένων μεμβρανοπρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Με ακόμη μία τεχνική, την κυτταρομετρία ροής, μετρήθηκε η απόδοση χιμαιρικών πρωτεϊνών BR2-GFP ή NTR1(D03)-GFP ανά κύτταρο για τα στελέχη MC1061, SuptoxD, SuptoxR, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε ότι οι διαφορές είναι ακόμη μεγαλύτερες υπέρ των SuptoxD και SuptoxR, όταν η παραγωγικότητα αυτών των στελεχών συγκρίνεται με βάση την απόδοση ανά κύτταρο (Σχήμα 31).

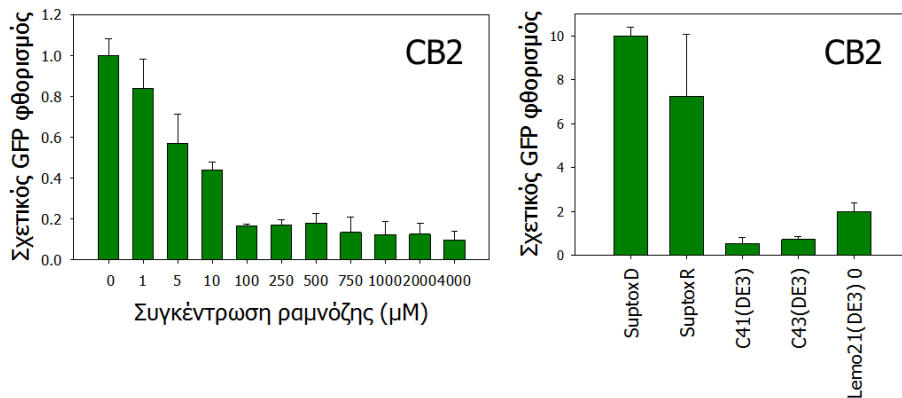
Επιπλέον, με την κυτταρομετρία ροής εξετάστηκε και η ομοιογένεια του πληθυσμού των κυττάρων που υπερπαραγωγή τις μεμβρανικές πρωτεΐνες και βρέθηκε ότι για τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR οι πληθυσμοί είναι όσο ομοιογενείς όσο είναι και αυτοί των AT *E. coli* κυττάρων παρά το γεγονός ότι υπερπαραγωγή πολύ

τοξικές μεμβρανικές πρωτεΐνες σε πολύ υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (Σχήμα 31) (Gialama, Kostelidou et al. 2016).

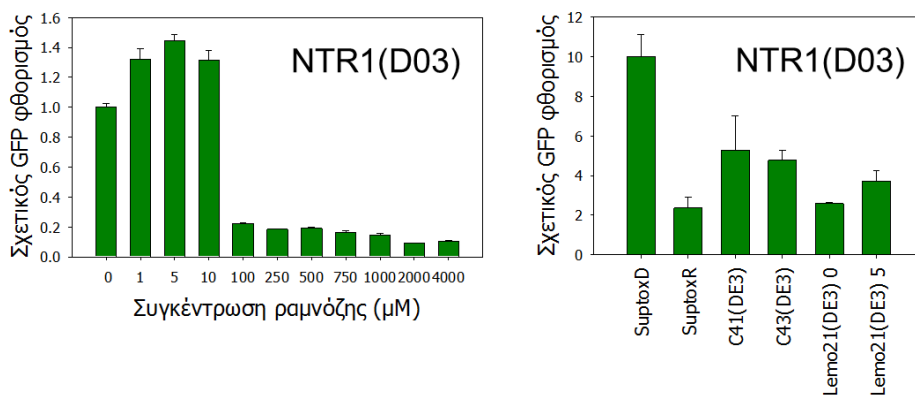
**A**

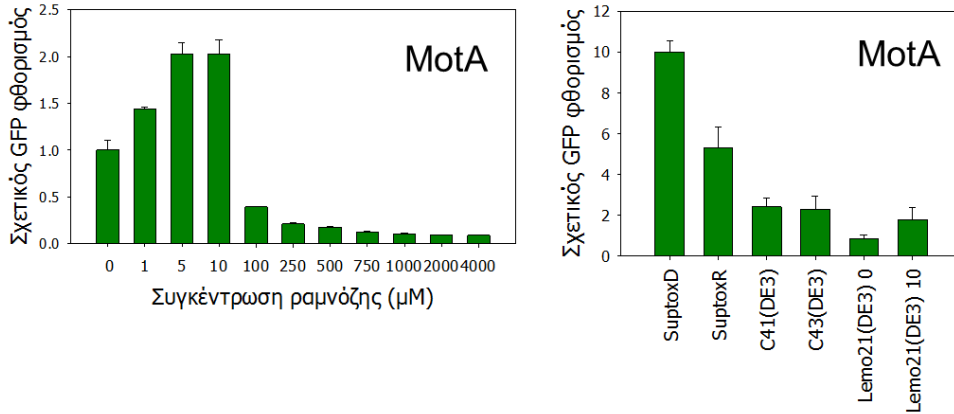
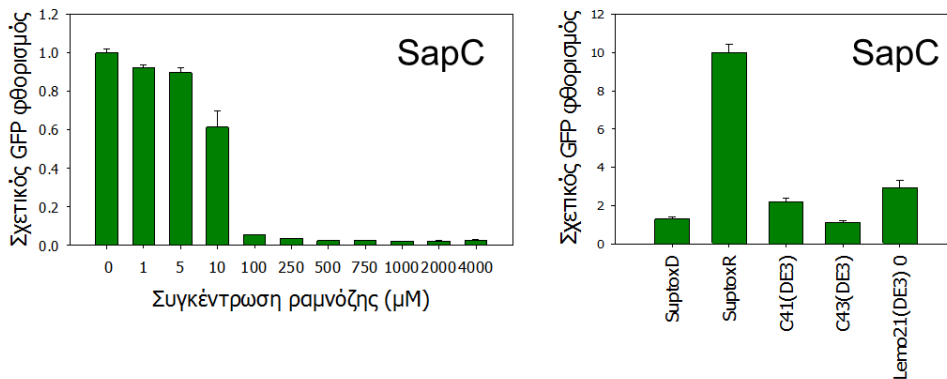


**B**



**Γ**

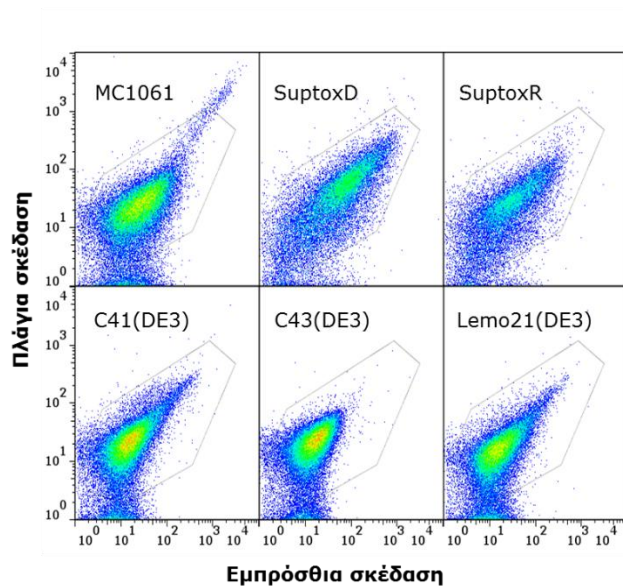


**Δ****Ε**

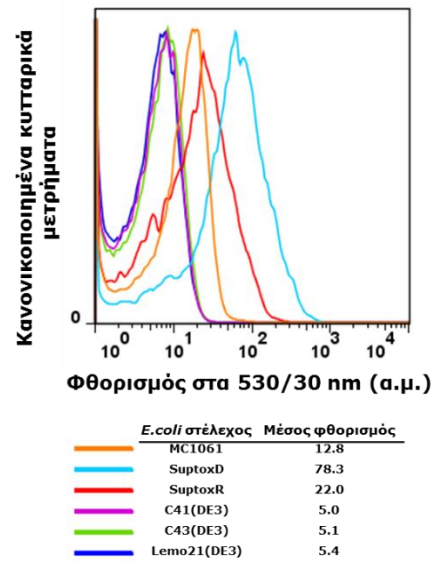
Σχήμα 30. Σύγκριση των επιδόσεων των SuptoxD και SuptoxR με αυτές στελεχών *E. coli* που τυπικά χρησιμοποιούνται στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. (Αριστερά) Υπερέκφραση στο στέλεχος Lemo21(DE3) με διαφορετικές ποσότητες ραμνόζης για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσής της για τις χιμαιρικές πρωτεΐνες BR2-GFP (A), CB2-GFP (B), NTR1(D03)-GFP (Γ), MotA-GFP (Δ) και SapC-GFP (E) από τον φορέα έκφρασης pET28a(+). (Δεξιά) Σύγκριση φθορισμού των SuptoxD και SuptoxR κυττάρων που υπερπαραγάγουν τις χιμαιρικές πρωτεΐνες BR2-GFP (A), CB2-GFP (B), NTR1(D03)-GFP (Γ), MotA-GFP (Δ) και SapC-GFP (E) από τον φορέα έκφρασης pASK75 με 0.2 μg/mL aTc στους 25 °C για περίπου 16 ώρες με τον φθορισμό καλλιέργειών ίσων όγκων των κυττάρων των C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) που υπερπαραγάγουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες από τον φορέα έκφρασης pET28a(+) με 0.4 mM IPTG στους 25 °C για περίπου 16 ώρες. Για το στέλεχος Lemo21(DE3) η υπερπαραγωγή διεξήχθη απουσία ραμνόζης, το δείγμα Lemo21(DE3) 0, ενώ όταν δεν ήταν μηδενική η βέλτιστη συγκέντρωση, όπως καθορίστηκε από τα διαγράμματα αριστερά, η υπερπαραγωγή διεξήχθη και στην κατάλληλη βέλτιστη συγκέντρωση. Ο συνολικός φθορισμός μετρήθηκε για ίσους όγκους καλλιέργειας. Οι αναφερόμενες

τιμές αντιστοιχούν σε μέση τιμή από τουλάχιστον δύο πειράματα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. Σε όλα τα διαγράμματα δεξιά, ο φθορισμός του στελέχους με τα υψηλότερα επίπεδα συσσώρευσης μεμβρανικής πρωτεΐνης για κάθε χιμαιρική πρωτεΐνη τέθηκε αυθαίρετα στο δέκα.

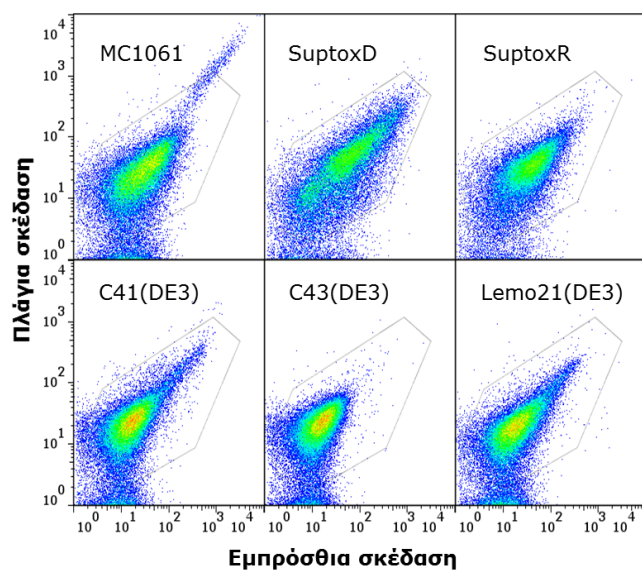
**A**



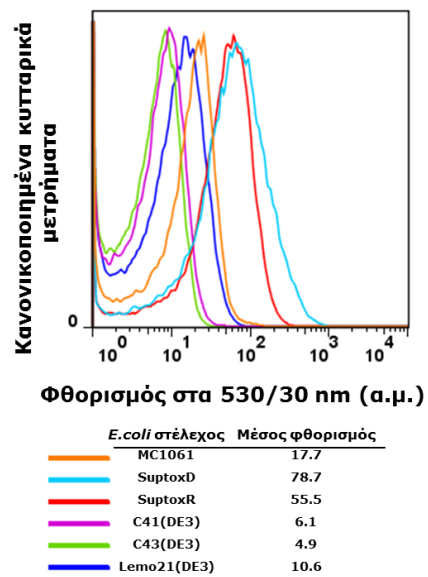
**B**



**Γ**



**Δ**



Σχήμα 31. Σύγκριση των SuptoxD και SuptoxR με στελέχη *E. coli* που τυπικά χρησιμοποιούνται στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. (Α) Διαγράμματα εμπρόσθιας και πλάγιας σκέδασης που προέκυψαν από κυτταρομετρία ροής των *E. coli* MC1061, SuptoxD και SuptoxR κυττάρων που υπερπαραγωγή την πρωτεΐνη BR2-GFP από το φορέα έκφρασης pASK75 με προσθήκη 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης για 16 h στους 25 °C και των C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) κυττάρων που υπερπαραγωγή την ίδια πρωτεΐνη από το φορέα έκφρασης pET28a(+) με προσθήκη 0.4 mM IPTG και της βέλτιστης συγκέντρωσης ραμνόζης (μόνο για τα κύτταρα Lemo21(DE3) και όπως προέκυψε από το Σχήμα 30) για 16 ώρες στους 25 °C. (Β) Σύγκριση των επιπέδων φθορισμού μεμονωμένων κυττάρων των στελεχών *E. coli* MC1061, SuptoxD, SuptoxR, C41(DE3), C43(DE3) και Lemo21(DE3) που υπερπαραγωγή την BR2-GFP όπως στο (Α). Οι μετρήσεις έγιναν με κυτταρομετρία ροής. Η οριοθέτηση κυττάρων που μετρήθηκαν παρουσιάζεται με μια γκρι γραμμή στο (Α). Οι τιμές φθορισμού αντιστοιχούν στη μέση τιμή πειράματος με τριπλές καλλιέργειες. (Γ) Για το NTR1(D03)-GFP όπως στο (Α). (Δ) Για το NTR1(D03)-GFP όπως στο (Β).

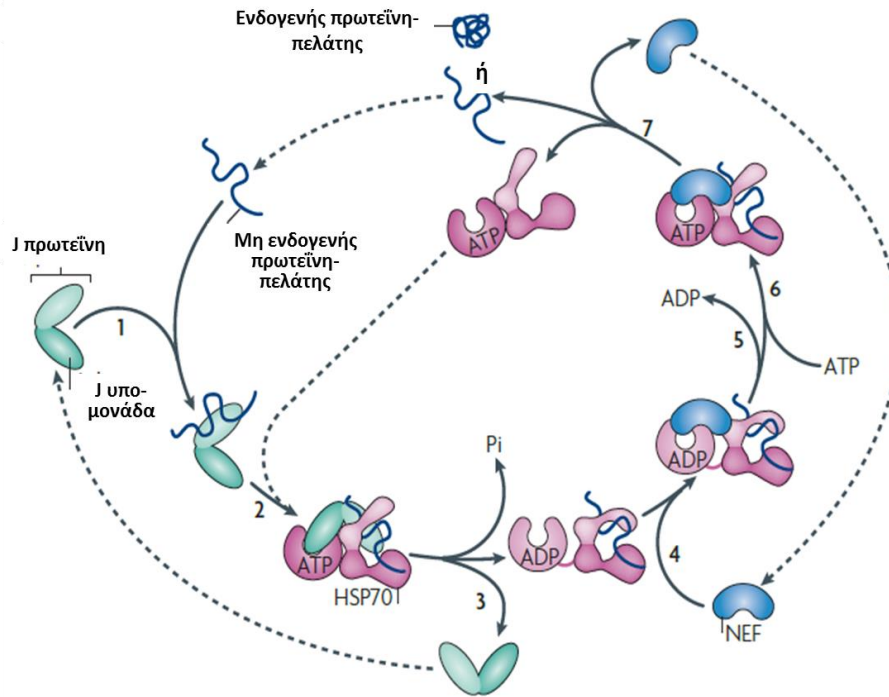


### 3.4. Διερεύνηση στοιχείων του μηχανισμού της καταστολής της τοξικότητας υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω των DjIA και RgaA

Τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR αποτελούν πολύ σημαντικά εργαλεία για την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Πέρα, όμως, από τη βελτιστοποίηση της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν και η εξακρίβωση στοιχείων του μηχανισμού της τοξικότητας της υπερπαραγωγής αυτών των πρωτεϊνών. Η μελέτη των στελεχών SuptoxD και SuptoxR μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά στοιχεία για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αυτού και κατ' επέκταση να οδηγήσει στην κατασκευή στελεχών *E. coli* με ακόμη πιο βελτιωμένες ιδιότητες στην υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Η πρωτεΐνη DjIA (DnaJ-like) είναι μια Hsp40 (heat-shock 40 kDa proteins) πρωτεΐνη, βρίσκεται ενσωματωμένη στη μεμβράνη και λειτουργεί ως ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού (co-chaperone) του *E. coli* DnaK, η οποία ανήκει στις πρωτεΐνες Hsp70. Οι Hsp70 πρωτεΐνες είναι μοριακοί συνοδοί που βρίσκονται σε πολλούς οργανισμούς και εκτελούν διάφορες λειτουργίες (Kamringa and Craig 2010). Στο *E. coli* κωδικοποιούνται τρεις Hsp70 πρωτεΐνες και η DnaK είναι το βασικό μέλος τους (Genevaux, Georgopoulos et al. 2007). Οι πρωτεΐνες Hsp70s μπορούν μόνο να λειτουργήσουν όταν συνεργάζονται με μία J ή αλλιώς Hsp40 πρωτεΐνη, η οποία συνήθως ορίζει την εξειδίκευση της Hsp70 καθώς εμπλέκεται στην αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη-πελάτη (Kamringa and Craig 2010).

Οι J πρωτεΐνες ή Hsp40s χαρακτηρίζονται από μία J υπομονάδα, στην οποία οφείλεται η λειτουργική αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες Hsp70s και η διέγερση της υδρόλυσης του ATP (Σχήμα 32) (Kamringa and Craig 2010). Η J υπομονάδα είναι μια συντηρημένη αλληλουχία ~70 αμινοξέων (Clarke, Jacq et al. 1996) που περιέχει το επίσης συντηρημένο μοτίβο HPD (τριπεπτίδιο), το οποίο βρίσκεται σε έναν εκτεθειμένο βρόχο της υπομονάδας (Pellecchia, Szyperski et al. 1996). Μεταλλάξεις στο μοτίβο HPD καταργούν τη λειτουργία του, τη διέγερση της υδρόλυσης του ATP (Genevaux, Georgopoulos et al. 2007).



(Kampering and Craig 2010)

Σχήμα 32. Κανονικό μοντέλο του τρόπου δράσης του πυρήνα του μηχανισμού Hsp70 στην πρωτεϊνική αναδίπλωση βασισμένο σε *in vitro* μελέτες αναδίπλωσης μετουσιωμένων πρωτεϊνών. (1) Η J πρωτεΐνη προσδένεται στην πρωτεΐνη-πελάτη μέσω της υπομονάδας που προσδένεται σε πεπτίδια και (2) αλληλεπιδρά με μια Hsp70 μέσω της J υπομονάδας (J). (3) Ο πελάτης γρήγορα, αλλά παροδικά αλληλεπιδρά με την «ανοιχτή» περιοχή που προσδένονται τα πεπτίδια του Hsp70. Η υδρόλυση ATP ενεργοποιείται ταυτόχρονα από την J υπομονάδα και τον πελάτη που προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στο Hsp70 κλείνοντας το ελικοειδές καπάκι πάνω από τη σχισμή, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση με τον πελάτη. Η J πρωτεΐνη αφήνει το σύμπλοκο. (4) Ο παράγοντας ανταλλαγής νουκλεοτιδίου (NEF) που έχει υψηλότερη συγγένεια με το Hsp70(ADP) από το Hsp70(ATP) προσδένεται στο Hsp70. (5) Το ADP απομακρύνεται μέσω της παραμορφωμένης υπομονάδας στην οποία είναι προσδεμένο. Κατόπιν (6) το ATP προσδένεται στο Hsp70. (7) Ο πελάτης απελευθερώνεται λόγω της χαμηλής συγγένειας με το Hsp70(ATP). Η πρόσδεση του ATP στο Hsp70 ευνοείται καθώς οι κυτταρικές συγκεντρώσεις του ATP είναι τυπικά πολύ υψηλότερες από αυτές του ADP. Αν η σωστή διαμόρφωση του πελάτη δεν έχει επιτευχθεί κατά την απελευθέρωση, η J πρωτεΐνη προσδένεται και πάλι σε εκτεθειμένες υδρόφοβες περιοχές και ο κύκλος ξεκινά και πάλι. Τυπικά απαιτείται τέτοια επαναληπτική πρόσδεση.

Το βασικό μέλος των J πρωτεϊνών στο *E. coli* είναι η πρωτεΐνη DnaJ (Genevaux, Georgopoulos et al. 2007, Kampinga and Craig 2010). Εκτός από τη DnaJ και τη DjIA το γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιεί τέσσερις ακόμη J πρωτεΐνες, τις CbpA, HscB, DjIB και DjIC. Από όσο γνωρίζουμε δεν αλληλεπιδρούν όλες οι Hsp40 με όλες τις Hsp70 πρωτεΐνες προκειμένου να διεγερθεί η υδρόλυση του ATP. Έχει δειχθεί ότι η DnaK αλληλεπιδρά με αυτό τον τρόπο με την DnaJ (Gassler, Buchberger et al. 1998, Mayer, Laufen et al. 1999), τη CbpA (Chae, Sharma et al. 2004) ή τη DjIA (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001). Έχει δειχθεί ότι η DjIA μπορεί να λειτουργήσει ως ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού DnaK, καθώς καθαρισμένη κυτταροπλασματική DjIA μπορεί να ενεργοποιήσει την ενεργότητα ATPάσης της DnaK in vitro (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001). Οι τρεις ενεργοποιητές της DnaK έχουν ξεχωριστούς (Clarke, Holland et al. 1997, Kelley and Georgopoulos 1997), αλλά και μερικώς επικαλυπτόμενους ρόλους (Genevaux, Schwager et al. 2001, Gur, Biran et al. 2004). Το γονίδιο *djIA* δεν είναι ένα απαραίτητο γονίδιο, όμως κύτταρα που περιέχουν τη διπλή *dnaJ djIA* μετάλλαξη είναι ευαίσθητα στη θερμοκρασία (Genevaux, Schwager et al. 2001).

Ανάμεσα στις J πρωτεΐνες του *E. coli* η DjIA έχει μοναδική δομή καθώς είναι η μόνη που είναι ενσωματωμένη στη κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli* μέσω του N-τελικού της άκρου, ενώ περιέχει τη J υπομονάδα στο C-τελικό της άκρο (Clarke, Jacq et al. 1996). Ενδιάμεσα βρίσκεται μια υπομονάδα περίπου 170 αμινοξέων άγνωστης λειτουργίας (Clarke, Holland et al. 1997), την οποία ονομάζουμε κεντρική υπομονάδα (central domain). Το N-τελικό διαμεμβρανικό τμήμα της είναι και υπομονάδα διμερισμού (Toutain, Clarke et al. 2003).

Ομόλογες πρωτεΐνες της DjIA βρίσκονται και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια (Clarke, Holland et al. 1997, Ohnishi, Mizunoe et al. 2004, Lakhali, Bury-Mone et al. 2008). Η DjIA του βακτηρίου *E. coli* αρχικά περιγράφηκε ως υποθετική πρωτεΐνη (Yura, Mori et al. 1992) και ως ομόλογη πρωτεΐνη της πρωτεΐνης MucZ του βακτηρίου *Coxiella burnetii*, της οποίας η υπερπαραγωγή από υψηλού αριθμού αντιγράφων πλασμίδιο στο *E. coli* προκαλεί την εμφάνιση ενός βλενώδους φαινοτύπου λόγω της συσσώρευσης του θυλακώδους πολυσακχαρίτη κολανικού οξέος (Zuber, Hoover et al. 1995). Ύστερα, καταγράφηκε ότι η υπερπαραγωγή του γονιδίου *djIA* ακόμη και σε

μέτρια επίπεδα μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή κολανικού οξέος (colanic acid) και την εμφάνιση βλέννας μέσω ενεργοποίησης του οπερονίου *cps* (Clarke, Jacq et al. 1996, Kelley and Georgopoulos 1997), η οποία προέρχεται από ενεργοποίηση της αντίδρασης Rcs μέσω του RcsB/RcsC συστήματος (Kelley and Georgopoulos 1997). Η μεταγραφική ενεργοποίηση του οπερονίου *cps* μέσω της DjlA βρέθηκε να απαιτεί ενεργούς τους παράγοντες RcsA, RcsB και RcsC και την πρωτεΐνη DjlA σε μορφή πλήρους μήκους, της οποίας η J υπομονάδα μπορεί να αλληλεπιδράσει λειτουργικά με την DnaK (Clarke, Jacq et al. 1996, Kelley and Georgopoulos 1997).

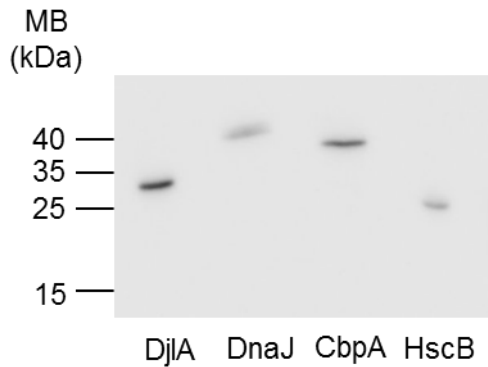
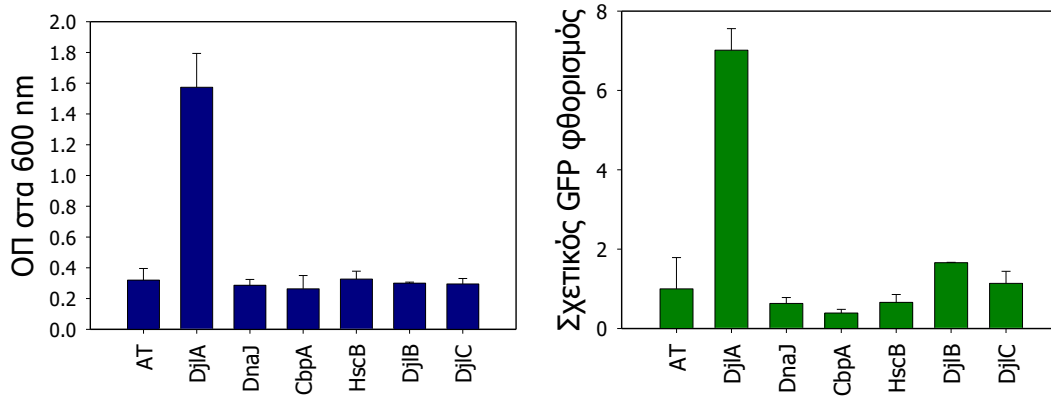
Ο δεύτερος καταστολέας της τοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών που εντοπίστηκε είναι, όπως αναφέρθηκε, το γονίδιο *rraA*. Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης RraA είναι να ρυθμίζει την ενεργότητα της RNase E, η οποία διασπά μόρια mRNA (Lee, Zhan et al. 2003). Η πρωτεΐνη RNase E είναι μια πολύ μεγάλη ενδονουκλεάση που περιέχει 1061 αμινοξέα, αποτελεί το κύριο ένζυμο για αλλαγή του mRNA στο βακτήριο *E. coli* και είναι απαραίτητη για την επιβίωσή του (Carpousis 2007). Έχει βρεθεί ότι η υπερέκφραση του *rraA* γονιδίου αυξάνει τα επίπεδα πάνω από 2,000 διαφορετικών μορίων mRNA στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E. coli* (Lee, Zhan et al. 2003).

Η διάσπαση του mRNA μέσω της πρωτεΐνης RNase E σε αυτό τον οργανισμό, αλλά και σε άλλα βακτήρια, μπορεί να λάβει χώρα από την ενδονουκλεάση αποκλειστικά ή από ένα σύμπλοκο που αποτελείται από πολλά ένζυμα, το οποίο ονομάζεται το RNA διασπάσωμα (degradosome). Στο διασπάσωμα η RNase E σχηματίζει τον πυρήνα και συμπληρώνεται ο ρόλος της από τρία επιπλέον ένζυμα: την πολυνουκλεοτιδική φωσφορυλάση (PNPase), την ελικάση DEAD-box RhlB και το γλυκολυτικό ένζυμο ενολάση (Carpousis 2007). Η RNase E αποτελείται από δύο κυρίως λειτουργικές υπομονάδες, μια N-τελική τετραμερική καταλυτική υπομονάδα, η οποία είναι υπεύθυνη για τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα, και μια C-τελική εγγενώς διαταραγμένη υπομονάδα (CTD), η οποία περιέχει τις κύριες περιοχές που μεσολαβούν για τις αλληλεπιδράσεις με άλλα τμήματα του διασπασώματος και άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως η RraA (Lee, Zhan et al. 2003). Εκτός από την RraA, το γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιεί τουλάχιστον και έναν δεύτερο αναστολέα

της RNάσης E, που λέγεται RraB, ο οποίος όμως επηρεάζει την αποδόμηση διαφορετικών μορίων mRNA από την RraA (Yeom, Go et al. 2008).

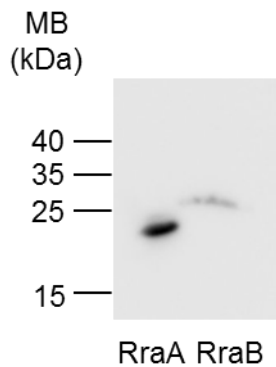
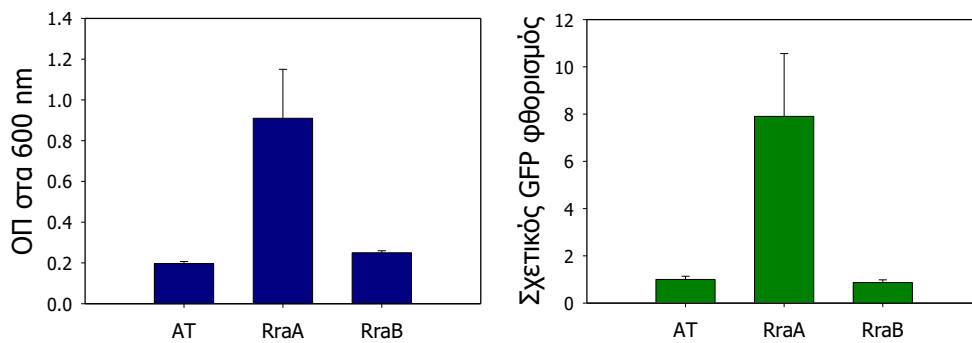
3.4.1. Οι πρωτεΐνες DjIA and RraA είναι μοναδικές ανάμεσα στις J πρωτεΐνες και στους αναστολείς της RNάσης E στην ικανότητά τους να βελτιώνουν την ανασυνδυασμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών

Για να εξεταστεί αν η ικανότητα της DjIA να βελτιώνει την υπερπαραγωγή της BR2 είναι ειδική ή αν μπορεί και άλλη J πρωτεΐνη να έχει κάποια επίδραση όπως η DjIA, τα γονίδια που κωδικοποιούν και τις έξι J πρωτεΐνες του *E. coli* κλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pBAD33 με ένα 8xHis επίτοπο στο C τελικό άκρο τους και η επίδραση της συμπαραγωγής τους στην υπερπαραγωγή του υποδοχέα BR2 αξιολογήθηκε. Με εξαίρεση τις πρωτεΐνες DjIB και DjIC, των οποίων η υπερέκφραση σε μορφή ενσωματωμένη στη μεμβράνη είναι γνωστό ότι είναι προβληματική για το *E. coli* και δεν μπορεί να ανιχνευτεί με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας anti-His αντίσωμα (Kluck, Patzelt et al. 2002), όλες οι υπόλοιπες *E. coli* J πρωτεΐνες συσσωρεύονταν σε επίπεδα που μπορούσαν να ανιχνευτούν (Σχήμα 33A). Ενδιαφέρον είναι ότι καμία άλλη J πρωτεΐνη δε βρέθηκε να λειτουργεί ως καταστολέας της τοξικότητας που προκύπτει από την υπερέκφραση της BR2 (Σχήμα 33B, αριστερά). Επίσης, καμία άλλη J πρωτεΐνη δε βρέθηκε να αυξάνει την υπερπαραγωγή ανά κύτταρο του υποδοχέα (Σχήμα 33, δεξιά). Αυτό σημαίνει ότι η DjIA είναι μοναδική ανάμεσα στις J πρωτεΐνες του *E. coli* που έχει την ικανότητα να βελτιώνει την βακτηριακή ανασυνδυασμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Προφανώς, για αυτό το λόγο οι άλλες J πρωτεΐνες δεν εντοπίστηκαν στην αρχική ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA.

**A****B**

Σχήμα 33. Η *DjlA* είναι μοναδική ανάμεσα στις ομόλογες πρωτεΐνες στην ικανότητά της να ξεπερνά την κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών και να βελτιώνει την ανασυνδυασμένη συσσώρευση μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A). SDS-PAGE/Western blot ανάλυση λυμένων κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερέκφραζαν τα γονίδια *djlA*, *dnaJ*, *cbpA*, ή *hscB* χρησιμοποιώντας 0.2% αραβινόζη και ένα αντι-His αντίσωμα. (B). Ανάπτυξη *E. coli* MC1061 κυττάρων που υπερέκφραζαν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA* και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούσαν J πρωτεΐνες του *E. coli*. (αριστερά). Φθορισμός *E. coli* MC1061 κυττάρων που υπερεκφράζουν τη χημεική πρωτεΐνη BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση των *djlA* and και άλλων γονιδίων που κωδικοποιούσαν J πρωτεΐνες του *E. coli*. Μετρήσεις που αντιστοιχούν σε ίδιο αριθμό κυττάρων (δεξιά). Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Όπως αναφερθηκε παραπάνω, εκτός από την RraA, το γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιεί τουλάχιστον και έναν δεύτερο αναστολέα της ενεργότητας της RNάσης E, που λέγεται RraB, ο οποίος όμως επηρεάζει την αποδόμηση διαφορετικών μορίων mRNA από την RraA (Yeom, Go et al. 2008). Για να εξεταστεί αν το γονίδιο *rraB* λειτουργεί ως καταστολέας της τοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών και η συμπαραγωγή του βελτιώνει την παραγωγή ανά κύτταρο, κλωνοποιήθηκε και αυτό στον φορέα έκφρασης pBAD33 με έναν 8xHis επίτοπο στο C-τελικό άκρο του και δοκιμάστηκε η συνέκφραση του γονιδίου αυτού με την υπερέκφραση του υποδοχέα BR2. Βρέθηκε ότι το *rraB* δεν καταστέλλει την τοξικότητα του BR2 (Σχήμα 34B, αριστερά) ούτε βελτιώνει τη συσώρευσή του ανά κύτταρο (Σχήμα 34B, δεξιά), παρά το γεγονός ότι υπερεκφράζεται επιτυχώς (Σχήμα 34A). Το φαινομενικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης RraB είναι μεγαλύτερο από το θεωρητικό στα πειράματά μας, όπως έχει και στο παρελθόν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Yeom, Go et al. 2008). Επομένως, και ο καταστολέας της τοξικότητας RraA είναι μοναδικός ανάμεσα στους αναστολείς της ενεργότητας αποδόμησης του mRNA της RNάσης E που έχει την ικανότητα να βελτιώνει την βακτηριακή ανασυνδυασμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Για αυτό το λόγο και η πρωτεΐνη RraB δεν εντοπίστηκε στον αρχική ανάλυση της βιβλιοθήκης ASKA.

**A****B**

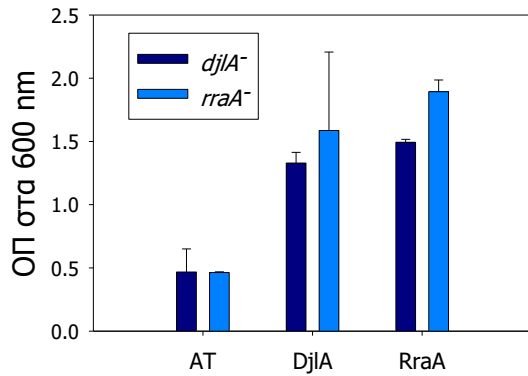
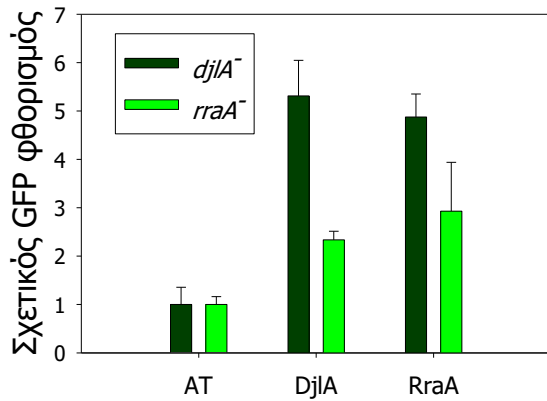
Σχήμα 34. Η RraA είναι μοναδική ανάμεσα στους αναστολείς της RNάσης E στην ικανότητά της να ξεπερνά την κυτταροτοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή μεμβρανοπρωτεϊνών και να βελτιώνει την ανασυνδυασμένη συσσώρευση μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A). SDS-PAGE/Western blot ανάλυση λυμένων κυττάρων *E. coli* MC1061 που υπερέκφραζαν τα γονίδια *rraA* ή *rraB* χρησιμοποιώντας 0.2% αραβινόζη και ένα αντι-His αντίσωμα. (B). Ανάπτυξη *E. coli* MC1061 κυττάρων που υπερέκφραζαν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση των γονιδίων *rraA* και *rraB*. (αριστερά). Φθορισμός *E. coli* MC1061 κυττάρων που υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση των γονιδίων *rraA* και *rraB*. Μετρήσεις που αντιστοιχούν σε ίδιο αριθμό κυττάρων (δεξιά). Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.



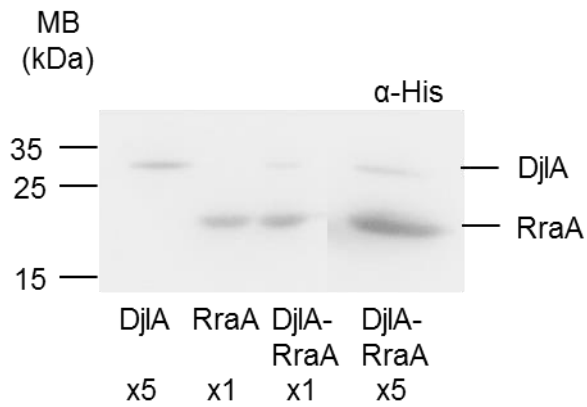
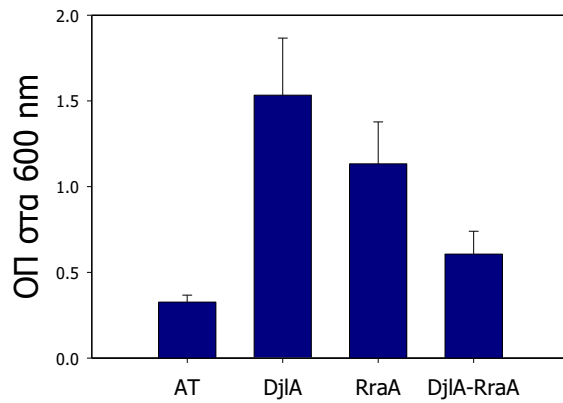
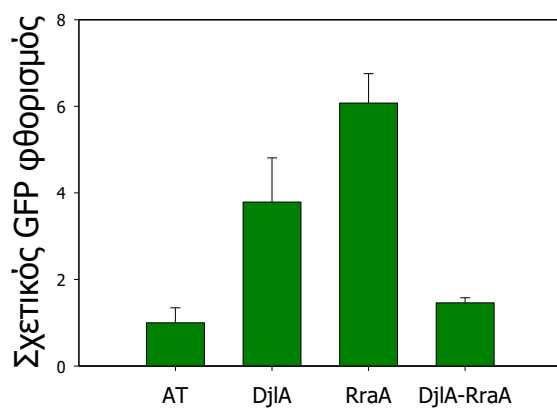
3.4.2. Οι πρωτεΐνες DjIA και RraA λειτουργούν ανεξάρτητα η μία από την άλλη και με μη προσθετικό τρόπο στην βελτίωση της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών

Το επόμενο βήμα ήταν να εξακριβωθεί αν υπάρχει κάποια σύνδεση ανάμεσα στους δύο καταστολείς ή αν αυτοί δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλον. Για αυτό το σκοπό μελετήσαμε την επίδραση της συνέκφρασης των *djIA* και *rraA* στην κυτταροτοξικότητα και υπερπαραγωγή της BR2-GFP σε *rraA*<sup>-</sup> ή *djIA*<sup>-</sup> *E. coli* κύτταρα, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 35A και Β η θετική επίδραση των RraA και DjIA στην υπερπαραγωγή BR2 και στην τελική πυκνότητα της καλλιέργειας παραμένει παρά την απουσία των DjIA και RraA, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η επίδραση κάθε καταστολέα στην υπερπαραγωγή πρωτεϊνών προέρχεται από έναν ανεξάρτητο μηχανισμό.

Τέλος, για να εξεταστεί, αν οι δύο καταστολείς μπορούν να δράσουν αθροιστικά, κλωνοποιήθηκαν και τα δύο γονίδια στον ίδιο φορέα έκφρασης pBAD33 και εξετάστηκε η ταυτόχρονη συμπαραγωγή τους από το δισιστρονικό πλασμίδιο pBADDjIA/RraA στην παραγωγή και στην τοξικότητα της πρωτεΐνης BR2. Αφού βεβαιώθηκε ότι οι πρωτεΐνες παράγονται από αυτό στο πλασμίδιο (Σχήμα 36A), βρέθηκε ότι η ταυτόχρονη συμπαραγωγή των *djIA* και *rraA* αυξάνει την παραγωγικότητα και μειώνει την τοξικότητα, όχι όμως σε βαθμό μεγαλύτερο από το κάθε γονίδιο ξεχωριστά (Σχήμα 36B και Γ). Επομένως, οι δύο καταστολείς δεν μπορούν να δράσουν αθροιστικά υπό αυτές τουλάχιστον τις συνθήκες.

**A****B**

Σχήμα 35. Η DjIA και RraA δρουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη. (Α). Ανάπτυξη *E. coli* κυττάρων που υπερέκφραζαν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση των γονιδίων *djIA* ή *rraA* σε *djIA*<sup>-</sup> ή *rraA*<sup>-</sup> περιβάλλον. (Β). Φθορισμός *E. coli* κυττάρων που υπερέκφραζουν τη χημικρή πρωτεΐνη BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση των γονιδίων *djIA* ή *rraA* σε *djIA*<sup>-</sup> ή *rraA*<sup>-</sup> περιβάλλον. Μετρήσεις που αντιστοιχούν σε ίδιο αριθμό κυττάρων. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

**A****B****Γ**

Σχήμα 36. Ταυτόχρονη συνέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* (SuptoxDR) και η επίδρασή τους την υπερέκφραση της BR2-GFP σε κύτταρα *E. coli* MC1061. (A). SDS-PAGE ανάλυση και ανάλυση ανοσοαποτυπώματος σε λυμένα κύτταρα *E. coli* MC1061

που υπερέκφραζαν τα γονίδια *djlA*, *rraA* ή ταυτόχρονα *djlA* και *rraA* από το δισιστρονικό πλασμίδιο *pBADDjIA/RraA* παρουσία 0.2% αραβινόζης χρησιμοποιώντας ένα αντι-His αντίσωμα. Τα δείγματα κανονικοποιήθηκαν σύμφωνα με την ΟΠ των καλλιεργειών στα 600 nm. (B). Ανάπτυξη *E. coli* MC1061 κυττάρων με το πλασμίδιο *pASKBR2-GFP* και τα πλασμίδια *pBAD33*, *pBAD33DjIA*, *pBAD33RraA* ή το δισιστρονικό πλασμίδιο *pBADDjIA/RraA* παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης και 0.2% αραβινόζης για 16 ώρες στους 25 °C. (Γ). Φθορισμός *E. coli* MC1061 κυττάρων με το πλασμίδιο *pASKBR2-GFP* και τα πλασμίδια *pBAD33*, *pBAD33DjIA*, *pBAD33RraA* ή το δισιστρονικό πλασμίδιο *pBADDjIA/RraA* παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης και 0.2% αραβινόζης για 16 ώρες στους 25 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από ένα πείραμα τριπλών καλλιεργειών και τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

#### 3.4.3. Οι πρωτεΐνη RraA δεν επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2

Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεΐνη RraA λειτουργεί ως αναστολέας της ενεργότητας αποδόμησης του mRNA της RNάσης E. Επομένως, εξετάστηκε το ενδεχόμενο να αυξάνει την παραγωγικότητα της BR2 μέσω σταθεροποίησης των επιπέδων του mRNA του γονιδίου που την κωδικοποιεί. Για αυτό το σκοπό, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο, η οποία αποκάλυψε ότι η συμπαραγωγή του γονιδίου *rraA* δεν επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα (Πίνακας 8). Επομένως, η ευεργετική επίδραση της RraA στην ανασυνδυασμένη παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν οφείλεται σε παρέμβαση στην αποδόμηση του mRNA που κωδικοποιεί την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη-στόχο.

Πίνακας 8. Ποσοτικοποίηση του mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 με PCR στον πραγματικό χρόνο σε κύτταρα *E. coli* MC1061 με το πλασμίδιο pASKBR2-GFP και τα πλασμίδια pBAD33 ή pBAD33RraA παρουσία 0.2 μg/mL ανυδροτετρακυκλίνης και 0.2% αραβινόζης για 4 ώρες στους 25 °C. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από δύο πειράματα τριπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

Δείγμα	mRNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BR2 κανονικοποιημένο σε σχέση με το pBAD33
pBAD33	1
RraA	1.21 ± 0.1

3.4.4. Για την ευεργετική επίδραση της DjIA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών απαραίτητη είναι η ενσωμάτωση πλήρους μήκους DjIA στη μεμβράνη

Για να διερευνηθεί ο ρόλος των διαφορετικών υπομονάδων της DjIA στην παρατηρούμενη βελτίωση κατά την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, κατασκευάστηκαν παραλλαγές DjIA που είχαν περικοπεί, με μία από τις λειτουργικές υπομονάδες της κάθε φορά να απουσιάζει. Έτσι, κατασκευάστηκαν οι εξής παραλλαγές της DjIA: χωρίς το διαμεμβρανικό τμήμα (DjIAΔTMD), χωρίς την κεντρική της υπομονάδα (DjIAΔcentral) και χωρίς την J υπομονάδα (DjIAΔJ) (Σχήμα 37A). Επιπλέον, κατασκευάστηκαν σημειακές μεταλλάξεις της DjIA και έγιναν ανταλλαγές υπομονάδων σε λειτουργικά κρίσιμες περιοχές της πρωτεΐνης. Αρχικά, κατασκευάστηκε η μεταλλαγμένη DjIA(M16R), η οποία βρίσκεται μέσα στο διαμεμβρανικό τμήμα της DjIA. Είναι γνωστό ότι αυτή η μετάλλαξη επιτρέπει τη σωστή ένταξη της πρωτεΐνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli*. Έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία καθώς μειώνει την ενεργοποίηση της αντίδρασης στρες Rcs που προκαλεί η υπερέκφραση της DjIA (Clarke, Holland et al. 1997). Ύστερα, κατασκευάστηκε η μεταλλαγμένη DjIA(H233Q). Αντίστοιχες μεταλλάξεις σε άλλες J πρωτεΐνες οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της J υπομονάδας (Genevaux,

Schwager et al. 2002) και δεν επιτρέπουν τη λειτουργική αλληλεπίδραση με την DnaK (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001). Τέλος, κατασκευάστηκε η χιμαιρική πρωτεΐνη DjIA JDnaJ, στην οποία η J υπομονάδα της DjIA αντικαταστήθηκε από αυτή της DnaJ. Ο σκοπός αυτής της αντικατάστασης ήταν να ελεγχθεί εάν η υπομονάδα J της DnaJ καταφέρνει μπορεί να λειτουργήσει με τρόπο παρόμοιο με την υπομονάδα J της DjIA όταν το N-τελικό άκρο της J πρωτεΐνης που ανήκει βρίσκεται ενσωματωμένο στη μεμβράνη. Οι J υπομονάδες των DjIA και DnaJ ταυτίζονται κατά 31% και είναι 44% παρόμοιες (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001) και έχει δειχθεί ότι σε κάποιες περιπτώσεις έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Genevaux, Schwager et al. 2001).

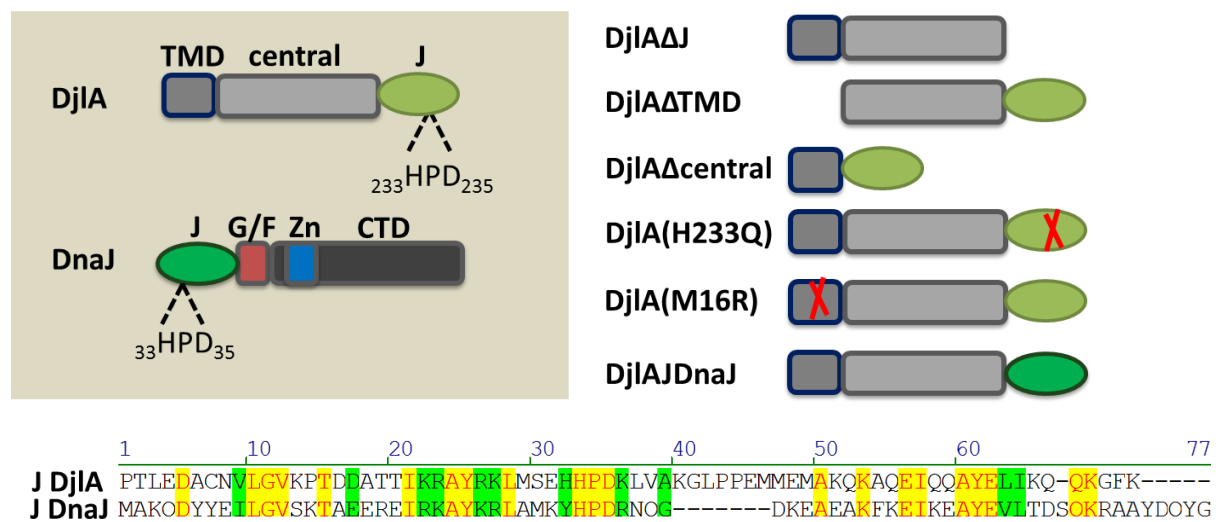
Μετά την κατασκευή των παραπάνω παραλλαγών της DjIA με τον His επίτοπο στο C-τελικό άκρο τους στον φορέα έκφρασης pBAD33 εξετάστηκε η ικανότητά τους να βελτιώνουν την παραγωγικότητα της BR2 και να καταστέλλουν την τοξικότητά της. Καθώς η DjIA είναι γνωστό ότι περιέχει μία υπομονάδα διμερισμού (Toutain, Clarke et al. 2003) όλες οι παραλλαγές εξετάστηκαν σε *djIA*<sup>-</sup> περιβάλλον προκειμένου να αποφευχθεί πιθανός διμερισμός των DjIA παραλλαγών με χρωμοσωμικά παραγόμενη αγρίου-τύπου DjIA. Ενδιαφέρον είναι ότι καμία παραλλαγή της DjIA δεν κατέστειλε την τοξικότητα που προκαλεί η υπερπαραγωγή της BR2 (Σχήμα 37Γ), παρά το γεγονός ότι οι παραλλαγές της DjIA συσσωρεύονταν σε επίπεδα τουλάχιστον ίσα με αυτά της αγρίου-τύπου DjIA με την εξαίρεση της DjIAΔcentral που συσσωρευόταν σε χαμηλότερα, αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα (Σχήμα 37B). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι απαιτείται πλήρους μήκους, ενσωματωμένη στη μεμβράνη DjIA, για να κατασταλεί η τοξικότητα της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Πολύ ενδιαφέρον είναι ότι όλες οι μεταλλάξεις - παραλλαγές της DjIA που περιείχαν μία λειτουργική J υπομονάδα βελτίωναν την συσσώρευση της BR2, όπως καθορίστηκε από μετρήσεις του φθορισμού της BR2-GFP, σε πολύ μικρότερο, όμως, βαθμό σε σχέση με την AT DjIA (Σχήμα 37Δ). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η βελτίωση υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο από την DjIA προέρχεται κυρίως μέσω της J υπομονάδας και ότι η λειτουργική αλληλεπίδραση με την DnaK απαιτείται για αυτή τη βελτίωση.

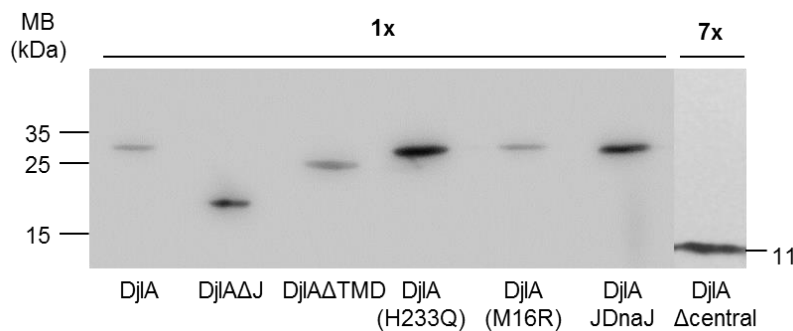
Επίσης, εξετάστηκε αν η μεταλλαγμένη DjIA(H233Q) έχει την ικανότητα να λειτουργεί όπως η AT DjIA. Όπως αναφέρθηκε, μεταλλάξεις στο μοτίβο HPD της DjIA

δεν επιτρέπουν τη λειτουργική αλληλεπίδραση με τη μοριακή συνοδό DnaK (Genevaux, Georgoroulos et al. 2007). Βρέθηκε ότι η DjIA(H233Q) δεν καταστέλλει την τοξικότητα υπερπαραγωγής της BR2 ούτε αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της ανά κύτταρο. Επομένως, η ικανότητα της DjIA να βελτιώνει την υπερπαραγωγή της BR2 εξαρτάται από μια λειτουργική αλληλεπίδραση με την DnaK.

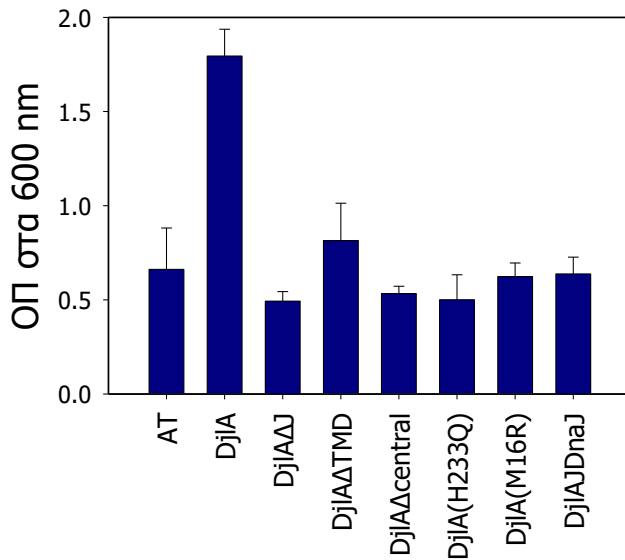
## A



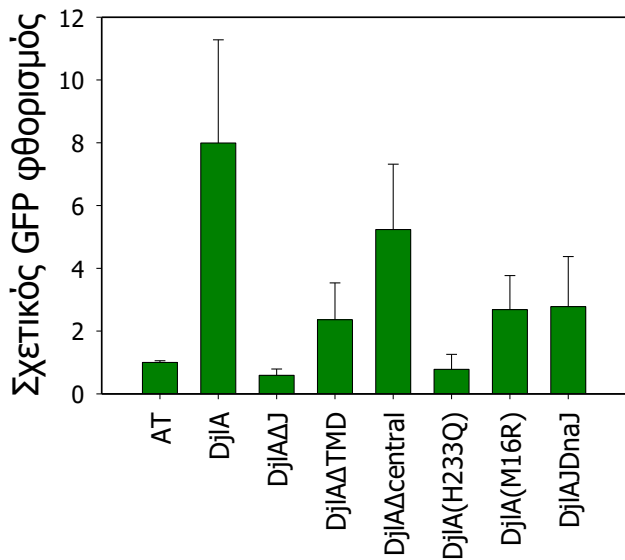
## B



Γ



Δ



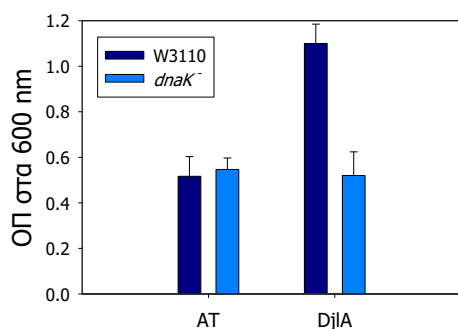
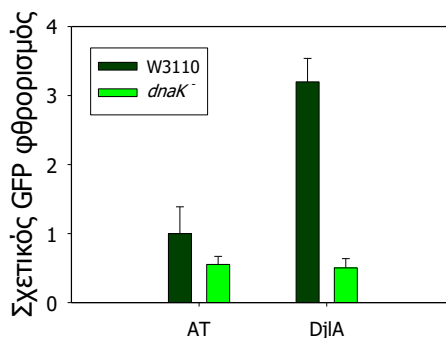
Σχήμα 37. Πλήρους μήκους DjIA προσδεσμένη στη μεμβράνη, ικανή να αλληλεπιδρά με την DnaK είναι απαραίτητη για την ευεργετική επίδραση στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. (Α). Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης των υπομονάδων των DnaJ, DjIA και των εξεταζόμενων DjIA παραλλαγών (πάνω) και σύγκριση/ευθυγράμμιση των J υπομονάδων των DnaJ και DjIA (κάτω). (Β). SDS-PAGE ανάλυση και ανάλυση ανοσοαποτυπώματος λυμένων *E. coli* MC1061 κυττάρων που



υπερέκφραζαν το γονίδιο *djlA* και τους προς εξέταση *djlA* μεταλλαγμένους κλώνους, τα οποία εξετάστηκαν με ένα αντι-His αντίσωμα. (Γ). Ανάπτυξη *E. coli* BW25113 *djlA*<sup>-</sup> κυττάρων που υπερεκφράζουν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση της *djlA* και των προς εξέταση *djlA* μεταλλαγμένων κλώνων. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα τριπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή. (Δ). Φθορισμός *E. coli* BW25113 *djlA*<sup>-</sup> κυττάρων που υπερεκφράζουν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA* και των προς εξέταση *djlA* μεταλλαγμένων κλώνων. Οι μετρήσεις αντιστοιχούν σε ίσο αριθμό κυττάρων. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα τριπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

#### 3.4.5. Επιβεβαίωση του κρίσιμου ρόλου της DnaK για την ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης του γονιδίου *djlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών

Όπως αναφέρθηκε, η ικανότητα της DjlA να βελτιώνει την υπερπαραγωγή της BR2 εξαρτάται από μια λειτουργική αλληλεπίδραση με την DnaK. Για να επιβεβαιωθεί ο ρόλος της DnaK στην ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης της DjlA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δοκιμάστηκε η υπερπαραγωγή του υποδοχέα BR2 και η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* σε περιβάλλον παρουσία και απουσία του γονιδίου *dnaK*. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *E. coli* W3110 και W3110 ΔDnaK52. Η συνέκφραση του γονιδίου *djlA* σε *dnaK*<sup>-</sup> στέλεχος είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη απώλεια της ικανότητας του γονιδίου *djlA* να βελτιώνει την παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών (Σχήμα 38A και B). Επομένως, η DnaK είναι απαραίτητη για την επιθυμητή δράση της συνέκφρασης του *djlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών.

**A****B**

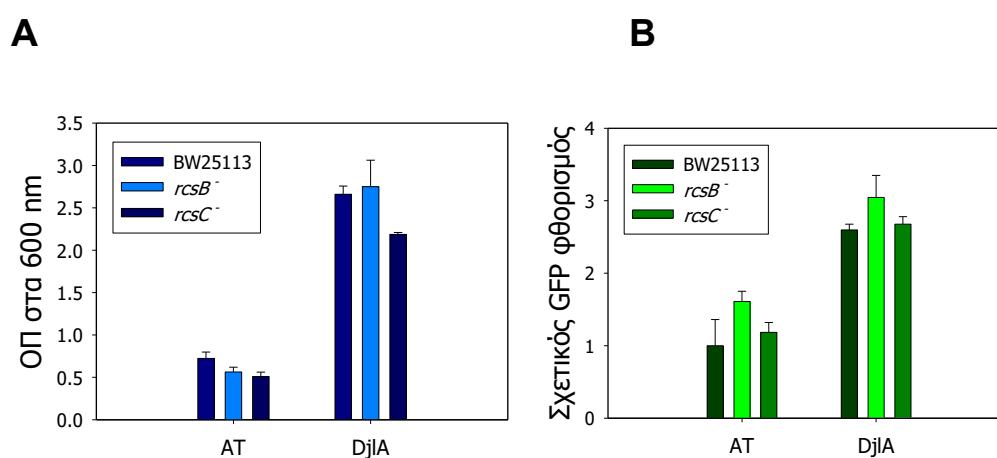
Σχήμα 38. Η DnaK είναι απαραίτητη για την επιθυμητή δράση της συνέκφρασης του *djlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. (A). Ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* W3110 ή *dnaK*<sup>-</sup> που υπερεκφράζουν την BR2-GFP από το πλασμίδιο pASK(KanR)BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA* από το πλασμίδιο pBAD30DjlA. (B). Φθορισμός ίσων όγκων καλλιέργειας *E. coli* W3110 ή *dnaK*<sup>-</sup> που υπερεκφράζουν την BR2-GFP από το πλασμίδιο pASK(KanR)BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA* από το πλασμίδιο pBAD30DjlA. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα τριπλών καλλιιεργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

#### 3.4.6. Η ευεργετική επίδραση της DjIA στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν εξαρτάται από τη ενεργοποίηση της αντίδρασης στρες Rcs

Όπως αναφέρθηκε, η υπερπαραγωγή του *djlA* σε πολλές περιπτώσεις συνεπάγεται την ενεργοποίηση της αντίδρασης Rcs. Για να διαλευκανθεί ο ρόλος της αντίδρασης στρες Rcs στην ευεργετική επίδραση της συνέκφρασης του *djlA* στην υπερπαραγωγή ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών, εξετάσαμε την κυτταροτοξικότητα και παραγωγή της BR2 σε αγρίου τύπου, *rscB*<sup>-</sup> και *rscC*<sup>-</sup> κύτταρα. Η υπερέκφραση της DjIA είναι γνωστό ότι προκαλεί την αντίδραση στρες Rcs και ενεργοποιεί την παραγωγή του κολανικού οξέος (Clarke, Jacq et al. 1996, Kelley and Georgopoulos 1997, Majdalani and Gottesman 2005). Η αντίδραση Rcs πιθανώς βοηθάει τα κύτταρα να επιβιώσουν εκτός του ξενιστή τους (Kelley and Georgopoulos 1997) ή πιθανώς παίζει κάποιο ρόλο στο σχηματισμό βιοφίλμ σε επιφάνειες (Majdalani and Gottesman 2005). Έχει δειχθεί ότι η αντίδραση Rcs απαιτεί την παραγωγική αλληλεπίδραση μεταξύ της DnaK και της DjIA (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001). Επίσης, χωρίς τους παράγοντες RcsB και RcsC το Rcs μονοπάτι δεν μπορεί

να ενεργοποιηθεί (Kelley and Georgopoulos 1997, Conter, Sturny et al. 2002, Ranjit and Young 2013). Η αντίδραση Rcs ενεργοποιείται κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *djlA* από φορέα έκφρασης υψηλού αριθμού αντιγράφων (Clarke, Jacq et al. 1996). Όμως, είναι γνωστό ότι η αντίδραση Rcs μπορεί να ενεργοποιηθεί απλά από διπλασιασμό των επιπέδων της *DjlA* (Clarke, Holland et al. 1997) και είναι πιθανό ότι στις συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος υπάρχει ενεργοποίηση.

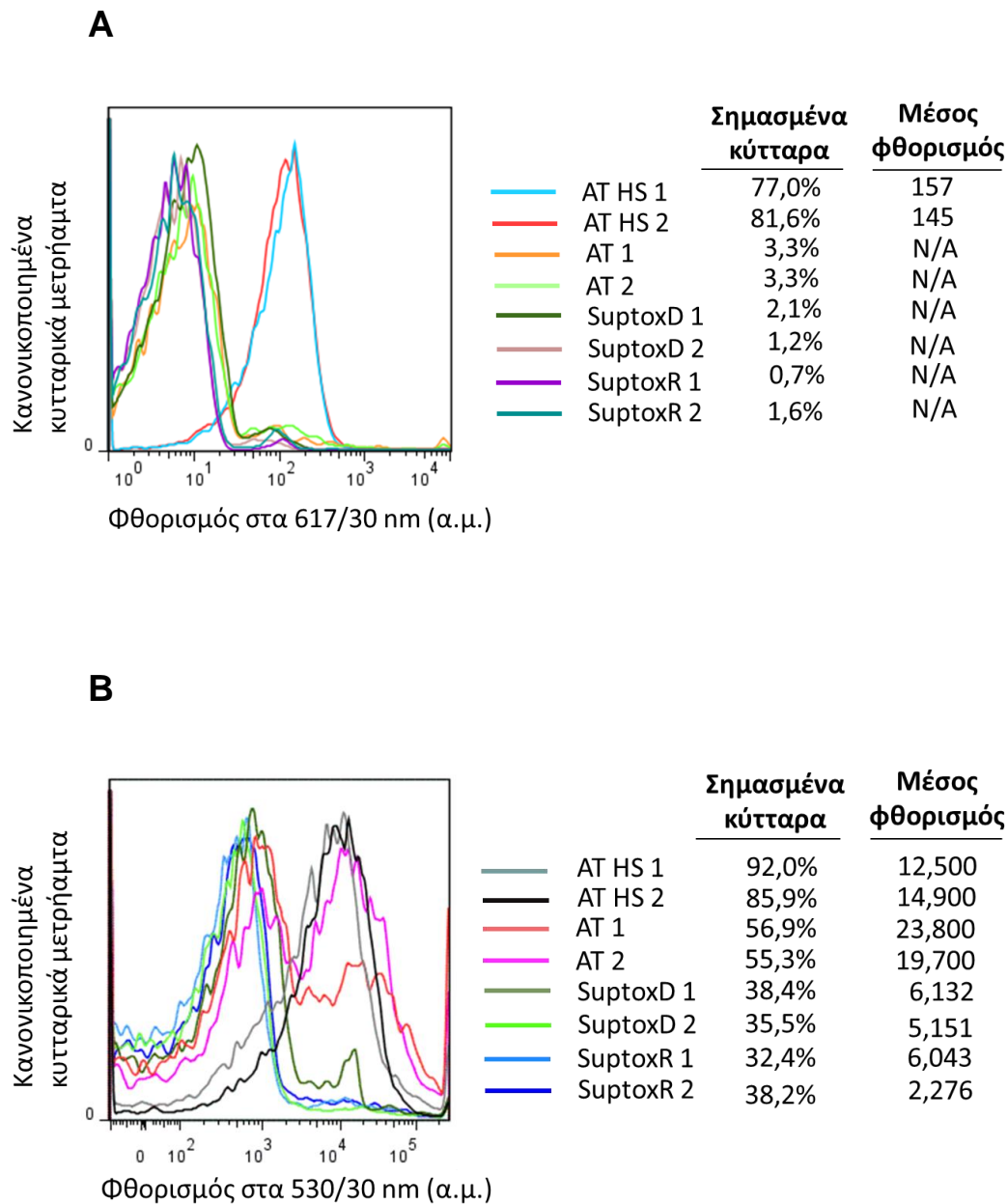
Βρέθηκε ότι η *DjlA* καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα υπερπαραγωγής της BR2 και βελτιώνει τη συσσώρευσή της ανεξάρτητα από την παρουσία των παραγόντων RcsB και RcsC (Σχήμα 39A και B), δείχνοντας επομένως ότι η αντίδραση Rcs δεν είναι απαραίτητη για το μηχανισμό βελτίωσης της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών από την *DjlA* (Gialama, Delivoria et al. 2017).



Σχήμα 39. Η ευεργετική επίδραση της *DjlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν εξαρτάται από τη ενεργοποίηση της αντίδρασης στρες Rcs (A). Ανάπτυξη κυττάρων *E. coli* BW25113 αγρίου τύπου ή *rcsB*<sup>-</sup> ή *rcsC*<sup>-</sup> που υπερεκφράζουν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA*. (B). Φθορισμός κυττάρων *E. coli* BW25113 AT ή *rcsB*<sup>-</sup> ή *rcsC*<sup>-</sup> που υπερεκφράζουν την BR2-GFP με και χωρίς συνέκφραση του γονιδίου *djlA*. Οι αναφερόμενες τιμές αντιστοιχούν στη μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα τριπλών καλλιέργειών και τα σφάλματα στην τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή.

3.4.7. Η υπερέκφραση του BR2 προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη του AT *E. coli*, η οποία μειώνεται σημαντικά στα στελέχη *SuptoxD* και *SuptoxR*. Η ελεγχόμενη έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μονοστιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων θηλαστικών είναι καθοριστικό βιοχημικό σημάδι της απόπτωσης (Fadok, Voelker et al. 1992). Επίσης, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η ανίχνευση της εξωκυτταρικής έκθεσης φωσφατιδυλσερίνης σε κύτταρα *E. coli* που πεθαίνουν από βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά (Dwyer, Camacho et al. 2012), χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής και σημασμένη με φθοροφόρο αννεξίνη V, ένα ανθρώπινο αντιθρομβωτικό που προσδένεται στη φωσφατιδυλσερίνη με υψηλή εξειδίκευση (Martin, Reutelingsperger et al. 1995).

Για να εξεταστεί αρχικά η ακεραιότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης επώαστηκαν κύτταρα που υπερπαραγωγή την πρωτεΐνη BR2 με ή χωρίς συμπαραγωγή των *djlA* και *rraA* με ιωδιούχο προπίδιο, μια χρωστική που περνάει μέσα από διαπερατές μεμβράνες και κάνει χρώση του DNA. Έτσι, με κυτταρομετρία ροής βρέθηκε ότι οι μεμβράνες του *E. coli* δεν γίνονται διαπερατές με την υπερπαραγωγή της BR2 ούτε και με τη συμπαραγωγή των *djlA* και *rraA*, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο για κύτταρα με διαπερατές μεμβράνες από θερμικό σοκ στους 75 °C για 4 λεπτά η χρώση με ιωδιούχο προπίδιο ήταν πάρα πολύ έντονη (Σχήμα 40A). Επομένως, κατά την υπερπαραγωγή της BR2 οι βακτηριακές εσωτερικές μεμβράνες παραμένουν ακέραιες. Ταυτόχρονα, τα ίδια κύτταρα επώαστηκαν και με φθορίζουσα αννεξίνη V. Ο φθορισμός των κυττάρων που είχαν υποστεί το προαναφερθέν θερμικό σοκ, όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν πάρα πολύ αυξημένος. Στα ίδια υψηλά επίπεδα κυμαινόταν και ο φθορισμός των κυττάρων που υπερπαραγωγή μόνο τον υποδοχέα BR2, ενώ κατά τη συμπαραγωγή των *djlA* ή *rraA* ο φθορισμός των κυττάρων μειωνόταν δραματικά (Σχήμα 40B) που δείχνει ότι τα *SuptoxD* και *SuptoxR* κύτταρα είναι πολύ πιο υγιή κατά την υπερπαραγωγή της BR2 σε σχέση με τα AT MC1061 κύτταρα.



Σχήμα 40. Η υπερέκφραση του BR2 προκαλεί έκθεση φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική μεμβράνη αγρίου τύπου *E. coli* MC1061, η οποία μειώνεται σημαντικά στα στελέχη SuptoxD και SuptoxR. (A). Σύγκριση κόκκινου φθορισμού με κυτταρομετρία ροής κυττάρων *E. coli* MC1061 ή SuptoxD ή SuptoxR που έχουν υποστεί χρώση με ιωδιούχο προπίδιο και φθορίζουσα αννεξίνη V μετά από υπερπαραγωγή της BR2 από το φορέα έκφρασης pASK75 με προσθήκη 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ανυδροτετρακυκλίνης για 16 ώρες στους 25 °C. (B). Σύγκριση πράσινου φθορισμού με κυτταρομετρία ροής κυττάρων που αναφέρθηκαν στο (A). HS: θερμικό σοκ. N/A: μη διαθέσιμο. Πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα διπλών καλλιεργειών.

## 4. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Σε αυτή τη εργασία κατασκευάστηκαν στελέχη *E. coli* με την ιδιότητα να υπερπαραγούν μεμβρανικές πρωτεΐνες με δραματικά βελτιωμένη απόδοση λόγω του συνδυασμού της καταστολής της τοξικότητας ή της βελτιωμένης απόδοσης ανά κύτταρο ή του συνδυασμού των παραπάνω. Για αυτό το σκοπό αναλύσαμε μια βιβλιοθήκη πλασμιδίων για γονίδια που κατά τη συνέκφρασή τους καταστέλλουν την τοξικότητα της υπερπαραγωγής της μεμβρανικής πρωτεΐνης μοντέλου, BR2, στο βακτήριο *E. coli*. Πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση της βιβλιοθήκης, η οποία περιέχει όλα τα γνωστά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης του *E. coli*, για την ιδιότητα του ενδιαφέροντος και η ανάλυση κατέληξε στον εντοπισμό δύο νέων παραγόντων που κατά τη συνέκφρασή τους βελτιώνουν την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BR2, τα γονίδια *djlA* και *rraA*. Η *DjlA* είναι ένας ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού DnaK, που είναι ενσωματωμένος στη μεμβράνη και ανήκει στην ίδια οικογένεια Hsp40s με τη DnaJ (Clarke, Jacq et al. 1996, Genevaux, Wawrzynow et al. 2001) και η *RraA* είναι ένας αναστολέας της ριβονουκλεάσης RNάσης E (Lee, Zhan et al. 2003). Η συνέκφραση του κάθε γονιδίου βελτιώνει δραματικά την ανάπτυξη των κυττάρων που υπερεκφράζουν την BR2. Επιπροσθέτως, τα επίπεδα έκφρασης της BR2 αυξάνονται σημαντικά παρουσία των υπερεκφρασμένων *DjlA* και *RraA*. Είναι ιδιαίτερης σημασίας ότι ο αντίκτυπος των δύο παραγόντων στην παραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι γενικός καθώς βελτιώνουν την υπερέκφραση ενός αριθμού άλλων υποδοχέων συζευγμένων με πρωτεΐνες G και άλλων τοξικών ευκαρυωτικών και βακτηριακών μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επίσης, η αύξηση της παραγόμενης ποσότητας μεμβρανικής πρωτεΐνης βρέθηκε να συμβαδίζει με την αύξηση της λειτουργικότητάς της που σημαίνει ότι η επιπλέον παραγόμενη πρωτεΐνη είναι υψηλής ποιότητας.

Κατόπιν, διερευνήθηκε ο μηχανισμός λειτουργίας των δύο καταστολέων της τοξικότητας. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε ο ρόλος των διαφορετικών υπομονάδων της *DjlA* στην επίδραση της υπερπαραγωγής της BR2 και βρέθηκε ότι ολόκληρο το μόριο της *DjlA* απαιτείται για την καταστολή της τοξικότητάς της. Επίσης, η ευεργετική επίδραση της *DjlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών ήταν εξειδικευμένη,

καθώς η υπερέκφραση του γονιδίου *djlA* και όχι αυτή των άλλων *E. coli* γονιδίων που κωδικοποιούν J πρωτεΐνες βρέθηκε να βελτιώνει την υπερπαραγωγή της BR2. Βρέθηκε, επίσης, ότι το διαμεμβρανικό τμήμα της DjIA δεν είναι απλά μια υπομονάδα που την διατηρεί ενσωματωμένη στη μεμβράνη, καθώς ακόμη και μία μόνο μετάλλαξη σημείου στην αλληλουχία που κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό τμήμα αναστέλει την καταστολή της τοξικότητας που επιφέρει η συνέκφραση της DjIA. Η κεντρική υπομονάδα της DjIA παίζει και αυτή πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς η διαγραφή της οδηγεί σε αντίστοιχο αποτέλεσμα. Παράλληλα, αυξάνει σημαντικά την παραγωγή ανά κύτταρο σχεδόν στα επίπεδα της αγρίου τύπου DjIA. Όσον αφορά την εξειδίκευση της J υπομονάδας της DjIA, βρέθηκε να είναι περιορισμένη, καθώς η J υπομονάδα της DnaJ μπορεί εν μέρει να την υποκαταστήσει στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BR2, όχι, όμως, και στην καταστολή της τοξικότητας. Η αντίδραση στρες Rcs που προκαλείται από την υπερπαραγωγή του *djlA* βρέθηκε να μην εμπλέκεται στο μηχανισμό που μελετήθηκε. Αντίθετα, η μοριακή συνοδός DnaK παίζει κρίσιμο ρόλο καθώς απαραίτητη είναι η αλληλεπίδραση με την DjIA προκειμένου να βελτιωθεί η υπερπαραγωγή του BR2. Τέλος, όσον αφορά στο μηχανισμό λειτουργίας της RgaA βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της BR2 βελτιώνεται χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα μεταγραφής της κατά την υπερέκφραση του *rraA*, ενώ η RgaB, ένας δεύτερος αναστολέας της ενεργότητας της RNάσης E, βρέθηκε να μην καταστέλλει την τοξικότητα υπερπαραγωγής της BR2 και να μην αυξάνει τα επίπεδα έκφρασής της.

Σε αυτή την εργασία, για τον εντοπισμό καταστολέων για την τοξικότητα που προκαλείται από την υπερπαραγωγή μεμβρανικής πρωτεΐνης περιγράφεται μια απλή ανάλυση χωρίς την απαίτηση εξοπλισμού υψηλού κόστους. Το πλεονέκτημα του συστήματος της συνέκφρασης γονιδίων είναι ότι είναι εύκολο και χαμηλού κόστους να εντοπιστεί ο παράγοντας που εμπλέκεται στη διαδικασία χωρίς την ανάγκη να αλληλουχηθούν ολόκληρα γονιδιώματα όπως στην περίπτωση της κατευθυνόμενης εξέλιξης.

Στο παρελθόν, αναλύσεις που περιλάμβαναν χιμαιρικές πρωτεΐνες μεμβρανικών πρωτεϊνών με πρωτεΐνες που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί, για να εντοπιστούν ή να κατασκευαστούν

βακτηριακά στελέχη με βελτιωμένα επίπεδα υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο (Linares, Geertsma et al. 2010, Skretas and Georgiou 2010). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι χιμαιρικές πρωτεΐνες κατασκευάστηκαν με τέτοιο τρόπο που τα επίπεδα παραγωγής της χιμαιρικής πρωτεΐνης συσχετίζονταν με την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, ενώ σε αυτή την εργασία οι χιμαιρικές πρωτεΐνες κατασκευάστηκαν, για να βεβαιωθεί ότι παράγεται η πλήρους μήκους μεμβρανική πρωτεΐνη και ότι το C τελικό της άκρο βρίσκεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Για την ελαχιστοποίηση του αριθμού των εσφαλμένα θετικών αποτελεσμάτων, σε μια ανάλυση όπως αυτή που διεξήχθη στην παρούσα εργασία, το βασικό πλεονέκτημα στην πρωτεϊνική χίμαιρα είναι η πρωτεΐνη με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό να είναι κυτταροπλασματική, όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε. Ο λόγος είναι ότι καθώς οι μεμβρανικές πρωτεΐνες χρησιμοποιούν το μονοπάτι SRP στο *E. coli* (Luirink, von Heijne et al. 2005) και συγκεκριμένα τουλάχιστον ένα GPCR έχει δειχθεί να ακολουθεί αυτό το μονοπάτι (Raine, Ullers et al. 2003) υπάρχει κατά πάσα πιθανότητα συν-μεταφραστική στόχευση του υποδοχέα BR2 στη μεμβράνη. Επομένως, η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό παράγεται αφού η μεμβρανική πρωτεΐνη έχει παραχθεί και ενταχθεί επιτυχώς στη μεμβράνη. Τα εσφαλμένα θετικά αποτελέσματα θα μπορούσαν να προκύψουν με μια περιπλαστική πρωτεΐνη με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό πιο εύκολα, αφού πρώτα θα παραγόταν η πρωτεΐνη που δίνει την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό και μετά θα μπορούσαν να ακολουθούν περικομμένες μορφές της μεμβρανικής πρωτεΐνης, λιγότερο τοξικές για το βακτήριο. Έτσι θα επιβίωνε το βακτήριο χωρίς να παράγει μικρό ή μεγαλύτερο μέρος του υποδοχέα.

Στη βιβλιογραφία η τοξικότητα της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών έχει αποδοθεί σε διαφορετικά προβλήματα. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, έχει προταθεί ότι η τοξικότητα αυτή οφείλεται στις ιδιότητες των ίδιων των μεμβρανικών πρωτεϊνών που μπορεί να είναι βιοχημικές ή διαμορφωτικές (Gubellini, Verdon et al. 2011). Για την υποστήριξη αυτής της θεωρίας, μεταλλάξεις της μεμβρανικής πρωτεΐνης περμεάσης της λακτόζης από το βακτήριο *E. coli* βρέθηκαν να προκαλούν τοξικότητα σε κύτταρα που την υπερεκφράζουν. Αυτό είναι μια επιπλέον ένδειξη ότι οι ιδιότητες της ίδιας της μεμβρανικής πρωτεΐνης ευθύνονται



για την τοξικότητα (Stewart, Bailey et al. 1998). Όμως, τουλάχιστον για την πρωτεΐνη BR2 και έναν αριθμό από άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες και τοπολογίες η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ανά κύτταρο και ταυτόχρονα καταστέλλει την τοξικότητα υπερπαραγωγής πρωτεϊνών. Επιπλέον, τα στελέχη *E. coli* C41(DE3) και C43(DE3) ξεπερνούν την τοξικότητα της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς τα επίπεδα έκφρασης της T7 RNA πολυμεράσης είναι μειωμένα σε σχέση με αυτά των κυττάρων BL21(DE3). Στο στέλεχος Lemo21(DE3) η ποσότητα της T7 RNA πολυμεράσης μπορεί να ρυθμιστεί ακριβώς για κάθε στόχο και έχει προταθεί ότι αυτή η προσαρμογή οδηγεί στην εναρμόνιση της μετάφρασης και της ένταξης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη (Wagner, Klepsch et al. 2008). Με παρόμοιο τρόπο οι τοξικές παρενέργειες της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορούν να μετριαστούν χρησιμοποιώντας τη «συγκρατημένη έκφραση». Σε αυτό το σύστημα η T7 RNA πολυμεράση είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή αραβινόζης στο χρωμόσωμα και το γονίδιο – στόχος ελέγχεται από τον ισχυρό T7lac υποκινητή. Η συγκρατημένη έκφραση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας πολύ χαμηλές ποσότητες αραβινόζης για την παραγωγή πολύ χαμηλών επιπέδων T7 RNA πολυμεράσης και χωρίς IPTG για την παραγωγή πολύ χαμηλών επιπέδων του mRNA στόχου (Narayanan, Ridilla et al. 2011). Αντίθετα, η συνέκφραση των γονιδίων *djlA* και *rraA* έχει δοκιμαστεί κάτω από τον έλεγχο διαφορετικών υποκινητών και έχει βρεθεί ότι λειτουργούν ανεξάρτητα από το φορέα έκφρασης που χρησιμοποιείται, που σημαίνει ότι ο μηχανισμός λειτουργίας τους δεν περιλαμβάνει ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου – στόχου.

Επίσης, πολύ πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η μοριακή αναγνώριση υπερέκφρασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών από παράγοντες του *E. coli* που τις υπερπαραγάγει είναι κρίσιμη για την επιτυχία της ετερόλογης υπερπαραγωγής τους (Hatahet, Blazyk et al. 2015). Αυτό είναι φανερό, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, από προσπάθειες υπερέκφρασης βακτηριακών και ευκαρυωτικών VKORs στο βακτήριο *E. coli*. Η επιτυχής υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών βασίζεται στην αναγνώρισή τους από την ιντεγκράση μεμβρανικών πρωτεϊνών YidC. Βακτηριακές VKORs αναγνωρίζονται από αυτήν, εντάσσονται σωστά στην κυτταροπλασματική

μεμβράνη και συσσωρεύονται σε υψηλά επίπεδα χωρίς να προκαλούν τοξικότητα στο βακτήριο. Οι ευκαρυωτικές VKORs από θηλαστικά, όμως, που περιέχουν πιο «ξένες» για τους παράγοντες του βακτηρίου αλληλουχίες, δεν μπορούν να αναγνωριστούν σωστά από την YidC και η υπερέκφρασή τους προκαλεί τοξικότητα, παρά το γεγονός ότι συσσωρεύονται σε χαμηλά επίπεδα. Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι αλλαγές στην αλληλουχία των προβληματικών VKORs ή στην YidC επιτρέπουν σωστή αναγνώριση ανασυνδυασμένων μεμβρανικών πρωτεϊνών από το μηχανισμό ένταξης στη μεμβράνη, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή σε κάποιο βαθμό της τοξικότητας και τη δραματική αύξηση της συσσώρευσης των VKORs από θηλαστικά στο *E. coli* (Hatahet, Blazyk et al. 2015). Επομένως, σε συμφωνία με αυτή τη δημοσίευση προτείνεται ότι η τοξικότητα οφείλεται και στο κύτταρο που χρησιμοποιείται για υπερέκφραση και στο γονίδιο που υπερεκφράζεται, δηλαδή στη μεταξύ τους «επικοινωνία». Έτσι, κατάλληλη τροποποίηση είτε του κυττάρου είτε του γονιδίου μπορούν να οδηγήσουν σε καταστολή της τοξικότητας και βελτίωση της υπερπαραγωγής του γονιδίου που προκαλεί τοξικότητα στο βακτήριο.

Η DjlA , όπως αναφέρθηκε, είναι μια από τις έξι J πρωτεΐνες του *E. coli*. Οι υπόλοιπες είναι οι DnaJ, CbrA, HscB, DjlB και DjlC. Από αυτές οι DjlA, DnaJ και CbrA είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν λειτουργικά με την μοριακή συνοδό DnaK (Genevaux, Georgopoulos et al. 2007). Για κάποιες J πρωτεΐνες υπάρχει πλεονασμός στις λειτουργίες (Genevaux, Schwager et al. 2001), ενώ για άλλες υπάρχουν λειτουργίες που δεν είναι αλληλοεπικαλυπτόμενες (Clarke, Holland et al. 1997, Kelley and Georgopoulos 1997). Η υπερέκφραση της DjlAΔTM μπορεί να συμπληρώσει την ταυτόχρονη απενεργοποίηση των DnaJ και CbrA σε υψηλές θερμοκρασίες, που διαφορετικά δεν επιτρέπει την επιβίωση του βακτηρίου (Clarke, Holland et al. 1997). Σε αντίθεση με την DnaJ, η DjlA δεν μπορεί να λειτουργήσει ως μοριακή συνοδός από μόνη της, και η ικανότητά της να ενεργοποιεί την DnaK βασίζεται στην αλληλεπίδραση με την DnaK, στην οποία βασικό ρόλο παίζει το μοτίβο HPD της J υπομονάδας της στο C τελικό της άκρο (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001).

Από τις J πρωτεΐνες στο *E. coli*, που μπορούν να παραχθούν σε πλήρους μήκους μορφή, η ικανότητα να βελτιώνει την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι ειδική για την DjlA. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα

αποτελέσματα της ανάλυσης της βιβλιοθήκης ASKA. Η DjIA είναι δομικά μοναδική ανάμεσα στις J πρωτεΐνες του *E. coli* (Ohnishi, Mizunoe et al. 2004), καθώς είναι η μοναδική που περιέχει ένα διαμεμβρανικό τμήμα στο N τελικό της άκρο και πιθανώς αυτός είναι ο λόγος που η DjIA είναι η μόνη μεμβρανική J πρωτεΐνη που μπορεί να υπερεκφραστεί κάτω από τις συνθήκες που δοκιμάστηκαν.

Πολύ ενδιαφέρον είναι ότι η αντικατάσταση της υπομονάδας J της DjIA από την αντίστοιχη της DnaJ οδήγησε σε κάποια αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BR2 χωρίς όμως καταστολή της τοξικότητας στα κύτταρα που την υπερεκφράζουν, παρά την 31% ταυτόσημη αλληλουχία τους και ένα συντηρημένο HPD μοτίβο, το οποίο βρίσκεται στις J πρωτεΐνες (Genevaux, Georgopoulos et al. 2007, Kampinga and Craig 2010). Αντίθετα, *in vivo* αναλύσεις λειτουργικής συμπλήρωσης της χιμαιρικής πρωτεΐνης DnaJ με τη J υπομονάδα της DjIA έδειξαν ότι η J υπομονάδα της DjIA μπορεί να αντικαταστήσει πλήρως την J υπομονάδα της DnaJ (Genevaux, Schwager et al. 2001).

Για να εξεταστεί ο ρόλος του διαμεμβρανικού τμήματος της DjIA στο βελτιωμένο φαινότυπο της υπερπαραγωγής της BR2, κατασκευάστηκε η μετάλλαξη M16R που δεν επηρεάζει τη σταθερότητα, τον εντοπισμό ή την τοπολογία της DjIA (Clarke, Holland et al. 1997). Επίσης αυτή η μετάλλαξη δεν εμποδίζει το διαμεμβρανικό τμήμα να λειτουργεί ως υπομονάδα διμερισμού (Toutain, Clarke et al. 2003). Η μετάλλαξη M16R, όμως, εμποδίζει εντελώς την ικανότητα της DjIA να καταστέλλει την τοξικότητα υπερπαραγωγής της BR2 και επηρεάζει αποτελεσματικά την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BR2 ανά κύτταρο. Είναι πιθανό ότι το διαμεμβρανικό τμήμα είναι σημαντικό για την κατάλληλη αλληλεπίδραση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων της DjIA, σε περίπτωση που η DjIA όντως διμερίζεται *in vivo*. Άλλη μια πιθανότητα είναι ότι το διαμεμβρανικό τμήμα της DjIA μπορεί να αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Άλλωστε, το διαμεμβρανικό τμήμα της DjIA περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο GxxxG που επαναλαμβάνεται τουλάχιστον τρεις φορές σε ομόλογες DjIA στα βακτήρια *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Coxiella burnetti* και άλλα παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο και τα φυτά και έχει προταθεί ότι παίζει κάποιο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες (Toutain, Clarke

et al. 2003, Teese and Langosch 2015). Άλλη μια πιθανότητα είναι ότι η *DjlA* αλληλεπιδρά με την μεμβρανική πρωτεΐνη που υπερέκφράζεται ή ακόμη και με το τρανσλοκόνιο. Πιθανώς, η *DjlA* απαλείφει τον κορεσμό του τρανσλοκονίου που πιθανώς προκύπτει από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών (Klepsch, Persson et al. 2011).

Προκύπτει βέβαια το ερώτημα γιατί μέχρι τώρα ο κρίσιμος ρόλος της *DjlA* στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών δεν είχε εντοπιστεί. Η σημασία του ρόλου της *DjlA* είναι προφανής δεδομένου ότι για υψηλές θερμοκρασίες η *DjlA* είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των κυττάρων σε περιβάλλον χωρίς *DnaJ* (Genevaux, Schwager et al. 2001). Καθώς, όπως αναφέρθηκε, η υπερέκφραση του *djlA* είναι τοξική για το *E. coli* από πλασμίδια υψηλού αριθμού αντιγράφων (Genevaux, Schwager et al. 2001) δεν είναι πιθανώς αναμενόμενο ότι μια τέτοια πρωτεΐνη θα μπορούσε να λειτουργεί ως καταστολέας της τοξικότητας για οποιαδήποτε τοξική διεργασία. Και μάλιστα μόνο χαμηλή συγκέντρωση επαγωγέα από πλασμίδιο χαμηλού αριθμού αντιγράφων απαιτείται για τη βελτίωση της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επίσης, στα AT κύτταρα υπάρχουν μόνο λίγα αντίγραφα της *DjlA* στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Clarke, Holland et al. 1997) και πιθανώς δεν είναι αναμενόμενο να έχουν τόσο σημαντική επίδραση στην υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα ότι η *DjlA* είναι ένας καταστολέας της τοξικότητας της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών είναι ενδεικτικό της δύναμης της προσέγγισης συστημικής βιοτεχνολογίας που χρησιμοποιήθηκε.

Είναι ενδιαφέρον ότι ούτε το γονίδιο *djlA* ούτε το *rraA* δεν εντοπίστηκαν στις γενετικές αναλύσεις μιας γονιδιακής βιβλιοθήκης του *E. coli* (Skretas, Makino et al. 2012) και της βιβλιοθήκης ASKA (Skretas and Georgiou 2010) που διεξήχθησαν στο παρελθόν με σκοπό την εύρεση γονιδίων που βελτιώνουν την υπερπαραγωγή των μεμβρανικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στους παρακάτω λόγους. Αυτά τα συστήματα δεν ήταν σχεδιασμένα να εντοπίζουν καταστολείς της τοξικότητας της υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών. Επίσης, η υπερέκφραση του *djlA* έχει δειχθεί να είναι τοξική για το *E. coli* από πλασμίδια υψηλού αριθμού αντιγράφων (Genevaux, Schwager et al. 2001) καθώς και η περιοριστική ενδονουκλεάση *FatI* που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της γενομικής DNA

βιβλιοθήκης που αναφέρθηκε κόβει την αλληλουχία του *djlA* γονιδίου σε δύο σημεία και επομένως, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μην υπάρχει το πλήρες μήκος γονίδιο στη βιβλιοθήκη. Τέλος, είναι γνωστό ότι γενετικές αναλύσεις διαφορετικών συστημάτων με διαφορετικό σχεδιασμό και πειραματικές συνθήκες μπορούν να καταλήξουν στον εντοπισμό διαφορετικών γονιδίων με τις επιθυμητές ιδιότητες. Συγκριτικά με τις προηγούμενες εντοπισμένες πρωτεΐνες που βελτιώνουν τη βακτηριακή ανασυνδυασμένη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, FtsH (Link, Skretas et al. 2008), YbaB, YciQ, GlpQ (Skretas and Georgiou 2010), NagD, PtsN-YhbJ-Npr και NlpDD(349-380) (Skretas, Makino et al. 2012), οι πρωτεΐνες DjIA και RraA είναι το ίδιο ή και περισσότερο αποδοτικές από τις πιο αποδοτικές από αυτές τις πρωτεΐνες, ενώ ταυτόχρονα έχουν ευεργετική επίδραση στην υπερπαραγωγή περισσότερων μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Παρόλο που υπάρχει η πιθανότητα η DjIA να εμπλέκεται έμμεσα στην ένταξη των πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli*, δεν θα ήταν έκπληξη αν ο ρόλος της ήταν άμεσος. Πολλές πρωτεΐνες J είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στη βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών και στη μετατόπιση πρωτεϊνών σε διάφορους οργανισμούς. Παράδειγμα μιας J πρωτεΐνης που εμπλέκεται απαραίτητως στη βιογένεση μιτοχονδριακών μεμβρανικών πρωτεϊνών στις ζύμες είναι η Djrp1 (Pacic, Elbaz-Alon et al. 2013) και παράδειγμα πρωτεΐνης θηλαστικών Hsp40 ενεργοποιητή μοριακής συνοδού εμπλεκόμενης απαραίτητως στη βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου είναι η πρωτεΐνη ERj1p (Dudek, Greiner et al. 2005). Επίσης, η πρωτεΐνη Sec63p στις ζύμες έχει δειχθεί να είναι απαραίτητη για μετατόπιση πρωτεϊνών σε ανασυστημένο πρωτεολιπόσωμα (Brodsky and Schekman 1993). Στο βακτήριο *E. coli* η ταυτόχρονη συνέκφραση των DnaK και DnaJ βελτίωσε την ενσωματωμένη στη μεμβράνη απόδοση της πρωτεΐνης CorA, του σημαντικότερου μεταφορέα μαγνησίου στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του *E. coli* (Chen, Song et al. 2003) και του ανθρώπινου κεντρικού υποδοχέα κανναβινοειδών (CB1) (Link, Skretas et al. 2008).

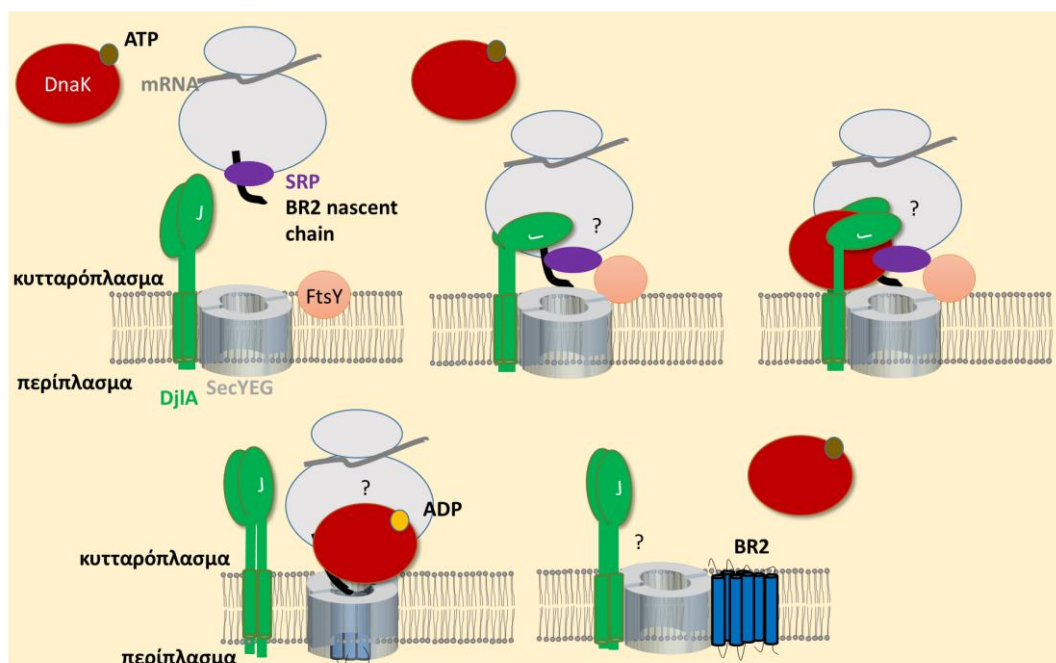
Σε αυτή την εργασία δείχθηκε ότι η ικανότητα της DjIA να καταστέλλει την τοξικότητα της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών και να βελτιώνει την συσσώρευσή τους ανά κύτταρο εξαρτάται απόλυτα από μία λειτουργική

αλληλεπίδραση με την DnaK. Όπως αποκαλύφθηκε από συγκρίσεις με άλλες *E. coli* J πρωτεΐνες και από παραλλαγές με αλλαγμένες υπομονάδες, μια λειτουργική J υπομονάδα είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της κυτταρικής συσσώρευσης μεμβρανικών πρωτεϊνών, όμως, όχι επαρκής.

Επίσης, σε αναλογία με την DnaK, η ευκαρυωτική πρωτεΐνη Bir, μια μοριακή συνοδός Hsp70 που βρίσκεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, μεταφέρεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου σε ριβοσώματα που μεταφράζουν (Dudek, Greiner et al. 2005). Η DnaK είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που πιθανώς εμπλέκεται στην εξαγωγή πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα, ενώ η Bir (Kar2p στις ζύμες) βρίσκεται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου και εμπλέκεται στην εισαγωγή πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Lyman and Schekman 1995, Lyman and Schekman 1997). Όμως, η πρωτεΐνη Bir και οι ενεργοποιητές της είναι επίσης γνωστό ότι εμπλέκονται και στην εξαγωγή πρωτεϊνών που δεν είναι σωστά αναδιπλωμένες στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (Plempner, Bohmler et al. 1997). Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας υποδηλώνουν ότι είναι πολύ πιθανό ότι ο ρόλος της μεταφοράς στη μεμβράνη των Hsp70 και Hsp40 πρωτεϊνών είναι συντηρημένος σε ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Για όλους του παραπάνω λόγους προτείνουμε ότι υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του συμπλόκου DjlA-DnaK με τη μεμβρανική πρωτεΐνη – στόχο. Προτείνουμε το εξής μοντέλο: Πρώτα, η J υπομονάδα της DjlA αναγνωρίζει την νέα αλυσίδα της παραγόμενης μεμβρανικής πρωτεΐνης καθώς αναφαίνεται από το ριβόσωμα. Κατόπιν, η DjlA παρουσιάζει αυτό το σύμπλοκο στην DnaK και ενεργοποιεί την ενεργότητα ATPάσης της DnaK, που προκαλεί την κατάλληλη διαμορφωτική αλλαγή και επιτρέπει την πρόσδεση της DnaK στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Τέλος, η πρωτεΐνη DjlA αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική πρωτεΐνη – στόχο μέσω του διαμεμβρανικού της τμήματος και διευκολύνει την ένταξη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli* με τρόπο που εξαρτάται από την DnaK. Η καταστολή της τοξικότητας από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών μεσολαβείται κυρίως από αυτό το τελευταίο βήμα ένταξης,

ενώ η βελτίωση των επιπέδων παραγωγής μεμβρανικής πρωτεΐνης από τις ιδιότητες του συμπλόκου DjIA-DnaK (Σχήμα 41).



Σχήμα 41. Μοντέλο αλληλεπίδρασης του συμπλόκου DjIA-DnaK με τη μεμβρανική πρωτεΐνη – στόχο. Αρχικά, η J υπομονάδα της DjIA αναγνωρίζει την νέα αλυσίδα της παραγόμενης μεμβρανικής πρωτεΐνης καθώς αναφαιίνεται από το ριβόσωμα. Κατόπιν, η DjIA παρουσιάζει αυτό το σύμπλοκο στην DnaK και ενεργοποιεί την ενεργότητα ATPάσης της DnaK, που προκαλεί την κατάλληλη διαμορφωτική αλλαγή και επιτρέπει την πρόσδεση της DnaK στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Τέλος, η πρωτεΐνη DjIA αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική πρωτεΐνη – στόχο μέσω του διαμεμβρανικού της τμήματος και διευκολύνει την ένταξη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli* με τρόπο που εξαρτάται από την DnaK.

Άλλωστε, υπάρχουν ενδείξεις στη βιβλιογραφία που δείχνουν ότι η DnaK έχει κάποιο ρόλο κοντά στη μεμβράνη. Η τεχνική της ανοσοχρυσής χρώσης της DnaK σε κύτταρα *E. coli* έδειξε ότι υπάρχει ένα ποσοστό της συνολικής κυτταρικής ποσότητας της DnaK, περίπου 25%, το οποίο είναι συνδεδεμένο με τη μεμβράνη (Bukau, Reilly et al. 1993), ενώ περίπου 11% των πρωτεϊνών-πελατών της DnaK είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες (Calloni, Chen et al. 2012), και έχει προταθεί ένας ενεργός ρόλος της DnaK στην βιογένεση μεμβρανικών πρωτεϊνών (Castanie-Cornet, Bruel et al. 2014). Επιλέον, η DnaK έχει καταγραφεί ότι προσδένεται σε πρόδρομες πρωτεΐνες της

εξωτερικής μεμβράνης και προάγει την έκκρισή τους σε *E. coli* κύτταρα *secA*<sup>-</sup> (Qi, Hyndman et al. 2002). Τέλος, αυτός ο ρόλος της DnaK μπορεί να είναι συντηρημένος σε διαφορετικά βακτηριακά είδη, καθώς μετά από στρες που προέκυψε από βραχυπρόθεσμη έκθεση σε αιθανόλη η DnaK βρέθηκε στη μεμβράνη του βακτηρίου *Bacillus subtilis* (Seydlova, Halada et al. 2012).

Ο δεύτερος καταστολέας της τοξικότητας, RraA, είναι, όπως αναφέρθηκε, αναστολέας της ενεργότητας της RNάσης E που εμπλέκεται στην αποδόμηση του mRNA και στην επεξεργασία των RNA στο βακτήριο *E. coli* (Lee, Zhan et al. 2003). Ο ρόλος της διαλευκάνθηκε μετά από εντοπισμό της σε μία ανάλυση για γονίδια των οποίων η υπερέκφραση οδηγεί σε βελτιωμένη ενεργότητα ισομερισμού των δισουλφιδικών δεσμών μέσω σταθεροποίησης του mRNA της ισομεράσης δισουλφιδικών δεσμών, DsbC (Lee, Zhan et al. 2003). Η πιθανότητα ότι η RraA βελτιώνει την απόδοση του BR2 σταθεροποιώντας το mRNA της, όπως στην περίπτωση της DsbC, έχει αποκλειστεί μέσω ανάλυσης PCR στον πραγματικό χρόνο. Άλλωστε, η αύξηση των επιπέδων mRNA μπορεί να είναι προβληματική για την υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών καθώς πιθανώς οδηγεί σε κορεσμό του τρανσλοκονίου (Wagner, Klepsch et al. 2008, Schlegel, Lofblom et al. 2012). Η αφθονία του RNA αλλάζει συνολικά με την υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* και επομένως ο μηχανισμός της μετέπειτα βιογένεσης στη μεμβράνη παραμένει για διαλεύκανση. Η υπερέκφραση του *rraA* έχει δειχθεί να επηρεάζει συνολικά τα επίπεδα πάνω από 2,000 διαφορετικών mRNAs στο βακτήριο *E. coli* (Lee, Zhan et al. 2003).

Ενδιαφέρον είναι ότι στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί με ανάλυση microarray ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *rraA* άλλαξε τα επίπεδα mRNA παραγόντων που εμπλέκονται στον αναερόβιο μεταβολισμό όπως και στη βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου (Lee, Zhan et al. 2003). Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, καθώς η ριβονουκλέαση RNase E είναι γνωστό ότι προσδένεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Liou, Jane et al. 2001). Η καταπόνηση της κυτταρικής μεμβράνης και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν βρεθεί να είναι συνέπειες της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών (Wagner, Baars et al. 2007). Προτείνουμε ότι η συνέκφραση του γονιδίου



*rraA* καταστέλλει την τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών και προάγει την αύξηση των επιπέδων της μεμβρανικής πρωτεΐνης χωρίς απευθείας αλληλεπίδραση με τη μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχο ή με το mRNA που την κωδικοποιεί, αλλά με έναν έμμεσο τρόπο που περιλαμβάνει σταθεροποίηση του mRNA και αύξηση των επιπέδων άλλων παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγικότητα και πιθανώς εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του κυτταρικού φακέλου και/ή στον αναερόβιο μεταβολισμό. Καθώς η υπερέκφραση του *rraB* δεν είχε αντίστοιχα αποτελέσματα με το γονίδιο *rraA* πρέπει να αναζητηθούν αυτοί οι παράγοντες ανάμεσα στο υποσύνολο των 370 βακτηριακών γονιδίων, των οποίων το mRNA ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη RraA και όχι από την RraB (Gao, Lee et al. 2006).

Για κάποιες πρωτεΐνες η DjlA λειτουργεί καλύτερα από την RraA ή το αντίστροφο, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η DjlA και η RraA λειτουργούν μέσω διαφορετικών μηχανισμών όπως φάνηκε και από την συνέκφραση του *djlA* σε περιβάλλον *rraA*<sup>-</sup> και του *rraA* σε περιβάλλον *djlA*<sup>-</sup>. Όμως, είδαμε ότι ο συνδυασμός της υπερέκφρασης του *djlA* και του *rraA* τουλάχιστον στην περίπτωση της πρωτεΐνης BR2 δεν έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω βελτίωση της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Παρόλο που η ταυτόχρονη ενεργοποίηση και των δύο μηχανισμών δεν αναιρεί το αποτέλεσμα, η αύξηση της απόδοσης είναι μεγαλύτερη για κάθε καταστολέα ξεχωριστά. Πιθανώς αυτό οφείλεται σε κοινούς παράγοντες που εμπλέκονται και στους δύο μηχανισμούς, οι οποίοι κατά την ταυτόχρονη υπερπαραγωγή των δύο καταστολέων δεν μπορούν να «εξυπηρετήσουν» και τους δύο μηχανισμούς, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της αύξησης της συνολικής απόδοσης. Άλλη πιθανή αιτία για τη μη αθροιστική δράση της DjlA με την RraA στην υπερπαραγωγή της BR2 είναι ότι και τα δύο υπερεκφραζόμενα γονίδια μεταγράφονται σε κοινό μόριο mRNA με το γονίδιο *djlA* να βρίσκεται στο 5' άκρο της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του mRNA και να ακολουθεί το γονίδιο *rraA*. Η μετάφραση του *rraA* από μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων χωρίς ελεύθερο το 5' άκρο της ίσως επηρεάζει την παραγωγή της RraA και πιθανώς και τη θέση της στο κύτταρο. Άλλωστε, από το γονιδίωμα του *E. coli* το γονίδιο *rraA* εκφράζεται από το δικό του υποκινητή σε ένα μόριο RNA (Zhao, Zhou et al. 2006). Ο μηχανισμός λειτουργίας των δύο καταστολέων χρειάζεται περαιτέρω διαλεύκανση.

## 5. Συμπεράσματα-Μελλοντικές προτάσεις

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να κατασκευαστούν στελέχη *E. coli* που ξεπερνούν την τοξικότητα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Με την ανάπτυξη της κατάλληλης γενετικής ανάλυσης της βιβλιοθήκης ASKA, μιας βιβλιοθήκης πλασμιδίων που περιλαμβάνει όλα τα γνωστά πλαίσια ανάγνωσης του *E. coli*, εντοπίστηκαν δύο καταστολείς της εν λόγω τοξικότητας που επιπλέον είχαν την ιδιότητα να αυξάνουν δραματικά τα επίπεδα υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών ανά κύτταρο. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν τις DjlA, που είναι ένας ενεργοποιητής της μοριακής συνοδού DnaK ενσωματωμένος στη μεμβράνη και παρόμοιος με τη DnaJ, και RgaA, που είναι αναστολέας της ριβονουκλεάσης RNάσης E. Με βάση τις ιδιότητες αυτών των γονιδίων κατασκευάστηκαν δύο νέα στελέχη *E. coli*, τα SuptoxD και SuptoxR, που παρουσιάζουν βελτιωμένη αποδοτικότητα στην υπερπαραγωγή ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών μεμβρανικών πρωτεϊνών γενικά σε σχέση με τα AT κύτταρα καθώς και τα εμπορικά στελέχη *E. coli* που θεωρούνταν κατάλληλα στελέχη μέχρι πρόσφατα. Η επιπλέον παραγόμενη πρωτεΐνη βρέθηκε να είναι λειτουργική για μια παραλλαγή του υποδοχέα νευροτενσίνης 1, γεγονός που δείχνει ότι η πρωτεΐνη που παράγεται είναι καλής ποιότητας. Ο καθαρισμός μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης που έχει υπερπαραχθεί στα νέα στελέχη και η κρυστάλωσή της μελλοντικά θα αποδείξει αν η πρωτεΐνη που παράγεται από τα στελέχη SuptoxD και SuptoxR είναι όντως κατάλληλης ποιότητας για κρυσταλλογραφικές μελέτες.

Σημειώνεται ότι η γενετική ανάλυση που περιγράφηκε θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε τοξικούς κυτταροπλασματικούς ή περιπλασματικούς υδατοδιαλυτούς στόχους.

Ένας επόμενος στόχος είναι να τεθούν τα γονίδια *djlA* και *rraA* υπό τον έλεγχο του υποκινητή αραβινόζης στο γονιδίωμα του *E. coli* προκειμένου να μπορεί να ελεγχθεί η ποσότητα της έκφρασής τους χωρίς την ανάγκη παρουσίας αντιβιοτικού. Με αυτό τον τρόπο ενδεχομένως μπορούν να φτάσουν οι καλλιέργειες μεμβρανικών πρωτεϊνών σε ακόμη μεγαλύτερες κυτταρικές πυκνότητες. Επίσης, σε ένα τέτοιο στέλεχος θα είναι πιο σωστό να δοκιμαστεί η επίδραση της ταυτόχρονης συνέκφρασης του *djlA* και του *rraA* χωρίς τη μεταγραφή τους σε δισιοτρονικό mRNA.

Επίσης, προτείνεται η κατασκευή βιβλιοθήκης μεταλλαγμένων *djlA* γονιδίων και γενετική ανάλυσή της για την εύρεση μεταλλαγμένου *djlA*, η συνέκφραση του οποίου επιφέρει ακόμη μεγαλύτερη βελτίωση στη συνολική απόδοση υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Προφανώς, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της *DjlA* δεν έχει ασκηθεί εξελικτική πίεση είτε για την ομόλογη είτε για την ετερόλογη υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, οπότε δεν έχει βελτιστοποιηθεί η αλληλουχία της για αυτό το ρόλο. Επομένως, η κατευθυνόμενη εξέλιξη της *DjlA* θα μπορούσε να οδηγήσει στην περαιτέρω βελτίωση της συνολικής απόδοσης αυτής της διεργασίας στο βακτηριακό κύτταρο.

Μετά την κατασκευή των στελεχών *SuptoxD* και *SuptoxR* αντικείμενο μελέτης αποτέλεσε και ο μηχανισμός της λειτουργίας των δύο καταστολέων της τοξικότητας μεμβρανικών πρωτεϊνών. Προέκυψαν στοιχεία που αποκαλύπτουν ότι η *DjlA* απαιτείται να είναι σε πλήρους μήκους μορφή για την καταστολή της τοξικότητάς του υποδοχέα BR2. Το διαμεμβρανικό τμήμα της *DjlA* δεν είναι μόνο μια υπομονάδα που την διατηρεί ενσωματωμένη στη μεμβράνη, αλλά πιθανότητα παίζει έναν ενεργό ρόλο στο μηχανισμό βελτίωσης της υπερπαραγωγής μεμβρανικών πρωτεϊνών. Η κεντρική υπομονάδα της *DjlA* παίζει και αυτή πολύ σημαντικό ρόλο στην καταστολή της τοξικότητας, αλλά όχι στην παραγωγή ανά κύτταρο της BR2. Επίσης, η υπερέκφραση μόνο του γονιδίου *djlA* σε αντίθεση με αυτή των άλλων *E. coli* γονιδίων που κωδικοποιούν J πρωτεΐνες βελτιώνει την υπερπαραγωγή της BR2. Η εξειδίκευση της J υπομονάδας της *DjlA* βρέθηκε να είναι περιορισμένη μετά την κατασκευή χιμαιρικής πρωτεΐνης *DjlA* με αντικατεστημένη την J υπομονάδα από αυτή της *DnaJ*. Η αντίδραση στρες *Rcs* που προκαλείται από την υπερπαραγωγή του *djlA* βρέθηκε να μην είναι απαραίτητη για το μηχανισμό που μελετήθηκε. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση της *DjlA* με τη μοριακή συνοδό *DnaK* καθίσταται απαραίτητη για τη βελτίωση της υπερπαραγωγής του BR2. Τέλος, μελετήθηκε και ο μηχανισμός λειτουργίας της *RraA* και βρέθηκε ότι τα επίπεδα μεταγραφής της BR2 κατά την συνέκφραση του *rraA* δεν επηρεάζονται, ενώ η υπερέκφραση της BR2 βελτιώνεται δραματικά. Μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να εξακριβωθεί αν αυτά τα συμπεράσματα ισχύουν και για άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Με βάση τις παρατηρήσεις μας, προτείνουμε ότι υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του συμπλόκου DjlA-DnaK με τη μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχο με βάση το παρακάτω μοντέλο. Αρχικά, η J υπομονάδα της DjlA αλληλεπιδρά με τη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα της υπερπαραγόμενης μεμβρανικής πρωτεΐνης καθώς αυτή προβάλλει από το ριβόσωμα. Κατόπιν, αυτό το σύμπλοκο παρουσιάζεται από τη DjlA στην DnaK και ενεργοποιείται η ενεργότητα ATPάσης της DnaK. Έτσι, με την κατάλληλη διαμορφωτική αλλαγή που προκύπτει επιτρέπεται η πρόσδεση της DnaK στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα της μεμβρανικής πρωτεΐνης. Στο τελικό στάδιο, το διαμεμβρανικό τμήμα της DjlA αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική πρωτεΐνη-στόχο και διευκολύνεται η ένταξη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli* με εξάρτηση από την DnaK. Το τελευταίο βήμα ένταξης είναι κρίσιμο για την καταστολή της τοξικότητας από την υπερπαραγωγή μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενώ ο σχηματισμός του συμπλόκου DjlA-DnaK είναι απαραίτητος για τη βελτίωση των επιπέδων παραγωγής μεμβρανικής πρωτεΐνης. Για να διερευνηθούν μελλοντικά οι λεπτομέρειες του μοντέλου, απαραίτητες καθίστανται αναλύσεις πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης.

Για να εξεταστούν οι προτάσεις ότι πιθανώς η DjlA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-στόχο (BR2) ή ακόμη και με το τρανσλοκόνιο SecYEG, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η *in vivo* φωτοσταυροσύνδεση (photocross-linking). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ενσωμάτωση του φωτοενεργού αναλόγου αμινοξέος p-benzoyl-L-phenylalanine (Bra) στην αλληλουχία της DjlA σε διαφορετικές θέσεις κάθε φορά. Το ανάλογο αυτό μπορεί να σταυροσυνδεθεί μόνο με πρωτεΐνες που βρίσκονται σε απόσταση εντός  $\sim 4 \text{ \AA}$  μετά από έκθεση σε UV. Κατόπιν, με ανοσοκαταβύθιση των πιθανών συμπλόκων με αντίσωμα κατά της DjlA και αναλύσεις ανοσοαποτυπώματος με αντισώματα κατά των πρωτεϊνών, με τις οποίες προτείνουμε ότι αλληλεπιδρά, μπορεί να διαλευκανθεί ο μηχανισμός καταστολής της τοξικότητας των μεμβρανικών πρωτεϊνών μέσω της DjlA.

Παρόλο που υπάρχουν ενδιαφέρουσες πληροφορίες για την πρωτεΐνη DjlA ο ακριβής ρόλος της στο κύτταρο δεν έχει εξακριβωθεί (Genevaux, Wawrzynow et al. 2001). Το γεγονός ότι ήπια υπερέκφρασή της αυξάνει δραματικά τα επίπεδα υπερέκφρασης μεμβρανικών πρωτεϊνών και καταστέλλει την τοξικότητά τους

πιθανότατα δείχνει το ρόλο της στην υπερπαραγωγή αυτών των πρωτεϊνών στο *E. coli* και στην ένταξή τους στη μεμβράνη. Πιθανώς, η DjIA παίζει κάποιο ρόλο και στη βιογένεση ενδογενών μεμβρανικών πρωτεϊνών στο *E. coli*. Αυτό θα μπορούσε να εντοπιστεί και πάλι με *in vivo* φωτοσταυροσύνδεση παρέχοντας νέες πληροφορίες για τον πιθανό πρωταρχικό ρόλο της DjIA στο κύτταρο.

## 6. Βιβλιογραφία

- Akermoun, M., M. Koglin, D. Zvalova-looss, N. Folschweiller, S. J. Dowell and K. L. Gearing (2005). "Characterization of 16 human G protein-coupled receptors expressed in baculovirus-infected insect cells." Protein Expr. Purif. **44**(1): 65-74.
- Andrell, J. and C. G. Tate (2013). "Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies." Mol. Membr. Biol. **30**(1): 52-63.
- Arditti, R. R., J. G. Scaife and J. R. Beckwith (1968). "The nature of mutants in the lac promoter region." J. Mol. Biol. **38**(3): 421-426.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol. Syst. Biol. **2**: 2006 0008.
- Bachmann, B. J. (1972). "Pedigrees of some mutant strains of Escherichia coli K-12." Bacteriol. Rev. **36**(4): 525-557.
- Bakheet, T. M. and A. J. Doig (2009). "Properties and identification of human protein drug targets." Bioinformatics **25**(4): 451-457.
- Bannwarth, M. and G. E. Schulz (2003). "The expression of outer membrane proteins for crystallization." Biochim. Biophys. Acta **1610**(1): 37-45.
- Bennasroune, A., M. Fickova, A. Gardin, S. Dirrig-Grosch, D. Aunis, G. Cremel and P. Hubert (2004). "Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling." Mol. Biol. Cell **15**(7): 3464-3474.
- Bennett, M. R., W. L. Pang, N. A. Ostroff, B. L. Baumgartner, S. Nayak, L. S. Tsimring and J. Hasty (2008). "Metabolic gene regulation in a dynamically changing environment." Nature **454**(7208): 1119-1122.
- Beranova, M., L. M. Oliveira, G. Y. Bedecarrats, E. Schipani, M. Vallejo, A. C. Ammini, J. B. Quintos, J. E. Hall, K. A. Martin, F. J. Hayes, N. Pitteloud, U. B. Kaiser, W. F. Crowley, Jr. and S. B. Seminara (2001). "Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism." J. Clin. Endocrinol. Metab. **86**(4): 1580-1588.

Bernaodat, F., A. Frelet-Barrand, N. Pochon, S. Dementin, P. Hivin, S. Boutigny, J. B. Rioux, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, P. Richaud, J. Joyard, D. Pignol, M. Sabaty, T. Desnos, E. Pebay-Peyroula, E. Darrouzet, T. Vernet and N. Rolland (2011). "Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host." PLoS One **6**(12): e29191.

Bill, R. M., P. J. Henderson, S. Iwata, E. R. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C. G. Tate and H. Vogel (2011). "Overcoming barriers to membrane protein structure determination." Nat. Biotechnol. **29**(4): 335-340.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of Escherichia coli K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.

Brodsky, J. L. and R. Schekman (1993). "A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome." J. Cell Biol. **123**(6 Pt 1): 1355-1363.

Bukau, B., P. Reilly, J. McCarty and G. C. Walker (1993). "Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in Escherichia coli cells." J. Gen. Microbiol. **139**(1): 95-99.

Calloni, G., T. Chen, S. M. Schermann, H. C. Chang, P. Genevoux, F. Agostini, G. G. Tartaglia, M. Hayer-Hartl and F. U. Hartl (2012). "DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network." Cell Rep. **1**(3): 251-264.

Camponova, P., S. Baud, H. Matras, I. Duroux-Richard, J. C. Bonnafeous and J. Marie (2007). "High-level expression and purification of the human bradykinin B(2) receptor in a tetracycline-inducible stable HEK293S cell line." Protein Expr. Purif. **55**(2): 300-311.

Carpousis, A. J. (2007). "The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E." Annu Rev. Microbiol. **61**: 71-87.

Casadaban, M. J. and S. N. Cohen (1980). "Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli." J. Mol. Biol. **138**(2): 179-207.

Castanie-Cornet, M. P., N. Bruel and P. Genevoux (2014). "Chaperone networking facilitates protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane." Biochim. Biophys. Acta **1843**(8): 1442-1456.

Chae, C., S. Sharma, J. R. Hoskins and S. Wickner (2004). "CbpA, a DnaJ homolog, is a DnaK co-chaperone, and its activity is modulated by CbpM." J. Biol. Chem. **279**(32): 33147-33153.

Chandran, V., R. Fronzes, S. Duquerroy, N. Cronin, J. Navaza and G. Waksman (2009). "Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system." Nature **462**(7276): 1011-1015.

Chen, Y., J. Song, S. F. Sui and D. N. Wang (2003). "DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in Escherichia coli." Protein Expr. Purif. **32**(2): 221-231.

Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **86**(7): 2172-2175.

Clarke, D. J., I. B. Holland and A. Jacq (1997). "Point mutations in the transmembrane domain of DjlA, a membrane-linked DnaJ-like protein, abolish its function in promoting colanic acid production via the Rcs signal transduction pathway." Mol. Microbiol. **25**(5): 933-944.

Clarke, D. J., A. Jacq and I. B. Holland (1996). "A novel DnaJ-like protein in Escherichia coli inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology." Mol. Microbiol. **20**(6): 1273-1286.

Conter, A., R. Sturny, C. Gutierrez and K. Cam (2002). "The RcsCB His-Asp phosphorelay system is essential to overcome chlorpromazine-induced stress in Escherichia coli." J. Bacteriol. **184**(10): 2850-2853.

Daegelen, P., F. W. Studier, R. E. Lenski, S. Cure and J. F. Kim (2009). "Tracing ancestors and relatives of Escherichia coli B, and the derivation of B strains REL606 and BL21(DE3)." J. Mol. Biol. **394**(4): 634-643.

Dalbey, R. E., A. Kuhn, L. Zhu and D. Kiefer (2014). "The membrane insertase YidC." Biochim. Biophys. Acta **1843**(8): 1489-1496.

Daley, D. O., M. Rapp, E. Granseth, K. Melen, D. Drew and G. von Heijne (2005). "Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome." Science **308**(5726): 1321-1323.

Dinh, T. and T. G. Bernhardt (2011). "Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies." J. Bacteriol. **193**(18): 4984-4987.



Dodevski, I. and A. Pluckthun (2011). "Evolution of three human GPCRs for higher expression and stability." J. Mol. Biol. **408**(4): 599-615.

Dong, C., K. Beis, J. Nesper, A. L. Brunkan-Lamontagne, B. R. Clarke, C. Whitfield and J. H. Naismith (2006). "Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein." Nature **444**(7116): 226-229.

Dowhan, W. (1997). "Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids?" Annu. Rev. Biochem. **66**: 199-232.

Drew, D., M. Lerch, E. Kunji, D. J. Slotboom and J. W. de Gier (2006). "Optimization of membrane protein overexpression and purification using GFP fusions." Nat. Methods **3**(4): 303-313.

Drew, D., D. Sjostrand, J. Nilsson, T. Urbig, C. N. Chin, J. W. de Gier and G. von Heijne (2002). "Rapid topology mapping of Escherichia coli inner-membrane proteins by prediction and PhoA/GFP fusion analysis." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**(5): 2690-2695.

Drew, D. E., G. von Heijne, P. Nordlund and J. W. de Gier (2001). "Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in Escherichia coli." FEBS Lett. **507**(2): 220-224.

Driessen, A. J. and N. Nouwen (2008). "Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane." Annu. Rev. Biochem. **77**: 643-667.

Dudek, J., M. Greiner, A. Muller, L. M. Hendershot, K. Kopsch, W. Nastainczyk and R. Zimmermann (2005). "ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum." Nat. Struct. Mol. Biol. **12**(11): 1008-1014.

Dwyer, D. J., D. M. Camacho, M. A. Kohanski, J. M. Callura and J. J. Collins (2012). "Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis." Mol. Cell **46**(5): 561-572.

Egloff, P., M. Hillenbrand, C. Klenk, A. Batyuk, P. Heine, S. Balada, K. M. Schlinkmann, D. J. Scott, M. Schutz and A. Pluckthun (2014). "Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in Escherichia coli." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **111**(6): E655-662.

Eilam, E. (2005). Reversing secrets of reverse engineering. Indianapolis, Ind., Wiley Pub.,: 1 online resource (xxxviii, 589 p.) ill.

Engelman, D. M. (2005). "Membranes are more mosaic than fluid." Nature **438**(7068): 578-580.

Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton and P. M. Henson (1992). "Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J. Immunol. **148**(7): 2207-2216.

Fairman, J. W., N. Noinaj and S. K. Buchanan (2011). "The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports." Curr. Opin. Struct. Biol. **21**(4): 523-531.

Frauenfeld, J., J. Gumbart, E. O. Sluis, S. Funes, M. Gartmann, B. Beatrix, T. Mielke, O. Berninghausen, T. Becker, K. Schulten and R. Beckmann (2011). "Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment." Nat. Struct. Mol. Biol. **18**(5): 614-621.

Friedel, S., B. Usadel, N. von Wiren and N. Sreenivasulu (2012). "Reverse engineering: a key component of systems biology to unravel global abiotic stress cross-talk." Front. Plant Sci. **3**: 294.

Gao, J., K. Lee, M. Zhao, J. Qiu, X. Zhan, A. Saxena, C. J. Moore, S. N. Cohen and G. Georgiou (2006). "Differential modulation of E. coli mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome." Mol. Microbiol. **61**(2): 394-406.

Gassler, C. S., A. Buchberger, T. Laufen, M. P. Mayer, H. Schroder, A. Valencia and B. Bukau (1998). "Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **95**(26): 15229-15234.

Geertsma, E. R., M. Groeneveld, D. J. Slotboom and B. Poolman (2008). "Quality control of overexpressed membrane proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **105**(15): 5722-5727.

Genevaux, P., C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2007). "The Hsp70 chaperone machines of Escherichia coli: a paradigm for the repartition of chaperone functions." Mol. Microbiol. **66**(4): 840-857.

Genevaux, P., F. Schwager, C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2001). "The djIA gene acts synergistically with dnaJ in promoting Escherichia coli growth." J. Bacteriol. **183**(19): 5747-5750.

Genevaux, P., F. Schwager, C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2002). "Scanning mutagenesis identifies amino acid residues essential for the in vivo activity of the Escherichia coli DnaJ (Hsp40) J-domain." Genetics **162**(3): 1045-1053.

Genevaux, P., A. Wawrzynow, M. Zylicz, C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2001). "DjlA is a third DnaK co-chaperone of Escherichia coli, and DjlA-mediated induction of colanic acid capsule requires DjlA-DnaK interaction." J. Biol. Chem. **276**(11): 7906-7912.

Genevaux, P., A. Wawrzynow, M. Zylicz, C. Georgopoulos and W. L. Kelley (2001). "DjlA is a third DnaK co-chaperone of Escherichia coli, and DjlA-mediated induction of colanic acid capsule requires DjlA-DnaK interaction." J. Biol. Chem. **276**(11): 7906-7912.

Gentz, R. and H. Bujard (1985). "Promoters recognized by Escherichia coli RNA polymerase selected by function: highly efficient promoters from bacteriophage T5." J. Bacteriol. **164**(1): 70-77.

Gialama, D., D. C. Delivoria, M. Michou and G. Skretas (2017). "Functional requirements for DjlA- and RraA-mediated enhancement of recombinant membrane protein production in the engineered E. coli strains SuptoxD and SuptoxR." J. Mol. Biol., υπό αναθεώρηση.

Gialama, D., F. Kolis and G. Skretas (2017). "Novel Processing Technology for Production of Biopharmaceuticals and Bioproducts, Chapter 16, New Expression Systems for GPCRs " Zhou W. and Komives C., John Wiley & Sons, υπό έκδοση.

Gialama, D., K. Kostelidou, M. Michou, D. C. Delivoria, F. N. Kolis and G. Skretas (2016). "Development of Escherichia coli strains that withstand membrane protein-induced toxicity and achieve high-level recombinant membrane protein production." ACS Synth. Biol., **6**(2): 284–300.

Gubellini, F., G. Verdon, N. K. Karpowich, J. D. Luff, G. Boel, N. Gauthier, S. K. Handelman, S. E. Ades and J. F. Hunt (2011). "Physiological response to membrane protein overexpression in E. coli." Mol. Cell. Proteomics **10**(10): M111 007930.

Gur, E., D. Biran, N. Shechter, P. Genevaux, C. Georgopoulos and E. Z. Ron (2004). "The Escherichia coli DjlA and CbpA proteins can substitute for DnaJ in DnaK-mediated protein disaggregation." J. Bacteriol. **186**(21): 7236-7242.

Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J. Bacteriol. **177**(14): 4121-4130.

Hatahet, F., J. L. Blazyk, E. Martineau, E. Mandela, Y. Zhao, R. E. Campbell, J. Beckwith and D. Boyd (2015). "Altered Escherichia coli membrane protein assembly machinery allows proper membrane assembly of eukaryotic protein vitamin K epoxide reductase." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **112**(49): 15184-15189.

He, Y., K. Wang and N. Yan (2014). "The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins." Protein Cell **5**(9): 658-672.

Hennon, S. W., R. Soman, L. Zhu and R. E. Dalbey (2015). "YidC/Alb3/Oxa1 Family of Insertases." J. Biol. Chem. **290**(24): 14866-14874.

Hermansson, M. and G. von Heijne (2003). "Inter-helical hydrogen bond formation during membrane protein integration into the ER membrane." J. Mol. Biol. **334**(4): 803-809.

Hillen, W. and C. Berens (1994). "Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance." Annu. Rev. Microbiol. **48**: 345-369.

Holtkamp, W., S. Lee, T. Bornemann, T. Senyushkina, M. V. Rodnina and W. Wintermeyer (2012). "Dynamic switch of the signal recognition particle from scanning to targeting." Nat. Struct. Mol. Biol. **19**(12): 1332-1337.

Houdebine, L. M. (2009). "Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals." Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **32**(2): 107-121.

Iost, I., J. Guillerez and M. Dreyfus (1992). "Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo." J. Bacteriol. **174**(2): 619-622.

Jeong, H., V. Barbe, C. H. Lee, D. Vallenet, D. S. Yu, S. H. Choi, A. Couloux, S. W. Lee, S. H. Yoon, L. Cattolico, C. G. Hur, H. S. Park, B. Segurens, S. C. Kim, T. K. Oh, R. E. Lenski, F. W. Studier, P. Daegelen and J. F. Kim (2009). "Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3)." J. Mol. Biol. **394**(4): 644-652.

Kampinga, H. H. and E. A. Craig (2010). "The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **11**(8): 579-592.

Kelley, W. L. and C. Georgopoulos (1997). "Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjlA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in Escherichia coli." Mol. Microbiol. **25**(5): 913-931.

Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga and H. Mori (2005). "Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research." DNA Res. **12**(5): 291-299.

Kitson, S. M., W. Mullen, R. J. Cogdell, R. M. Bill and N. J. Fraser (2011). "GPCR production in a novel yeast strain that makes cholesterol-like sterols." Methods **55**(4): 287-292.

Klepsch, M. M., J. O. Persson and J. W. de Gier (2011). "Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor, in Escherichia coli." J. Mol. Biol. **407**(4): 532-542.

Kluck, C. J., H. Patzelt, P. Genevaux, D. Brehmer, W. Rist, J. Schneider-Mergener, B. Bukau and M. P. Mayer (2002). "Structure-function analysis of HscC, the Escherichia coli member of a novel subfamily of specialized Hsp70 chaperones." J. Biol. Chem. **277**(43): 41060-41069.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne and E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J. Mol. Biol. **305**(3): 567-580.

Kwon, S. K., S. K. Kim, D. H. Lee and J. F. Kim (2015). "Comparative genomics and experimental evolution of Escherichia coli BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction." Sci. Rep. **5**: 16076.

Lakhal, F., S. Bury-Mone, Y. Nomane, N. Le Goic, C. Paillard and A. Jacq (2008). "DjIA, a membrane-anchored DnaJ-like protein, is required for cytotoxicity of clam pathogen Vibrio tapetis to hemocytes." Appl. Environ. Microbiol. **74**(18): 5750-5758.

Lee, K., X. Zhan, J. Gao, J. Qiu, Y. Feng, R. Meganathan, S. N. Cohen and G. Georgiou (2003). "RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in E. coli." Cell **114**(5): 623-634.

Lewis, M. (2005). "The lac repressor." C. R. Biol. **328**(6): 521-548.

Linares, D. M., E. R. Geertsma and B. Poolman (2010). "Evolved Lactococcus lactis strains for enhanced expression of recombinant membrane proteins." J. Mol. Biol. **401**(1): 45-55.

Link, A. J., G. Skretas, E. M. Strauch, N. S. Chari and G. Georgiou (2008). "Efficient production of membrane-integrated and detergent-soluble G protein-coupled receptors in Escherichia coli." Protein Sci. **17**(10): 1857-1863.

Liou, G. G., W. N. Jane, S. N. Cohen, N. S. Lin and S. Lin-Chao (2001). "RNA degradosomes exist in vivo in Escherichia coli as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**(1): 63-68.

Liu, M. Q., Z. Chen and L. X. Chen (2016). "Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases." Acta Pharmacol. Sin.

Luirink, J., G. von Heijne, E. Houben and J. W. de Gier (2005). "Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli." Annu. Rev. Microbiol. **59**: 329-355.

Lyman, S. K. and R. Schekman (1995). "Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of Saccharomyces cerevisiae." J. Cell. Biol. **131**(5): 1163-1171.

Lyman, S. K. and R. Schekman (1997). "Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP." Cell **88**(1): 85-96.

Majdalani, N. and S. Gottesman (2005). "The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system." Annu. Rev. Microbiol. **59**: 379-405.

Mandal, S., M. Moudgil and S. K. Mandal (2009). "Rational drug design." Eur. J. Pharmacol. **625**(1-3): 90-100.

Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace and D. R. Green (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." J. Exp. Med. **182**(5): 1545-1556.

Massey-Gendel, E., A. Zhao, G. Boulting, H. Y. Kim, M. A. Balamotis, L. M. Seligman, R. K. Nakamoto and J. U. Bowie (2009). "Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in E. coli." Protein Sci. **18**(2): 372-383.

Mayer, M. P., T. Laufen, K. Paal, J. S. McCarty and B. Bukau (1999). "Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy." J. Mol. Biol. **289**(4): 1131-1144.

McCusker, E. C., S. E. Bane, M. A. O'Malley and A. S. Robinson (2007). "Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures." Biotechnol. Prog. **23**(3): 540-547.

Mettetal, J. T., D. Muzzey, C. Gomez-Urbe and A. van Oudenaarden (2008). "The frequency dependence of osmo-adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*." Science **319**(5862): 482-484.

Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J. Mol. Biol. **260**(3): 289-298.

Nannenga, B. L. and F. Baneyx (2011). "Reprogramming chaperone pathways to improve membrane protein expression in *Escherichia coli*." Protein Sci. **20**(8): 1411-1420.

Narayanan, A., M. Ridilla and D. A. Yernool (2011). "Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator-repressor interactions." Protein Sci. **20**(1): 51-61.

Nelson, D. L., A. L. Lehninger and M. M. Cox (2008). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman.

Ng, D. P., B. E. Poulsen and C. M. Deber (2012). "Membrane protein misassembly in disease." Biochim. Biophys. Acta **1818**(4): 1115-1122.

Nyathi, Y., B. M. Wilkinson and M. R. Pool (2013). "Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum." Biochim. Biophys. Acta **1833**(11): 2392-2402.

Ohnishi, H., Y. Mizunoe, A. Takade, Y. Tanaka, H. Miyamoto, M. Harada and S. Yoshida (2004). "*Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth." Infect. Immun. **72**(6): 3592-3603.

Papic, D., Y. Elbaz-Alon, S. N. Koerdt, K. Leopold, D. Worm, M. Jung, M. Schuldiner and D. Rapaport (2013). "The role of Djp1 in import of the mitochondrial protein Mim1 demonstrates specificity between a cochaperone and its substrate protein." Mol. Cell. Biol. **33**(20): 4083-4094.

Park, S. H., B. B. Das, F. Casagrande, Y. Tian, H. J. Nothnagel, M. Chu, H. Kiefer, K. Maier, A. A. De Angelis, F. M. Marassi and S. J. Opella (2012). "Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers." Nature **491**(7426): 779-783.

Pellecchia, M., T. Szyperski, D. Wall, C. Georgopoulos and K. Wuthrich (1996). "NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone." J. Mol. Biol. **260**(2): 236-250.

Perrakis, A. and C. Romier (2008). "Assembly of protein complexes by coexpression in prokaryotic and eukaryotic hosts: an overview." Methods Mol. Biol. **426**: 247-256.

Perrody, E., A. M. Cirinesi, C. Desplats, F. Keppel, F. Schwager, S. Tranier, C. Georgopoulos and P. Genevaux (2012). "A bacteriophage-encoded J-domain protein interacts with the DnaK/Hsp70 chaperone and stabilizes the heat-shock factor sigma32 of Escherichia coli." PLoS Genet. **8**(11): e1003037.

Plempner, R. K., S. Bohmler, J. Bordallo, T. Sommer and D. H. Wolf (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." Nature **388**(6645): 891-895.

Powers, T. and P. Walter (1995). "Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases." Science **269**(5229): 1422-1424.

Prelich, G. (2012). "Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation." Genetics **190**(3): 841-854.

Qi, H. Y., J. B. Hyndman and H. D. Bernstein (2002). "DnaK promotes the selective export of outer membrane protein precursors in SecA-deficient Escherichia coli." J. Biol. Chem. **277**(52): 51077-51083.

Raine, A., R. Ullers, M. Pavlov, J. Luirink, J. E. Wikberg and M. Ehrenberg (2003). "Targeting and insertion of heterologous membrane proteins in E. coli." Biochimie **85**(7): 659-668.

Ranjit, D. K. and K. D. Young (2013). "The Rcs stress response and accessory envelope proteins are required for de novo generation of cell shape in Escherichia coli." J. Bacteriol. **195**(11): 2452-2462.

Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." Nature **450**(7170): 663-669.

Ratelade, J., M. C. Miot, E. Johnson, J. M. Betton, P. Mazodier and N. Benaroudj (2009). "Production of recombinant proteins in the lon-deficient BL21(DE3) strain of Escherichia coli in the absence of the DnaK chaperone." Appl. Environ. Microbiol. **75**(11): 3803-3807.



Rosenberg, A. H., B. N. Lade, D. S. Chui, S. W. Lin, J. J. Dunn and F. W. Studier (1987). "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." Gene **56**(1): 125-135.

Sarkar, C. A., I. Dodevski, M. Kenig, S. Dudli, A. Mohr, E. Hermans and A. Pluckthun (2008). "Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **105**(39): 14808-14813.

Sarramegna, V., F. Talmont, P. Demange and A. Milon (2003). "Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification." Cell. Mol. Life Sci. **60**(8): 1529-1546.

Sarramegna, V., F. Talmont, P. Demange and A. Milon (2003). "Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-scale production and purification." Cell. Mol. Life Sci. **60**(8): 1529-1546.

Schlegel, S., P. Genevaux and J. W. de Gier (2015). "De-convoluting the Genetic Adaptations of E. coli C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields." Cell Rep.

Schlegel, S., P. Genevaux and J. W. de Gier (2016). "Isolating Escherichia coli strains for recombinant protein production." Cell. Mol. Life Sci.

Schlegel, S., M. Klepsch, D. Gialama, D. Wickstrom, D. J. Slotboom and J. W. de Gier (2010). "Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria." Microb. Biotechnol. **3**(4): 403-411.

Schlegel, S., J. Lofblom, C. Lee, A. Hjelm, M. Klepsch, M. Strous, D. Drew, D. J. Slotboom and J. W. de Gier (2012). "Optimizing membrane protein overexpression in the Escherichia coli strain Lemo21(DE3)." J. Mol. Biol. **423**(4): 648-659.

Schleif, R. (1992). "DNA looping." Annu. Rev. Biochem. **61**: 199-223.

Schlyer, S. and R. Horuk (2006). "I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development." Drug Discov. Today **11**(11-12): 481-493.

Seydlova, G., P. Halada, R. Fiser, O. Toman, A. Ulrych and J. Svobodova (2012). "DnaK and GroEL chaperones are recruited to the Bacillus subtilis membrane after short-term ethanol stress." J. Appl. Microbiol. **112**(4): 765-774.

Sim, M. F., R. J. Dennis, E. M. Aubry, N. Ramanathan, H. Sembongi, V. Saudek, D. Ito, S. O'Rahilly, S. Siniossoglou and J. J. Rochford (2012). "The human lipodystrophy protein seipin is an ER membrane adaptor for the adipogenic PA phosphatase lipin 1." Mol. Metab. **2**(1): 38-46.

Skerra, A. (1994). "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia coli." Gene **151**(1-2): 131-135.

Skretas, G. and G. Georgiou (2009). "Genetic analysis of G protein-coupled receptor expression in Escherichia coli: inhibitory role of DnaJ on the membrane integration of the human central cannabinoid receptor." Biotechnol. Bioeng. **102**(2): 357-367.

Skretas, G. and G. Georgiou (2010). "Simple genetic selection protocol for isolation of overexpressed genes that enhance accumulation of membrane-integrated human G protein-coupled receptors in Escherichia coli." Appl. Environ. Microbiol. **76**(17): 5852-5859.

Skretas, G., T. Makino, N. Varadarajan, M. Pogson and G. Georgiou (2012). "Multi-copy genes that enhance the yield of mammalian G protein-coupled receptors in Escherichia coli." Metab. Eng. **14**(5): 591-602.

Soo, V. W., P. Hanson-Manful and W. M. Patrick (2011). "Artificial gene amplification reveals an abundance of promiscuous resistance determinants in Escherichia coli." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **108**(4): 1484-1489.

Souza, C. M., T. M. Schwabe, H. Pichler, B. Ploier, E. Leitner, X. L. Guan, M. R. Wenk, I. Riezman and H. Riezman (2011). "A stable yeast strain efficiently producing cholesterol instead of ergosterol is functional for tryptophan uptake, but not weak organic acid resistance." Metab. Eng. **13**(5): 555-569.

Stewart, C., J. Bailey and C. Manoil (1998). "Mutant membrane protein toxicity." J. Biol. Chem. **273**(43): 28078-28084.

Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J. Mol. Biol. **189**(1): 113-130.

Suzuki, T., Y. Araki, T. Yamamoto and T. Nakaya (2006). "Trafficking of Alzheimer's disease-related membrane proteins and its participation in disease pathogenesis." J. Biochem. **139**(6): 949-955.

Teese, M. G. and D. Langosch (2015). "Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions." Biochemistry **54**(33): 5125-5135.

Toutain, C. M., D. J. Clarke, J. A. Leeds, J. Kuhn, J. Beckwith, I. B. Holland and A. Jacq (2003). "The transmembrane domain of the DnaJ-like protein DjIA is a dimerisation domain." Mol. Genet. Genomics **268**(6): 761-770.

Tsirigotaki, A., J. De Geyter, N. Sostaric, A. Economou and S. Karamanou (2017). "Protein export through the bacterial Sec pathway." Nat. Rev. Microbiol. **15**(1): 21-36.

Vankeerberghen, A., H. Cuppens and J. J. Cassiman (2002). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions." J. Cyst. Fibros. **1**(1): 13-29.

Venkatakrishnan, A. J., X. Deupi, G. Lebon, C. G. Tate, G. F. Schertler and M. M. Babu (2013). "Molecular signatures of G-protein-coupled receptors." Nature **494**(7436): 185-194.

von Heijne, G. (2007). "The membrane protein universe: what's out there and why bother?" J. Intern. Med. **261**(6): 543-557.

von Heijne, G. and Y. Gavel (1988). "Topogenic signals in integral membrane proteins." Eur. J. Biochem. **174**(4): 671-678.

Wagner, S., L. Baars, A. J. Ytterberg, A. Klussmeier, C. S. Wagner, O. Nord, P. A. Nygren, K. J. van Wijk and J. W. de Gier (2007). "Consequences of membrane protein overexpression in Escherichia coli." Mol. Cell. Proteomics **6**(9): 1527-1550.

Wagner, S., M. L. Bader, D. Drew and J. W. de Gier (2006). "Rationalizing membrane protein overexpression." Trends Biotechnol. **24**(8): 364-371.

Wagner, S., M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson and J. W. de Gier (2008). "Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **105**(38): 14371-14376.

Wistrand, M., L. Kall and E. L. Sonnhammer (2006). "A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs." Protein Sci. **15**(3): 509-521.

Wurth, C., N. K. Guimard and M. H. Hecht (2002). "Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis." J. Mol. Biol. **319**(5): 1279-1290.

Yeom, J. H., H. Go, E. Shin, H. L. Kim, S. H. Han, C. J. Moore, J. Bae and K. Lee (2008). "Inhibitory effects of RraA and RraB on RNase E-related enzymes imply conserved functions in the regulated enzymatic cleavage of RNA." FEMS Microbiol. Lett. **285**(1): 10-15.

Yildirim, M. A., K. I. Goh, M. E. Cusick, A. L. Barabasi and M. Vidal (2007). "Drug-target network." Nat. Biotechnol. **25**(10): 1119-1126.

Yura, T., H. Mori, H. Nagai, T. Nagata, A. Ishihama, N. Fujita, K. Isono, K. Mizobuchi and A. Nakata (1992). "Systematic sequencing of the Escherichia coli genome: analysis of the 0-2.4 min region." Nucleic Acids Res. **20**(13): 3305-3308.

Zhao, M., L. Zhou, Y. Kawarasaki and G. Georgiou (2006). "Regulation of RraA, a protein inhibitor of RNase E-mediated RNA decay." J. Bacteriol. **188**(9): 3257-3263.

Zuber, M., T. A. Hoover and D. L. Court (1995). "Analysis of a Coxiella burnetti gene product that activates capsule synthesis in Escherichia coli: requirement for the heat shock chaperone DnaK and the two-component regulator RcsC." J. Bacteriol. **177**(15): 4238-4244.