

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

**Μελέτη της συν-  
έκφρασης των συνοδών  
πρωτεϊνών στη  
διαλυτότητα των  
αφυδατασών των  
ανθρακικών**

Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Ζωγράφου Χρυσούλα

ΑΘΗΝΑ 2010

*Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας*

*Μελέτη της συν-έκφρασης  
των συνοδών πρωτεϊνών  
στη διαλυτότητα των  
αφυδατασών των  
ανθρακικών*

*Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του  
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης*

*Ζωγράφου Χρυσούλα*

*ΑΘΗΝΑ 2010*

Η ανάθεση του θέματος της παρούσας εργασίας έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ (συνεδρία 16<sup>η</sup> /2.6.2009) κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή της μελέτης.

**Τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:**

1. Καθηγητής Παναγιώτης Κατινάκης (Επιβλέπων)
2. Επίκουρος Καθηγητής Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης (Μέλος)
3. Επίκουρος Καθηγητής Εμμανουήλ Φλεμετάκης (Μέλος)

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Μοριακή Οικολογία και Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Οργανισμών» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους ανθρώπους που μου έδωσαν την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την παρούσα ερευνητική εργασία, με στήριξαν κατά τη διάρκειά της και με βοήθησαν να τη φέρω εις πέρας.

Τον Καθηγητή μου κ. Κατινάκη Παναγιώτη, που μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την ερευνητική μελέτη, για την προσανατολισμένη καθοδήγηση, την εποικοδομητική κριτική και τη συνεχή υποστήριξη.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρο Καθηγητή κ. Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ για τις πολύτιμες συμβουλές.

Επίσης, ευχαριστώ την Διδάκτορα κ. Δήμου Μαρία για την αδιάκοπη υποστήριξη, την βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές και την Διδάκτορα κ. Βενιεράκη Αναστασία για το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και την παραγωγική συνεργασία.

Τα μέλη του εργαστηρίου για τις χρήσιμες συμβουλές και για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα.

Κλείνοντας θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και απέραντη ευγνωμοσύνη στους γονείς μου για τη συνεχή συμπαράσταση και πολύπλευρη υποστήριξή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών.....	8
1.2. Μοριακές συνοδοί (Molecular chaperones).....	8
1.2.1. Οι μοριακές συνοδοί εμποδίζουν την δημιουργία συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών.....	8
1.2.2. Μοριακές συνοδοί- Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες.....	9
1.2.3. Βασικές κατηγορίες μοριακών συνοδών που συμμετέχουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα της <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.3. Trigger factor.....	12
1.3.1. Δομή.....	12
1.3.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης.....	13
1.4. DnaK.....	14
1.4.1. Δομή της DnaK και ο κύκλος αλληλεπιδράσεων με τα υποστρώματα.....	15
1.4.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης.....	16
1.4.3. Πώς όμως οι κύκλοι αναδίπλωσης προωθούν την αναδίπλωση και τη σωστή δομή των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών;.....	17
1.5. GroEL – GroES.....	18
1.5.1. Δομή.....	18
1.5.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης.....	20
1.6. sHsps – Μικρές Hsp.....	21
1.7. Η αξιοποίηση των μοριακών συνοδών στη βελτίωση της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών στο <i>E.coli</i> .....	22
1.7.1. Συν-έκφραση του TF.....	22
1.7.2. Συν-έκφραση των DnaK-DnaJ-GrpE.....	22
1.7.3. Συν-έκφραση GroEL/GroES.....	23
1.7.4. Συν-έκφραση των μικρών Hsp (sHsp).....	23
1.8. Σκοπός.....	24
2. Υλικά και μέθοδοι.....	26
2.1. Το βακτήριο <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3.....	26
2.2. Ο πλασμιδιακός φορέας pET 28a.....	27
2.3. Ο πλασμιδιακός φορέας pET 26b.....	27
2.4. Πλασμίδια (Takara plasmid set).....	28
2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	29
2.5.1. Μέθοδος miniprep (Qiagen Kit).....	29
2.6. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> BL21 DE3.....	29

2.7. Μετασηματισμός <i>Escherichia coli</i> κυττάρων (transformation) με τα πλασμίδια HrpZ, CA <sub>Azotobacter</sub> , CA <sub>C.elegans</sub> , CA <sub>Arabidopsis</sub> και τα πλασμίδια pGKJE8, pGro7, pGTf2, pKJE7, pTf16 .....	30
2.8. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ( <i>induction</i> ) .....	30
2.9. Διασύνδεση πρωτεϊνών <i>in vivo</i> με τη χρήση φορμαλδεΰδης.....	32
2.10. Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης .....	34
2.10.1. Διαδικασία απομόνωσης .....	34
2.10.2. Καθαρισμός κολώνας .....	35
2.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	36
2.11.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS).....	36
2.12. Παράρτημα Α .....	38
2.12.1. Ρυθμιστικά διαλύματα .....	38
PBS (Phosphate buffered saline): αναμιγνύονται 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Ρυθμίζεται το pH στο 6.5, αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. ....	38
2.12.2. Θρεπτικά μέσα.....	39
2.12.3. Αντιβιοτικά.....	39
2.12.4. Λοιπά.....	39
3. Αποτελέσματα .....	40
3.1. Έκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης..	41
3.1.1. Συν-έκφραση της ετερόλογης βακτηριακής και της φυτικής προέλευσης καρβονικής αφυδατάσης (CA) .....	41
3.1.2. Συνέκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης και των μοριακών συνοδών.....	42
3.1.3. Απομόνωση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης εκφρασμένης σε κύτταρα <i>E.coli BL21 DE3</i> .....	44
3.1.4. Απομόνωση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης εκφρασμένης σε κύτταρα <i>Escherichia coli BL21 DE3</i> στα οποία συνεκφράζονται οι μοριακές συνοδοί .....	45
3.1.5. Διασύνδεση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης (CA) και των GroEL/GroES <i>in vivo</i> .....	46
3.2. Συν-έκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) ζωικής προέλευσης και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.3. Συνέκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) φυτικής προέλευσης και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .....	51
3.4. Συνέκφραση της ετερόλογης HrpZ και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .....	53
4. Συζήτηση .....	56

## Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της συν-έκφρασης σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21 (DE3) των μοριακών συνοδών (GroES, DnaK, Trigger factor) και της καρβονικής αφυδατάσης (CA) φυτικής, ή ζωικής ή βακτηριακής προέλευσης, στα επίπεδα διαλυτού κλάσματος των τελευταίων. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η συν-έκφραση των μοριακών συνοδών και της χαρπίνης (HrpZ) στα επίπεδα διαλυτού κλάσματος της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια σημαντική αύξηση του διαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης HrpZ, γνωστή ως χαρπίνη, με την συνέκφραση των μοριακών συνοδών, ιδιαίτερα με τις πρωτεΐνες GroEL/GroES και με τις GroEL/GroES-DnaK/DnaJ/GrpE (συνδυασμένη δράση). Η συν-έκφραση της καρβονικής αφυδατάσης ζωικής προέλευσης (CA<sub>C.elegans</sub>) και των μοριακών συνοδών δεν είχε ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση του διαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης. Η συν-έκφραση της φυτικής καρβονικής αφυδατάσης (CA<sub>Arabidopsis</sub>) και των μοριακών συνοδών GroEL/GroES και της πρωτεΐνης Trigger factor συνέβαλε στην αύξηση του διαλυτού κλάσματος της CA<sub>Arabidopsis</sub>. Η συν-έκφραση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης (CA<sub>Azotobacter</sub>) και των μοριακών συνοδών GroEL/GroES-DnaK/DnaJ/GrpE αλλά και των GroEL/GroES-Trigger factor συνέβαλε στην αύξηση του διαλυτού κλάσματος της. Ακολούθησε η απομόνωση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας και η ανάλυση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμίδης πριν και μετά τη συνέκφραση των μοριακών συνοδών. Επίσης, διερευνήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση της καρβονικής αφυδατάσης, βακτηριακής προέλευσης, με τις πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς GroEL/GroES μέσω της διαδικασίας διασύνδεσης των πρωτεϊνών με φορμαλδεΰδη.

## Abstract

*Escherichia coli* has been successfully used as a workhorse for high level production of numerous proteins. However, overproduction of heterologous proteins in *E.coli* often results in the misfolding of the protein of interest and its subsequent degradation by cellular proteases or its deposition into biologically inactive aggregates known as inclusion bodies. There are various approaches to minimize inclusion body formation such as co-expression of **molecular proteins or foldases** (the Trigger factor, the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL/GroES systems) which can be effective by increasing the soluble expression of heterologous proteins.

The aim of this study is to examine the effects of coexpression of molecular chaperones on the production of three **carbonic anhydrases** from *Azotobacter vinelandii* (bacterial), *Arabidopsis thaliana* (plant) and *Caenorhabditis elegans* (animal carbonic anhydrase) and one **harpin** from *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (bacterial), in order to develop a highly productive recombinant *E.coli* strain.

The process required transformation of *E.coli* *BL21 DE3* cells with the TaKaRa plasmids **pGro7, pGkJE8, pGTf2, pKJE7 pTf16** and the plasmids containing the structural **carbonic anhydrase** and **harpin** genes. Moreover, we examined the level of interaction of CA with the molecular chaperones through the process of crosslinking. It was found that the soluble fraction of recombinant carbonic anhydrases was slightly increased by co-expression with the molecular chaperones, whereas the co-expression of molecular chaperones with harpin resulted in a significant enhancement of the soluble fraction of the latter recombinant protein. Among the TakaRa vectors examined, a better folding level was achieved by the co-expression of DnaK/DnaJ/GrpE and GroES/GroEL proteins.



# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες, ανεξάρτητα του μεγέθους τους, για να είναι βιολογικά ενεργές πρέπει να αναδιπλωθούν και να λάβουν μια τριτοταγή διαμόρφωση, μέσω μιας πορείας όπου λαμβάνουν χώρα διάφορες ενδιάμεσες αναδιπλώσεις. Σύμφωνα με τη θεωρία του Anfinsen (πειράματα αναδίπλωσης πρωτεϊνών, *in vitro*) η πληροφορία για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων κάθε πρωτεΐνης. Ωστόσο, στα κύτταρα (*in vivo*) η αναδίπλωση των πρωτεϊνών, προς την τελική τους φυσική διαμόρφωση, λαμβάνει χώρα σε ένα πολύπλοκο περιβάλλον, με εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία βιομορίων και ιόντων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (η συγκέντρωση των πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου είναι περίπου 300-400 gr/l). Η αναδίπλωση των πολυπεπτιδίων υποβοηθείται από δυο κατηγορίες πρωτεϊνών, τις **μοριακές συνοδούς (*molecular chaperones*)** και τις **αναδιπλάσες (*foldases*)**. **Οι μοριακές συνοδοί παρέχουν προστασία στις πρωτεΐνες από συσσωμάτωση και λανθασμένη αναδίπλωση, χωρίς όμως να επηρεάζουν την ταχύτητα αναδίπλωσης, ενώ οι αναδιπλάσες καταλύουν την διαδικασία αναδίπλωσης επηρεάζοντας την ταχύτητα κάθε σταδίου της αναδίπλωσης.** Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, αυτός ο διαχωρισμός είναι ασαφής καθώς οι αναδιπλάσες παρουσιάζουν δράση μοριακών συνοδών και οι μοριακές συνοδοί παρουσιάζουν δράση αναδιπλάσων (Shiue and Fischer, 2000).

## 1.2. Μοριακές συνοδοί (*Molecular chaperones*)

Ως μοριακή συνοδός ορίζεται μια οποιαδήποτε πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά, σταθεροποιεί ή βοηθά μια μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη να αποκτήσει μια τριτοταγή δομή, ώστε να είναι βιολογικά ενεργή. Οι πρωτεΐνες μοριακές συνοδοί συμμετέχουν σε μια πλειάδα ενδοκυτταρικών λειτουργιών όπως η *de novo* αναδίπλωση, η επαναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, η μεταφορά πρωτεϊνών και η πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.

### 1.2.1. Οι μοριακές συνοδοί εμποδίζουν την δημιουργία συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών

Οι μοριακές συνοδοί εμποδίζουν την δημιουργία συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών είτε κατά την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε συνθήκες στρες, όπως είναι η ξαφνική άνοδος της θερμοκρασίας. Αν και πολλές από τις μοριακές συνοδούς βιοσυντίθενται συνεχώς (*constitutively expressed*) από τα κύτταρα, όταν αυτά εκτεθούν σε υψηλή θερμοκρασία, τότε τα επίπεδα βιοσύνθεσης τους αυξάνονται θεαματικά. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται ως θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες ή πρωτεΐνες

θερμικού σοκ (*Heat Shock Proteins*) καθώς η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τις συνθήκες στρες που επικρατούν στο περιβάλλον του κυττάρου και σε επίπεδα ανάλογα του αριθμού των συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών. Γενικά, οι μοριακές συνοδοί αναγνωρίζουν υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων και/ή αποδιατεταγμένες δομές (δηλαδή δομικά στοιχεία τα οποία εδράζονται στο εσωτερικό της κανονικής φυσικής διαμόρφωσης της πρωτεΐνης) ως υποστρώματά τους.

### 1.2.2. Μοριακές συνοδοί- Θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες

Τα κύτταρα απαιτούν αποτελεσματικά συστήματα για να επιβιώσουν μετά από σοβαρές στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι η έκθεση σε ακραίες θερμοκρασίες. Η απόκριση σε θερμικό σοκ είναι μια από τις πιο πρωτόγονες και υψηλά συντηρημένες αντιδράσεις για την κυτταρική επιβίωση. Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε μια γρήγορη αλλαγή στην έκφραση των γονιδίων και στη βιοσύνθεση μιας σειράς νέων πρωτεϊνών. Αυτή η αλλαγή επιτυγχάνεται, εν μέρει, με μια γενική αναστολή της μεταγραφής, ταυτόχρονα όμως παρατηρείται μια αύξηση στη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς. Παράλληλα με τις αλλαγές στο επίπεδο της μεταγραφής, παρατηρείται και μια επιλεκτική μετάφραση εκείνων των μηνυμάτων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που επάγονται από το θερμικό σοκ. Τα μηνύματα όμως που δεν μεταφράζονται κατά τη διάρκεια του θερμικού σοκ, δεν αποικοδομούνται, αλλά απλά απενεργοποιούνται. Αυτή η περίπλοκη διαδικασία είναι πλήρως αντιστρεπτή: Όταν η θερμοκρασία επανέλθει στα φυσιολογικά για τον οργανισμό επίπεδα, τα θερμοεπαγόμενα γονίδια σταματούν να μεταγράφονται, ενώ αρχίζουν να μεταγράφονται και πάλι τα υπόλοιπα γονίδια των κυττάρων.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ φέρουν στην περιοχή του προαγωγέα τους συγκεκριμένες ακολουθίες, οι οποίες αντικαθιστούν τις συνήθεις -35 και -10 περιοχές. Ο παράγοντας  $\sigma^{32}$  αναγνωρίζει συγκεκριμένες περιοχές του προαγωγέα και είναι καθοριστικός για την έναρξη της μεταγραφής. Το βακτήριο *Escherichia coli* χρησιμοποιεί δύο  $\sigma^{32}$  παράγοντες μεταγραφής των γονιδίων θερμικού σοκ, τον RpoH και RpoE. Η ίδια διαδικασία ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων θερμικού σοκ συμβαίνει και σε άλλα βακτήρια. Στο Gram αρνητικό βακτήριο *Bacillus subtilis*, η μεταγραφή ρυθμίζεται από τον  $\sigma$  παράγοντα SigB και καταστέλλεται από δύο διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, τους HrcA και CtsR (Toshiyuki et al, 2007).

Οι *Heat Shock Proteins* αποτελούν μια “υπεροικογένεια” πρωτεϊνών, υψηλά συντηρημένων κατά την εξέλιξη, που ταξινομούνται σε υπό-οικογένειες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, διακρίνονται σε οικογένειες των **100 kDa, 90 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 40 kDa**, την

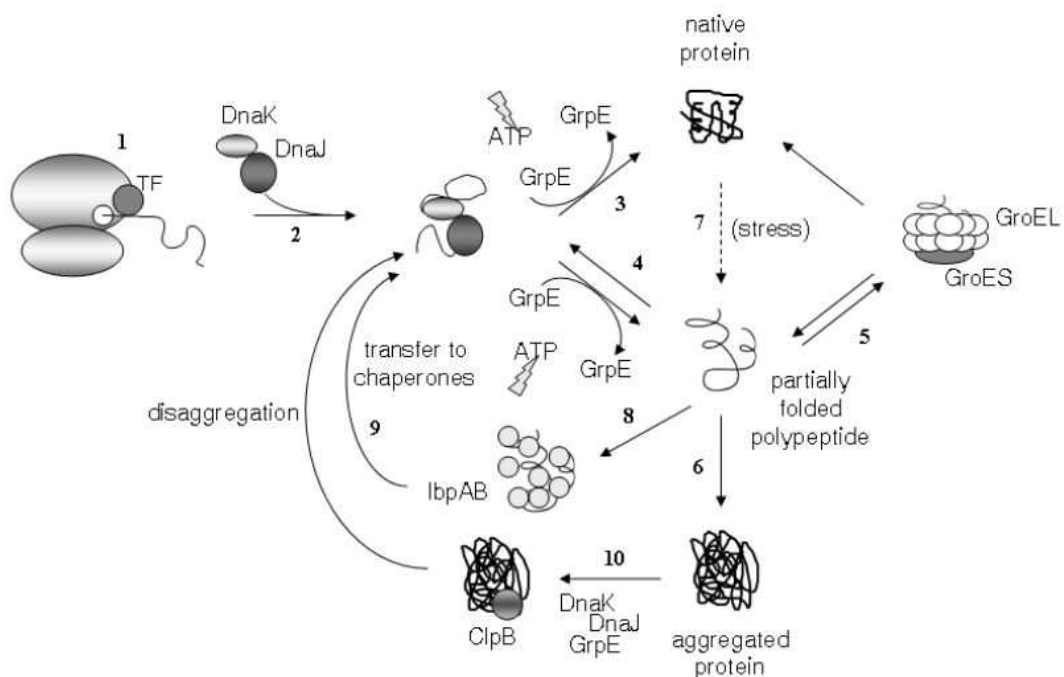
οικογένεια των **μικρών Hsps (10-28 kDa)** και την **ουμπικουΐτινη (ubiquitin)**. Οι ομάδες αυτές συμπεριλαμβάνουν μέλη που λειτουργούν είτε ως **μοριακές συνοδοί**, δηλαδή πρωτεϊνικά μόρια που συνεργάζονται και βοηθούν άλλες πρωτεΐνες στην αναδίπλωση, μεταφορά και σχηματισμό συμπλεγμάτων, είτε ως **πρωτεάσες**, όπως το εξαρτώμενο από την ουμπικουΐτινη πρωτεάσωμα, εξασφαλίζοντας την αποτελεσματική αποδόμηση και την παρεμπόδιση του σχηματισμού συσσωρευμάτων βραχύβιων ή μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι μοριακές συνοδοί, των οποίων η σύνθεση επάγεται μετά από θερμικό σοκ, σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα.

Πίνακας 1.1. Οικογένειες θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών

<i>Μοριακό Βάρος (kDa)</i>	<i>Προκαρυωτικές πρωτεΐνες</i>	<i>Ευκαρυωτικές πρωτεΐνες</i>	<i>Λειτουργία</i>
10 kDa	<b>GroES</b>	Hsp10	Σύμπλοκο με την GroEL.
20-30 kDa	<b>GrpE</b>	Οι HspB, 10 μέλη στα θηλαστικά που περιλαμβάνουν τις Hsp27, HspB1.	Παράγοντας υποκατάστασης νουκλεοτιδίων.
40 kDa	<b>DnaJ</b>	Hsp 40	Σύμπλοκο με την DnaK.
60 kDa	<b>GroEL</b>	Hsp60	Συμβολή στην πρωτεϊνική αναδίπλωση.
70 kDa	<b>DnaK</b>	Οι HspA που περιλαμβάνουν τις Hsp71, Hsp70, Hsp72, Grp78, Hsx70 (πρωτεύοντα θηλαστικά).	Πρωτεϊνική αναδίπλωση, συμβάλλει στη θερμοαντοχή του κυττάρου (συνθήκες στρες).
90 kDa	<b>HtpG, C62.5</b>	Οι HspC που περιλαμβάνουν τις Hsp90, Grp94.	Υποστήριξη δράσης παραγόντων μεταγραφής και στεροειδών υποδοχέων.
100 kDa	<b>ClpB, ClpA, ClpX</b>	Hsp 104, Hsp110.	Αντοχή σε εξαιρετικά υψηλές θερμοκρασίες.

### 1.2.3. Βασικές κατηγορίες μοριακών συνοδών που συμμετέχουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα της *Escherichia coli*

Στο βακτήριο *E.coli* οι βασικές κατηγορίες μοριακών συνοδών που συμμετέχουν στην πρωτεϊνική αναδίπλωση είναι ο παράγοντας πυροδότησης (Trigger factor, TF), τα μέλη των οικογενειών Hsp70 και Hsp60, DnaK και GroES αντίστοιχα, οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (sHsps) και η ClpB, η οποία αποδιατάσσει συσσωματώματα πολυπεπτιδίων. Η συνεισφορά των μοριακών συνοδών στη διαδικασία αναδίπλωσης των πολυπεπτιδίων συνοψίζεται σχηματικά στην εικόνα 1 (Kolaj et al, 2009).



Εικόνα 1.1. Η διαδικασία της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης στο κυτταρόπλασμα της *E.coli*:

Οι νεοσχηματιζόμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες αλληλεπιδρούν με την TF μόλις μετά την έξοδό της από το ριβόσωμα (1). Στο επόμενο βήμα το σχηματισμένο πολυπεπτίδιο αλληλεπιδρά με την DnaK ώστε να προωθηθεί η αναδίπλωση του και είτε το πολυπεπτίδιο να αποκτήσει τη τελική φυσική του διαμόρφωση (3) ή μια μερική αναδίπλωση (4). Το μερικώς ή ανεπιτυχώς αναδιπλωμένο πολυπεπτίδιο είτε αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα GroEL/GroES (5) ώστε να ολοκληρωθεί η αναδίπλωση είτε σχηματίζει συσσωματώματα (6). Μετά από θερμικό στρες, μπορεί να πραγματοποιηθεί μερική αποδιάταξη των θερμο-ευαίσθητων πρωτεϊνών, με συνέπεια τη συσσωμάτωσή τους λόγω της έκθεσης στο υδατικό περιβάλλον υδρόφοβων περιοχών τους (7). Οι μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ, όπως η IbpA και η IbpB δρουν ως συνοδοί στις μερικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες κατά την μεταφορά τους στις μοριακές συνοδούς Hsp60 και Hsp70 (8,9). Η πρωτεΐνη ClpB αποδιατάσσει τα συσσωματώματα των πολυπεπτιδίων, σε συνεργασία με το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών DnaK/DnaJ/GrpE.

### 1.3. Trigger factor

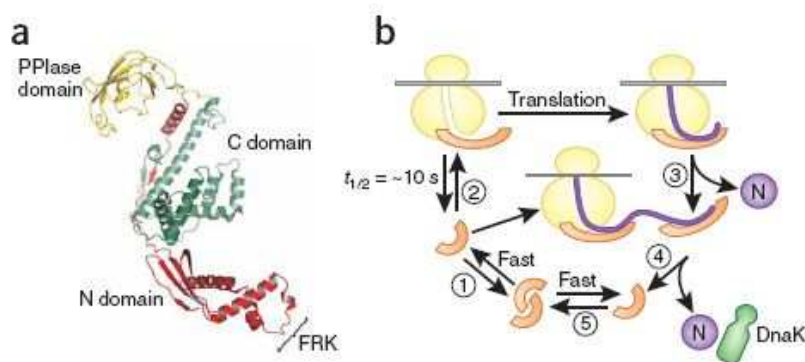
Ο Trigger factor είναι μια πρωτεΐνη μεγέθους **48 kDa** και αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές. Η πρωτεΐνη TF απαντάται στο κυτταρόπλασμα σε δύο μορφές: σε μορφή μονομερούς πρωτεΐνης, όταν βρίσκεται συνδεδεμένη με το ριβόσωμα σε αναλογία 1:1 και σε μορφή διμερούς πρωτεΐνης, όταν εντοπίζεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα, η οποία είναι σε ισορροπία με την μονομερή μορφή. Διαπιστώθηκε μετά από ανάλυση πρωτεϊνών με τη διαδικασία *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ότι το βακτήριο *E.coli* φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη TF.

Η πρόσδεση της TF στο ριβόσωμα έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα της διαμόρφωσής της πιθανά για την διευκόλυνση της αλληλεπίδρασης της TF με την νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Το ελάχιστο μήκος της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας που αλληλεπιδρά με την TF αποτελείται από 57 κατάλοιπα αμινοξέων. Σημειώνεται, ότι παρόλο που η πρωτεΐνη TF έχει δράση ΡΡΙΑσης (*Peptidyl-prolyl Isomerase*) *in vitro*, αναγνωρίζει νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια στόχους τα οποία δεν φέρουν κατάλοιπα προλίνης. Η απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από την TF δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την υδρόλυση της ATP και πιθανά επηρεάζεται από την τάση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας να εγκλωβίζει στο εσωτερικό της τις υδρόφοβες περιοχές. Η πρωτεΐνη TF φαίνεται να προωθεί την πρωτεϊνική αναδίπλωση δρώντας συνεργιστικά με την πρωτεΐνη DnaK της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp70 (Liu et al., 2005). Πράγματι, στο βακτήριο *E.coli* η συνδυασμένη απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις TF και DnaK και όχι η μεμονωμένη του ενός εκ των δύο, (τα μεταλλάγματα της επιβιώνουν στους 37°C), έχει θανάσιμες επιπτώσεις για το *E.coli* σε θερμοκρασία ανώτερη των 30°C (Teter et al., 1999).

#### 1.3.1. Δομή

Η πρώτη δομική περιοχή (1-145 κατάλοιπα αμινοξέων) εδράζεται στο αμινοτελικό άκρο της TF και είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο ριβόσωμα. Στο βακτήριο *Escherichia coli*, η πρωτεΐνη TF προσδέεται στο σημείο εξόδου ή διόδου (μεγέθους 80-100 Å) των πεπτιδίων του ριβοσώματος μέσω της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες L23 και L29 του ριβοσώματος και δρα ως η πρώτη πρωτεΐνη-μοριακή συνοδός. Η δεύτερη δομική περιοχή (148-249 κατάλοιπα αμινοξέων) παρουσιάζει δράση προλυλο-ισομεράσης (PPIase). Ο ρόλος της δράσης της ΡΡΙΑσης παραμένει αινιγματικός. Η αφαίρεση τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί για την δράση της PPIase μειώνει ελάχιστα την λειτουργία της πρωτεΐνης TF ως

μοριακής συνοδού (Scholz et al., 1997; Kramer et al., 2004; Merz et al., 2006). Η τρίτη δομική περιοχή παρουσιάζει δραστηριότητα μοριακού συνοδού (Εικόνα 2α).



Εικόνα 1.2. Δομή και λειτουργία της TF (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

α) Δομή της πρωτεΐνης TF όπου φαίνεται η περιοχή σύνδεσης με το ριβόσωμα, FRK.

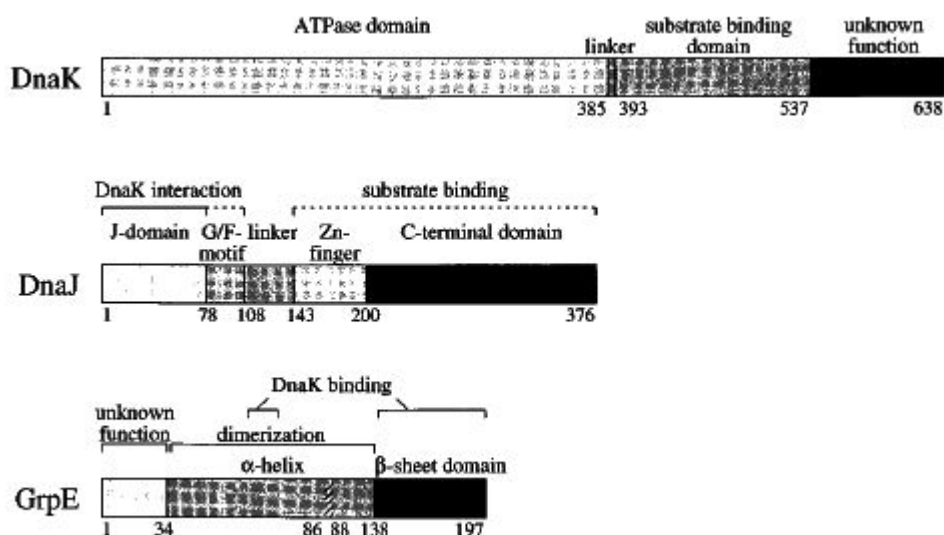
β) Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της πρωτεΐνης TF: (1) η πρωτεΐνη TF σε ελεύθερη κατάσταση ισορροπεί ανάμεσα σε μονομερή και διμερή μορφή. (2) Η μονομερής TF συνδέεται με το ριβόσωμα για 10 δευτερόλεπτα με  $K_d \sim 1 \mu\text{M}$ . Η σύνδεση αυτή προκαλεί μια μεταβολή στη δομή της πρωτεΐνης, η οποία εμφανίζεται πιο διευρυμένη στο χώρο. Έτσι, ενεργοποιείται για να αλληλεπιδράσει με τις νεοσχηματιζόμενες αλυσίδες. (3) Η αλληλεπίδραση, η οποία είναι ασθενής, πραγματοποιείται συ-μεταφραστικά, καθώς τα πολυπεπίδια δεσμεύονται από την TF, αμέσως μετά την έξοδό τους από το ριβόσωμα. Η αποδέσμευση των νεοσχηματιζόμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων από την TF συμπίπτει με την απελευθέρωση αυτής από το ριβόσωμα. (4) Οι αλυσίδες που είναι δομικά πολυπλοκότερες αλληλεπιδρούν πιο σθεναρά με την πρωτεΐνη TF. Η TF παραμένει συνδεδεμένη με την νεοσχηματιζόμενη αλυσίδα ακόμη και μετά από την έξοδό της από το ριβόσωμα, ενώ ένα άλλο μόριο TF εισέρχεται σε αυτό. Την αποδέσμευση του πολυπεπτιδίου από την TF ακολουθεί η μεταφορά του στο DnaK. (5) Η αποδέσμευμένη TF μεταπίπτει πάλι στην μονομερή ή διμερή μορφή.

### 1.3.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης

Γενικώς, η δραστηριότητα της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης TF συνοψίζεται ως ένας δυναμικός κύκλος δέσμευσης και αποδέσμευσης από το ριβόσωμα και ως ένας δυναμικός κύκλος πρόσδεσης και απελευθέρωσης νεοσχηματιζόμενων πολυπεπτιδίων (Bukau et al., 2000; Kaiser et al., 2006). Η πρωτεΐνη TF φαίνεται να προστατεύει νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια και να προωθεί την μετά-μεταφραστική τους διαμόρφωση στο χώρο (Stoller et al., 1995) (Εικόνα 2β).

## 1.4. DnaK

Η οικογένεια Hsp70 αποτελείται από ευρέως διαδεδομένες, υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες, με χαρακτηριστικό τους την ικανότητα να προσδένονται σε μικρές και γραμμικές υδρόφοβες περιοχές πολυπεπτιδίων. Επιπρόσθετα του ρόλου τους, υπό συνθήκες στρες, συμβάλλουν στην αναδίπλωση πολυπεπτιδίων και στην ενδοκυττάρια διακίνησή τους, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το γένωμα των βακτηρίων, με σπάνιες εξαιρέσεις, φέρει μικρό αριθμό γονιδίων (1-2) που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη DnaK ή για πρωτεΐνες που ομοιάζουν με την DnaK και αναφέρονται ως εξειδικευμένες DnaK (HscA και HscB). Οι HscA και HscB εμπλέκονται στην αναδίπλωση Fe-S πρωτεϊνών. Στα βακτήρια η δραστηριότητα της DnaK (~69 kDa) εξαρτάται από τις DnaJ (~41 kDa) και GrpE πρωτεΐνες (ομοδιμερές, ~22 kDa κάθε υπομονάδα) (Εικόνα 3).



Εικόνα 1.3. Οργάνωση των δομικών περιοχών των DnaK, DnaJ και GrpE (Bukau et al., 1998).

Οι περιοχές των DnaK, DnaJ και GrpE και ο αριθμός των αμινοξέων που καθορίζει τα (κατά προσέγγιση) σύνορα περιοχών, τα γνωστά δομικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα και τις λειτουργίες των περιοχών. Ο καθορισμός των περιοχών είναι βασισμένος στις τρισδιάστατες δομές και τις ευθυγραμμίσεις ακολουθιών που χρησιμοποιούν τυποποιημένους αλγόριθμους.

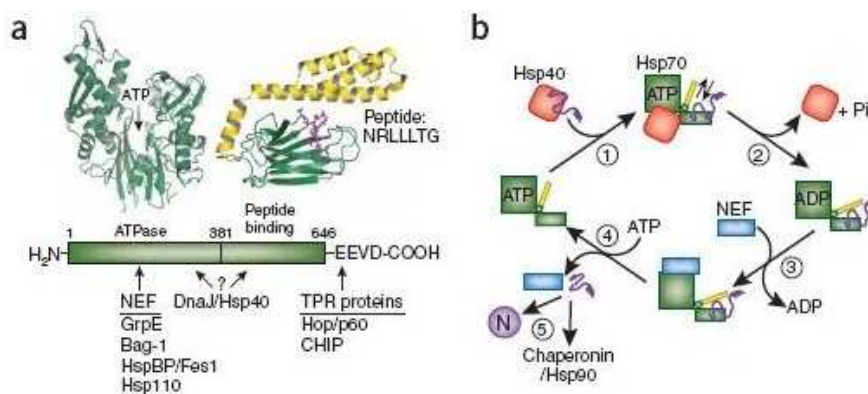
DnaK: τα αμινοξέα 386-392 αποτελούν έναν σύνδεσμο μεταξύ της ATPάσης και της περιοχής δέσμευσης των υποστρωμάτων.

Διαπιστώθηκε μετά από ανάλυση πρωτεϊνών με τη διαδικασία *blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ότι το βακτήριο *Escherichia coli* φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη DnaK, ένα για την πρωτεΐνη DnaJ και ένα για την GrpE.

### 1.4.1. Δομή της DnaK και ο κύκλος αλληλεπιδράσεων με τα υποστρώματα

Η δομή και ο μηχανισμός δράσης της DnaK έχει μελετηθεί εκτενώς στην *E.coli*. Η πρωτεΐνη DnaK περιέχει δυο δομικές περιοχές. Η πρώτη δομική περιοχή (~44 kDa) είναι εξελικτικά συντηρημένη και κωδικοποιεί για μια ΑΤΡάση και η δεύτερη δομική περιοχή (~27 kDa) είναι λιγότερο συντηρημένη και κωδικοποιεί την περιοχή πρόσδεσης με τις μη διπλωμένες πρωτεΐνες. Η περιοχή πρόσδεσης με τις μη διπλωμένες πρωτεΐνες διαχωρίζεται σε μικρότερες υπό-δομικές περιοχές (Εικόνα 3). Η κάθε υπό-δομική περιοχή φέρει μια περιοχή πρόσδεσης του πεπτιδίου-στόχου και μια περιοχή με δομή  $\alpha$ -έλικας. Τα πεπτίδια-στόχοι φέρουν μια υδρόφοβη περιοχή, παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια (5nM-5μM) με την DnaK, και απαντώνται στα πολυπεπτίδια στόχους με σχετικά υψηλή συχνότητα (κάθε 40 κατάλοιπα αμινοξέων του πολυπεπτιδίου-στόχου) (Εικόνα 3) (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

Τα πεπτίδια-στόχοι προσδένονται στην ενεργοποιημένη από το ATP, DnaK. Η συνδεδεμένη κατάσταση της DnaK με την ATP παρουσιάζει μια χαμηλή συγγένεια προς τα υποστρώματα, επομένως ο ρυθμός δέσμησης και απελευθέρωσης των υποστρωμάτων είναι ταχύς. Η DnaJ επιταχύνει την υδρόλυση της ATP από την DnaK. (Εικόνα 4b). Το εγκλωβισμένο πεπτίδιο-στόχος λαμβάνει την επιθυμητή διαμόρφωση με την ταυτόχρονη παροχή ενέργειας μέσω της υδρόλυσης της ATP. Η GrpE προσδένεται στη DnaK και διευκολύνει την απελευθέρωση του πεπτιδίου-στόχου. Η περιοχή 1-33 αα της GrpE είναι αρμόδια για την αλληλεπίδραση με την περιοχή δέσμησης υποστρώματος του DnaK και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών υποστρωμάτων από την DnaK (Brehmer et al., 2004).



Εικόνα 1.4. Σύστημα Hsp70 (DnaK) στα προκαρυωτικά και στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

α) Δομή της περιοχής της ΑΤΡάσης και της περιοχής πρόσδεσης των πεπτιδίων της DnaK του βακτηρίου *E.coli*. Η  $\alpha$ -έλικα αναπαρίσταται με κίτρινο χρώμα.

β) Κύκλος μηχανισμού αναδίπλωσης της DnaK/DnaJ/GrpE [Hsp40 (DnaJ), Hsp70 (DnaK), NEF (GrpE)].



### 1.4.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης

Η μεταφορά της νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πρωτεΐνης DnaJ, που ανήκει στην οικογένεια Hsp40. Η υδρόλυση του ATP σε ADP, που επιτυγχάνεται από την DnaJ, έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο της α-έλικας, η οποία λειτουργεί ως καπάκι και την πρόσδεση των πολυπεπτιδίων στην DnaK. Έπειτα, η DnaJ αποδεσμεύεται και απομακρύνεται από την DnaK. Η απομάκρυνση του ADP πραγματοποιείται από την πρωτεΐνη GrpE. Αφού ένα νέο μόριο ATP έχει δεσμευθεί, τότε ανοίγει το καπάκι και η αναδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα εξέρχεται. Σε περίπτωση ανεπιτυχούς αναδίπλωσης, το μη-αναδιπλωμένο πολυπεπτίδιο επανεισέρχεται στο σύστημα (εικόνα 4b).

Τα επίπεδα συγκέντρωσης της DnaK στο κύτταρο (~50  $\mu\text{M}$ ) υπερβαίνουν αυτά των ριβοσωμάτων (~30  $\mu\text{M}$ ). Η DnaK αλληλεπιδρά στοχευμένα κυρίως με νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια (υποστρώματα) μεγέθους μεγαλύτερου από 20 με 30 kDa και έτσι δρα διαδοχικά μιας άλλης πρωτεΐνης-μοριακού συνοδού, της Trigger factor. Σε περίπτωση απουσίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Trigger factor, το ποσοστό των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων που αλληλεπιδρούν με την DnaK αυξάνεται από ~15% σε ~40%. Ορισμένα από τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπτίδια αλληλεπιδρούν με την DnaK για μικρά χρονικά διαστήματα (< 1 λεπτό) και απελευθερώνονται έχοντας ολοκληρώσει την τελική τους διαμόρφωση ενώ άλλα απελευθερώνονται από την DnaK μετά από τουλάχιστον 10 λεπτά (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

Οι πρωτεΐνες μεγάλου μεγέθους (> 60 kDa) που δε μπορούν να εισέλθουν στην κοιλότητα των μοριακών συνοδών GroEL-GroES, αλληλεπιδρούν με την DnaK η οποία τις βοηθά να αποκτήσουν, μετά-μεταφραστικά, τη σωστή δομή, ώστε να είναι βιολογικά ενεργές (Teter et al., 1999). Απουσία του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη DnaK αλλά και του TF, παρατηρήθηκε συσσώρευση πολυάριθμων νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, μεγάλου μεγέθους (> 60 kDa) υπό μορφή αδιάλυτων, βιολογικά ανενεργών πολυπεπτιδίων (Deuerling et al., 1999).

### 1.4.3. Πώς όμως οι κύκλοι αναδίπλωσης προωθούν την αναδίπλωση και τη σωστή δομή των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών;

Ο κύκλος αναδίπλωσης μιας βιολογικά ανενεργής πρωτεΐνης από την οικογένεια Hsp70 μπορεί να επαναληφθεί σε περίπτωση που η πρωτεΐνη εγκαταλείψει την μοριακή συνοδό χωρίς να έχει αναδιπλωθεί σωστά. Συνεπώς, η μερικώς αναδιπλωμένη πρωτεΐνη επανεισέρχεται στο σύστημα της Hsp70 και επαναλαμβάνεται ο κύκλος. Οι μεγάλες πρωτεϊνικές αλυσίδες μπορούν να υποβοηθηθούν και από πολλαπλά, ανεξάρτητα Hsp70 μόρια με σκοπό την *παρεμπόδιση* σχηματισμού ενδοκυττάρων σωματιδιακών εγκλείστων. Αυτή η λειτουργία επιβεβαιώνεται από την πρόσφατη ανακάλυψη της δράσης ΡΡΙάσης της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp70 (Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

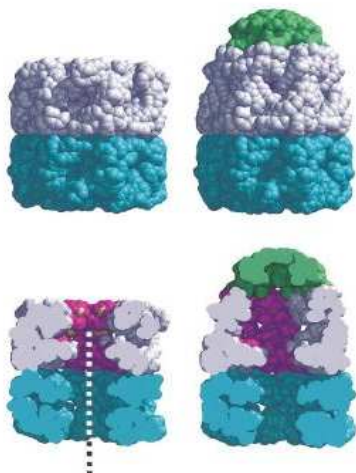
## 1.5. GroEL – GroES

Το καλύτερα μελετημένο σύστημα μοριακών συνοδών αποτελεί η βακτηριακής προέλευσης, πρωτεΐνη GroEL που ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών Hsp60 και πρόκειται για μια μεγάλο μεγέθους πρωτεΐνη με δομή δακτυλίου δυαδικής συμμετρίας (Boisvert et al., 1996; Xu et al., 1997; Grallert and Buchner, 2001). Η οικογένεια Hsp60 είναι μεταξύ άλλων το πιο εκτενέστερα μελετημένο πρωτεϊνικό σύστημα και αποτελείται από την GroEL, την GroES και ομόλογα γονίδια στους προκαρυώτες, χλωροπλάστες και μιτοχόνδρια αλλά και στην οικογένεια TRiC/TCP-1, στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες GroEL/GroES κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνική αναδίπλωση καθώς παρέχουν ένα προστατευμένο περιβάλλον, εντός του οποίου επιτρέπεται η εκ νέου αναδίπλωση, αποφεύγοντας τον σχηματισμό συσσωματωμάτων και την κατακρήμνισή τους.

Γονίδια που κωδικοποιούν για την GroEL και την GroES απαντώνται σχεδόν σε όλα τα βακτήρια. Τα περισσότερα βακτήρια φέρουν τουλάχιστον δυο γονίδια που κωδικοποιούν για την GroEL και την GroES. Διαπιστώθηκε μετά από ανάλυση πρωτεϊνών με τη διαδικασία *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ότι το βακτήριο *E.coli* φέρει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για την GroEL. Ωστόσο, έχει δειχθεί ότι άλλα βακτήρια, όπως το *Mesorhizobium loti*, φέρουν έως πέντε αντίγραφα του γονιδίου αυτού. Στο *E.coli*, το σύμπλοκο GroEL/GroES αλληλεπιδρά με περισσότερες από 250 πρωτεΐνες, ενώ μπορεί δυνητικά να συμβάλει στην αναδίπλωση όλων των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες έχουν μέγεθος, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 20-60 kDa.

### 1.5.1. Δομή

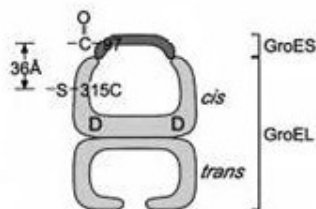
Η δομή της πρωτεΐνης GroEL προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, το 1994. Η πρωτεΐνη **GroEL** αποτελείται από ένα κυλινδρικό σύμπλοκο μεγέθους ~800 kDa που αποτελείται από δύο επταμερείς δακτυλίους με υπομονάδες μεγέθους ~57 kDa και ένα κεντρικό κανάλι, στο οποίο δεσμεύονται νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια. Οι επτά υπομονάδες του κάθε δακτυλίου διευθετούνται με τέτοιο τρόπο, ώστε να συνδέονται με έναν άξονα συμμετρίας. Η πρωτεΐνη **GroES**, ένας επταμερής δακτύλιος 10 kDa υπομονάδων εδράζεται στο άκρο του GroEL κυλίνδρου (Εικόνα 5).



Εικόνα 1.5. Δομή του συμπλόκου GroEL/GroES και της ακραίας περιοχής δέσμευσης πολυπεπτιδίων (Bukau et al., 1998).

Μοντέλο της δομικής μονάδας της GroEL (αριστερά) και του συμπλόκου GroEL/GroES (δεξιά). Η εξωτερική (επάνω) και η εσωτερική, με εγκάρσια τομή, (κάτω) όψη των πρωτεϊνών. Η μπλε περιοχή αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη GroEL, η πράσινη στην GroES και η μωβ στην υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα.

Κάθε υπομονάδα της GroEL αποτελείται από την **ισημερινή ATPase** περιοχή (**Equatorial**), την **ακραία** περιοχή (**Apical**) και την **ενδιάμεση** περιοχή (**Intermediate**). Οι δακτύλιοι βρίσκονται τοποθετημένοι ο ένας πάνω στον άλλον, δημιουργώντας μια ενδιάμεση επιφάνεια μεταξύ τους που σχηματίζεται κατά μήκος του ισημερινού επιπέδου (Branden and Tooze, 1999) (Εικόνα 7).



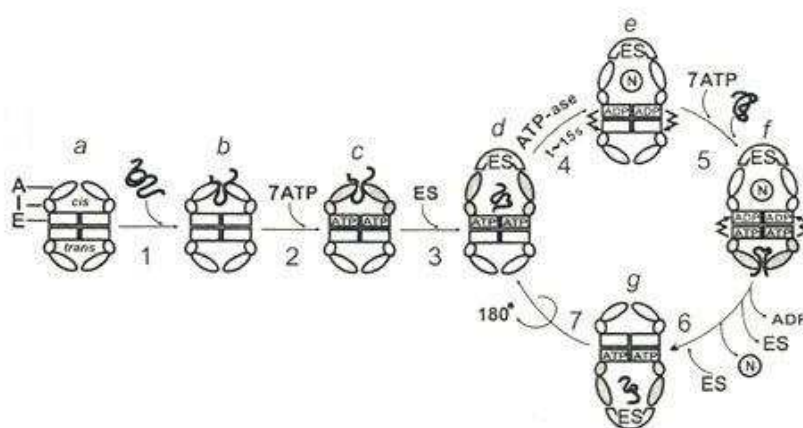
Εικόνα 1.6. Δομική διαμόρφωση του συμπλόκου GroEL-GroES. Είναι ορατή η διαφοροποίηση των *cis* και *trans* περιοχών (Farr et al., 2003).

### 1.5.2. Μηχανισμός αναδίπλωσης

Ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ξεκάθαρος αλλά τα κύρια γνωρίσματα του λειτουργικού κύκλου είναι πλέον γνωστά.

Το πρώτο στάδιο (εικόνα 7, στάδιο 1) περιλαμβάνει την δέσμευση της νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, με έναν ισχυρό δεσμό, στην πρωτεΐνη GroEL. Η δέσμευση γίνεται στον *cis* δακτύλιο και πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση μεταξύ της ακραίας περιοχής της GroEL με την υδρόφοβη περιοχή του πολυπεπτιδίου. Έπειτα, επτά μόρια ATP προσδέονται στην ισημερινή περιοχή του *cis* δακτυλίου (στάδιο 2). Η πρόσδεση του ATP πυροδοτεί το κλείσιμο της κοιλότητας, με τη συμμετοχή της GroES (στάδιο 3). Έπειτα από την υδρόλυση του μορίου ATP και την μετατροπή του σε ADP, προκύπτει το σύμπλοκο GroEL/ADP/πολυπεπτιδίο/GroES (στάδιο 4). Ο δακτύλιος της GroEL, στον οποίο δεσμεύεται η GroES σε *cis* θέση, υπόκειται σε αλλοστερικές δομικές μεταβολές (στάδιο 5). Παράλληλα, η μεταγωγή του σήματος προκαλεί την πρόσδεση επτά νέων μορίων ATP στον *trans* δακτύλιο, όπου αυτό με τη σειρά του πυροδοτεί την μεταγωγή νέου σήματος στον *cis* δακτύλιο. Έτσι, μαζί με την πρόσδεση της GroES στον *trans* δακτύλιο και την είσοδο νέας μη διπλωμένης πρωτεΐνης στην κοιλότητα, αποδεσμεύονται από τον *cis* δακτύλιο με τη σειρά το ADP, η πρωτεΐνη GroES και τελευταίο το αναδιπλωμένο πολυπεπτιδίο (στάδιο 6) (Nagradona, 2008).

Η είσοδος της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας στον δακτύλιο της GroEL (*cis*), η λεγόμενη “**Anfinsen**” κοιλότητα, ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις της (εικόνα 6).



Εικόνα 1.7. Προτεινόμενο μοντέλο πρωτεϊνικής αναδίπλωσης από το σύμπλοκο GroEL/GroES (Nagradona, 2008).

Η υδρόλυση των επτά μορίων ATP στον *cis* δακτύλιο ενισχύει τη συγγενεία του με την GroES και οδηγεί σε μερικές διαμορφωτικές αλλαγές στις ακραίες περιοχές με συνέπεια την απελευθέρωση του πρωτεϊνικού στόχου στην κοιλότητα “Anfinsen” για το αυθόρμητο δίπλωμα σε μια περιοχή απομονωμένη από το διαλύτη. Οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται είτε στην *cis* είτε στην *trans* θέση, ανάλογα με το μέγεθός τους, όπως έχει προαναφερθεί. Αρχικά, η μη-διπλωμένη πρωτεΐνη δεσμεύεται στον *cis* δακτύλιο, στην ανοιχτή δομή του συμπλόκου. Έπειτα, η πρωτεΐνη εισέρχεται μέσα στη κοιλότητα. Η υδρόλυση του ATP και η δέσμευση της μη-διπλωμένης πρωτεΐνης και του ATP στον δεύτερο δακτύλιο (*trans*), οδηγεί ακολούθως στην απελευθέρωση της GroES, του ADP και της πρωτεΐνης από την *cis* κοιλότητα, με έναν δευτερογενή μηχανισμό. Η απελευθέρωση της GroES, όπως και η δέσμευσή της απαιτεί υδρόλυση του ATP, αλλά αυτή τη φορά από μόρια ATP που δεσμεύονται στο μακρινό δακτύλιο της GroEL, στην *trans* θέση. Πιστεύεται ότι συμβαίνουν πολυάριθμοι λειτουργικοί κύκλοι για την αναδίπλωση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ώστε αυτή να λάβει τη σωστή, βιολογικά ενεργή διαμόρφωση. Κάθε κύκλος διαρκεί 10-15 s και καταναλώνει επτά μόρια ATP (Todd 1994, Rye et al., 1999). Εσωτερικά της κοιλότητας, έχουν προταθεί διαφορετικά μοντέλα για το τί συμβαίνει. Πειράματα απέδειξαν ότι η αναδίπλωση συμβαίνει εσωτερικά της κοιλότητας *cis* και οδηγεί είτε στη φυσική κατάσταση, είτε στην ενδιάμεση κατάσταση. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η αναδίπλωση συμβαίνει σε κλειστό περιβάλλον, εμποδίζοντας τη συσσωμάτωση ή την αλληλεπίδραση με άλλες μη-διπλωμένες πρωτεΐνες (Nagradova, 2008).

Το σύμπλοκο GroEL–GroES λειτουργεί ως δεσμευτής μη διπλωμένων ή μερικώς διπλωμένων πολυπεπτιδίων, καθώς σχηματίζει ένα *trans* τριαδικό σύμπλοκο. Η λειτουργία του συμπλόκου αυτού, εξαρτάται άμεσα από την πρόσδεση του ATP καθώς καθορίζει την θέση της πρωτεΐνης GroES (άνοιγμα/κλείσιμο κοιλότητας).

## 1.6. sHsps – Μικρές Hsp

Οι sHsps είναι μια ομάδα πρωτεϊνών που συναντώνται *in vivo*, ως μακρομοριακά σύμπλοκα, με στοιχειομετρία που διαφέρει ανάμεσα στις κατηγορίες των εν λόγω πρωτεϊνών. Αλληλεπιδρούν με μη διπλωμένες πρωτεΐνες και δεν δεσμεύουν μόρια ATP. Η εξαιρετικά αργού ρυθμού απελευθέρωση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν, έχει οδηγήσει στη διαπίστωση ότι λειτουργούν ως δεξαμενές μη διπλωμένων πολυπεπτιδίων. Επίσης, έχει δειχθεί ότι, μετά την απομάκρυνση του στρες, οι sHsps συνεργάζονται με μοριακές συνοδούς, όπως η οικογένεια Hsp70, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πεπτιδίου στόχου και την ATP-εξαρτώμενη αναδίπλωσή του. Η δραστηριότητά τους προσέκλυσε το ενδιαφέρον των

ερευνητών ως έναν επιπρόσθετο μηχανισμό αναδίπλωσης ή αύξησης της διαλυτότητας ετερόλογων πρωτεϊνών στο βακτήριο *E.coli* (Kolaj et al., 2009).

## 1.7. Η αξιοποίηση των μοριακών συνόδων στη βελτίωση της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών στο *E.coli*

Την τελευταία δεκαετία έχουν κατασκευασθεί πλασμίδια τα οποία υπερεκφράζουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για διάφορες μοριακές συνοδούς (GroEL/ES, DnaK/DnaJ). Η συν-έκφραση αυτών των πλασμιδίων με συμβατά πλασμίδια που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες βιοτεχνολογικής σημασίας, έχει οδηγήσει στη βελτίωση της παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.

### 1.7.1. Συν-έκφραση του TF

Η συν-έκφραση της πρωτεΐνης TF οδήγησε σε μια τετραπλάσια αύξηση της έκφρασης του αντισώματος *Fab* στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E.coli*, καθώς και σε αυξημένα επίπεδα της διαλυτής ανθρώπινης ORP150 και της λυσοζύμης, στην αναδίπλωση της οποίας συνέβαλε και η GroES. Παρομοίως, η συνεργιστική δράση των TF και της πρωτεΐνης Hsp60 οδήγησε σε μια περίπου τριπλάσια αύξηση της διαλυτότητας του μεταφραστικού παράγοντα *eIF2a*. Η υπέρ-έκφραση της πρωτεΐνης TF μπορεί επίσης να δρα συνεργιστικά με την DnaK, όπως παρατηρήθηκε στην παραγωγή της τρυσουλφουραμίνωσης του ήπατος ινδικού χοιριδίου και της βασοστατίνης (*vasostatin*) (Kolaj et al, 2009).

### 1.7.2. Συν-έκφραση των DnaK-DnaJ-GrpE

Η συν-έκφραση των γονιδίων DnaK/DnaJ/GrpE έχει δώσει τη δυνατότητα να εκφρασθούν επιτυχώς μια ομάδα πρωτεϊνών, που άλλοτε σχημάτιζαν σωματιδιακά έγκλειστα. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει αντισώματα (*scFv*, *single-chain antibody fragment*), κινάσες (*human tyrosine kinases Csk, Fyn and Lck*), μονοοξυγονάσες (*cyclohexanone monooxygenase*) και αλλεργιογόνα (*cedar pollen allergen*). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η συν-έκφραση των DnaK/DnaJ, χωρίς την παρουσία της GrpE, αυξάνει την παραγωγή πρωτεϊνών, καταστέλλει τον σχηματισμό σωματιδιακών εγκλείστων, βελτιώνει την διαλυτότητα και αυξάνει τη δραστηριότητα πολυάριθμων πρωτεϊνών (Kolaj et al., 2009).

Αντιθέτως, όσον αφορά στην περίπτωση πολυπεπτιδίων πλούσιων σε προλίνη, το σύμπλοκο DnaK/DnaJ επηρεάζει ελάχιστα την διαλυτότητα τους και δυσμενώς την παραγωγή και την δράση τους. Άλλοι ερευνητές έχουν τονίσει ότι ο σχηματισμός σωματιδιακών εγκλείστων μπορεί να αποφευχθεί, όταν οι DnaK/DnaJ/GrpE εκφράζονται σε διπλάσια ή τριπλάσια

επίπεδα, αλλά οδηγεί σε μειωμένα ποσοστά ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα αυτά τονίζουν ότι η υπερπαραγωγή των μοριακών συνοδών στο κύτταρο πρέπει να ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου για αναδίπλωση πρωτεϊνών-στόχων παρά δευτερογενών πρωτεϊνικών ειδών (Kolaj et al., 2009).

### 1.7.3. Συν-έκφραση GroEL/GroES

Η υπερέκφραση των GroEL/GroES, αποδείχθηκε μια αποτελεσματική μέθοδος ώστε να επιλύσουμε ζητήματα μη σωστής αναδίπλωσης πρωτεϊνών, αυξάνοντας τη διαλυτότητα πολυπεπτιδίων που σχηματίζουν σωματιδιακά έγκλειστα. Παρά αυτό το εντυπωσιακό ιστορικό και το γεγονός ότι η πρωτεΐνη GroEL έχει δείχθει να υποστηρίζει την αναδίπλωση ενός σημαντικού αριθμού νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων στο *E.coli*, η υπερέκφραση του συστήματος GroEL/GroES δεν θεωρείται ακόμα πανάκεια για την διαλυτότητα ετερόλογων πρωτεϊνών. Υπάρχουν πολυάριθμες βιβλιογραφικές αναφορές για το σύστημα πρωτεϊνών GroEL/GroES, όπου δεν βελτιώθηκε η πρωτεϊνική διαλυτότητα, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η συνέκφραση της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp70 ήταν επιτυχής (Kolaj et al., 2009).

Η υπερέκφραση του συστήματος GroEL/GroES έχει δείχθει επίσης να οδηγεί σε μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα και χαμηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής έκφρασης. Συνεπώς, συμπεραίνεται ένας βαθμός εκλεκτικότητας εκ μέρους των GroEL/GroES, από τα διαφορετικά αποτελέσματα στην έκφραση δύο ανθρώπινων παραλλαγών του ενζύμου της αρωματάσης (*aromatase*) που διαφέρουν μόνο κατά μια αμινοξική ακολουθία. Η υπερέκφραση του συστήματος GroEL/GroES απέτυχε να βελτιώσει την αναδίπλωση πρωτεϊνών με πολυσύνθετους δισουλφιδικούς δεσμούς (Kolaj et al., 2009).

### 1.7.4. Συν-έκφραση των μικρών Hsp (sHsp)

Οι πρωτεΐνες IbpA και IbpB του βακτηρίου *E.coli*, αποτρέπουν τη μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση σωματιδιακών εγκλείστων. Η υπερέκφραση της IbpA είχε ως συνέπεια την αύξηση της παραγωγής του μηλικού ενζύμου του *E.coli*, της GFP, της ανθρώπινης IGF-If, της ιντερφερόνης  $\gamma$  και της  $\beta$  αλυσίδας της ιντερλευκίνης-12 από 1.3 έως 2x στο κυτταρόπλασμα του *E.coli*. Επίσης, αύξησε τη διαλυτότητα 17 σε σύνολο 23 πρωτεϊνών που ήταν δύσκολο να εκφραστούν. Πρόσφατα, ο ερευνητής De Marco και η ομάδα του παρουσίασαν μια μελέτη που αφορούσε τις επιπτώσεις της συνέκφρασης της IbpAB με τις Hsp70, Hsp60 και τη πρωτεΐνη ClpB. Η συνέκφραση της IbpAB είχε ως αποτέλεσμα την



αύξηση της διαλυτότητας 20 σε σύνολο 23 πρωτεϊνών, περιλαμβάνοντας 12 πρωτεΐνες, οι οποίες ήταν πλήρως αδιάλυτες, απουσία της IbrAB (Kolaj et al., 2009).

## 1.8. Σκοπός

Τα βακτήρια, και ιδιαίτερα το βακτήριο *Escherichia coli*, αποτελούν τον πιο κατάλληλο οργανισμό για έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα. Οι υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης, η απλή γενετική, η παραγωγή υψηλής κυτταρικής βιομάζας και το ευρύ φάσμα των γενετικών μεθόδων και εργαλείων που μπορούν να εφαρμοσθούν σε αυτά είναι λίγα από τα πλεονεκτήματα τους. Έχουν την δυνατότητα να φέρουν πολλαπλά αντίγραφα πλασμιδιακών φορέων έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών, τα οποία φέρουν ισχυρούς προαγωγείς με αποτέλεσμα την ασυνήθιστα υψηλού ρυθμού μεταγραφή των κλωνοποιημένων γονιδίων. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της συνέκφρασης των μοριακών συνοδών στην αύξηση της διαλυτότητας της καρβονικής αφυδατάσης (CA) φυτικής, ζωικής ή βακτηριακής προέλευσης και της χαρπίνης (HgrZ).

Πίνακας 1.2: Πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργικότητα υποβοηθείται από το σύστημα πρωτεϊνών αναδίπλωσης GroE (Kolaj et al., 2009).

Ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη	Συνέκφραση των μοριακών συνοδών GroE
Προκολλαγενάση (ανθρώπινη)	Δεκαπλάσια αύξηση επιπέδων έκφρασης και διαλυτότητας
Κινάση τυροσίνης (p50csk)	>50% αύξηση της διαλυτότητας και της δράσης της
Μεταλλοένζυμο του <i>Candida albicans</i> (PMI)	Διπλάσια αύξηση της διαλυτότητας
α-1,6-φουκοσυλτρανσφεράση από <i>Rhizobium</i> sp.	Αύξηση της δραστηριότητας έως 1,76x στους 30°C
4-δεϋδρογονάση πυριδοξάλης από <i>Microbacterium luteolum</i>	Συνέκφραση στους 20°C μείωσε τα ποσοστά αδιάλυτης πρωτεΐνης και αύξησε την δραστηριότητα 9,1x
β-γλυκοσιδάση από <i>Cellobivrio gilvus</i> και <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Χαμηλότεροι ρυθμοί ανάπτυξης αλλά 20–60% αυξημένη διαλυτότητα στους 37°C και έως 70% στους 25°C
Ολιγο-1,6-γλυκοσιδάση από <i>Bacillus thermoglucosidasius</i>	Αύξηση δραστηριότητας έως 44%, 56% και 56% με συνέκφραση των GroES, GroEL και GroESL αντίστοιχα
Ευκαρυωτική αμμωνιολυάση της φαινυλαλανίνης	Δραματική βελτίωση της δραστηριότητας έπειτα από την απομάκρυνση σπάνιων κωδικονίων (rare codons)
Ρεδουκτάση της αδρενοδοξίνης (AdR)	Αύξηση ποσοστού διαλυτής πρωτεΐνης έως 10 mg/l, σε σύγκριση με 4 mg/l από την Hsp70
Παράγοντας μεταγραφής κυανοβακτηρίου	Έως τετραπλάσια αύξηση της διαλυτότητας
4-α-γλουκανοτρανσφεράση του <i>Thermococcus litoralis</i> (GTase)	Πενταπλάσια αύξηση δραστηριότητας του διαλυτού μέρους με συνέκφραση των tRNA <sub>AGA</sub> and tRNA <sub>AGG</sub>
Καρβαμοϋλάση του <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Τετραπλάσια αύξηση της δραστηριότητας
N-ακυλο-D-αμινοξική αμινοϋδρολάση <i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	Αύξηση δραστηριότητας από 7.8 έως 72.4 U/mg και 7.1 έως 22.7 U/mg, αντίστοιχα, στους 30°C
Δικαρβοξυλάση α-κετο-δεϋδρογονάσης	Αύξηση δραστηριότητας 500x
Προτοπορφυρινογενής οξειδάση καλαμποκιού (PPO)	Αύξηση διαλυτότητας 6x
Καταλάση μαγγανίου από <i>Thermus</i> sp.	50% αύξηση διαλυτότητας
Ειδικό μονόκλωνο αντίσωμα (scFv) ειδικό για την c-Met	Αύξηση διαλυτότητας έως 2x στο <i>E. coli</i> Origami2(DE3) αλλά όχι στο BL21(DE3)
Fab αντίσωμα	Αύξηση διαλυτότητας 4x
D-καρβαμοϋλάση του <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60% αύξηση διαλυτότητας και αύξηση δραστηριότητας 6,2x στους 28°C ενώ στους 25°C 75% και 4,5x αντίστοιχα
NADPH: Οξειδορεδουκτάση κουϊνόνης	Τριπλάσια αύξηση διαλυτότητας
Ακονιτάση	Αύξηση διαλυτότητας 40% και αύξηση δραστηριότητας 1,5x
Desulfinate <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Αύξηση διαλυτότητας έως 50% και αύξηση δραστηριότητας 25x
Ρακεμάση από <i>E.coli</i> (GluR)	Αύξηση ποσοστού 2,2x καθώς και βελτιωμένη ανάπτυξη κυττάρων
Δισμουτάση φορμαλδεϋδη νικοτινοπρωτεΐνης (NDF) από <i>Pseudomonas putida</i> F16	Αύξηση διαλυτότητας έως 80% και αύξηση δραστηριότητας 6x (με τον <i>tac</i> προαγωγέα)
Μεθυλτρανσφεράση PP2A (ανθρώπινη)	Αύξηση διαλυτότητας 24x

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1. Το βακτήριο *Escherichia coli* BL21 DE3

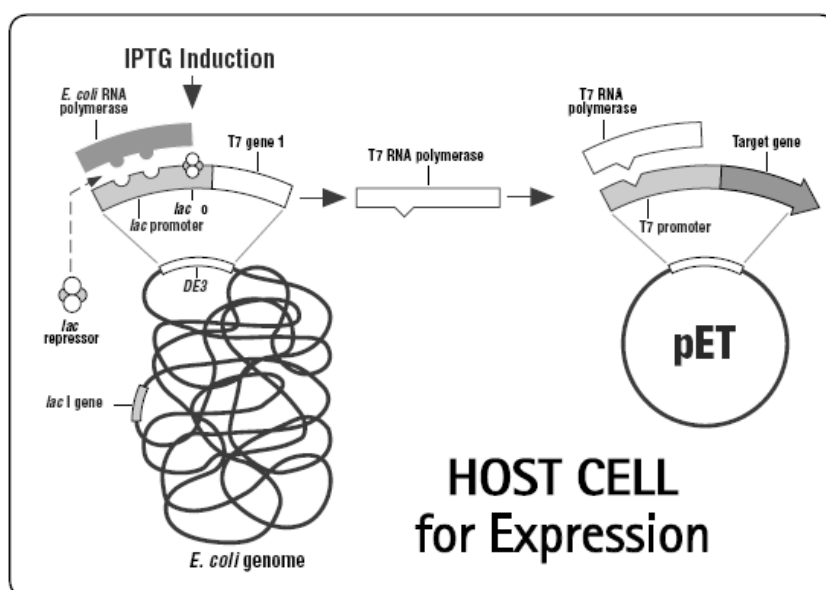
Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Escherichia coli*, στέλεχος BL21 DE3. Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ένας Gram αρνητικός οργανισμός, προαιρετικά αναερόβιος, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C, που ανήκει στα γ-πρωτεοβακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*.

F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

- *E. coli* στελέχους B, με τον DE3, ένα λ προφάγο που περιέχει το γονίδιο T7 RNA πολυμεράσης και το *lacI<sup>f</sup>*.
- Μετασηματισμένα πλασμίδια που περιέχουν τον T7 προαγωγέα έκφρασης, καταστέλλονται μέχρι την επαγωγή της T7 RNA πολυμεράσης, με IPTG από τον *lac* προαγωγέα.

Taxonomy ID: 469008

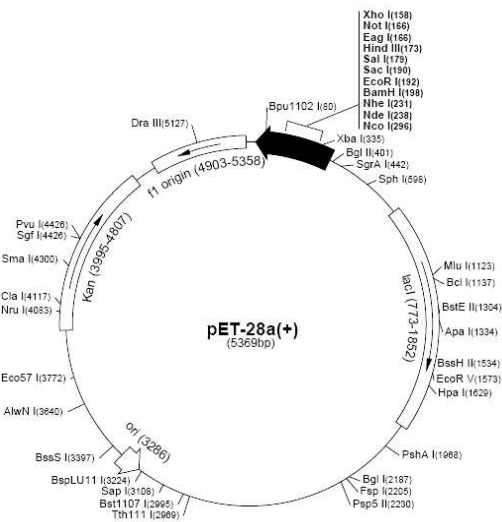
Inherited blast name: **enterobacteria**



Εικόνα 2.1. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3.

## 2.2. Ο πλασμιδιακός φορέας *pET 28a*

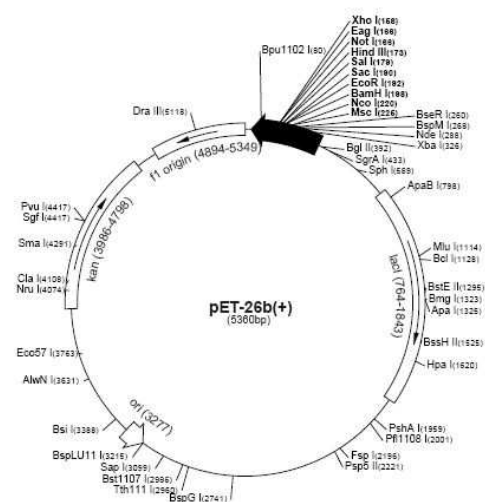
Ο πλασμιδιακός φορέας *pET28a* περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2. Φορέας έκφρασης *pET28a(+)*.

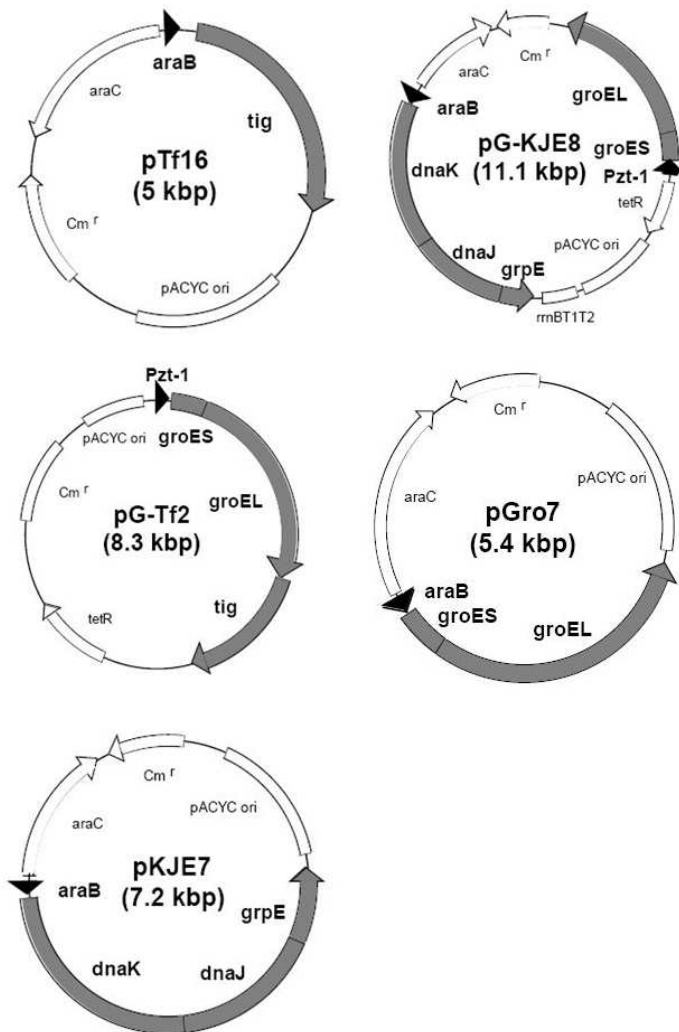
## 2.3. Ο πλασμιδιακός φορέας *pET 26b*

Ο πλασμιδιακός φορέας *pET26b* περιγράφεται σχηματικά στην εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3. Φορέας έκφρασης *pET26b(+)*.

## 2.4. Πλασμίδια (Takara plasmid set)



Εικόνα 2.4. Σχηματική απεικόνιση των πλασμιδίων που φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις διάφορες πρωτεΐνες - μοριακές συνοδούς.

Τα σετ των πλασμιδίων κωδικοποιούν τις εξής πρωτεΐνες:

- **pTf16:** Trigger factor.
- **pG-KJE8:** GroEL/GroES, DnaK/DnaJ/GrpE.
- **pG-Tf2:** Trigger factor, GroEL/GroES.
- **pGro7:** GroEL/GroES.
- **pKJE7:** DnaK/DnaJ/GrpE.

## 2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

### 2.5.1. Μέθοδος miniprep (Qiagen Kit)

- 5 mL θρεπτικού υλικού LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό, εμβολιάζονται με μονή αποικία μετασχηματισμένων, με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *Escherichia coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.
- Από την καλλιέργεια αυτή 2 x 1.5 mL μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνται στις 10.000 στρ./λεπτό για 2 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 250 µL ρυθμιστικού διαλύματος P1 που περιέχει RNάση A.
- Προστίθενται 250 µL διαλύματος P2 και ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση.
- Έπειτα, προστίθενται επιπλέον 350 µL διαλύματος N3 και αμέσως αναστρέφεται ο σωλήνας 4-6 φορές. Το εναιώρημα θολώνει.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 στρ./λεπτό, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί άσπρο ίζημα.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε κολώνα QIAprep spin column.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα και το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται.
- Η στήλη ξεπλένεται με 750 µL ρυθμιστικό διάλυμα PE και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30-60 δευτερόλεπτα.
- Το διερχόμενο από το φίλτρο υγρό απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται για 1 λεπτό.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα erpendorf και προστίθενται 50 µL διαλύματος EB ή ddH<sub>2</sub>O, αφήνεται για 1 λεπτό και τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA.

## 2.6. Δημιουργία δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli* BL21 DE3

- 5 mL LB εμβολιάζονται με μια αποικία *Escherichia coli* BL21 DE3 και επωάζονται, με ανακίνηση, για περίπου 18 ώρες στους 37°C.
- 2 mL της καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 mL LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C, για περίπου 2 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα να είναι περίπου 0.3-0.4.

- Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ/λεπτό για 10 λεπτά.
- Το ίζημα των κυττάρων, αφού επαναδιαλυθεί με ήπια ανάδευση σε 50 mL 0.1 M MgCl<sub>2</sub> φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στρ/λεπτό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> και διατηρείται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 6.000 στρ/λεπτό.
- Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 mL 0.1 M CaCl<sub>2</sub> και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 20% (v/v).
- Τα κύτταρα αφού μοιραστούν σε σωλήνες erpendorf (50-200 μl) αποθηκεύονται στους -80°C.

## 2.7. Μετασχηματισμός *Escherichia coli* κυττάρων (transformation) με τα πλασμίδια HrpZ, CA<sub>Azotobacter</sub>, CA<sub>C.elegans</sub>, CA<sub>Arabidopsis</sub> και τα πλασμίδια pGKJE8, pGro7, pGTf2, pKJE7, pTf16

- Μεταφέρονται 50 μL από τα δεκτικά κύτταρα σε erpendorf και προστίθεται 1μL από το πλασμίδιο (ή 10-100 ng πλασμιδιακού DNA σε όγκο που δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1/10 του όγκου των προς μετασχηματισμό κυττάρων).
- Το μίγμα αφήνεται να επωαστεί στον πάγο περίπου 20 λεπτά.
- Τα κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ (*heat shock*) με την εισαγωγή τους σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 42°C, επί ένα λεπτό.
- Προστίθενται 200 μL LB, υπό ελαφρά ανακίνηση και αφήνεται για επώαση επί 60 λεπτά, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C.
- Έπειτα, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό με το κατάλληλο αντιβιοτικό (20 mg/ml χλωραμφαινικόλη και 25 mg/ml καναμυκίνη), για την επιλεγμένη ανάπτυξη των κυττάρων.
- Τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 15-20 ώρες.

## 2.8. Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (*induction*)

Η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία κατά την οποία διεγείρεται η μεταγραφή και η γονιδιακή πληροφορία σε γονιδιακά προϊόντα.

Π.χ. για την επαγωγή των γονιδίων σε κύτταρα *Escherichia coli* μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο *pGKJE8* και με το πλασμιδιακό φορέα έκφρασης *pET28-CA<sub>Azotobacter</sub>* :

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος **LB**, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (2.5μl Τετρακυκλίνη 0.001 mg/ml, 2.9μl Χλωραμφαινικόλη 34 mg/ml και 25 μl Αραβινόζης 100 mg/ml), εμβολιάζονται με μια αποικία μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* στελέχους *BL21 DE3* με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης.
- Η προκαλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες (*overnight*).
- 1 mL της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 20 mL αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει 10μl Τετρακυκλίνη (0.001 mg/ml) και 11.7μl Χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml) και 100 μl Αραβινόζη (100 mg/ml). Στην καλλιέργεια προστίθεται **IPTG** (40 μL), τελικής συγκέντρωσης 0.5mM, τη στιγμή που η οπτική πυκνότητα (*O.D.<sub>600</sub>-Optical Density*) κυμαίνεται από 0.4-0.6.
- Η καλλιέργεια επωάζεται σε αναδευτήρα θερμοκρασίας 30°C, έως 4 ώρες.
- Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε erpendorf και φυγοκεντρείται σε 3.500 στρ./λεπτό επί 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 300μl **Tris-HCl 50mM**. Διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.
- Σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Φυγοκέντρωση στις 10.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C.
- Συλλέγεται και φυλάσσεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων.
- Τα κυτταρικά θραύσματα επαναδιαλύονται σε 300 μL διαλύματος **50 mM Tris-HCl** pH 7.
- Προσθέτονται 50 μl **Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης**, ακολουθεί επώαση στους 100°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Για την επαγωγή των γονιδίων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

**pTf16**: Αραβινόζη (100 mg/ml), χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml).

**pG-Tf2**: Χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml), τετρακυκλίνη (0.001 mg/ml).

**pGro7**: Αραβινόζη (100 mg/ml), χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml).

**pKJE7**: Αραβινόζη (100 mg/ml), χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml).

**pG-KJE8**: Αραβινόζη (100 mg/ml), χλωραμφαινικόλη (34 mg/ml), τετρακυκλίνη (0.001 mg/ml).

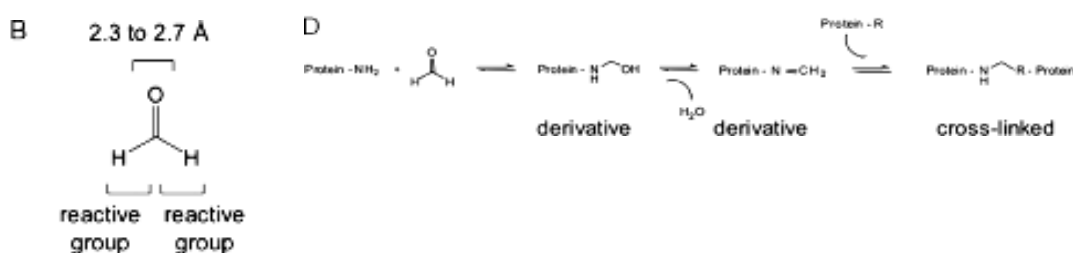
**HrpZ**: Καναμυκίνη (25 mg/ml).

**CA<sub>Azotobacter</sub>**, **CA<sub>C.elegans</sub>**, **CA<sub>Arabidopsis</sub>**: Καναμυκίνη (25 mg/ml).



## 2.9. Διασύνδεση πρωτεϊνών *in vivo* με τη χρήση φορμαλδεΐδης

Ως διασύνδεση ορίζεται η διαδικασία της χημικής σύνδεσης δυο ή περισσότερων μορίων με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται κατά την διαδικασία της διασύνδεσης φέρουν ενεργές ομάδες οι οποίες αντιδρούν με ομάδες των μορίων-στόχων (π.χ. αμινο-ομάδες). Η φορμαλδεΐδη χρησιμοποιείται ευρέως ως μέσο χημικής διασύνδεσης πρωτεϊνών σε κύτταρα, ιστούς και σε ορισμένες περιπτώσεις, σε ολόκληρους οργανισμούς. Το μικρό μέγεθος της φορμαλδεΐδης επιτρέπει τη διέλευσή της μέσω των μεμβρανών και των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η δράση της φορμαλδεΐδης είναι ταχύτατη και επιτρέπει την διασύνδεση πρωτεϊνών που ευρίσκονται πολύ κοντά ή μια στην άλλη.



Εικόνα 2.5. Η χημική δομή της φορμαλδεΐδης (B). Η πορεία της χημικής αντίδρασης με τις αμινο-ομάδες των πρωτεϊνών της φορμαλδεΐδης (D). Οι ενεργές ομάδες της φορμαλδεΐδης ευρίσκονται σε απόσταση 2-2,7 Å.

- Έπειτα από την φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3.500 στρ./λεπτό, επαναδιαλύεται το ίζημα με 1 mL **PBS** (*Phosphate buffered saline*).
- Φυγοκέντρηση στις 3.500 στρ./λεπτό για 10 λεπτά.
- Επαναδιαλύεται το ίζημα με 1 mL **PBS** και μεταφέρεται σε μικρή φιάλη που περιέχει 14 mL **PBS** και 1 mL **16% Formaldehyde (w/v)**, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 16 mL.
- Τα κύτταρα επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 8 λεπτά.
- Στα 8 λεπτά προστίθενται 0.6 mL TrisHCl (0.05 M τελική συγκέντρωση).
- Το δείγμα αφήνεται για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι και φυγοκεντρώνονται στις 3.500 στρ./λεπτό για 10 λεπτά.
- Συλλέγεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται το ίζημα με 200-300 μL TrisHCl (1M). Διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

- Σπάσιμο των κυττάρων με υπέρηχους. Φυγοκέντρωση στις 10.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C.
- Συλλέγεται και φυλάσσεται το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις διαλυτές πρωτεΐνες των κυττάρων.
- Τα κυτταρικά θραύσματα επαναδιαλύονται σε 300  $\mu\text{L}$  διαλύματος **50 mM Tris-HCl** pH 7.
- Προσθέτονται 50  $\mu\text{l}$  **Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης**, ακολουθεί επώαση στους 100°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

## 2.10. Απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης

Η απομόνωση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης γίνεται με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας. Σφαιρίδια αγαρόζης είναι φορτισμένα με νικέλιο (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) στο οποίο δεσμεύεται η ανασυνδυσμένη πρωτεΐνη εξ' αίτιας της δημιουργίας συμπλόκου ανάμεσα στο νικέλιο και το εξαπεπτίδιο ιστιδίνης.

- 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχουν προστεθεί 5μL καναμυκίνη εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων *Escherichia coli* στέλεχος *BL21 DE3* με τον ανασυνδυσμένο φορέα έκφρασης και επωάζονται για περίπου 16 ώρες στους 30°C, με συνεχή ανακίνηση.

- 5 ml της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 100 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB με 100 μL καναμυκίνη. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 30°C, με συνεχή ανακίνηση έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι  $O.D._{600}=0.4-0.6$ .

Όταν  $O.D._{600}=0.4-0.6$ , προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM και  $ZnSO_4$  σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM.

Η καλλιέργεια συνεχίζει να αναπτύσσεται στους 37°C, με συνεχή ανακίνηση για 4 ώρες.

### 2.10.1. Διαδικασία απομόνωσης

- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3.500 στρ./λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα τοποθετούνται στον πάγο.

- Τα κύτταρα επαναδιαλύονται με 2-5 ml διάλυμα λύσης (**Lysis Buffer**), ανά gr κυττάρων.

- Προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml.

- Αναμονή διάρκειας 30 λεπτών στους 4°C.

- Προστίθεται ο αναστολέας πρωτεασών **PMSF** σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM.

- Τα κύτταρα λύνονται με υπέρηχους (6 φορές για 10sec σε 200-300 Watt με ενδιάμεση παύση 10 sec).

- Φυγοκέντρηση στις 10.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά, στους 4°C.

- Συλλέγεται το υπερκείμενο.

- Στο υπερκείμενο προστίθεται 50% Ni-NTA. Συνεχής ήπια ανακίνηση στους 4°C στην στήλη χρωματογραφίας για 60 λεπτά.

- Απομακρύνεται το καπάκι και συλλέγεται το διάλυμα που διαπερνά την στήλη (**Flow-through**).
- Ακολουθεί διπλός καθαρισμός της στήλης με 4 mL διαλύματος πλύσης (**Wash Buffer**). .
- Ακολουθεί έκλυση της ανασυνδυσμένης πρωτεΐνης από την στήλη με 0.5 mL διάλυμα έκλυσης (**Elution Buffer**).

### 2.10.2. Καθαρισμός κολώνας

1. Εισάγονται 20 mL dH<sub>2</sub>O και αφήνονται να εκλουθούν.
2. Προστίθεται 0.5 M NaOH και αφήνεται για 30 λεπτά.
3. Εισάγονται ξανά 30 mL dH<sub>2</sub>O.
4. Προστίθεται 30% αιθανόλη και διατηρούμε την κολώνα στους 4°C.

## 2.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

### 2.11.1. Ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειικού νατρίου (SDS)

Η μέθοδος SDS-PAGE βασίζεται στην τεχνική ηλεκτροφόρησης ζώνης, η οποία εφαρμόζεται για την ανάλυση πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται υπό συνθήκες μετουσίωσης πρωτεϊνών ώστε να προκύψει διαχωρισμός πρωτεϊνικών τμημάτων. Τα μόρια πρωτεϊνών τα οποία διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται βάσει του μοριακού μεγέθους, καθώς περνούν από τους πόρους της πηκτής.

Η προσθήκη του δωδεκανοθειικού νατρίου στη πηκτή διαχωρισμού προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Το αρνητικά φορτισμένο δωδεκανοθειικό οξύ προσδένεται στην πρωτεϊνική αλυσίδα και προκαλεί λύση των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά δύο αμινοξέα. Το σύμπλοκο του SDS με την πρωτεΐνη αποκτά μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογα με την μάζα της πρωτεΐνης και επομένως, ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μοριακό τους μέγεθος με γραμμική σχέση.

Η χρήση της πηκτής πολυακρυλαμίδης είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις μικρών τμημάτων (**δεκάδες έως εκατοντάδες ζεύγη βάσεων**). Εντούτοις, μικρά πρωτεϊνικά μόρια έως 10KD δεν επιδέχονται πρόσδεση του SDS και έτσι απαιτούν ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

Η ανάλυση πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Το απορρυπαντικό SDS σε συνδυασμό με έναν ισχυρό αναγωγικό παράγοντα, όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη, με θέρμανση οδηγεί στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες, ώστε όλες πλέον αποκτούν αρνητικό φορτίο.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοίβαξης.

**Πίνακας 2.2.:** Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης συναρτήσει τελικής συγκέντρωσης ακρυλαμίδης.

	Πηκτική διαχωρισμού							Πηκτική επιστοιβαξής
	7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	20%	25%	
1 <b>Ακρυλαμίδη 30%</b>	7.5	10	12.5	15	17.5	20	25	1.3
2 <b>1% Bis- ακρυλαμίδη</b>	5.2	3.9	3.1	2.6	2.2	1.9	1.5	1
3 <b>3 M Tris (pH: 8.8)</b>	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	-
4 <b>1M Tris (pH: 6.8)</b>	-	-	-	-	-	-	-	1.25
5 <b>10% SDS</b>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1
6 <b>dH<sub>2</sub>O</b>	13.04	11.85	10.14	8.14	6.04	3.84	-	6.24
7 <b>TEMED</b>	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
8 <b>10% APS</b>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15

Η διαδικασία παρασκευής της πηκτής διαχωρισμού είναι η ακόλουθη: Αναμειγνύονται τα διαλύματα 1, 2, 3, 5 και 6 και στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα 7 και 8. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται αμέσως στο γυάλινο κάθετο καλούπι όπου αφήνεται να πολυμεριστεί (30-60 λεπτά, 20-25°C). Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός, εισάγεται η πηκτική επιστοιβαξής, η οποία παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι περιέχει το αντιδραστήριο 4 και όχι το 5. Το μίγμα αναδεύεται ελαφρώς και εισάγεται στο γυάλινο κάθετο καλούπι. Πριν ξεκινήσει ο πολυμερισμός, στην κορυφή της πηκτής εισάγεται κατάλληλος υποδοχέας (χτένα) ώστε να δημιουργηθούν τα κανάλια-θέσεις εισαγωγής των δειγμάτων. Ο πολυμερισμός ολοκληρώνεται σε ~30 λεπτά (25°C).

Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτικής επιστοιβαξης η πηκτική τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στην συσκευή προστίθεται **το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης**. Με μια σύριγγα απομακρύνονται οι φυσαλίδες που σχηματίζονται στο κάτω μέρος της πηκτής μεταξύ των τζαμιών.

## 2.12. Παράρτημα Α

### 2.12.1. Ρυθμιστικά διαλύματα

**PBS (Phosphate buffered saline):** αναμιγνύονται 136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ρυθμίζεται το pH στο 6.5, αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Διάλυμα πλύσης (Wash Buffer):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole.

**Διάλυμα έκλουσης (Elution Buffer):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole.

**Διάλυμα λύσης (Lysis Buffer):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole.

**APS (10%):** 1 g APS (Amonium Persulfate) διαλύονται σε 10 mL dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.

**BIS-ακρυλαμίδη (1%):** 0.5 g BIS-ακρυλαμίδης διαλύονται σε 50 mL dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**Tris-HCl (1M pH7):** Σε τελικό όγκο 1 L H<sub>2</sub>O διαλύονται 121.14 g Tris-Base (BDH). Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.0 με την προσθήκη πυκνού HCl. Το τελικό διάλυμα αποστειρώνεται και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

**Ακρυλαμίδη (30%):** Σε 100 mL dH<sub>2</sub>O διαλύονται 30 gr ακρυλαμίδης. Το διάλυμα αναδεύεται παρουσία ιοντοανταλλακτικής ρητίνης για 30 λεπτά, φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4°C.

**Διάλυμα χρωματισμού – Staining buffer:** 10% Οξικό οξύ, 45% Μεθανόλη, 0.25% Coomassie R250 brilliant blue.

**Διάλυμα αποχρωματισμού – Destaining buffer:** 30% Μεθανόλη, 10% Οξικό οξύ.

**Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης – SDS Running buffer (10x):** 144 g/L Γλυκίνη, 30 g/L Tris και 10 g/L SDS.

**Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης – Sample buffer:** 4% SDS, 10% β-Μερκαπτοαιθανόλη, 20% Γλυκερόλη, 0.1M Tris pH6.8 και 0.0005% χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης.

### 2.12.2. Θρεπτικά μέσα

#### **LB**

**Υγρό LB:** Για την παρασκευή ενός (1L) λίτρου θρεπτικού διαλύματος LB, αναμιγνύονται 10 gr NaCl, 10 gr Tryptone και 5 gr Yeast extract. Φυλάσσεται σε φιαλίδια MacCartney σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

**Στερεό LB (τρυβλία):** Για την παρασκευή ενός (1L) λίτρου στερεού θρεπτικού διαλύματος LB, αναμιγνύουμε 10 gr NaCl, 10 gr Tryptone, 5 gr Yeast extract και 15 gr Agar (1.5%).

### 2.12.3. Αντιβιοτικά

**Χλωραμφαινικόλη (Chlor 34 mg/mL):** Διαλύονται 34 mg σε 1 mL καθαρής αιθανόλης (ethanol 100%). Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

**Καναμυκίνη (Kn 0.025 mg/mL):** Διαλύονται 0.025 mg σε 1 mL αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

**Αραβινόζη (Ara 100 mg/mL):** Διαλύονται 100 mg σε 1 mL αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.

### 2.12.4. Λοιπά

**IPTG (0.5 M):** 0.119 gr IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) διαλύονται σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποστειρώνεται με φιλτράρισμα (0.22 μm Millipore) και φυλάσσεται στους -20°C.



### 3. Αποτελέσματα

Ικανά κύτταρα προς μετασχηματισμό (competent cells) βακτηρίου *Escherichia coli* BL21 DE3 μετασχηματίστηκαν με πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς (DnaK/DnaJ, GroESL, Trigger factor).

Πίνακας 3.1. Τα πλασμίδια, οι προαγωγείς, οι επαγωγείς και το γονίδιο ανθεκτικότητας των πρωτεϊνών-μοριακών συνοδών.

Πλασμίδιο	Μοριακή συνοδός	Προαγωγέας	Επαγωγέας	Γονίδιο ανθεκτικότητας
<i>pG-KJE8</i>	DnaK/DnaJ/GrpE GroEL/GroES	araB Pzt 1	L-αραβινόζη Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
<i>pGro7</i>	GroEL/GroES	araB	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
<i>pKJE7</i>	DnaK/DnaJ/GrpE	araB	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
<i>pG-Tf2</i>	GroEL/GroES- Trigger factor	Pzt 1	Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
<i>pTf16</i>	Trigger factor	araB	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη

Συγχρόνως, στο βακτήριο *Escherichia coli* επιλέχθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για την έκφραση της πρωτεΐνης χαρπίνης (HrpZ), της καρβονικής ανυδράσης ή αφυδατάσης των δισανθρακικών (CA) βακτηριακής, φυτικής και ζωικής προέλευσης. Η επαγωγή των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σε υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου, στους 30°C, με την προσθήκη β-D-ισοπροπυλικής θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG), η οποία αποτελεί τον επαγωγέα του προαγωγέα του πλασμιδίου έκφρασης.

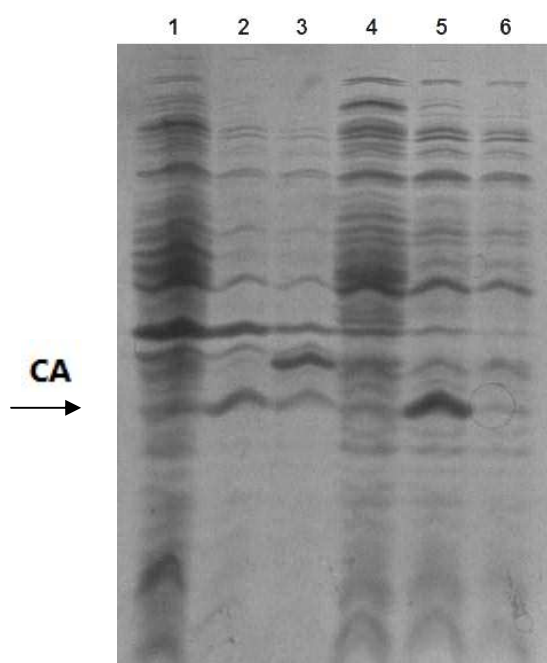
Πίνακας 4. Το μέγεθος των μοριακών συνοδών και των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν.

Πρωτεΐνες	GroEL	GroES	DnaK	DnaJ	GrpE	TF	CA <sub>Arab</sub>	CA <sub>Azotob</sub>	CA <sub>C.elegans</sub>	HrpZ
Μέγεθος (kDa)	60	10	70	40	22	56	30	27	32	32.3

### 3.1. Έκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης

#### 3.1.1. Συν-έκφραση της ετερόλογης βακτηριακής και της φυτικής προέλευσης καρβονικής αφυδατάσης (CA)

Πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση γενωματικού DNA κλώνου, ενσωματωμένου στον πλασμιδιακό φορέα *pET28a*, που κωδικοποιεί για την καρβονική αφυδατάση ή αφυδατάση των ανθρακικών α-τύπου (*pET28a-CA<sub>Azotobacter</sub>*) που προέρχεται από το αζωτοδεσμευτικό βακτήριο *Azotobacter vinelandii*. Η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στο βακτήριο *Escherichia coli*, με συνέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς.



Εικόνα 3.1. Έκφραση της ανασυνδυασμένης φυτικής πρωτεΐνης CA και της βακτηριακής πρωτεΐνης CA σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Στήλη 1: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>*.

Στήλη 3: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Arabidopsis</sub>*.

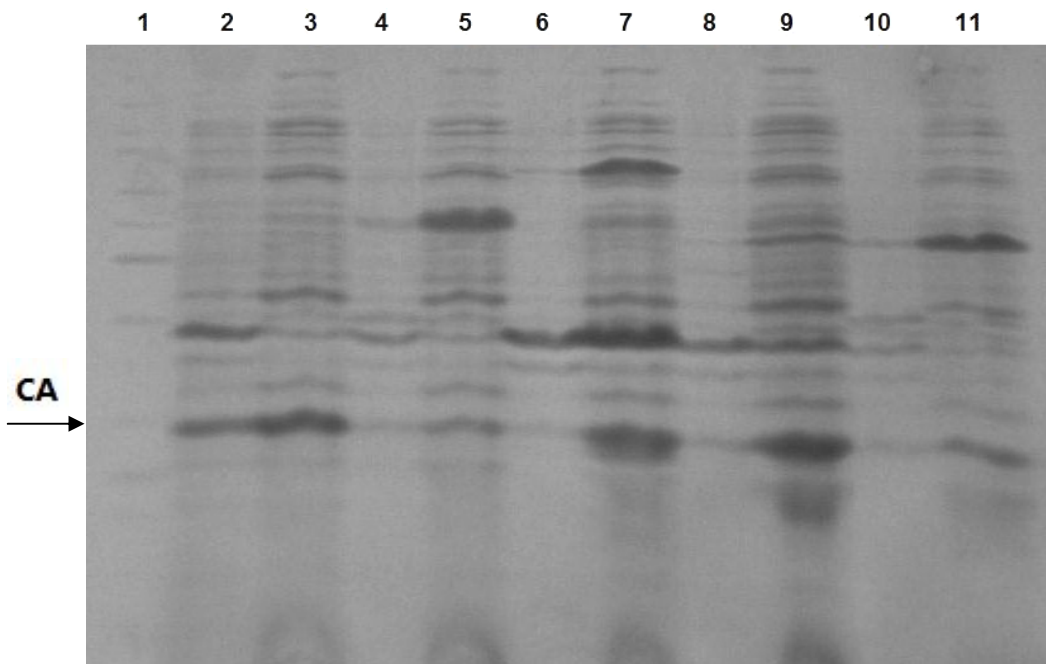
Στήλη 4: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).

Στήλη 5: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>*.

Στήλη 6: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Arabidopsis</sub>*.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli* το οποίο μετασχηματίστηκε με τον πλασμιδιακό φορέα *pET28a* που φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν για την φυτική και την βακτηριακή πρωτεΐνη CA, επιβεβαιώνει την επαγωγή των εν λόγω πρωτεϊνών. Παρατηρείται το μεγαλύτερο επίπεδο της βακτηριακής πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα ενώ το μεγαλύτερο επίπεδο της φυτικής πρωτεΐνης σημειώθηκε στο αδιάλυτο κλάσμα.

### 3.1.2. Συνέκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης και των μοριακών συνοδών



Εικόνα 3.2. Έκφραση της ανασυνδυσμένης βακτηριακής πρωτεΐνης CA σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυσμένες πρωτεΐνες (CA).

Στήλη 1: Δείκτες γνωστών μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (50, 40, 30 kDa).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>*.

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>*.

Στήλη 4: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGro7*.

Στήλη 5: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGro7*.

Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGKJE8*.

Στήλη 7: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGKJE8*.

Στήλη 8: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGTf2*.

Στήλη 9: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGTf2*.

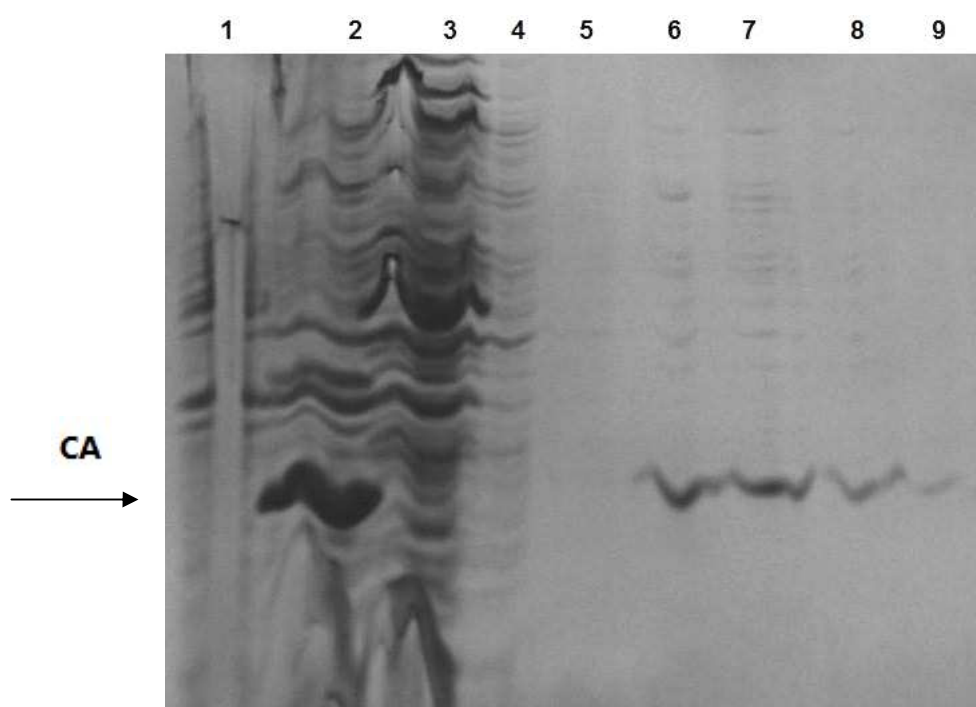
Στήλη 10: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pTf16*.

Στήλη 11: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pTf16*.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli* το οποίο μετασχηματίστηκε με τον πλασμιδιακό φορέα *pET28a*, ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την βακτηριακή πρωτεΐνη CA και με τον φορέα που κωδικοποιεί για τις μοριακές συνοδούς, επιβεβαιώνει την επαγωγή της εν λόγω πρωτεΐνης που μελετήθηκε. Παρατηρείται το μεγάλο ποσοστό της βακτηριακής πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα κυρίως στην περίπτωση όπου συνεκφράστηκαν με τις πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς GroEL/GroES, DnaK/DnaJ/GrpE (πλασμίδιο *pGKJE8*) και τις GroEL/GroES, Trigger factor (πλασμίδιο *pGTf2*) και δευτερευόντως στην περίπτωση των GroEL/GroES (πλασμίδιο *pGro7*) και Trigger factor (πλασμίδιο *pTf16*).

### 3.1.3. Απομόνωση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης εκφρασμένης σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3

Η απομόνωση της καρβονικής αφυδατάσης, βακτηριακής προέλευσης, έγινε με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας μετά από την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη CA στο βακτήριο *E.coli*. Η παραγόμενη πρωτεΐνη φέρει ουρά έξι ιστιδινών, γεγονός που καθιστά δυνατή την απομόνωσή της με αυτή τη μέθοδο. Κατά την διαδικασία της απομόνωσης, η ουρά ιστιδινών αλληλεπιδρά με το νικέλιο και συγκρατείται στη στήλη αгарόζης. Το διαλυτό και αδιάλυτο κλάσμα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και τα κλάσματα έκλουσης της στήλης αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE, 15%).



Εικόνα 3.3. Απομόνωση της ανασυνδυασμένης βακτηριακής πρωτεΐνης CA εκφρασμένης σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli* BL21 DE3. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος αναπαρίστανται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (CA).

Στήλη 1: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3.

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub>.

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3.

Στήλη 4: Κλάσμα πλύσης (Wash A) της στήλης.

Στήλη 5: Κλάσμα πλύσης (Wash B) της στήλης.

Στήλη 6: Κλάσμα έκλουσης (Elution 1) της στήλης.

Στήλη 7: Κλάσμα έκλουσης (Elution 2) της στήλης.

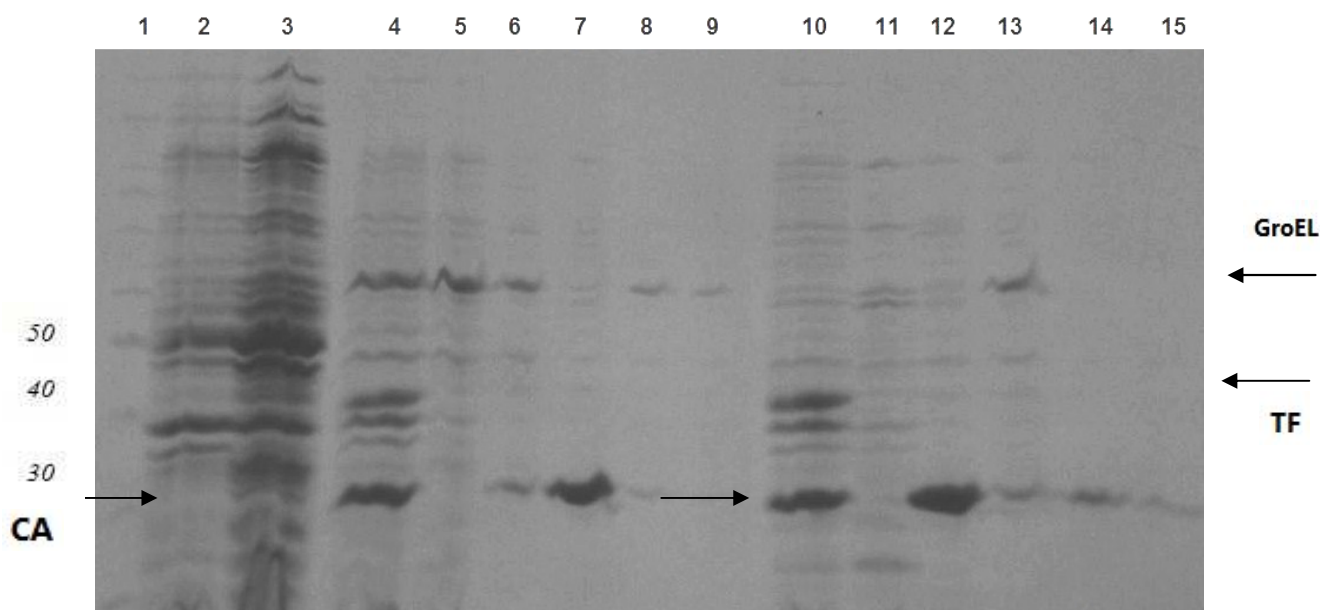
Στήλη 8: Κλάσμα έκλουσης (Elution 3) της στήλης.

Στήλη 9: Κλάσμα έκλουσης (Elution 4) της στήλης.

Παρατηρείται η επιτυχής απομόνωση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης καθώς, όπως επιβεβαιώνεται από την ανάλυση σε πηκτική πολυακρυλαμίδης, το εξαπεπτιδίο ιστιδίνης που φέρει η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη συγκρατείται στην στήλη.

### 3.1.4. Απομόνωση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) βακτηριακής προέλευσης εκφρασμένης σε κύτταρα *Escherichia coli* BL21 DE3 στα οποία συνεκφράζονται οι μοριακές συνοδοί

Η απομόνωση της καρβονικής αφυδατάσης, βακτηριακής προέλευσης, έγινε με την μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας μετά από την συν-έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη CA και των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς, στο βακτήριο *Escherichia coli*. Οι μοριακές συνοδοί που εκφράστηκαν στο βακτήριο είναι οι πρωτεΐνες GroEL/GroES (πλασμίδιο pGro7) και οι GroEL/GroES και TF (πλασμίδιο pGTf2).



Εικόνα 3.4. Απομόνωση της ανασυνδυασμένης βακτηριακής πρωτεΐνης CA εκφρασμένης σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli* BL21 DE3, μετά από την συνέκφραση των πρωτεϊνών-μοριακών συνοδών GroEL/GroES και TF. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος αναπαρίστανται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Στήλη 1: Δείκτες γνωστών μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (50, 40, 30 kDa).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3.

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3.

Στήλη 4: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασηματισμένων με τα πλασμίδια pET28a

CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7.

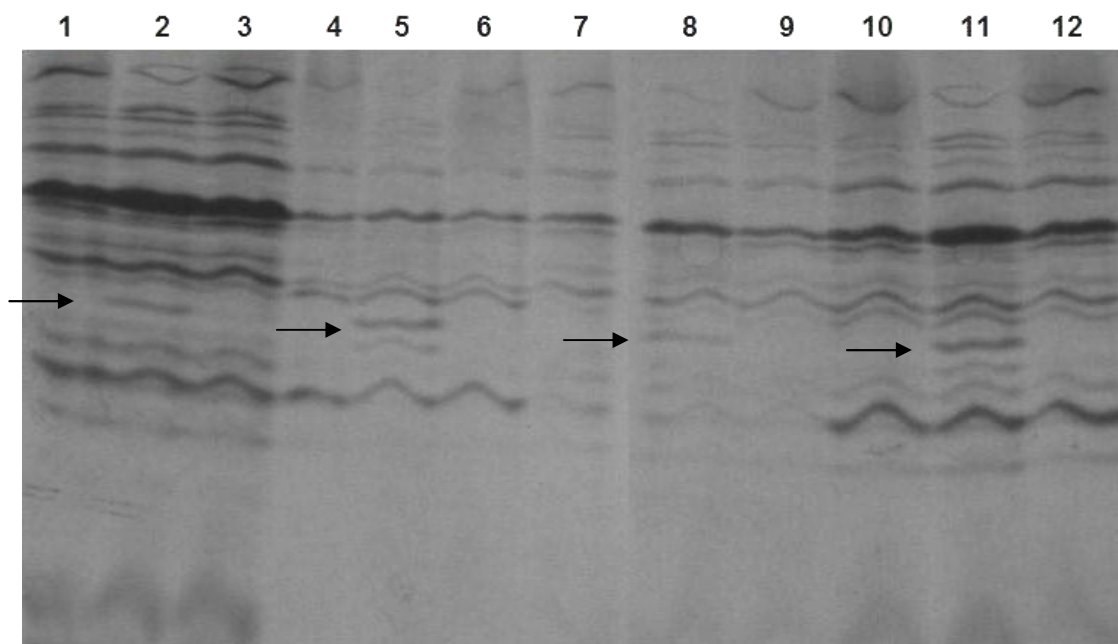
Στήλη 5: Κλάσμα πλύσης (Wash A) της στήλης.  
Στήλη 6: Κλάσμα έκλουσης (Elution 1) της στήλης.  
Στήλη 7: Κλάσμα έκλουσης (Elution 2) της στήλης.  
Στήλη 8: Κλάσμα έκλουσης (Elution 3) της στήλης.  
Στήλη 9: Κλάσμα έκλουσης (Elution 4) της στήλης.  
Στήλη 10: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* *CA<sub>Azotobacter</sub>* και *pGTf2*.  
Στήλη 11: Κλάσμα πλύσης (Wash A) της στήλης.  
Στήλη 12: Κλάσμα έκλουσης (Elution 1) της στήλης.  
Στήλη 13: Κλάσμα έκλουσης (Elution 2) της στήλης.  
Στήλη 14: Κλάσμα έκλουσης (Elution 3) της στήλης.  
Στήλη 15: Κλάσμα έκλουσης (Elution 4) της στήλης.

Παρατηρείται η απομόνωση της καρβονικής αφυδατάσης εκφρασμένης σε *E.coli* κύτταρα τα οποία μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα *pET28a*. Σημειώνεται η παράλληλη απομόνωση των GroEL/GroES πρωτεϊνών, γεγονός που πιθανόν να υποδηλώνει την αλληλεπίδραση της μοριακής συνοδού με την καρβονική αφυδατάση κατά την αναδίπλωση της δεύτερης.

### 3.1.5. Διασύνδεση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης (CA) και των GroEL/GroES *in vivo*

Διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της *CA<sub>Azotobacter</sub>* και της GroEL/GroES μέσω της διαδικασίας διασύνδεσης (*crosslink*) των πρωτεϊνών. Η διαδικασία της πρωτεϊνικής διασύνδεσης, με τη χρήση φορμαλδεΐδης, ουσιαστικά συνδέει πρωτεΐνες ή αμινοξέα που βρίσκονται σε απόσταση 2-2.7 Å (Sutherland et al., 2008). Χρησιμοποιώντας την φορμαλδεΐδη (15% formaldehyde, w/v) διαλυμένη σε **PBS** (*Phosphate buffered saline*) ως ρυθμιστικό διάλυμα, πραγματοποιήθηκε η διασύνδεση της καρβονικής αφυδατάσης, έπειτα από συνέκφραση των μοριακών συνοδών GroEL/GroES (πλασμίδιο *pGro7*). Η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την καρβονική αφυδατάση έγινε σε κύτταρα *Escherichia coli BL21 DE3*. Η διαδικασία της πρωτεϊνικής διασύνδεσης διήρκησε πέντε και δέκα λεπτά. Τα δύο χρονικά διαστήματα επέφεραν διαφορετικά αποτελέσματα. Επίσης, τα διαλυτά και αδιάλυτα κλάσματα των πρωτεϊνών υπέστησαν θέρμανση σε δύο θερμοκρασίες (100°C και 60°C), για την καλύτερη ανάλυση των αποτελεσμάτων. Η θερμοκρασία βρασμού του δείγματος προκαλεί αναστροφή ή καταστολή της διασύνδεσης, οπότε οι ζώνες των πρωτεϊνών στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, διαχωρίζονται. Η θερμοκρασία των 60°C δεν αναστρέφει την διασύνδεση των πρωτεϊνών, συνεπώς οι ζώνες των πρωτεϊνών που έχουν συνδεθεί με τη

διαδικασία του crosslink παραμένουν, στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, συγκεντρωμένες σε μία.



Εικόνα 3.5. Διασύνδεση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης εκφρασμένης σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli* BL21 DE3, μετά από την συνέκφραση των μοριακών συνοδών GroEL/GroES. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Οι στήλες 1-3 αποτελούν τα διαλυτά κλάσματα των πρωτεϊνών που υποβλήθηκαν σε *crosslink* με διάρκεια δράσης της φορμαλδεΐδης 5 λεπτά, ενώ οι στήλες 4-6 αποτελούν τα αδιάλυτα κλάσματα των πρωτεϊνών. Οι στήλες 7-9 αποτελούν τα διαλυτά κλάσματα των πρωτεϊνών που υποβλήθηκαν σε *crosslink* με διάρκεια δράσης της φορμαλδεΐδης 10 λεπτά, ενώ οι στήλες 10-12 αποτελούν τα αδιάλυτα κλάσματα των πρωτεϊνών.

Στήλη 1: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (χωρίς θέρμανση-5').

Στήλη 2: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (100°C-5').

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (60°C-5').

Στήλη 4: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (χωρίς θέρμανση-5').

Στήλη 5: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (100°C-5').

Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (60°C-5').

Στήλη 7: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (χωρίς θέρμανση-10').

Στήλη 8: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (100°C-10').

Στήλη 9: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (60°C-10').

Στήλη 10: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli* BL21 DE3 μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* CA<sub>Azotobacter</sub> και pGro7 (χωρίς θέρμανση-10').



Στήλη 11 Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a*  $CA_{Azotobacter}$  και *pGro7* (100°C-10').

Στήλη 12: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a*  $CA_{Azotobacter}$  και *pGro7* (60°C-10').

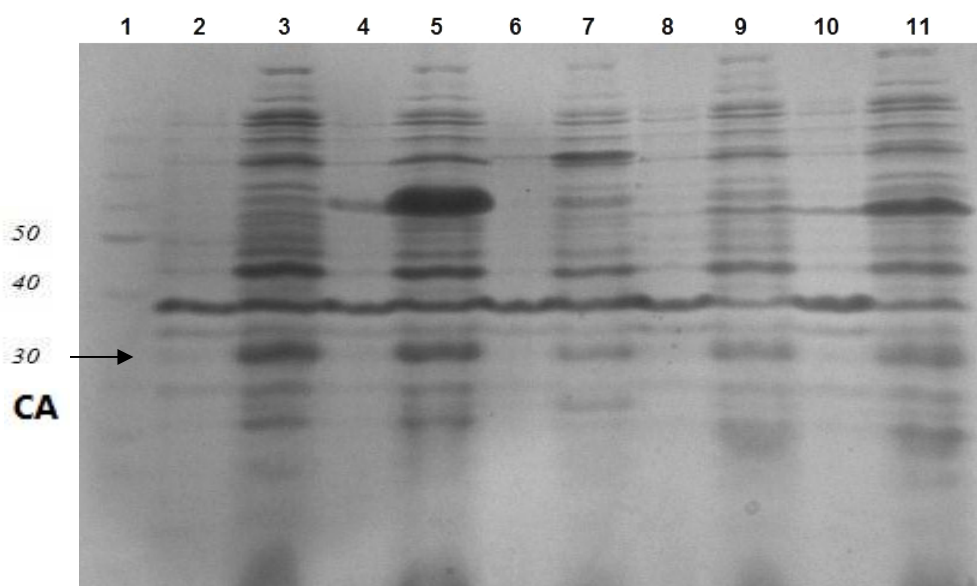
Η ανάλυση των πρωτεϊνών των *E.coli* κυττάρων τα οποία μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα *pET28a* ο οποίος φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν για την καρβονική αφυδατάση και τις μοριακές συνοδούς GroEL/GroES πραγματοποιήθηκε μετά από τη διαδικασία της σύνδεσης των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε απόσταση 2-2.7 Å.

Παρατηρείται ότι, στις στήλες 2, 5, 8 και 11 εμφανίζεται η ζώνη της καρβονικής αφυδατάσης καθώς τα δείγματα αυτά έχουν υποστεί θέρμανση με βρασμό, οπότε έχει αναστραφεί το φαινόμενο της διασύνδεσης των πρωτεϊνών GroEL/GroES με την CA. Η διασύνδεση της καρβονικής αφυδατάσης με πρωτεΐνες που βρίσκονται σε απόσταση 2Å θα μπορούσε να αποκαλύψει ενδεχόμενες αλληλεπιδράσεις της με τρίτες, άγνωστες πρωτεΐνες που εκφράζονται στο κύτταρο *E.coli*. Όμως, όπως απεδείχθη από τις προηγηθείσες αναλύσεις απομόνωσης, η καρβονική αφυδατάση αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς.

Σημειώνεται ότι, στα διαλυτά και αδιάλυτα κλάσματα που δεν υπέστησαν θέρμανση καθώς και αυτά που θερμάνθηκαν στους 60°C, εμφανίζεται το ίδιο αποτέλεσμα έκφρασης της καρβονικής αφυδατάσης.

### 3.2. Συν-έκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) ζωικής προέλευσης και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα *Escherichia coli*

Πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση ενός cDNA κλώνου (Y116A8C28), ενσωματωμένου στον πλασμιδιακό φορέα *pET28a*, που κωδικοποιεί για την καρβονική αφυδατάση ή αφυδατάση των ανθρακικών  $\beta$ -τύπου (*pET28a-CA<sub>C.elegans</sub>*) του οργανισμού *Caenorhabditis elegans*. Η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στο βακτήριο *E.coli*, με συνέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς.



Εικόνα 3.6. Έκφραση της ανασυνδυασμένης ζωικής πρωτεΐνης CA και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Στήλη 1: Δείκτες γνωστών μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (50, 40, 30 kDa).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>*.

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>*.

Στήλη 4: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGro7.

Στήλη 5: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGro7.

Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGKJE8.

Στήλη 7: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGKJE8.

Στήλη 8: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGTf2.

Στήλη 9: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>C.elegans</sub>* και pGTf2.

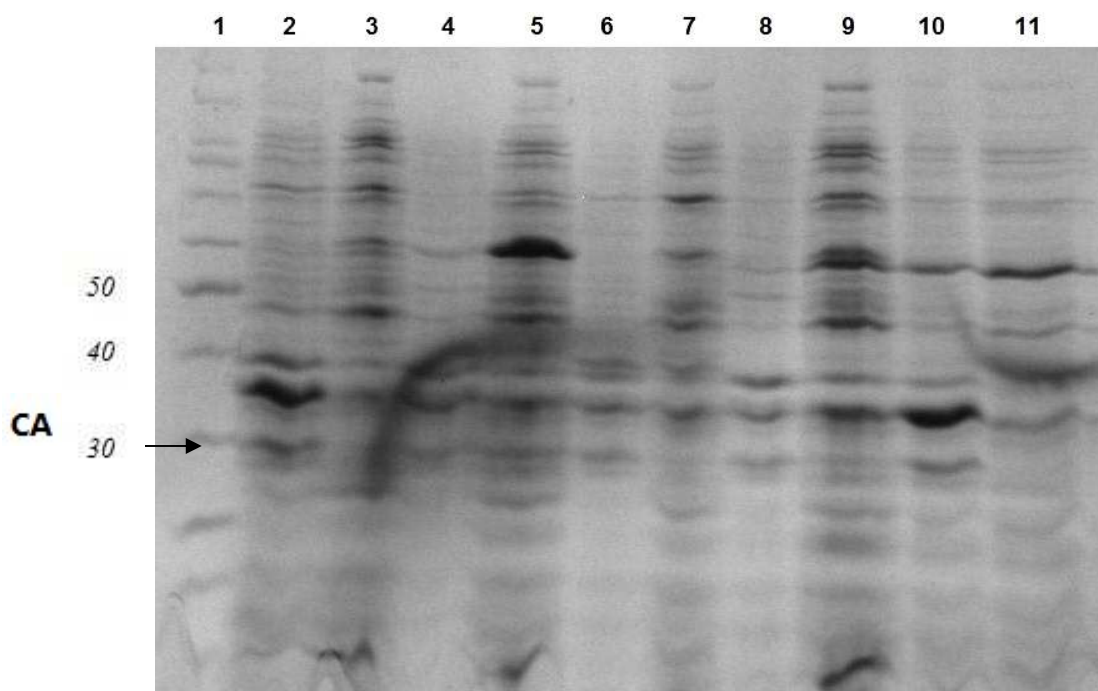
Στήλη 10: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* *CA<sub>C.elegans</sub>* και pTf16.

Στήλη 11: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a* *CA<sub>C.elegans</sub>* και pTf16.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli* το οποίο μετασχηματίστηκε με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης *pET28a*, ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την CA, επιβεβαιώνει την επαγωγή της ζωικής καρβονικής αφυδατάσης. Ωστόσο, παρόλη τη συνέκφραση των μοριακών συνοδών, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του διαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης που μελετήθηκε.

### 3.3. Συνέκφραση της ετερόλογης καρβονικής αφυδατάσης (CA) φυτικής προέλευσης και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα *Escherichia coli*

Πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση ενός cDNA κλώνου που κωδικοποιεί για την καρβονική αφυδατάση ή αφυδατάση των ανθρακικών α-τύπου (*pET28a-CA<sub>Arabidopsis</sub>*) που προέρχεται από το φυτό *Arabidopsis thaliana*, στο βακτήριο *E.coli*, με συνέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς.



Εικόνα 3.7. Έκφραση της ανασυνδυασμένης φυτικής πρωτεΐνης CA και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (CA και μοριακές συνοδοί).

Στήλη 1: Δείκτες γνωστών μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών (50, 40, 30 kDa).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Arab</sub>*.

Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET28a CA<sub>Arab</sub>*.

Στήλη 4: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGro7*.

Στήλη 5: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGro7*.

Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGKJE8*.

Στήλη 7: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGKJE8*.

Στήλη 8: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGTF2*.

Στήλη 9: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pGTF2*.

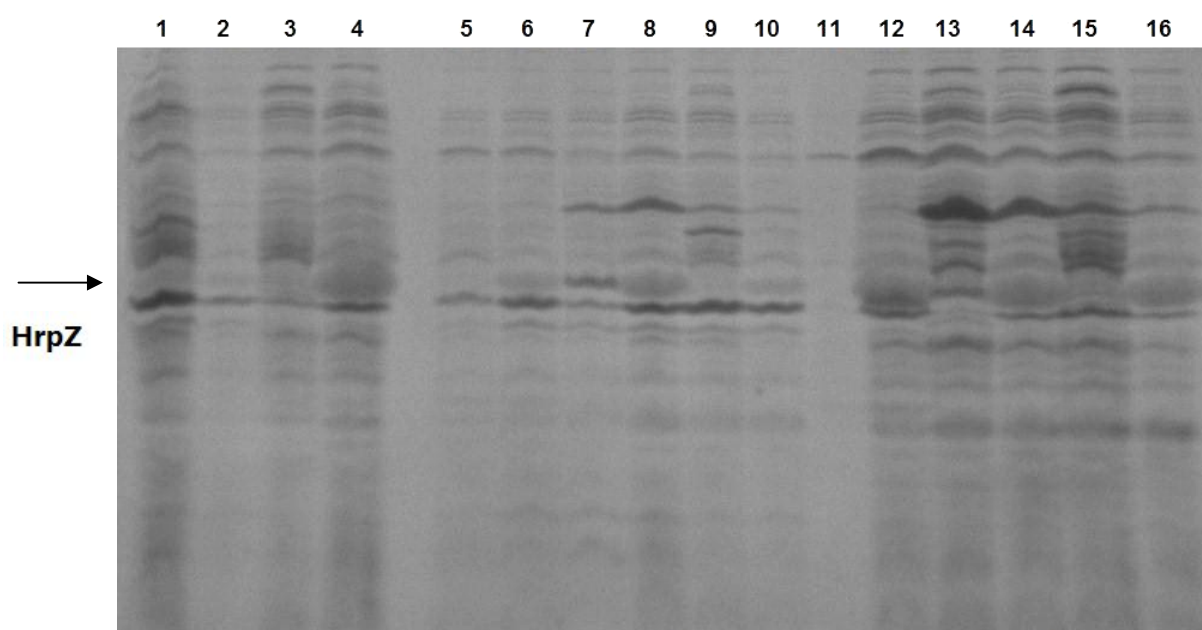
Στήλη 10: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pTF16*.

Στήλη 11: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET28a CA<sub>Arab</sub>* και *pTF16*.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli* το οποίο μετασχηματίστηκε με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης *pET28a*, ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την φυτική CA επιβεβαιώνει την επαγωγή της φυτικής καρβονικής αφυδατάσης. Ωστόσο, παρόλη τη συνέκφραση των μοριακών συνοδών, δεν παρατηρήθηκε μεγάλη αύξηση του διαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης που μελετήθηκε, εκτός από την περίπτωση των πρωτεϊνών-μοριακών συνοδών GroEL/GroES-TF (πλασμίδιο *pGTF2*), η οποία συνέβαλε στην αύξηση του διαλυτού κλάσματος της CA.

### 3.4. Συνέκφραση της ετερόλογης HrpZ και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα *Escherichia coli*

Πραγματοποιήθηκε η επαγωγή ενός γονιδίου, ενσωματωμένου στον πλασμιδιακό φορέα *pET26b*, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη χαρπίνη (*HrpZ*) του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. Η έκφραση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στο βακτήριο *Escherichia coli*, με συνέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς. Η πρωτεΐνη HrpZ, γνωστή ως χαρπίνη εκκρίνεται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III ή εκκριτικό σύστημα Hrp και σε καθαρτισμένη μορφή προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού.



Εικόνα 3.8. Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HrpZ και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα βακτηρίων *E. coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

- Στήλη 1: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες του βακτηρίου *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).
- Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET26b HrpZ*.
- Στήλη 3: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες του βακτηρίου *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).
- Στήλη 4: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET26b HrpZ*.
- Στήλη 5: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pKJE7.
- Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και pKJE7.
- Στήλη 7: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pTf16.
- Στήλη 8: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26a HrpZ* και pTf16.
- Στήλη 9: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pGTf2.
- Στήλη 10: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26a HrpZ* και pGTf2.
- Στήλη 11: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο pKJE7.

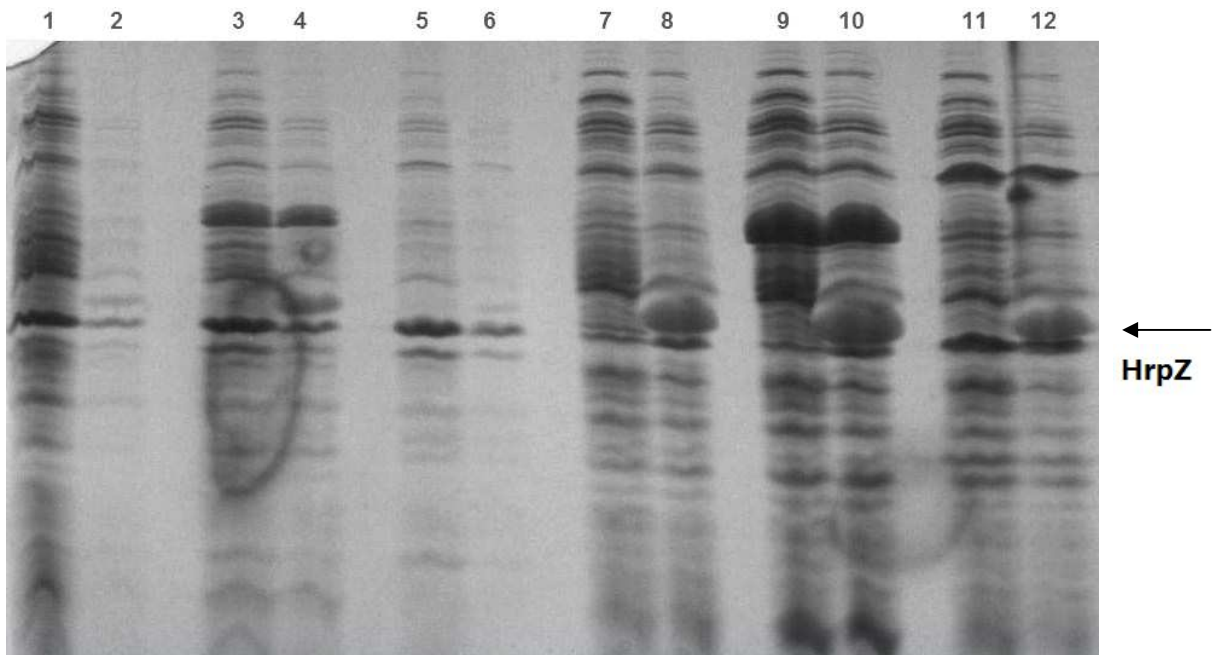
Στήλη 12: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pKJE7*.

Στήλη 13: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pTf16*.

Στήλη 14: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pTf16*.

Στήλη 15: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pGTf2*.

Στήλη 16: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pGTf2*.



Εικόνα 3.9. Έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης HrpZ και των μοριακών συνοδών σε κύτταρα βακτηρίων *E.coli BL21 DE3*. Η ανάλυση του διαλυτού και αδιάλυτου κλάσματος των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη IPTG (0.5 mM) και επώαση στους 30°C. Με βέλος δεικνύονται οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.

Στήλη 1: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες του βακτηρίου *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).

Στήλη 2: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET26b HrpZ*.

Στήλη 3: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pGro7*.

Στήλη 4: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pGro7*.

Στήλη 5: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pGKJE8*.

Στήλη 6: Αδιάλυτες ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pGKJE8*.

Στήλη 7: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες του βακτηρίου *E.coli BL21 DE3* (μάρτυρας).

Στήλη 8: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pET26b HrpZ*.

Στήλη 9: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pGro7*.

Στήλη 10: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pGro7*.

Στήλη 11: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με το πλασμίδιο *pGKJE8*.

Στήλη 12: Διαλυτές ολικές πρωτεΐνες *E.coli BL21 DE3* μετασχηματισμένων με τα πλασμίδια *pET26b HrpZ* και *pGKJE8*.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli* που μετασχηματίστηκε με τον πλασμιδιακό φορέα *pET26b* ο οποίος φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη

HrpZ, επιβεβαιώνει την επαγωγή της εν λόγω πρωτεΐνης. Παρατηρήθηκε ωστόσο η αύξηση του διαλυτού κλάσματος με την συνέκφραση των μοριακών συνοδών καθώς συνέβαλαν στην αύξηση της διαλυτότητας της χαρπίνης (HrpZ). Ιδιαίτερη αύξηση στη διαλυτότητα της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης παρατηρήθηκε κατά την συνέκφραση των μοριακών συνοδών pGro7 και pGKJE8 με την ανασυνδυασμένη HrpZ.



## 4. Συζήτηση

Η υψηλού ρυθμού μεταγραφή των γονιδίων και έκφραση των πρωτεϊνών οδηγεί τα βακτήρια σε μια κατάσταση στρες. Οι συνθήκες αυτές δεν επιτρέπουν στο κύτταρο να ρυθμίσει την λειτουργικότητα των παραγόμενων πρωτεϊνών, οπότε αυτές χάνουν την βιολογική ενεργότητά τους καθώς δεν αναδιπλώνονται σωστά. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων ή σωματιδιακών εγκλείστων. Οι μοριακές συνοδοί ή σαπερόνες συμβάλλουν στην καταστολή του φαινομένου του σχηματισμού των σωματιδιακών εγκλείστων και προάγουν την αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών. Οι βασικές κατηγορίες μοριακών συνοδών που μελετήθηκαν για τον ρόλο τους στην πρωτεϊνική αναδίπλωση της καρβονικής αφυδατάσης είναι η πρωτεΐνη Trigger factor (TF), οι DnaK/DnaJ/GrpE και οι πρωτεΐνες GroEL/GroES. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η συνέκφραση των μοριακών συνοδών με την καρβονική αφυδατάση βακτηριακής, φυτικής και ζωικής προέλευσης και με την πρωτεΐνη χαρπίνη (HrpZ). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξάνεται η διαλυτότητα των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν με εξαίρεση την φυτική καρβονική αφυδατάση, καθώς διαπιστώθηκε, με την μέθοδο ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών, ότι οι μοριακές συνοδοί δεν συνέβαλαν στην αναδίπλωσή της. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες, όπως απεδείχθη, αλληλεπιδρούν με τις μοριακές συνοδούς οι οποίες τις βοηθούν να λάβουν την κατάλληλη δομή. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι οι μοριακές συνοδοί GroEL/GroES, DnaK/DnaJ/GrpE και TF βελτίωσαν την αναδίπλωση της βακτηριακής καρβονικής αφυδατάσης. Η συνδυασμένη δράση των GroEL/GroES και DnaK/DnaJ/GrpE (πλασμίδιο pGKJE8) καθώς και αυτή των GroEL/GroES και TF (πλασμίδιο pGTF2), βελτίωσε το ποσοστό του διαλυτού κλάσματος της πρωτεΐνης, από ότι η μεμονωμένη δράση των GroEL/GroES (πλασμίδιο pGro7) ή της TF (πλασμίδιο pTF16). Υπάρχει δηλαδή, μια συμπληρωματική δράση των μοριακών συνοδών στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι, στην περίπτωση της ζωικής καρβονικής αφυδατάσης, οι μοριακές συνοδοί GroEL/GroES συνέβαλαν στην αναδίπλωση του νεοσυντιθέμενου πολυπεπτιδίου περισσότερο από τις άλλες (φυτικής και βακτηριακής προέλευσης). Στην περίπτωση της φυτικής καρβονικής αφυδατάσης δεν προέκυψε ανάλογο αποτέλεσμα καθώς φάνηκε ότι οι μοριακές συνοδοί δεν συνέβαλαν στην αναδίπλωσή της. Αντίθετα, η διαλυτότητα της πρωτεΐνης χαρπίνης HrpZ αυξήθηκε με την συνδυασμένη δράση των GroEL/GroES και DnaK/DnaJ/GrpE (pGKJE8) και με την μεμονωμένη δράση των GroEL/GroES.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση της καρβονικής αφυδατάσης με τις GroEL/GroES και την TF, πραγματοποιήσαμε τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας. Η διαδικασία διασύνδεσης των πρωτεϊνών (*crosslink*) δεν κατέδειξε την αλληλεπίδραση της CA

με άλλες πρωτεΐνες, εκτός των μοριακών συνοδών (GroEL/GroES, TF).

## Βιβλιογραφία

1. Branden C. and Tooze J. **Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών** (1999), 2<sup>η</sup> έκδοση.
2. Brehmer D., Gassler C., Rist W., Mayer M.P., and Bukau B. (2004): **Influence of GrpE on DnaK-Substrate Interactions**. JBC, 279 (27), 27957–27964.
3. Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Craig E.A. (2000): **Getting newly synthesized proteins into shape**. Cell, 101, 119–122.
4. Bukau B., Horwich A. L. (1998): **The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines**. Cell, 92, 351–366.
5. De Marco A., Deuerling E., Mogk A., Tomoyasu T. and Bukau B. (2007): **Chaperone based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *Escherichia coli***. BMC Biotechnology, 7:32.
6. De Marco Ario (2009): **Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli***. Microbial Cell Factories, 8:26.
7. Deuerling E., Patzelt H., Vorderwülbecke S. , Rauch T., Kramer G., Elke Schaffitzel E., Mogk A., Schulze-Specking A., Langen H. and Bukau B. (1999). **Trigger Factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins**. Nature, 400, 693-696.
8. Evstigneeva Z.G., Solov'eva N.A. and Sidel'nikova L.I. (2001): **Structures and functions of chaperones and chaperonins**. Applied Biochemistry and Microbiology, 37(1), 1-13.
9. Farr W.G., Fenton A.W., Chaudhuri K.T., Clare K.D., Saibil R.H. and Horwich L.A. (2003): **Folding with and without encapsulation by *cis* and *trans*-only GroEL-GroES complexes**. The EMBO Journal, 22, 12, 3220-3230.
10. Forreiter C. and Nover L. (1998): **Heat induced stress proteins and the concept of molecular proteins**. J. Biosc., 23, 287-302.
11. Gasser B., Saloheimo M., Rinas U., Dragosits M., Rodriguez-Carmona E., Baumann K., Giuliani M., Parrilli E., Branduardi P., Lang C., Porro D., Ferrer P., Tutino M.-L., Mattanovich D. and Villaverde A. (2008): **Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview**. Microbial Cell Factories, 7:11.
12. Genevaux P., Georgopoulos C., Kelley W.L. (2007): **The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions**. Molecular Microbiology 66(4), 840–857.
13. Hartl F. U. & Hayer-Hartl M. (2002): **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein**. Science, 295(5561), 1852 – 1858.
14. Hartl F. U. & Hayer-Hartl M. (2009): **Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo**. Nature, 461 (6), 574 - 581.
15. Herzberg C., Weidinger L.A.F., Dorrbecker B., Hubner S., Stulke J. & Commichau F.M. (2007): **SPINE: A method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo**. Proteomics, 7, 4032-4035.

16. Hesterkamp T., Bukau B. (1996): **The *Escherichia coli* trigger factor**. FEBS Letters, 389, 32-34.
17. Hesterkamp T., Hauser S., Lutcke H., Bukau B. (1996): ***Escherichia coli* trigger factor is a prolyl-isomerase that associates with nascent polypeptide chains**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 4437-4441.
18. Hoffmann A., Merz F., Rutkowska A., Zachmann-Brand B., Deuerling E., Bukau B. (2006): **Trigger factor forms a protective shield for nascent polypeptides at the ribosome**. JBC, 281 (10), 6539–6545.
19. Hu B. and Masaru T. (2007): **The Hsp70 chaperone system maintains high concentrations of active proteins and suppresses ATP consumption during heat shock**. Syst. Synth. Biol. 1, 47–58.
20. Kaiser C.M., Chang H.C., Agashe V.R., Lakshminpathy S.K., Etchells S.A., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. and Barral J.M. (2006): **Real-time observation of trigger factor function on translating ribosomes**. Nature, 444, 455–460.
21. Kerner M.J., Naylor D.J., Ishihama Y., Maier T., Chang H.C., Stines A.P., Georgopoulos C., Frishman D., Hayer-Hartl M., Mann M. & Hartl F.U. (2005): **Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli***. Cell, 122, 209-220.
22. Kolaj O., Spada S., Robin S. and Wall J.G. (2009): **Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli***. Microbial Cell Factories, 8:9.
23. Kramer G., Boehringer D., Ban N. and Bukau B. (2009): **The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins**. Nature, 16 (6).
24. Kramer G., Rutkowska A., Wegrzyn R.D., Patzelt H, Kurz T.A., Merz F., Rauch T., Vorderwulbecke S., Deuerling E. and Bukau B. (2004): **Functional dissection of *Escherichia coli* trigger factor: unraveling the function of individual domains**. J. Bacteriol. 186, 3777–3784.
25. Liu C. and Zhou J. (2004): **Trigger factor-assisted folding of bovine carbonic anhydrase II**. September 2003, Biochemical and Biophysical Research Communications 313, 509-515.
26. Marchenkov V.V. and Semisotnov G.V. (2009): **GroEL-Assisted protein folding: Does it occur within the chaperonin inner cavity?** International Journal of Molecular Sciences, 10, 2066-2083.
27. Martinez-Hackert E. and Hendrickson W. A. (2009): **Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone**. Cell, 138(5), 923-934.
28. McCarty J.S., Rudiger S., Schonfeld H.J., Schneider-Mergener J., Kenji Nakahigashi<sup>4</sup>, Yura T. and Bukau B. (1996): **Regulatory region C of the *E. coli* Heat Shock Transcription Factor, s<sup>32</sup>, constitutes a DnaK Binding Site and is conserved among Eubacteria**. J. Mol. Biol. 256, 829–837.
29. Merz F., Hoffmann A., Rutkowska A., Zachmann-Brand B., Bukau B. and Deuerling E. (2006): **The C-terminal domain of *Escherichia coli* trigger factor represents the central module of its chaperone activity**. J. Biol. Chem. 281, 31963–31971.

30. Nagradova N.K. (2008): **Foldase enzymes catalyzing protein folding**. Nova Science Publishers (New York).
31. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000): **The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis**. *Science* 289, 920–930.
32. Rye H.S., Roseman A.M., Chen S., Furtak K., Fenton W.A., Saibil H.R., Horwich A.L. (1999): **GroEL-GroES cycling: ATP and nonnative polypeptide direct alternation of folding-active rings**. *Cell*, 97, 325–338.
33. Scholz C., Stoller G., Zarnt T., Fischer G. and Schmid F.X (1997): **Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding**. *EMBO J*. **16**, 54–58
34. Stoller G., Rücknagel K. P., Nierhaus K. H., Schmid F. X., Fischer G., and Rahfeld J. U. (2005): **A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis/trans isomerase identified as the trigger factor**. *EMBO J*, 14(20), 4939–4948.
35. Teter S.A., Houry W.A., Ang D., Tradler T., Rockabrand D., Fischer G., Blum P., Georgopoulos C. & Hartl F.U. (1999): **Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains**. *Cell* 97, 755–765.
36. Toshiyuki U. and Derek R. L. (2007): **Heat-shock sigma factor RpoH from *Geobacter sulfurreducens***. *Microbiology*, 153, 838–846.
37. Ullers, R.S., Ang, D., Schwager, F., Georgopoulos, C. & Genevoux, P. (2007): **Trigger factor can antagonize both SecB and DnaK/DnaJ chaperone functions in *Escherichia coli***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3101–3106.

