

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

Διδακτορική διατριβή:  
**Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός βακτηριακών  
πεπτιδουλ-πρόλυλ ισομερασών**

Χρυσούλα Χ. Ζωγράφου

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

Αθήνα 2014

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής  
Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

Διδακτορική διατριβή:  
**Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός βακτηριακών  
πεπτιδουλ-πρόλυλ ισομερασών**

Χρυσούλα Χ. Ζωγράφου

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

Αθήνα 2014

Διδακτορική διατριβή:  
Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός βακτηριακών  
πεπτίδυλ-πρόλυλ ισομερασών

Χρυσούλα Χ. Ζωγράφου

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Κατινάκης

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)  
Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)  
Αναστασία Ταμπακάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)  
Ιορδάνης Χατζηπαυλίδης, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)  
Αναστασία Ταμπακάκη, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)  
Δημήτριος Γεωργακόπουλος, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)  
Πολυμνία Αντωνίου, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)  
Γεώργιος Ζερβάκης, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)  
Μαρία Δήμου, Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)

## Περίληψη

Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIάσες, EC: 5.2.1.8) αποτελούν μια υπεροικογένεια συντηρημένων πρωτεϊνών, οι οποίες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς. Οι πρωτεΐνες αυτές καταλύουν την *cis/trans* ισομερίωση πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών τόσο νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών όσο και ώριμων πρωτεϊνών στόχων τροποποιώντας τη δομή τους ή τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τους και ως εκ τούτου επηρεάζουν τη λειτουργία τους. Τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών διακρίνονται στις εξής οικογένειες: τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins), τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK506 (FKBPs) και τις παρβουλίνες (Parvulins). Οι PPIάσες, εκτός από την ενεργότητα PPIάσης, εμφανίζουν και ενεργότητα τσαπερόνης μέσω της οποίας επιτελείται η αναδίπλωση πρωτεϊνών και παρεμποδίζεται η δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Η σημαντικότητα των PPIασών τονίζεται από την παρουσία τους σχεδόν σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων και από τη συμμετοχή τους σε πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες μεταξύ των οποίων η μετάδοση σήματος εκτός και εντός του κυττάρου, η σύνθεση των πρωτεϊνών και ο συντονισμός του κύκλου ζωής του κυττάρου. Ευρήματα σχετικά με τη δράση τους αφορούν στη δέσμευση της Gag πρωτεΐνης από την κυκλοφιλίνη A του ανθρώπου, μια ιδιαίτερα σημαντική αλληλεπίδραση για τη μόλυνση από τον ιό HIV, στη συμμετοχή της κυκλοφιλίνης B στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νόσων και τη συμβολή των παρβουλινών στην ογκογόνο σηματοδότηση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο βιοχημικός και μοριακός χαρακτηρισμός των μελών της FKBP οικογένειας των μικροοργανισμών *Azotobacter vinelandii* και *Escherichia coli*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του πλήρως αλληλουχημένου γονιδιώματος των δυο βακτηρίων μέσω της οποίας εντοπίστηκαν έξι και πέντε γονίδια αντίστοιχα, που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που ανήκουν στην FKBP οικογένεια. Κατά τον *in vitro* υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας διαπιστώθηκε ότι οι *AnfkbX*, *AnfkbB*, *AnfkbA1*, *AnfkbA2* του *A. vinelandii* και οι *EcfkA*, *EcfkB*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *Ectig* του *E. coli* είναι ενεργές PPIάσες, ενώ οι περισσότερες με βάση τη μέθοδο παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος εμφάνισαν ενεργότητα τσαπερόνης. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων τα οποία μετέχουν στον ενεργό κέντρο PPIάσης κάθε FKBP πρωτεΐνης. Διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της ενεργότητας PPIάσης στις *AnfkbA1*<sub>Y194A</sub>, *AnfkbA2*<sub>Y84A</sub> και *EcfkA*<sub>Y225A</sub> ενώ δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα PPIάσης στις *EcfkIB*<sub>Y181A</sub>, *EcslyD*<sub>F132A</sub>, *Ectig*<sub>F198A</sub> και *EcfkB*<sub>D119A</sub>. Ο φυσιολογικός ρόλος των FKBP πρωτεϊνών μελετήθηκε μέσω της ανάπτυξης, σε διαφορετικές συνθήκες, των *E. coli* στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* στα οποία έχει απενεργοποιηθεί (απαλοιφθεί) το συγκεκριμένο FKBP γονίδιο. Η απουσία των FKBP πρωτεϊνών είχε ως αποτέλεσμα πλειοτροπικούς φαινοτύπους, οι οποίοι περιλαμβάνουν αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής και επιφανειακής ομαδικής κίνησης, καθώς και αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Η έκφραση των αγρίου τύπου γονιδίων *EcfkA*, *EcfkB*, *EcfkIB*, *EcslyD* και *Ectig* στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* επανέφερε τους φυσιολογικούς προαναφερθέντες φαινοτύπους ενώ η έκφραση των μεταλλαγμένων γονιδίων *EcfkA*<sub>Y225A</sub>, *EcfkB*<sub>D119A</sub>, *EcfkIB*<sub>Y181A</sub>, *EcslyD*<sub>F132A</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη δεν επανέφερε, στις περισσότερες περιπτώσεις, το φαινότυπο του σχηματισμού βιοϋμενίου, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των FKBP πρωτεϊνών σε αυτό το οργανωμένο σύστημα

ζωής. Εξετάζοντας την κυτταρική μορφολογία των στελεχών που υπερεκφράζουν κάθε FKBP γονίδιο (κατά την κολυμβητική και επιφανειακή ομαδική κίνηση) παρατηρήθηκε μια σημαντική κυτταρική επιμήκυνση, αντίθετα με τα στελέχη τα οποία υπερεκφράζουν κάθε μεταλλαγμένο FKBP γονίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης επηρεάζει το μήκος των κυττάρων του *E. coli*. Επίσης, ο φαινότυπος των στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα μέσω υπερέκφρασης της πλειοψηφίας των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις ΡΡιάσες του *E. coli*, υποδηλώνοντας ότι είναι δυνατή μια λειτουργική υποκατάσταση ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡιασών. Η αυξημένη ικανότητα ομαδικής, κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔfkrB* επανήλθε σε φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από την υπερέκφραση πρωτεϊνών που αποτελούν πιθανούς στόχους της *EcFkrB*, υποδηλώνοντας ότι ο παρατηρούμενος φαινότυπος προκύπτει από την λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών στόχων, λόγω της απουσίας του *EcFkrB* γονιδίου. Η παρουσία αυτών των πιθανών στόχων είχε ως συνέπεια τη μείωση της *in vitro* ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcFkrB*. Η υπερέκφραση των πιθανών πρωτεϊνών στόχων της *EcFkrB* στο στέλεχος *ΔslyD* σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου έδειξε ότι οι πρωτεΐνες *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflcC* και *EcrpB* είναι πιθανοί κοινοί στόχοι της *EcFkrB* και της *EcslyD* ενώ μόνο οι *EcdnaK* και *EccheA* είναι πιθανοί κοινοί στόχοι της *EcFkrB* και της *EcFkrA*. Τέλος, ανιχνεύθηκε η αλληλεπίδραση της *EccarA*, η οποία αποτελεί πιθανή πρωτεΐνη στόχο της *EcFkrB*, με την *EcFkrB* και η αλληλεπίδραση της *AncaA*, με τις *AnfkbA1* και *AnfkbA2* μέσω συνέκφρασης και απομόνωσης των σταθερών συμπλεγμάτων. Η χρήση του διασυνδετή DTBP συνέβαλλε στη σταθεροποίηση του συμπλέγματος της *EcFkrB* με την *EcispH*, η οποία αποτελεί πιθανή πρωτεΐνη στόχο της *EcFkrB*. Η *EcispH* εδράζεται στο ίδιο οπερόνιο με την *EcFkrB* και διαθέτει δύο κατάλοιπα προλίνης με *cis* διάταξη, τα P8 και P32. Η εξέταση της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων ως προς την προλίνη *EcispH<sub>P8A</sub>* και *EcispH<sub>P32A</sub>* με την *EcFkrB* κατέδειξε ότι μόνο η προλίνη P8 είναι υπεύθυνη για το σύμπλεγμα αυτό.

*Λέξεις κλειδιά: cis/trans* ισομερίωση, FKBP, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, ομαδική κίνηση σε επιφάνεια, κολυμβητική κίνηση (κολύμβηση), βιοϋμένιο.

## Abstract

Peptidyl prolyl cis/trans isomerases (PPIases, EC: 5.2.1.8) are ubiquitous folding proteins, present in eukaryotic and prokaryotic cells that catalyze the cis/trans isomerization of peptidyl prolyl bonds of newly synthesized target proteins, in which peptide bonds are thought to be synthesized exclusively in the *trans* conformation. Based on drug specificity PPIases are divided into three distinct and structurally unrelated subfamilies: the cyclophilins, which bind cyclosporin A, the parvulins, which bind the immunosuppressant juglone and the FKBP, which bind the FK506. Additionally to the proven isomerase function of the majority of PPIase family members, they also demonstrate chaperone activity which allows them to prevent both newly synthesized polypeptide chains and assembled subunits from aggregating into nonfunctional structures, inducing conformational changes in mature target proteins, altering their structure and intermolecular interactions, thus affecting their activity. The importance of PPIases in eukaryotic, specially yeast and mammalian cells has been shown through their participation in signal transduction, trafficking, assembly and cell cycle regulation. Some major findings regarding the function of PPIases include binding of human cyclophilin A to the Gag polyprotein of virus HIV-1, an essential interaction for HIV infection, the involvement of cyclophilin B in the onset of neurodegenerative disorders and the contribution of human parvulin in oncogenic signaling.

The main objective of the present study was to explore the biochemical and molecular function of all members of FKBP family of diazotroph *A. vinelandii* and model *E. coli*. Our goal was initially addressed through the analysis of the fully sequenced genome of *A. vinelandii* and *E. coli*, which revealed the existence of six and five members of the FKBP family, respectively. Recombinant AvfkbX, AvfkbB, AvfkbA1 and AvfkbA2 of *A. vinelandii* as well as EcfkpA, EcfkpB, EcfkIB, EcslyD and Ectig of *E. coli* exhibited *in vitro* PPIase activity with different substrate specificities, whilst all, except AvfkbA1, displayed *in vitro* chaperone activity. We tested AvfkbA1, AvfkbA2, EcfkpA, EcfkIB, EcslyD and Ectig variants, each carrying a single point mutation at the PPIase active site, for enzyme activities and found that PPIase activity in AvfkbA1<sub>Y194A</sub>, AvfkbA2<sub>Y84A</sub>, and EcfkpA<sub>Y225A</sub> was reduced, whereas no detectable activity was found for variants EcfkIB<sub>Y181A</sub>, EcslyD<sub>F132A</sub>, Ectig<sub>F198A</sub> and for EcfkpB<sub>D119A</sub>, being the only one who carries three altered amino acids located in FKBP and in the IF domain, as well. The physiological role of FKBP proteins of *E. coli* was exploited by examining the growth of strains  $\Delta fkpA$ ,  $\Delta fkpB$ ,  $\Delta fklB$ ,  $\Delta slyD$  and  $\Delta tig$ , lacking each FKBP gene, under various conditions. Characterization of FKBP mutants revealed that the absence of FKBP proteins resulted in pleiotropic phenotypes, including increased swarming and swimming motility in addition to enhanced biofilm formation. Complementation with FKBP genes restored the motility and sessility phenotypes while complementation with PPIase-deficient FKBP genes, in most cases, failed to rescue the biofilm phenotype, suggesting the involvement of PPIase activity in this motile collective behavior. Cells overexpressing FKBP genes harbored from swarming and swimming plates exhibited elongated cells who failed to divide normally, unlikely to cells overexpressing PPIase-deficient FKBP genes, indicating that PPIase activity is affecting cell length. Multi-copy suppressor screens demonstrated that the expression of a majority of PPIase encoding genes restored swarming and swimming motility and biofilm formation of *E. coli* FKBP mutant strains. Moreover, the motility and sessility phenotype of EcfkpB mutant strain was inversed by over-expressing several putative prey proteins, in the presence of which the *in vitro* catalytic activity of the enzyme was diminished.

Overexpression of putative prey proteins of fkpB in slyD mutant strain, under swimming and biofilm conditions, demonstrated that only the *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcfliC* and *EcrpoB* might be common targets of fkpB and slyD whilst *EcdnaK* and *EccheA* might be most probable to validate the bait-prey model with fkpA. Moreover, we explored the physical interaction of *EccarA*, a putative prey protein of *EcfkpB*, with *EcfkpB* and the physical interaction of *AvcarA*, with *AvfkbA1* and *AvfkbA2* through affinity chromatography. Cross-link assay contributed in revealing the transient physical interaction of *EcfkpB* with *EcispH*, sharing a mutual operon with *EcfkpB* and possessing two *cis* proline residues, P8 and P32. Checking the physical interaction of both mutants *EcispH<sub>P8A</sub>* and *EcispH<sub>P32A</sub>* with *EcfkpB*, in order to clarify which proline residue is the target, we discovered that only the P8 residue of *EcispH* is critical for the formation of a protein complex with *EcfkpB*.

*Keywords: cis/trans isomerization, FKBP, Escherichia coli, Azotobacter vinelandii, swarming motility, swimming motility, biofilm.*

Η ανάθεση του θέματος της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγινε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 10<sup>η</sup>/03.02.2011).

Η Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (Συνεδρία 2<sup>η</sup>/04.11.2010) και αποτελείται από τους κ.κ.:

Παναγιώτη Κατινάκη, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Αναστασία Ταμπακάκη, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή ορίστηκε με απόφαση της ΓΣΕΣ του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής (Συνεδρία 20.06.2014) σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 9, παρ. 4α του Ν.3685/08 και αποτελείται από τους κ.κ.:

Παναγιώτη Κατινάκη, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Χατζηπαυλίδη Ιορδάνη, Επίκ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Ταμπακάκη Αναστασία, Επίκ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Γεωργακόπουλο Δημήτριο, Επίκ. Καθηγητή ΓΠΑ (Μέλος)

Αντωνίου Πολυμνία, Αναπλ. Καθηγήτρια ΓΠΑ (Μέλος)

Ζερβάκη Γεώργιο, Αναπλ. Καθηγητής ΓΠΑ (Μέλος)

Δήμου Μαρία, Λέκτορας ΓΠΑ (Μέλος)



## **Αντί προλόγου**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Π. Κατινάκη, που μου έδωσε τη δυνατότητα να εκπονήσω την ερευνητική μελέτη, για την προσανατολισμένη καθοδήγηση και την εποικοδομητική κριτική. Τα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής: τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Χατζηπαυλίδη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κα. Α. Ταμπακάκη για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεχή υποστήριξη κατά την πραγματοποίηση της ερευνητικής διαδικασίας. Επίσης, ευχαριστώ τη Λέκτορα κα. Μ. Δήμου για την αδιάκοπη υποστήριξη, τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές καθώς και τη Διδάκτορα κα. Α. Βενιεράκη για το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και την παραγωγική συνεργασία. Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Π. Χατζόπουλο και Κ. Φασσέα για την ευγενική παραχώρηση μέρους του εργαστηριακού τους εξοπλισμού.

Τις ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω επίσης και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής: τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Ζερβάκη, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Γεωργακόπουλο και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Π. Αντωνίου για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα και ιδιαίτερα τη συνάδελφο υπ. Διδάκτορα Α. Σκαγιά για την αμέριστη συμπαράστασή της.

Το μεγαλύτερο, ωστόσο, ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την ατέρμονα αγάπη και υποστήριξή τους καθώς χωρίς αυτή θα ήταν αδύνατον να τα καταφέρω.

## Περιεχόμενα

---

<b>A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>17</b>
<b>A.1.1 Η ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</b> .....	<b>17</b>
<b>A.1.2 Η ΙΣΟΜΕΡΙΩΣΗ ΤΟΥ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΔΕΣΜΟΥ ΤΗΣ ΠΡΟΛΙΝΗΣ</b> .....	<b>19</b>
<b>A.1.3 ΟΙ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ</b> .....	<b>20</b>
A.1.3.1 ΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ.....	21
<i>Οι κυκλοφιλίνες του ανθρώπου</i> .....	21
<i>Οι κυκλοφιλίνες των φυτών</i> .....	21
A.1.3.2 ΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΚΥΚΛΟΦΙΛΙΝΕΣ .....	22
<b>A.1.4 ΟΙ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ</b> .....	<b>23</b>
A.1.4.1 ΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ.....	24
<i>Οι παρβουλίνες του ανθρώπου</i> .....	24
<i>Οι παρβουλίνες των φυτών</i> .....	24
<i>Οι παρβουλίνες λοιπών οργανισμών</i> .....	25
A.1.4.2 ΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ ΠΑΡΒΟΥΛΙΝΕΣ .....	25
<b>A.1.5 ΟΙ FKBPΣ</b> .....	<b>27</b>
A.1.5.1 ΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ FKBPΣ.....	28
<i>Οι FKBPΣ του ανθρώπου</i> .....	28
<i>Οι FKBPΣ των φυτών</i> .....	28
<i>Οι FKBPΣ λοιπών οργανισμών</i> .....	30
A.1.5.2 ΟΙ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΕΣ FKBPΣ .....	30
<b>A.1.6 Η ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ FKPA</b> .....	<b>30</b>
A.1.6.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ FKPA .....	31
A.1.6.2 Η FKPA ΕΙΝΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΗ .....	32
A.1.6.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ FKPA ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	33
<b>A.1.7 Η ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ FKPB</b> .....	<b>33</b>
A.1.7.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ECFKPB .....	34
A.1.7.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ FKPB ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	35
<b>A.1.8 Η ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ FKLB</b> .....	<b>35</b>
A.1.8.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ FKLB.....	36
<b>A.1.9 Η ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ SLYD</b> .....	<b>36</b>
A.1.9.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ SLYD ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	38
<b>A.1.10 Η ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗ TRIGGER FACTOR (TF)</b> .....	<b>38</b>
A.1.10.1 Η ΔΟΜΗ ΤΗΣ ECTIG .....	40
A.1.10.2 Η ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ TIG ΣΤΗΝ ΑΝΑΔΙΠΛΩΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	40
<b>A.2.1 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ</b> .....	<b>41</b>
A.2.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ .....	42
A.2.1.2 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ.....	43
A.2.1.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ .....	44
A.2.1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΥΝΟΟΥΝ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ .....	45

Χημειοτακτισμός .....	45
Βιοσύνθεση μαστιγίων.....	46
Έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών.....	47
Πολυσακχαρίτες.....	47
Λιποπολυσακχαρίτες (LPS).....	47
Λιποπρωτεΐνες/Λιποπεπτίδια .....	47
Γλυκολίδια.....	48
A.2.1.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....	48
A.2.1.6 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ .....	49
A.2.1.7 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΥΛ-ΠΡΟΛΥΛ <i>CIS/TRANS</i> ΙΣΟΜΕΡΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ.....	51
<b>A.2.2 ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ .....</b>	<b>52</b>
A.2.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ.....	52
A.2.2.2 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	52
A.2.2.3 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	53
A.2.2.4 ΕΙΔΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....	56
A.2.2.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ( <i>QUORUM SENSING</i> ) .....	56
A.2.2.7 C-DI-GMP .....	57
A.2.2.8 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....	58
A.2.2.9 ΒΙΟΪΜΕΝΙΟ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> .....	59
<b>A.2.3 ΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ <i>E. COLI</i> ΚΑΙ <i>A. VINELANDII</i> .....</b>	<b>59</b>
A.2.3.1 Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>E. COLI</i> .....	59
A.2.3.2 Ο ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ <i>A. VINELANDII</i> .....	60
<b>B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>63</b>
<b>B.1 <i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....</b>	<b>63</b>
<b>B.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....</b>	<b>63</b>
B.2.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	63
<b>B.3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....</b>	<b>65</b>
B.3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA .....	65
B.3.2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	65
B.3.2.1 <i>Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR.....</i>	<i>65</i>
B.3.3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	69
B.3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	69
B.3.5 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ.....	70
B.3.6 ΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ DNA ΛΙΓΑΣΗΣ .....	70
B.3.7 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA .....	71
B.3.8 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΑΙΝΟΛΗ .....	71
B.3.9 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ .....	72
B.3.10 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ (RT-PCR) .....	72
B.3.11 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR) .....	73
<b>B.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....</b>	<b>75</b>
B.4.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i> ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕΣΩ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ .....	75
B.4.2 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. COLI</i> ΜΕΣΩ ΘΕΡΜΙΚΟΥ ΣΟΚ.....	75
B.4.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΙΚΑΝΩΝ ΓΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ .....	75
B.4.4 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΟΜΟΛΟΓΟ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕΣΩ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗΣ (ELECTROPORATION).....	76

B.4.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA .....	77
B.4.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΝΙΠΡΕΠ .....	77
B.4.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΒΡΑΣΜΟΥ (BOILING PREP).....	77
<b>B.5 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....</b>	<b>78</b>
B.5.1 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	78
B.5.2 ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>IN VIVO</i> ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΔΙΑΣΥΝΔΕΤΗ DTBP .....	79
B.5.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ .....	79
B.5.4 ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ.....	80
B.5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΔΩΔΕΚΑΝΟΘΕΪΪΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SDS) .....	80
B.5.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BRADFORD .....	82
B.5.7 ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN .....	82
B.5.8 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ.....	83
B.5.9 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ .....	84
B.5.10 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ .....	84
B.5.11 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ <i>AVCARA</i> .....	84
B.5.12 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ.....	85
B.5.13 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΟΜΑΔΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗ ΚΙΝΗΣΗ .....	85
B.5.14 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....	86
B.5.15 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ .....	86
B.5.16 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ GFP ΕΠΙΤΟΠΟ.....	87
<b>Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>89</b>
<b>Γ.1 ΟΙ FKBPΣ ΤΟΥ <i>A. VINELANDII</i>.....</b>	<b>89</b>
Γ.1.1 <i>IN SILICO</i> ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΟΥΝ ΓΙΑ FKBPΣ ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ <i>A. VINELANDII</i> .....	89
Γ.1.2 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ <i>AVFKBΧ</i> , <i>AVFKBB</i> , <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> .....	91
Γ.1.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΡΡΙΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> .....	93
Γ.1.4 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΩΝ <i>AVFKBA1</i> <sub>Y194A</sub> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> <sub>Y84A</sub> .....	94
Γ.1.5 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΠΙΘΑΝΑ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΙΣ <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> .....	95
Γ.1.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ <i>AVCARA</i> ΣΤΗΝ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΡΡΙΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> .....	96
Γ.1.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> ΣΤΗΝ ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑ ΤΗΣ <i>AVCARA</i> .....	97
Γ.1.7.1 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>AVFKBA1</i> ΚΑΙ <i>AVFKBA2</i> ΜΕ ΤΗΝ <i>AVCARA</i> .....	97
Γ.1.10 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ ΜΕΣΩ ΟΜΟΛΟΓΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ .....	100
<b>Γ.2 ΟΙ FKBPΣ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>102</b>
Γ.2.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ <i>EcΔFKBP</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	102
Γ.2.2 ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΩΝ <i>EcFKBP</i> ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ .....	102
Γ.2.3 ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ <i>EcFKBP</i> ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ.....	104
Γ.2.3.1 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΜΑΔΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ( <i>SWARMING</i> ) ΤΩΝ <i>EcΔFKBP</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	104
Γ.2.3.2 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΟΛΥΜΒΗΤΙΚΗΣ ΚΙΝΗΣΗΣ ( <i>SWIMMING</i> ) ΤΩΝ <i>EcΔFKBP</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	105
Γ.2.3.3 ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ ( <i>BIOFILM</i> ) ΤΩΝ <i>EcΔFKBP</i> ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	106
<b>Γ.2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΤΩΝ <i>EcFKBP</i> ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>107</b>
Γ.2.4.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΡΡΙΑΣΗΣ ΤΩΝ <i>EcFKBP</i> ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	107
Γ.2.4.2 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>EcFKPA</i> .....	108
Γ.2.4.2.1 <i>Ενζυμική ενεργότητα της Ecfkpa</i> .....	108
Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	109
Ικανότητα σχηματισμού βιοϊμενίου .....	111

Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	112
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	112
Γ.2.4.2.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων <i>EcfkρA</i> και <i>EcfkρA<sub>Y225A</sub></i> στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	114
Γ.2.4.3 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>EcfkρB</i> .....	116
Γ.2.4.3.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>EcfkρB</i> .....	116
Γ.2.4.3.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>ΔfkρB</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcfkρB</i> είτε το <i>EcfkρB<sub>D119A</sub></i> .....	117
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	118
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	119
Γ.2.4.3.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>BW25113</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcfkρB</i> είτε το <i>EcfkρB<sub>D119A</sub></i> .....	120
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	120
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	121
Γ.2.4.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών <i>BW25113</i> και <i>ΔfkρB</i> τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο <i>EcfkρB</i> είτε το <i>EcfkρB<sub>D119A</sub></i> .....	122
Γ.2.4.3.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων <i>EcfkρB</i> και <i>EcfkρB<sub>D119A</sub></i> στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	123
Γ.2.4.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>EcfkIB</i> .....	125
Γ.2.4.4.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>EcfkIB</i> .....	125
Γ.2.4.4.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>ΔfkIB</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcfkIB</i> είτε το <i>EcfkIB<sub>Y181A</sub></i> .....	126
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	127
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	127
Γ.2.4.4.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>BW25113</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcfkIB</i> είτε το <i>EcfkIB<sub>Y181A</sub></i> .....	128
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	128
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	129
Γ.2.4.4.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών <i>BW25113</i> και <i>ΔfkIB</i> τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο <i>EcfkIB</i> είτε το <i>EcfkIB<sub>Y181A</sub></i> .....	130
Γ.2.4.4.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων <i>EcfkIB</i> και <i>EcfkIB<sub>Y181A</sub></i> στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	132
Γ.2.4.5 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>EcslyD</i> .....	133
Γ.2.4.5.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>EcslyD</i> .....	133
Γ.2.4.5.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>ΔslyD</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcslyD</i> είτε το <i>EcslyD<sub>F132A</sub></i> .....	134
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	135
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	136
Γ.2.4.5.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους <i>BW25113</i> στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>EcslyD</i> είτε το <i>EcslyD<sub>F132A</sub></i> .....	136
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	136
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	137
Γ.2.4.5.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών <i>BW25113</i> και <i>ΔslyD</i> τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο <i>EcslyD</i> είτε το <i>EcslyD<sub>F132A</sub></i> .....	138
Γ.2.4.5.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης <i>EcslyD</i> και της <i>EcslyD<sub>F132A</sub></i> στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	140
Γ.2.4.6 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ <i>Ectig</i> .....	141
Γ.2.4.6.1 Ενζυμική ενεργότητα της <i>Ectig</i> .....	141
Iκανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	143
Iκανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	144

Γ.2.4.6.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο <i>Ectig</i> είτε το <i>Ectig<sub>V66G</sub></i> είτε το <i>Ectig<sub>F198A</sub></i> .....	144
Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης.....	145
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	146
Γ.2.4.6.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και <i>Δtig</i> τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο <i>Ectig</i> είτε το <i>Ectig<sub>V66G</sub></i> είτε το <i>Ectig<sub>F198A</sub></i> .....	146
Γ.2.4.6.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων <i>Ectig</i> , <i>Ectig<sub>V66G</sub></i> και <i>Ectig<sub>F198A</sub></i> στην ανάπτυξη του βακτηρίου <i>E. coli</i> .....	148
Γ.2.5 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΡΡΙΑΣΕΣ.....	149
Γ.2.5.1 Λειτουργική υποκατάσταση της πρωτεΐνης <i>EcfkpA</i> από τις ΡΡιάσεις.....	150
Ικανότητα ομαδικής κίνησης.....	151
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	151
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	152
Γ.2.5.2 Λειτουργική υποκατάσταση της <i>EcfkpB</i> από τις ΡΡιάσεις.....	154
Ικανότητα ομαδικής κίνησης.....	154
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	155
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	155
Γ.2.5.3 Λειτουργική υποκατάσταση της <i>EcfklB</i> από τις ΡΡιάσεις.....	157
Ικανότητα ομαδικής κίνησης.....	157
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	157
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	158
Γ.2.5.4 Λειτουργική υποκατάσταση της <i>EcslyD</i> από τις ΡΡιάσεις.....	159
Ικανότητα ομαδικής κίνησης.....	160
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	160
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	161
Γ.2.5.5 Λειτουργική υποκατάσταση της <i>Ectig</i> από τις ΡΡιάσεις.....	162
Ικανότητα ομαδικής κίνησης.....	162
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	163
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	164
Γ.2.6 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΠΙΘΑΝΑ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗΝ <i>EcfkpB</i> ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ .....	165
Γ.2.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την <i>EcfkpB</i> .....	165
Γ.2.6.2 Επίδραση των πρωτεϊνών στόχων στην μετρούμενη ενεργότητα ΡΡιάσης της <i>EcfkpB</i> .....	166
Γ.2.6.3 Διερεύνηση της επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου στο στέλεχος <i>ΔfkrB</i> από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων.....	167
Γ.2.6.4 Διερεύνηση της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου των <i>ΔdnaK</i> , <i>ΔglpD</i> , <i>ΔcarA</i> , <i>ΔcheA</i> , <i>ΔfliC</i> .....	169
Γ.2.6.5 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>EcfkpB</i> με τις πρωτεΐνες στόχους .....	170
Γ.2.6.5 Ο ρόλος της <i>EcfkpB</i> πρωτεΐνης στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών στόχων.....	172
Γ.2.6.6 Διερεύνηση της επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου στα στελέχη <i>ΔfkrA</i> και <i>ΔslyD</i> από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της <i>EcfkpB</i> .....	175
Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης.....	175
Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου .....	176
Γ.2.6.7 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της <i>EcfkpB</i> και της <i>Ectig</i> με την <i>EcfzS</i> .....	178
<b>Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>181</b>
Δ.1 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> ΚΑΙ ΤΟΥ <i>A. VINELANDII</i> .....	181
Δ.2 Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΡΡΙΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΣΑΠΕΡΟΝΗΣ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ <i>A. VINELANDII</i> ΚΑΙ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> .....	183
Δ.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i> ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ.....	184
Δ.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>E. COLI</i> .....	185
Δ.5 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ.....	189
Δ.6 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ FKBP ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΡΡΙΑΣΕΣ .....	191

Δ.8 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ FKPB ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ <i>E. COLI</i> ΚΑΙ ΤΟΥ <i>A. VINELANDII</i> .....	195
<b>Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>199</b>
<b>ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>223</b>
ΣΤ.1 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ RENNIE .....	223
ΣΤ.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ.....	223
ΣΤ.3 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ .....	224

## **A. Εισαγωγή**



## A. Εισαγωγή

### A.1 Οι πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσεις

#### A.1.1 Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες, ανεξαρτήτως του μεγέθους τους, προκειμένου να είναι βιολογικά ενεργές πρέπει να αναδιπλωθούν έτσι ώστε να λάβουν μια τριτοταγή διαμόρφωση, διαμέσου μιας πορείας κατά την οποία λαμβάνουν χώρα διάφορες ενδιάμεσες αναδιπλώσεις. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μια αυθόρμητη διαδικασία, μέσω της οποίας καθίσταται δυνατή η μετατροπή της πληροφορίας που φέρει μια γραμμική πολυπεπτιδική αλυσίδα σε μια σωστά διαμορφωμένη τριτοταγή δομή. Σύμφωνα με τα *in vitro* πειράματα αναδίπλωσης πρωτεϊνών του Anfinsen, η πληροφορία για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων κάθε πρωτεΐνης (Erstein et al., 1963). Αυτή η πληροφορία οδηγεί στη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυπεπτιδικών αλυσίδων και υπομονάδων πρωτεϊνών που επιτελούν την αναδίπλωση τους και σταθεροποιούν τη δομή τους. Ωστόσο, στα κύτταρα (*in vivo*) η αναδίπλωση των πρωτεϊνών και η πορεία τους προς την τελική φυσική διαμόρφωση, λαμβάνει χώρα σε ένα πολύπλοκο περιβάλλον, με εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία βιομορίων και ιόντων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα της επίδρασης εξωκυτταρικών παραγόντων καταπόνησης ενώ παράλληλα οδηγεί σε δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων καταλήγοντας πιθανώς ακόμα και σε κυτταρικό θάνατο. Εντατικές ερευνητικές προσπάθειες της τελευταίας εικοσαετίας έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη των εξελικτικά συντηρημένων οικογενειών, των αναδιπλάσων (*foldases or folding helper enzymes*) και των μοριακών συνοδών ή τσαπερονών (*molecular chaperones*). Οι αναδιπλάσες συμμετέχουν σε μια πληθώρα ενδοκυτταρικών λειτουργιών όπως η *de novo* αναδίπλωση, η μεταγωγή σήματος, η επαναδίπλωση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, η ενδοκυτταρική μεταφορά πρωτεϊνών, η πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, η μετά-μεταγραφική χημική μεταβολή πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η αλλοστερική ρύθμιση (Lu et al., 2007).

Η *cis/trans* ισομερίωση των πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμών και η ισομερίωση των δισουλφιδικών δεσμών είναι αργού ρυθμού διαδικασίες οι οποίες έχουν ανασταλτικές επιπτώσεις για τις λειτουργίες του κυττάρου. *In vivo*, αυτές οι διαδικασίες επιδέχονται επίσπευσης με τη συμβολή των δύο κατηγοριών των αναδιπλάσων: των πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομερασών (Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerases, PPI) και των ισομερασών πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών (Protein Disulfide Isomerases, PDI), αντίστοιχα.

Οι τσαπερόνες εμποδίζουν τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων είτε κατά την ανάπτυξη των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε υπό συνθήκες καταπόνησης. Αν και πολλές από τις τσαπερόνες βιοσυντίθενται συνεχώς από τα κύτταρα, όταν αυτά εκτεθούν σε υψηλή θερμοκρασία, τότε τα επίπεδα βιοσύνθεσης τους αυξάνονται θεαματικά. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται ως θερμοεπαγόμενες πρωτεΐνες (Heat Shock Proteins, HSPs) καθώς η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο περιβάλλον του κυττάρου και σε επίπεδα ανάλογα του αριθμού των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Οι τσαπερόνες παρέχουν προστασία στις πρωτεΐνες από ενδεχόμενη συσσωμάτωση και λανθασμένη αναδίπλωση, δίχως να

επηρεάζουν την ταχύτητα αναδίπλωσης, σε αντίθεση με τις αναδιπλάσεις, οι οποίες καταλύουν τη διαδικασία αναδίπλωσης επηρεάζοντας την ταχύτητα κάθε σταδίου της αναδίπλωσης. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, αυτός ο διαχωρισμός είναι ασαφής καθώς οι αναδιπλάσεις εμφανίζουν δράση τσαπερονών και οι τσαπερόνες εμφανίζουν δράση αναδιπλασών (Shiue and Fischer, 2000).

Ορισμένα ένζυμα υποβοηθούν τη δημιουργία των σωστών δισουλφιδικών δεσμών κατά τη διάρκεια της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών. Τα “ένζυμα σχηματισμού δισουλφιδικών γεφυρών” (ισομεράσες δισουλφιδικών δεσμών ) είναι ενεργές τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην ανηγμένη μορφή τους. Στην οξειδωμένη μορφή τους, εισάγουν δισουλφιδικούς δεσμούς σε νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με άμεση ανταλλαγή θειόλης/δισουλφιδίου. Στην ανηγμένη μορφή τους επενεργούν στους ήδη υπάρχοντες δισουλφιδικούς δεσμούς καταστρέφοντάς τους γεγονός που οδηγεί σε εσφαλμένη αναδίπλωση. Οι ισομεράσες δισουλφιδικών δεσμών απαντώνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ευκαρυωτικών κυττάρων, στο περίπλασμα των προκαρυωτικών και οι περισσότερες φέρουν επιπλέον και ενεργότητα τσαπερόνης (Klappa et al., 1998). Τα κυριότερα μέλη της οικογένειας των ισομερασών δισουλφιδικών δεσμών αποτελούν οι πρωτεΐνες dsbA, dsbB, dsbC, και dsbD.

Οι πεπτιδύλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομεράσες (PPIάσες; EC: 5.2.1.8) αποτελούν μια υπεροικογένεια συντηρημένων κατά την εξέλιξη, πρωτεϊνών (Gothel and Marahiel, 1999). Εμφανίζουν αυξημένη καταλυτική δράση *in vitro* ενώ ο *in vivo* ρόλος τους δεν έχει μελετηθεί επαρκώς (Nagradova, 2007). Οι PPIάσες ισομεριώνουν τον *cis/trans* πεπτιδικό δεσμό που προηγείται της προλίνης, επιταχύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (διαρκεί από ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου έως ένα δευτερόλεπτο) και συνεπώς αποτρέπουν τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Schmid, 1993).

Τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIάσων, ονομάζονται επίσης και ανοσοφιλίνες, δε σχετίζονται δομικά και ανάλογα με τη δυνατότητα να δεσμεύουν την κυκλοσπορίνη A, το FK506 και την 5-υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη διακρίνονται στις εξής οικογένειες: τις κυκλοφιλίνες (Cyclophilins, Cyprs), τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το FK506 (FKBPs), τις παρβουλίνες (Parvulins, Pars) και όπως πρόσφατα ανακαλύφθηκε, την ΡΤΡΑ (Ser/Thr phosphatase 2A activator) (Lu et al., 2007).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η κυκλοσπορίνη A (CsA), ένα ενδεκαπεπτίδιο το οποίο προέρχεται από μύκητες όπως ο *Tolypocladium inflatum*, χορηγούνταν ως ανοσοκατασταλτική αγωγή ενώ πλέον χρησιμοποιείται ευρέως με σκοπό την πρόληψη και τη θεραπεία της απόρριψης μοσχεύματος ανθρώπινων οργάνων και ιστών. Το έτος 1984 μια πρωτεΐνη μεγέθους 18 kDa από θυμοκύτταρα θηλαστικών προσδιορίστηκε ως μια ενδοκυτταρική πρωτεΐνη-υποδοχέας για την κυκλοσπορίνη και αυτή η πρωτεΐνη έλαβε την ονομασία κυκλοφιλίνη. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1989 αποδείχθηκε ότι οι κυκλοφιλίνες και οι PPIάσες ήταν παραλλαγές της ίδιας πρωτεΐνης. Ωστόσο, ταυτοχρόνως ανακαλύφθηκε μια άλλη PPIάση, κατά τη διάρκεια της αναζήτησης της πρωτεΐνης-υποδοχέα του ανοσοκατασταλτικού μακρολιδίου (*macrolide*) FK506. Το FK506 είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces tsukubaensis*, το οποίο ανακαλύφθηκε σε ένα δείγμα εδάφους στην πόλη Tsukuba της Ιαπωνίας. Σχετίζεται δομικά με το αντιβιοτικό ραπαμυκίνη (rapamycin), η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1975, ως ένας αντιμυκητιασικός παράγοντας. Απομονώθηκε από το *Streptomyces hygroscopicus* και το όνομα ραπαμυκίνη προέρχεται από το Rapa Nui, η αρχική ονομασία για το Νησί του Πάσχα.

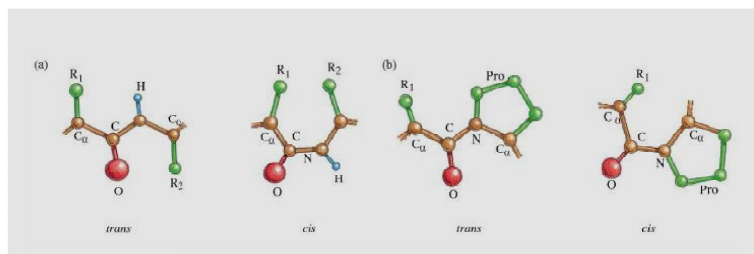
Η πρωτεΐνη-υποδοχέας απομονώθηκε και ονομάστηκε FKBP ή αλλιώς πρωτεΐνη πρόσδεσης του FK506 (FK506-binding protein). Ωστόσο, η αμινοξική αλληλουχία των FKBP πρωτεϊνών βρέθηκε να είναι

εντελώς διαφορετική από αυτή των κυκλοφιλινών, ακόμη και στο ενεργό τους κέντρο. Με αυτόν τον τρόπο, οι ΡΡΙΑσες διαχωρίστηκαν σε διαφορετικές κατηγορίες χρησιμοποιώντας ως κριτήριο τη δέσμευση σε διαφορετικά υποστρώματα.

Επί μακρό χρονικό διάστημα ο αναστολέας της τρίτης ομάδας των ΡΡΙΑσών, δηλαδή των παρβουλινών, της οποίας το πρώτο μέλος απομονώθηκε από το *Escherichia coli*, παρέμενε άγνωστος. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η γιουγλόνη (Juglone), αναστέλλει, μη αντιστρεπτά, την ενζυμική δραστηριότητα αρκετών παρβουλινών (Gothel and Marahiel, 1999).

### A.1.2 Η ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης

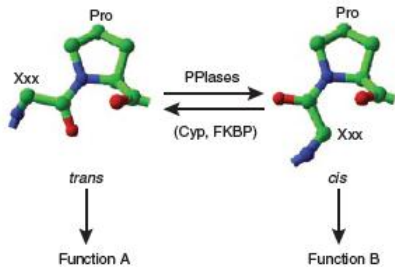
Για τους πεπτιδικούς δεσμούς των αμινοξέων η *trans* διαμόρφωση είναι ενεργειακά προτιμότερη της *cis*, η οποία εμφανίζεται σε ποσοστό 5–6% στις πρωτεΐνες των κυττάρων, εξαιτίας των λιγότερων απώσεων μεταξύ των δεσμών υδρογόνου. Ωστόσο, για τους πεπτιδικούς δεσμούς που προηγούνται της προλίνης, η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ των δύο ισομερών *cis/trans* είναι μικρότερη, με αποτέλεσμα η σταθερότητα της *cis* διαμόρφωσης να είναι συγκρίσιμη με αυτήν της *trans*. Αφού η *trans* και η *cis* διαμόρφωση των πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται της προλίνης (X-Pro) είναι σχεδόν ισοενεργειακή, τα μικρότερα πολυπεπίδια λαμβάνουν και τις δύο διαμορφώσεις (Εικόνα A.1.1). Η *cis/trans* ισομερίωση είναι μια αργού ρυθμού αντίδραση, με σταθερές χρόνου μεταξύ 10 και 100 δευτερολέπτων (σε 25°C), επειδή περιλαμβάνει μια περιστροφή γύρω από τον διπλό πεπτιδικό δεσμό (Schmid, 1993, Lu et al., 2007) (Εικόνα A.1.2).



**Εικόνα A.1.1. (a)** Οι πεπτιδικές ομάδες μπορούν να υιοθετήσουν δύο διαφορετικές στερεοδιατάξεις, την *trans* και τη *cis*. Στην *trans* μορφή, οι ομάδες C=O και N-H διευθετούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις ενώ στη *cis* μορφή διευθετούνται προς την ίδια κατεύθυνση. Για τα περισσότερα πεπίδια η *trans* μορφή είναι περίπου 1000 φορές πιο σταθερή από τη *cis* μορφή. **(b)** Όταν το δεύτερο κατάλοιπο σε ένα πεπίδιο είναι η προλίνη, η *trans* μορφή είναι περίπου τέσσερις φορές σταθερότερη από τη *cis* μορφή. Πεπίδια με *cis* προλίνη συναντώνται σε πολλές πρωτεΐνες (Branden and Tooze, 1999).

Τα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια, τα οποία φέρουν κατάλοιπα προλίνης και δύνανται να λάβουν διαφορετική *cis* και *trans* διαμόρφωση, αναγνωρίζονται από τις ΡΡΙΑσες, ως υποστρώματα που λειτουργούν ως διακόπτες ρύθμισης της διαμόρφωσης και επιταχύνουν τη *cis* σε *trans* ισομερίωση (Lu et al., 2007). Η ταχύτατη αυτή ισομερίωση των πεπτιδικών δεσμών, η οποία πραγματοποιείται εντός χιλιοστών του δευτερολέπτου, επιτελείται από τις ΡΡΙΑσες.

Τα ενδιάμεσα προϊόντα αναδίπλωσης (*folding intermediates*) χαρακτηρίζονται ως ιδιαίτερος ευπαθή στην πρωτεολυτική αποδόμηση και συσσωμάτωση ώστε η παρουσία ενός ενζύμου-καταλύτη της ισομερίωσης της προλίνης να καθίσταται αναγκαία (Gothel and Marahiel, 1999).



**Εικόνα A.1.2.** Η ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού προλίνης είναι μια αργή διαδικασία και καταλύεται από ένζυμα με ενεργότητα ΡΡιάσης. Ο πεπτιδικός δεσμός προλίνης έχει τη δυνατότητα να διαθέτει και τις δύο ισομερείς διαμορφώσεις (Lu et al., 2007).

### A.1.3 Οι κυκλοφιλίνες

Οι κυκλοφιλίνες αποτελούν την οικογένεια με τη μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στις ΡΡιάσες. Πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένες κατά την εξέλιξη, πολλές φέρουν επιπλέον και ενεργότητα τσαπερόνης και εντοπίζονται σε προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Έχουν ανακαλυφθεί 17 διαφορετικοί ισότυποι κυκλοφιλινών στον άνθρωπο με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 18 έως 150 kDa (Davis et al., 2010; Gothel and Marahiel, 1999). Η κυκλοφιλίνη A (*cypA*) του ανθρώπου είναι η πρώτη που ανακαλύφθηκε και αποτελεί μια κυτταροπλασματική ή εκκρινόμενη πρωτεΐνη, με ενεργότητα ΡΡιάσης, η οποία προσδέεται στην κυκλοσπορίνη A (*CsA*) (Kofron et al., 1991; Liu et al., 1991).

Οι κυκλοφιλίνες εντοπίζονται στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων του ενδοπλασματικού δικτύου, των μιτοχόνδριων, των χλωροπλαστών και του πυρήνα. Έχουν βρεθεί 29 στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, οκτώ στο *Saccharomyces cerevisiae* ενώ μόνο δύο στο βακτήριο *E. coli*, εκ των οποίων η πρώτη στο κυτταρόπλασμα και η δεύτερη στο περίπλασμα (Wang and Heitman, 2005). Οι μικροοργανισμοί *Haemophilium influenza* και *Bacillus subtilis* διαθέτουν από μια κυκλοφιλίνη (Pahl et al., 1997).

Όλες οι κυκλοφιλίνες μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά όπως μια δομική περιοχή 109 αμινοξέων που ονομάζεται cyclophilin-like domain (CLD), όπου εδράζεται η ενεργότητα ΡΡιάσης (Marks, 1996). Η δομή της ανθρώπινης *hcypA* και της βακτηριακής *EcrrpIA* έχει προσδιορισθεί και καταδείξει ότι οι δομές των δύο κυκλοφιλινών είναι ιδιαίτερα συντηρημένες. Η *hcypA* αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, δημιουργώντας δομή β-βαρελιού. Η κυκλοφιλίνη σχηματίζει σύμπλοκο με την *CsA* και την καλσινευρίνη με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ενεργότητα φωσφατάσης της καλσινευρίνης (Friedman and Weissman, 1991).

### A.1.3.1 Οι ευκαρυωτικές κυκλοφιλίνες

#### Οι κυκλοφιλίνες του ανθρώπου

Στις κυκλοφιλίνες αποδίδονται ορισμένες ανθρώπινες παθογένειες όπως είναι η προσβολή ιών, η χημειοταξία κατά τη φλεγμονή, ο καρκίνος και η μιτοχονδριακή καταπόνηση (Fischer et al., 2010). Η *hcypA* (17kDa) καταλύει την *cis/trans* ισομερίωση του πεπτιδικού δεσμού της προλίνης 35 της ιικής πρωτεΐνης *vpr*, μιας σημαντικής πρωτεΐνης του ιού HIV και παράλληλα με την ενεργότητα τσαπερόνης συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό του ιού και στην παθογένειά του (Barik, 2006). Αν και ο ρόλος της *hcypB* (21kDa) στην μολυσματικότητα των ιών HIV και HCV δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Galat and Bua, 2010), η πρωτεΐνη είναι γνωστή για την συμμετοχή της στα  $Ca^{2+}$  εξαρτώμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος (Wang and Heitman, 2005). Η *hcypC* (23 kDa), ομοίως με την *hcypB*, εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ενώ παράλληλα εκφράζεται περισσότερο στα νεφρά από ότι στο ήπαρ και στα T κύτταρα.

Η *hcypD* (18kDa) ρυθμίζει τη διαπερατότητα του πόρου  $Ca^{2+}$  στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, του οποίου η καταστολή παρέχει προστασία έναντι νευροεκφυλιστικών νόσων ενώ επίσης αλληλεπιδρά με την ATP συνθάση των μιτοχονδρίων. Το τελευταίο και μεγαλύτερο μέλος της οικογένειας των κυκλοφιλινών, η *hcypNK-TR* (150kDa) εδράζεται στην επιφάνεια των NK κυττάρων (φυσικά κύτταρα φορείς) και θεωρείται μέρος του συμπλόκου αναγνώρισης όγκων (Wang and Heitman, 2005).

#### Οι κυκλοφιλίνες των φυτών

Οι φυτικές κυκλοφιλίνες ανακαλύφθηκαν το έτος 1990, με την απομόνωση cDNA ακολουθίας από την τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), τον αραβόσιτο (*Zea mays*) και την ελαιοκράμβη (*Brassica napus*). Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί φέρουν ένα σημαντικό αριθμό κυκλοφιλινών (Gasser et al., 1990). Στο φυτό *Arabidopsis* απαντώνται 29 κυκλοφιλίνες, στο ρύζι 27 και στο *Chlamydomonas* 26. Στα θυλακοειδή των χλωροπλαστών του φυτού *Arabidopsis* απαντώνται πέντε κυκλοφιλίνες, ο υψηλότερος αριθμός κυκλοφιλινών που έχει καταγραφεί σε ένα μόλις κυτταρικό οργανίδιο. Η πρώτη αναφορά σχετικά με τη συμμετοχή των κυκλοφιλινών στη φωτοσυνθετική διαδικασία έγινε στην κυκλοφιλίνη TLP40 (40 kDa) από το σπανάκι, ένα ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος και στην αποφωσφορύλιωση της πρωτεΐνης D1 του φωτοσυστήματος II (Dominguez-Solis et al., 2008). Η ομόλογη πρωτεΐνη της TLP40 στο *Arabidopsis*, η *AtCyp38*, συντελεί στη δημιουργία και διατήρηση του φωτοσυστήματος II. Μεταλλαγμένα φυτά που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου *AtCyp38* με T-DNA ένθεση, επέδειξαν ατροφική ανάπτυξη και υπερευαισθησία σε υψηλό φωτισμό ενώ μέσω της ανάλυσης του φθορισμού της χλωροφύλλης και της σύνθεσης της μεμβράνης των θυλακοειδών των φυτών, αποδείχτηκε η ελλιπής λειτουργία του φωτοσυστήματος II (Fu et al., 2007).

Η πρωτεΐνη *cyp20-3* ή ROC4, που εδράζει στο στρώμα των χλωροπλαστών, επιδεικνύει υπερευαισθησία σε συνθήκες υψηλού φωτισμού, υψηλής αλατότητας και ωσμωτικής καταπόνησης. Έχει βρεθεί ότι μέσω της *cyp20-3*, το φως και η καταπόνηση συνδέονται με την ενεργότητα της SAT1 (ακετυλ-μεταφοράση της σερίνης) και τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης. Συνεπώς, η ενεργότητα ΡΡ1άσης της *cyp20-3* είναι υπεύθυνη για την αναδίπλωση της SAT1, επιτρέποντας στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της θειόλης να προσαρμοστεί στην οξειδωτική και ωσμωτική καταπόνηση. Μια άλλη κυκλοφιλίνη, η οποία επάγεται υπό συνθήκες καταπόνησης (στρες), είναι η *cyp-45* του σιταριού (*Triticum spp.*)

(Sharma and Kaur, 2009), ενώ η κυκλοφιλίνη *Lecyp1* της τομάτας (*Lycopersicon esculentum*) εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος για την ανάπτυξη και την απόκριση σε στρες, μέσω της ρύθμισης της αυξίνης (Oh et al., 2006). Τα παραπάνω γεγονότα καταδεικνύουν τον ρόλο των κυκλοφιλινών στην προσαρμογή των φυτών στο εξωγενές στρες.

Μελέτες Φασματοσκοπίας Μάζας (MS) κατέδειξαν τη συμμετοχή των ΡΡΙΑσών ως τσαπερόνες, και συγκεκριμένα της κυκλοφιλίνης *Rccyp1* στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών του φλοιού του *Ricinus communis*, μέσω της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτό το μηχανισμό (Giavalisco et al., 2006; Gottschalk et al., 2008).

Εκτός από την CLD δομική περιοχή αρκετές κυκλοφιλίνες φέρουν ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA (RRM) στο αμινοτελικό τους άκρο και ένα πλούσιο σε φορτισμένα αμινοξέα καρβοξυτελικό άκρο. Η *Atcyp59* του *Arabidopsis* εντοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II και με την SCL33/SR33, μια πρωτεΐνη SR (RNA splicing), επομένως πιθανολογείται ότι εμπλέκεται στη μεταγραφή και ωρίμανση του pre-mRNA (Gullerova et al., 2006).

#### A.1.3.2 Οι προκαρυωτικές κυκλοφιλίνες

Η μελέτη των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που δεσμεύουν την CsA και εμφανίζουν ενεργότητα ΡΡΙΑσης σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για πρωτεΐνες υψηλά συντηρημένες με μεγάλη ομολογία της ακολουθίας τους. Σε αντίθεση με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, οι αναζητήσεις προκαρυωτικών πρωτεϊνών ικανών να δεσμεύουν την CsA δεν ευδοκίμησαν (Koletsky et al., 1986).

Λίγο αργότερα, δείχθηκε ότι ο μικροοργανισμός *E. coli* παρουσιάζει ενεργότητα ΡΡΙΑσης τόσο στο κυτταρόπλασμα (Rahfeld et al., 1994a) όσο και στο περιπλασμικό χώρο (Liu and Walsh, 1990). Η περιπλασμική *EcrrpA* (20kDa) είναι ομόλογη της *hcypA* και εμφανίζει ενεργότητα ΡΡΙΑσης με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide να ανέρχεται στα  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , τιμή όμοια με την αντίστοιχη της *hcypA*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες είναι παρόμοιες και στη δομή και στη λειτουργία του ενεργού κέντρου ΡΡΙΑσης. Η *EcrrpA*, όπως και η *hcypA*, καταλύει την αναδίπλωση του θερμικά αποδιατεταγμένου κολλαγόνου τύπου III (Compton et al., 1992).

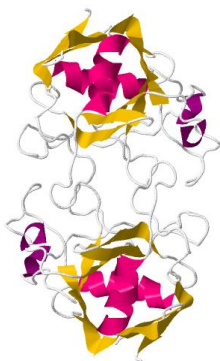


**Εικόνα A.1.3.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης *EcrrpA* του *E. coli*. Διακρίνονται οι αντιπαράλληλοι β-πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 1CLH) (Clubb et al., 1994).

Αντίθετα με τη *hcypA*, η *EcrrpA*, όπως και η *EcrrpB*, δεσμεύει τη CsA με τη σταθερά  $K_i$  να ανέρχεται στα 25-50  $\mu\text{M}$ , μια ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση η οποία είναι 1000 φορές παραπάνω από

τη συγκέντρωση της CsA που απαιτείται για τη δέσμευσή της από την ευκαρυωτική κυκλοφιλίνη A (Compton et al., 1992). Η δομή της *EcrrpIA* περιγράφεται στην εικόνα A.1.3. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *rrpIA* κατέδειξε ότι δεν είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση (*non-essential gene*) (Kleerebezem et al., 1995). Η μεταγραφή του γονιδίου της πρωτεΐνης *EcrrpIA* βρίσκεται υπό τον έλεγχο τεσσάρων προαγωγέων. Τρεις εξ' αυτών ενεργοποιούνται από το cAMP-CRP ρυθμιστικό σύστημα ενώ απενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη καταστολέα CytR (Nørregaard-Madsen et al., 1994). Ο τέταρτος προαγωγέας ρυθμίζεται/ελέγχεται από το Cpx δυαδικό σύστημα (*two-component system*) το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναδίπλωση περιπλαστικών πρωτεϊνών (Pogliano et al., 1997).

Το δεύτερο μέλος της οικογένειας των κυκλοφιλινών είναι η κυτταροπλασματική *EcrrpIB* (18kDa) η οποία παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης με τη σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (αλανίνη) να ανέρχεται στα  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Schönbrunner and Schmid, 1992). Η *EcrrpIB* καταλύει την αναδίπλωση του θερμικά αποδιατεταγμένου κολλαγόνου τύπου III (Compton et al., 1992) και βελτιστοποιεί τη λειτουργία μιας ισομεράσης δισουλφιδικών δεσμών (PDI) (Schönbrunner and Schmid, 1992). Η δομή της *EcrrpIB* αναφέρεται στην εικόνα A.1.4.



**Εικόνα A.1.4.** Η τριτοταγής δομή της διμερούς πρωτεΐνης *EcrrpIB* του *E. coli*. Διακρίνονται ανά μονομερές οι αντιπαράλληλοι β-β-πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 2NUL) (Edwards et al., 1997).

Η *AnrriB* από τον αζωτοδεσμευτικό μικροοργανισμό *Azotobacter vinelandii* παρουσιάζει παρόμοια ενεργότητα PPIάσης με την *EcrrpIB*, ενώ η αλληλεπίδρασή της με την τσαπερόνη *AnvDnaK* και την υδρολάση *AnlpxH* (UDP-2, 3-diacetylglucosamine hydrolase) οφείλεται κυρίως στην ενεργότητα τσαπερόνης της (Dimou et al., 2011).

#### A.1.4 Οι παρβουλίνες

Οι παρβουλίνες αποτελούν τη μικρότερη και την πιο πρόσφατα μελετημένη οικογένεια των PPIασών. Η πρώτη αναφορά σε αυτές έγινε από τον Rahfeld, ο οποίος εντόπισε μια πρωτεΐνη μόλις 92 αμινοξέων στο κυτταρόπλασμα του *E. coli* και την ονόμασε παρβουλίνη *par10* (Λατινικά: *parvulus*=πολύ μικρή) (Rahfeld et al., 1994). Σε μια πρώτη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία γιουγλόνη, η οποία παράγεται από τη μαύρη καρυδιά (*Juglans nigra*) και διαπιστώθηκε η ικανότητα αυτής να αναχαιτίζει την ενεργότητα της *par10*, ενώ άφηνε ανεπηρέαστες τις υπόλοιπες PPIάσεις του βακτηρίου *E. coli* (Hennig et al., 1998). Μέσω της ευθυγράμμισης της αλληλουχίας της προέκυψε ότι η νέα PPIάση εμφάνιζε ομολογία με μεγαλύτερες πρωτεΐνες βακτηρίων, ζυμών, σπονδυλωτών ακόμα και του ανθρώπου (Rahfeld et al., 1994). Οι παρβουλίνες δεν εμφανίζουν ομολογία με τις κυκλοφιλίνες και τις

FKBPs και δεν έχουν τη δυνατότητα δέσμευσης της CsA ή του FK506. Αρκετές από τις ομόλογες των παρβουλινών στους προκαρυωτικούς οργανισμούς εμπλέκονται σε λειτουργίες όπως το αρχικό στάδιο της ωρίμανσης των πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μεμβράνης (OMPs) (Lazar and Kolter, 1996; Rouviere and Gross, 1996). Όλα τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών διακρίνονται από μια χαρακτηριστική ακολουθία δύο συντηρημένων μοτίβων ιστιδινών (His-XaaVal(Ile)-Xaa-Lys και Gly-Xaa-His-Ile(Leu,Val)-Ile) που διαχωρίζονται από 70–85 αμινοξέα (Yao et al., 2001; Metzner et al., 2001).

#### **A.1.4.1 Οι ευκαρυωτικές παρβουλίνες**

##### *Οι παρβουλίνες του ανθρώπου*

Στον άνθρωπο, έχουν εντοπιστεί μόνον οι εξής τρεις παρβουλίνες: η *hpin1*, η *hpar14* και η *hpar17*. Η *hpin1*, η κατεχοχίνη γνωστή και εκτενώς μελετημένη παρβουλίνη, αλληλεπιδρά με την κινάση NIMA και καταλύει την αναδίπλωση πρωτεϊνών *in vitro* (Scholz et al., 1997a). Παρουσιάζει ενζυμική εξειδίκευση έναντι πρωτεϊνών οι οποίες περιλαμβάνουν στην ακολουθία τους φωσφορυλιωμένη σερίνη ή θρεονίνη πριν από την προλίνη (pSer/Thr-Pro), επομένως επηρεάζει την ενεργότητα, την λειτουργικότητα και την υποκυτταρική τοποθέτηση των φωσφοπρωτεϊνών ενώ η ιδιότητά της αυτή αποτέλεσε καίριο σημείο έρευνας. Μια άλλη έρευνητική εργασία υποδεικνύει το ρόλο της ενεργότητας ΡΡιάσης της *hpin1* στη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών (Weiwad et al., 2004). Η πρωτεΐνη *hpin1* φέρει μια WW περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο ενώ η καταλυτική περιοχή ΡΡιάσης εδράζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (Ranganathan et al., 1997). Έχει αποδειχθεί, επίσης, ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *hpin1* σχετίζεται με διάφορους τύπους καρκίνου ενώ η καταστολή του είναι ικανή να παρεμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Bao et al., 2004). Ο σημαντικός ρόλος της *hpin1* σε κυτταρικές διεργασίες συνάδει με το γεγονός ότι η ενζυμική της ενεργότητα εμπλέκεται στη λειτουργικότητα πρωτεϊνών της μίτωσης, μεταγραφικών παραγόντων, πρωτεϊνών της απόπτωσης, πρωτεΐνης ταυ του κυτταροσκελετού, πρωτεϊνών καταστολέων της ογκογένεσης p53 και p73 κ.α. (Wulf et al., 2005).

Η *hpar14* εδράζεται στον πυρήνα και παρουσιάζει ενζυμική εξειδίκευση έναντι πρωτεϊνών οι οποίες περιλαμβάνουν στην ακολουθία τους το αμινοξύ αργινίνη πριν από την προλίνη (Fujiyama et al., 2002, Uchida et al., 1999). Παρουσιάζει 34.5% ομολογία με την *par10* του *E. coli* και 34% ομολογία με την *hpin1* (Uchida et al., 1999). Η *hpar14* εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο και στο σχηματισμό της χρωματίνης ενώ εκφράζεται σε ιστούς και όργανα όπως η καρδιά, ο πλακούντας, το ήπαρ, οι νεφροί και το πάγκρεας (Reimer et al., 2003).

Η *hpar17* είναι υψηλά συντηρημένη σε όλα τα μετόζωα και στον άνθρωπο και φέρει ενεργότητα ΡΡιάσης. Κωδικοποιείται από τον ίδιο γενετικό τόπο με την *hpar14* στο χρωμόσωμα Χq13.1. Σε αντίθεση με την *hpar14*, η *hpar17* μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο καθότι το αμινοτελικό της άκρο λειτουργεί ως οδηγός (Kessler et al., 2007).

##### *Οι παρβουλίνες των φυτών*

Κατά τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος του φυτού *Arabidopsis*, εντοπίστηκαν τουλάχιστον 52 γονίδια που πιθανά κωδικοποιούν για ανοσοφιλίνες ενώ μόνο τρία γονίδια που κωδικοποιούν για παρβουλίνες και τα οποία ονομάστηκαν *Atpin1*, *Atpin2* και *Atpin3*. Η *Atpin1* εμφανίζει ποσοστό 52% ομολογία με την *hpin1* και 51% ομολογία με την *Scs1*, με μόνη διαφορά ότι δεν φέρει τη WW δομική



περιοχή στην ακολουθία της όπως και καμία άλλη παρβουλίνη φυτικής προέλευσης. Η *Atpin2*, αντίθετα, είναι 53% ομόλογη της *hpar14* και μόνο 32% με την *Atpin1* ενώ η *Atpin3* είναι 39% ομόλογη της *Ecrpar10* (He et al., 2004). Οι τρεις φυτικές παρβουλίνες διαφέρουν στη δομή: η *Atpin1* αποτελείται από μια δομική περιοχή ενζυμικής κατάλυσης, η *Atpin2* φέρει εκτός από τη δομική περιοχή ενζυμικής κατάλυσης και μια περιοχή πλούσια στο αμινοξύ λυσίνη στο αμινοτελικό της άκρο ενώ η *Atpin3* φέρει τρεις δομικές περιοχές. Στο αμινοτελικό της άκρο της *Atpin3* εδράζεται το πεπτιδίο οδηγός το οποίο τη μεταφέρει στο χλωροπλάστη, στο καρβοξυτελικό της άκρο εδράζεται η περιοχή ροδανάσης και στο ενδιάμεσο απαντάται η περιοχή ενζυμικής κατάλυσης (Bordo and Bork, 2002).

Άλλη φυτική παρβουλίνη τύπου *pin* είναι η *Mdpin1*, η οποία εντοπίζεται στον πρώιμο καρπό της μηλιάς (*Malus domestica*), διαθέτει ενεργότητα ΡΡΙΑσης, εμφανίζει ενζυμική εξειδίκευση για φωσφορυλιωμένα υποστρώματα στη σερίνη, πριν από την προλίνη, υποστρώματα και συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση κατά την ανάπτυξη (Yao et al., 2001).

Στο φυτό *Lotus japonicus* εκφράζονται τρεις παρβουλίνες, οι *Ljpar1*, *Ljpar2* και *Ljpar3*, οι οποίες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα πλαστίδια αντίστοιχα και όλες διαθέτουν ενεργότητα ΡΡΙΑσης (Kouri et al., 2009).

#### Οι παρβουλίνες λοιπών οργανισμών

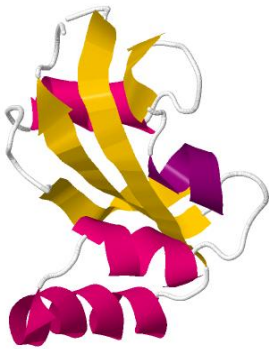
Οι παρβουλίνες, μεταξύ άλλων, εμπλέκονται σημαντικά στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου καθώς η απενεργοποίηση του ομόλογου, με το *hpin1*, γονιδίου *ess1* της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, προκαλεί θνησιμότητα, λόγω διακοπής της διαδικασίας της μίτωσης. Η κυτταροπλασμική παρβουλίνη *Scs1* (19kDa), όπως οι υπόλοιπες πρωτεΐνες τύπου *pin*, εκ των οποίων η *mPIN1* από το ποντίκι *Mus sp.*, η *Dodo* από τον οργανισμό *Drosophila melanogaster*, η *xpin1* από το βάτραχο *Xenopus laevis*, η *PINA* από το μύκητα *Aspergillus nidulans* και η *Ssp1* από το μύκητα *Neurospora crassa*, με εξαίρεση την *AtPin1* του *Arabidopsis thaliana*, περιέχει την WW περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο (Metzner et al., 2001). Η *Scs1* ισομεριώνει περιοχές των πρωτεϊνών *Swi6p* και *Whi5p* που περιέχουν φωσφορυλιωμένη σερίνη πριν από την προλίνη (phospho-Ser-Pro) με αποτέλεσμα την αλλαγή στη διαμόρφωσή τους, η οποία επηρεάζει τη μεταφορά τους στον πυρήνα του κυττάρου (Atencio et al., 2014). Επίσης, η *Scs1* αλληλεπιδρά με μια περιοχή που εδράζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της μεγάλης υπομονάδας της RNA πολυμεράσης II (CTD) ισομεριώνοντας το δεσμό μεταξύ Ser5 και Pro6 στο επταπεπτιδίο (YSPTSPS) με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων στο σύμπλεγμα της RNA πολυμεράσης II (Singh et al. 2009). Η *Scs1* αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του συμπλέγματος της αποακετυλάσης των ιστονών (*Sin3-Rpd3*), το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή σημαντικού αριθμού γονιδίων (Arévalo-Rodríguez et al., 2004).

#### A.1.4.2 Οι προκαρυωτικές παρβουλίνες

Οι προκαρυωτικές παρβουλίνες, επιπρόσθετα της ενεργότητας ΡΡΙΑσης, εμφανίζουν και ενεργότητα τσαπερόνης. Στο βακτήριο *E. coli* απαντώνται οι εξής τρεις παρβουλίνες, αντιπροσωπευτικές των προκαρυωτικών: η *EcrpiC* (10kDa), η *EcrpiD* (68kDa) και η περιπλασμική *EcsurA* (47kDa).

Η *EcrpiC* ή *Ecrpar10* είναι η πρώτη παρβουλίνη, η οποία ανακαλύφθηκε από τους Rahfeld et al. το έτος 1994. Εδράζεται στο κυτταρόπλασμα και φέρει ενεργότητα ΡΡΙΑσης με τη σταθερά

εξειδίκευσης kcat/Km έναντι του τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide (λευκίνη) να είναι ίση με  $1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , ενώ εμφανίζει ενζυμική εξειδίκευση για υδρόφοβα αμινοξέα όπως η λευκίνη ή η φαινυλαλανίνη πριν από την προλίνη των τετραπεπτιδίων (Scholz et al., 1997a). Η EcrrpC διαθέτει την ικανότητα δέσμευσης της γιουγλόνης, η οποία την καθιστά, μη αντιστρεπτά, ανενεργή (Hennig et al., 1998) και έχει τη δυνατότητα εκτός από την αναδίπλωση πρωτεϊνών να επιταχύνει και τη δική της αναδίπλωση (Scholz et al., 1997a). Πρόσφατη μελέτη κατέδειξε ότι η EcrrpC αλληλεπιδρά με μια ρεδοκτάση, την EcahpC (*alkyl hydroperoxide reductase subunit C*) και υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση αυτή αποτελεί η περιοχή ενεργότητας PPIάσης. Η ίδια περιοχή είναι υπεύθυνη και για τη μειωμένη ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες που εμφανίζει το μεταλλαγμένο στέλεχος, στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο που κωδικοποιεί για την EcrrpC (Malesevic et al., 2010). Η τριτοταγής δομή της EcrrpC αποικονίζεται στη εικόνα A.1.5.



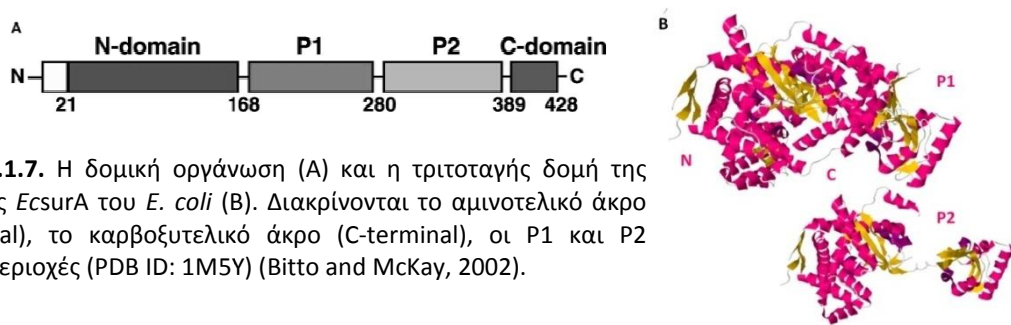
**Εικόνα A.1.5.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης EcrrpC του *E. coli*. Διακρίνονται οι αντιπαράλληλοι β-πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 1JNS) (Kühlewein et al., 2004).

Η EcrrpD αποτελεί μια περιπλασμική πρωτεΐνη 623 αμινοξέων και ένα τμήμα της εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη (καρβοξυτελικό άκρο), όπου εδράζεται και η ενεργότητα PPIάσης (Dartigalongue and Raina, 1998). Η EcrrpD δεν παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης αλλά μόνο τσαπερόνης η οποία συμβάλλει στην αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων που εισέρχονται στον περιπλασμικό χώρο (Weininger et al. 2010, Matern et al., 2010). Ο μεταλλαγμένος φαινότυπος που εμφανίζεται λόγω της απαλοιφής της EcrrpD αποκαθίσταται μετά από την έκφραση της EcrrpD (Dartigalongue and Raina, 1998). Η συνδυασμένη απενεργοποίηση των γονιδίων *rrpD* και *surA* έχει θανάσιμες επιπτώσεις για το κύτταρο. Η τριτοταγής δομή της EcrrpD περιγράφεται στη εικόνα A.1.6.



**Εικόνα A.1.6.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης EcrrpD του *E. coli*. Διακρίνονται οι αντιπαράλληλοι β-πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα και οι α-έλικες με μοβ χρώμα (PDB ID: 2KGJ) (Weininger et al., 2009).

Το τρίτο μέλος της οικογένειας των παρβουλινών είναι η *EcsurA*, η κυρίως υπεύθυνη πρωτεΐνη για την ωρίμανση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs). Οι OMPs, εκ των οποίων οι πρωτεΐνες ompA, ompF και lamB, διατηρούν την ακεραιότητα της εξωτερικής μεμβράνης εμποδίζοντας την είσοδο μικρού μοριακού βάρους μορίων (π.χ. αντιβιοτικών) στο κύτταρο. Η απαλοιφή του γονιδίου *EcsurA* είχε σημαντικές επιπτώσεις στην αφθονία των OMPs, ιδιαίτερα στις πρωτεΐνες που φέρουν δομές β-βαρελίου (Vertommen et al., 2009). Η ιδιότητα αυτή της *EcsurA* αρχικά αποδόθηκε στην ενεργότητα PPIάσης, (η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide είναι ίση με  $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Behrens et al., 2001), η οποία εδράζεται σε δύο ξεχωριστές δομικές περιοχές (P1 και P2) (Rouvière and Gross, 1996). Ωστόσο, αργότερα διαπιστώθηκε ότι η πρόσδεση και αναδίπλωση των OMPs πραγματοποιούνταν στην πρώτη δομική περιοχή στην οποία φιλοξενείται η ενεργότητα τσαπερόνης, ενώ από την ίδια μελέτη προέκυψε ότι μόνο η δεύτερη δομική περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου (P2) είναι ενζυμικά ενεργή (Behrens et al., 2001). Το στέλεχος *E. coli* που φέρει απενεργοποίηση του γονιδίου *EcsurA* δεν επιζεί κατά την στατική φάση ανάπτυξης, σε υψηλό pH (Lazar et al., 1998).



**Εικόνα A.1.7.** Η δομική οργάνωση (A) και η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης *EcsurA* του *E. coli* (B). Διακρίνονται το αμινοτελικό άκρο (N-terminal), το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal), οι P1 και P2 δομικές περιοχές (PDB ID: 1M5Y) (Bitto and McKay, 2002).

Η επίλυση της τριτοταγούς δομής της *EcsurA* πραγματοποιήθηκε από τους Bitto και McKay, οι οποίοι επεσήμαναν τις τέσσερις δομικές περιοχές της πρωτεΐνης (Εικόνα A.1.1.7). Ο συνδυασμός του αμινοτελικού και του καρβοξυτελικού άκρου είναι απαραίτητος για την ενεργότητα τσαπερόνης. Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο και η P2 δομική περιοχή ευθύνονται για την ενεργότητα PPIάσης (Bitto and McKay, 2002).

### A.1.5 Οι FKBP

Όπως όλες οι ανοσοφιλίνες, οι FKBP εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς, ευκαρυώτες ή προκαρυώτες και είναι υψηλά συντηρημένες στο σύνολο τους. Όπως προαναφέρθηκε, ο όρος FKBP αφορά σε κάθε πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει την ανοσοκατασταλτική ένωση FK506 και τη ραπαμυκίνη, αλλά όχι την CsA (Gothel and Marahiel, 1999). Οι FKBP χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας τουλάχιστον περιοχής δέσμευσης του FK506, που αποτελεί μια συντηρημένη αλληλουχία 110 αμινοξέων (Galat, 2003; Somarelli and Herrera, 2007). Αν και η παρουσία ή μη της συντηρημένης αλληλουχίας αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση χαρακτηρισμού της οικογένειας, υπάρχουν πρωτεΐνες FKBP που εμφανίζουν χαμηλή ή μηδενική ενζυμική ενεργότητα PPIάσης (Kamphausen et al., 2002; Sinars et al., 2003; Lima et al., 2006) ενώ παράλληλα παρουσιάζουν ενεργότητα τσαπερόνης. Στις

περισσότερες των περιπτώσεων η ενζυμική ενεργότητα ΡΡιάσης και η ενεργότητα τσαπερόνης είναι δύο ανεξάρτητες ενεργότητες που εδράζονται σε διαφορετικές δομικές περιοχές του ενζύμου. Οι FKBP συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων της μεταγωγής σήματος, της μεταγραφής και της κυτταρικής προσαρμογής σε συνθήκες καταπόνησης.

#### **A.1.5.1 Οι ευκαρυωτικές FKBP**

##### *Οι FKBP του ανθρώπου*

Προς το παρόν τουλάχιστον δεκαπέντε FKBP είναι γνωστές (Hunter, 1998; Kang et al., 2008, Galat 2013).

Η πρώτη FKBP πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε το έτος 1989 σε ανθρώπινα Τ-λεμφοκύτταρα (Harding et al., 1989; Siekierka et al., 1989) και ονομάστηκε *hFKBP12*. Επρόκειτο για μια πρωτεΐνη μεγέθους 12 kDa, η οποία δεν σχετιζόταν δομικά με τις κυκλοφιλίνες, είχε υψηλή ικανότητα δέσμωσης του FK506 και της ραπαμυκίνης και κατέλυε την *cis/trans* ισομερίωση του δεσμού της προλίνης σε ολιγοπεπτίδια. Το σύμπλοκο της *hFKBP12* με τη CsA ή με το FK506, διαθέτει την ικανότητα πρόσδεσης και απενεργοποίησης της καλσινευρίνης (CN) στα Τ-λεμφοκύτταρα (Liu et al., 1991). Αν και αρχικά εντοπίστηκε στα Τ-λεμφοκύτταρα, διαπιστώθηκε ότι εδράζεται σε όλους τους ιστούς ενώ παράλληλα βρίσκεται σε αφθονία στον εγκέφαλο (Snyder et al., 1998). Αποτελεί μέρος των διαύλων  $Ca^{+}$  και συγκεκριμένα του υποδοχέα IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) και του υποδοχέα της ρυανοδίνης, αλλά και του TGFβ υποδοχέα (Ser-Thr Kinase receptor) (Cameron et al., 1995, Wang et al., 1994). Απενεργοποίηση του *FKBP12* γονιδίου σε ποντίκια οδηγεί σε καρδιακή υπερτροφία και σε φυσιολογική λειτουργία των καναλιών  $Ca^{+}$  (Shou et al., 1998). Η δομή της προσδιορίστηκε με τις μεθόδους φασματοσκοπίας NMR και κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ, σε ελεύθερη μορφή, καθώς και σε σύμπλοκο με το FK506 και τη ραπαμυκίνη. Η δευτεροταγής δομή της *hFKBP12* αποτελείται από πέντε αντιπαράλληλες β-πτυχωτές και από μια α-έλικα (Schmid, 2002).

Η απενεργοποίηση του γονιδίου *hFKBP12.6* του καρδιακού μυός προκαλεί καρδιακές αρρυθμίες. Η πρωτεΐνη *hFKBP12.6* συμβάλλει στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης RyR2 (Ryanodine receptor 2), η οποία είναι υπεύθυνη για την ομαλή λειτουργία των καναλιών  $Ca^{+}$  (Wehrens et al., 2003).

Η *hFKBP13* παρουσιάζει ενεργότητα ΡΡιάσης και εδράζεται πιθανότατα στο ενδοπλασματικό δίκτυο των Τ-λεμφοκυττάρων (Gothel and Marahiel, 1999). Η *hFKBP25*, εδράζεται στον πυρήνα των Τ-λεμφοκυττάρων του θύμου αδένου ενώ εντοπίζεται παράλληλα στον εγκέφαλο και στο ήπαρ και έχει υψηλή ικανότητα δέσμωσης της ραπαμυκίνης. Η *hFKBP38* διαθέτει μια ανενεργή FKBP περιοχή ενώ συμμετέχει στον μηχανισμό της απόπτωσης (Kang et al., 2008). Η *hFKBP25* και η *hFKBP54* είναι ομόλογες πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από δύο FKBP δομικές περιοχές και από τρία μοτίβα TPR (tetratricopeptide repeat). Τα δύο μεγαλύτερα μέλη της FKBP οικογένειας συμμετέχουν στο σύμπλεγμα των υποδοχέων στεροειδών, μέσω της αλληλεπίδρασης με την τσαπερόνη HSP90 και στη μεταφορά τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα (Peattie et al., 1992; Shimamoto et al., 2010).

##### *Οι FKBP των φυτών*

Οι FKBP απαντώνται στα ανώτερα φυτά σε αφθονία καθώς έχουν εντοπιστεί 23 ισότυποι στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (He et al., 2004) και 29 στο ρύζι (*Oryza sativa*) (Gollan and Bhave, 2010).

Οι FKBP's που έχουν απομονωθεί από φυτά εμφανίζουν υψηλή ομολογία με τις αντίστοιχες των θηλαστικών ενώ εμπλέκονται σε μηχανισμούς, όπως η απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης, η ανάπτυξη των φυτών και η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, όμως οι λεπτομερείς γνώσεις των λειτουργιών τους παραμένουν περιορισμένες (Geisler and Bailly, 2007). Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι φυτικές FKBP's ρυθμίζουν τη λειτουργία πρωτεϊνών μέσω της εξειδικευμένης αλληλεπίδρασής τους με αυτές (Gollan et al., 2012). Οι φυτικές FKBP's ποικίλλουν σε μέγεθος και σε δομή: η AtFKBP12 (12kDa) του *Arabidopsis* διαθέτει μια FKBP δομική περιοχή, ενώ η μεγαλύτερη wFKBP77 (77kDa) του σιταριού διαθέτει δύο δομικές περιοχές και τρεις επαναλήψεις TPR, οι οποίες αποτελούν σημείο αλληλεπίδρασης με την τσαπερόνη HSP90 (Faure et al., 1998; Kurek et al., 1999).

Στην απόκριση του φυτού *Arabidopsis* σε συνθήκες καταπόνησης συμμετέχουν οι ισότυποι AtFKBP62 (ROF1) και AtFKBP65 (ROF2) (Aviezer-Hagai et al., 2007). Οι AtFKBP62 και AtFKBP65 δρουν ανταγωνιστικά στην απόκτηση μακροχρόνιας θερμοανθεκτικότητας ρυθμίζοντας την έκφραση των μικρών θερμοεπαγόμενων πρωτεϊνών (sHSPs). Η HSP90 προσδέεται στην TPR περιοχή της AtFKBP62 και μαζί προσδέονται στον HsfA2 μεταγραφικό παράγοντα. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο AtFKBP62 – HSP90–HsfA2 μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου επάγεται η έκφραση των sHSPs και του AtFKBP65 (Meiri and Breiman, 2009). Κατά τη διάρκεια ανάκαμψης από τις συνθήκες καταπόνησης, η AtFKBP65 προσδέεται στην FKBP δομική περιοχή (FKBd) της AtFKBP62, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των sHSPs (Meiri et al., 2010). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι η AtFKBP65 εμπλέκεται στη ρύθμιση της διατήρησης του ενδοκυττάριου pH και της πολικότητας της κυτταρικής μεμβράνης διαμέσου του ελέγχου του διαύλου των ιόντων K<sup>+</sup> (Bissoli et al., 2012). Το ζεύγος AtFKBP62 και AtFKBP65 αποτελεί ένα από τα πολλά συντηρημένα ζεύγη πρωτεϊνών τα οποία εμπλέκονται στην απόκτηση θερμοανθεκτικότητας και απαντώνται, επίσης, στο σιτάρι, στο ρύζι και στο καλαμπόκι (Gollan et al., 2012).

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών παίζει η πρωτεΐνη AtFKBP72 ή PAS1 (PASTICCINO1), η οποία αποτελείται από μια FKBP περιοχή στο αμινοτελικό της άκρο και από την TPR περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Η AtFKBP72 δραστηριοποιείται στους διαιρούμενους ιστούς του ακραίου μεριστώματος και η απενεργοποίηση του γονιδίου οδηγεί στο φαινότυπο PASTICCINO, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αποδιοργανωμένο ορμονικό έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης από τις κυτοκίνες και την αυξίνη (Vittorioso et al., 1998). Συγκεκριμένα, το φυτό *Arabidopsis*, με απαλοιφή του γονιδίου *AtFKBP72*, έχει μικρό και παχύ υποκοτύλιο, μη φυσιολογικές κοτυληδόνες και φύλλα (Harrar et al., 2001). Επίσης η *AtFKBP72*, συμμετέχει στη ρύθμιση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας (LCFAs), ορισμένων φωσφολιπιδίων και σφιγγολιπιδίων, τα οποία είναι απαραίτητα για την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση (Roudier et al., 2010).

Τέλος, όσον αφορά στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων, βρέθηκε ότι η AtFKBP53, η οποία εδράζεται στον πυρήνα, αλληλεπιδρά μέσω μιας όξινης δομικής περιοχής, με την ιδιότητα της τσαπερόνης, με την H3 ιστόνη ελέγχοντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφή των γονιδίων του 18S rRNA (Li and Luan, 2010). Επίσης, αποδειχθεί ότι η H3 ιστόνη αλληλεπιδρά η κυκλοφιλίνη AtCYP71 (Li et al., 2007).

Οι FKBP's λοιπών οργανισμών

Στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχουν εντοπιστεί οι ακόλουθες FKBP's: α/ η κυτταροπλασματική Scfpr1 (12kDa), β/ η θερμοεπαγόμενη Scfpr2 (12.5kDa) η οποία εδράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Dolinski and Heitman, 1999), γ/ η Scfpr3 (70kDa), η οποία εδράζεται στον πυρηνίσκο και δ/ η Scfpr4 (60kDa), η οποία εδράζεται στον πυρήνα και είναι ομόλογη της Scfpr3 (Gothel and Marahiel, 1999). Οι Scfpr3 και Scfpr4 αλληλεπιδρούν με την H3 ιστόνη. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί την ισομερίωση των καταλοίπων προλίνης της H3 με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεθυλώσεώς της (Nelson et al., 2006). Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε στελέχη της *S. cerevisiae* έδειξε ότι η απαλοιφή των γονιδίων *Scfpr3* ή *Scfpr4* επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής σημαντικού αριθμού γονιδίων (Park et al., 2014).

#### A.1.5.2 Οι προκαρυωτικές FKBP's

Προκαρυωτικές FKBP's τύπου MIP (24-30kDa) έχουν αναγνωριστεί ως παράγοντες παθογένειας σε μικροοργανισμούς. Οι πρωτεΐνες MIP (*macrophage infectivity potentiator proteins*), οι οποίες εμφανίζουν ενεργότητα PPIάσης, ανήκουν στην οικογένεια των FKBP's και εκκρίνονται από έναν υψηλό αριθμό παθογόνων βακτηρίων, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Trypanosoma cruzi*, *Aeromonas hydrophila* και *Salmonella typhimurium*. Οι πρωτεΐνες MIP αρχικά περιγράφηκαν στον μικροοργανισμό *L. pneumophila* (Gaestel, 2006).

Η λύση της δομής της πρωτεΐνης LpFKBP25, του μικροοργανισμού *L. pneumophila* και της πρωτεΐνης TcFKBP18.8 του *T. cruzi* αποκάλυψαν την παρουσία μιας FKBP περιοχής ενζυμικής κατάλυσης σε κάθε μονομερές (Pereira et al. 2002; Riboldi-Tunnicliffe et al., 2001). Συνεπώς, το ανοσοκατασταλτικό FK506 μπορεί να καταστείλει την ικανότητα μόλυνσης των μικροοργανισμών *Chlamydia trachomatis* (Lundemose et al. 1993) και *T. cruzi* (Moro et al., 1995). Επιπρόσθετα, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της LpFKBP25 προκαλούν αναχαίτιση της έναρξης της ενδοκυτταρικής μόλυνσης στα ανθρώπινα U937 φαγοκύτταρα και σε κύτταρα του μικροοργανισμού φυσικού ξενιστή *Acanthamoeba castellanii* (Helbig et al. 2003).

Οι προκαρυωτικές FKBP's, όπως και οι περισσότερες ανοσοφιλίνες, παρουσιάζουν ενεργότητα PPIάσης και ενεργότητα τσαπερόνης. Στο βακτήριο *E. coli* απαντώνται οι εξής πέντε: η EcfkpA (28.8kDa), η EcfkpB (16kDa), η EcfklB (22kDa), η EcslyD (20kDa) και η Ectig (48kDa).

#### A.1.6 Η προκαρυωτική FkpA

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι αναδιπλάσεις συμμετέχουν στην αναδίπλωση πρωτεϊνών που μεταφέρονται προς ή βρίσκονται εντός του περιπλασματικού χώρου των κυττάρων. Καθότι οι τσαπερόνες όπως η πρωτεΐνη GroEL (HSP60 οικογένεια) ή η DnaK (HSP70 οικογένεια), καταναλώνουν ATP, δεν μπορούν να δράσουν στο περίπλασμα από το οποίο το ATP απουσιάζει (Gething and Sambrook, 1992). Η συμβολή των τσαπερονών στην αναδίπλωση περιπλασματικών πρωτεϊνών έχει μελετηθεί επαρκώς (Missiakas and Raina, 1997; Danese and Silhavy, 1998; Raivio and Silhavy, 1999, Goeman et al., 2014). Οι PPIάσες εντοπίζονται και στα δύο διαμερίσματα του κυττάρου. Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί τέσσερις περιπλασμικές PPIάσες συμπεριλαμβανομένων των παρβουλινών surA (Rouvière and Gross,

1996) και *ppiD* (Dartigalongue and Raina, 1998), της κυκλοφιλίνης *ppiA* (γνωστής και ως *cyrA* ή *rotA*) (Liu and Walsh, 1990) και του μέλους της FKBP οικογένειας, *fkpA* (Horne and Young, 1995).

Η πρωτεΐνη *fkpA* παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα ΡΡιάσης και τσαπερόνης καθότι είναι θερμοεπαγόμενη (*Heat shock protein*) (Horne and Young, 1995; Missiakas et al., 1996). Η ενεργότητα της ΡΡιάσης είναι συγκρίσιμη με εκείνη της *MipA* του βακτηρίου *L. pneumophilla*, με τη σταθερά εξειδίκευσης *kcat/Km* έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilide (αλανίνη) να ανέρχεται στα  $90 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Missiakas et al., 1996). Νεότερες μετρήσεις της ενεργότητας ΡΡιάσης της *fkpA* αναφέρουν ότι οι σταθερές εξειδίκευσης *Km* και *kcat* ανέρχονται στα  $730 \pm 100 \mu\text{M}$  και  $550 \pm 50 \text{ s}^{-1}$  αντίστοιχα (Arie et al., 2001), ενώ σε άλλη, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος απουσία πρωτεάσης (χυμοθρυψίνης), αναφέρεται ότι η σταθερά εξειδίκευσης *kcat/Km* κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα των  $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Ramm and Pluckthun, 2001).

Πρόκειται για ένα διμερές μόριο, αποτελούμενο από 245 αμινοξέα, έχει μέγεθος 28.8 kDa και εδράζεται στο περίπλασμα του κυττάρου του βακτηρίου *E. coli*. Μελέτη απενεργοποίησης του γονιδίου *fkpA* κατέδειξε ότι, όπως και τα περισσότερα γονίδια των ΡΡιάσων, δεν είναι απαραίτητο για την κυτταρική επιβίωση (*non-essential gene*) (Horne and Young, 1995).

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ανταποκρίνονται στην παρουσία μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης μέσω δύο ξεχωριστών ρυθμιστικών συστημάτων, του παράγοντα  $\sigma^E$  και του Cpx δυαδικού συστήματος (*two-component system*) (Raivio and Silhavy, 1999). Και τα δύο συστήματα περιλαμβάνουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για περιπλασμικές αναδιπλώσεις συμπεριλαμβανομένων των ΡΡιάσων και των Dsb πρωτεϊνών (Disulfide bond proteins/protein disulphide isomerase like-PDI) (Arie et al., 2001). Στο βακτήριο *E. coli* και σε άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, η μεταγραφή του γονιδίου *fkpA* ρυθμίζεται από τον παράγοντα  $\sigma^E$  (Saul et al., 2004). Ο παράγοντας  $\sigma^E$  ενεργοποιείται έπειτα από την επίδραση θερμικού στρες, από την υπερέκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών ή από την υπερέκφραση πορινών και πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs-Outer Membrane Proteins), παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ή τοξίνων και τέλος, λόγω υψηλού pH (Narayanan and Chou, 2008; Mecsas et al., 1993).

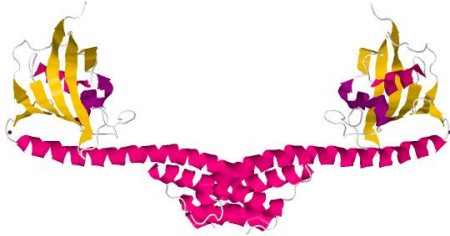
Η απενεργοποίηση του γονιδίου *fkpA* οδηγεί σε αύξηση της απόκρισης του παράγοντα  $\sigma^E$  (Bothmann and Pluckthun, 2000). Η πρωτεΐνη *fkpA* έχει χαρακτηριστεί ως *Global Folding Catalyst* καθώς έχει βρεθεί ότι τα υψηλά κυτταρικά της επίπεδα μπορούν να αποτρέψουν την συσσώρευση μη αναδιπλωμένων περιπλασμικών πρωτεϊνών καθώς και πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Κατά την επαγωγή εξοκυτταροπλασμικού στρες παρατηρείται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της *fkpA*, της επίσης περιπλασμικής παρβουλίνης *surA* και των Dsb πρωτεϊνών (Missiakas et al., 1996).

#### **A.1.6.1 Η δομή της FkpA**

Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης έχει προσδιορισθεί σε τρεις μορφές: (1) Ως μια πλήρης πολυπεπτιδική αλυσίδα που περιέχει 245 αμινοξέα, (2) Ως μια μεταλλαγμένη μονομερής πρωτεΐνη που περιλαμβάνει τα τελευταία 21 αμινοξέα της δομικής περιοχής του καρβοξυτελικού άκρου σε ελεύθερη μορφή και (3) σε σύμπλοκο με το FK506 (Saul et al., 2004)(Εικόνα A1.8.).

Η δομή της διμερούς πρωτεΐνης *EcFkpA* έχει την μορφή V (V shaped) και αποτελείται από δύο δομικές περιοχές ανά μονομερές. Το μόριο της πρωτεΐνης *EcFkpA* περιλαμβάνει ένα πεπτιδίο οδηγό μεγέθους 25 αμινοξέων. Η πρώτη δομική περιοχή (26-163 κατάλοιπα αμινοξέων), που αποτελείται από

τρεις έλικες που αλληλεπικαλύπτονται με τις αντίστοιχες της δεύτερης υπομονάδας, εδράζεται στο αμινοτελικό άκρο της (N-terminal) και παρουσιάζει ενεργότητα τσαπερόνης (Saul et al., 2004; Hu et al., 2006). Η δεύτερη δομική περιοχή (164-249 κατάλοιπα αμινοξέων) εδράζεται στο καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal) και περιλαμβάνει την ενεργότητα ΡΡιάσης (FKBP περιοχή) (Saul et al., 2004).



**Εικόνα A.1.8.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης *EcfkA* του *E. coli*. Διακρίνονται ανά μονομερές, οι β-πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα (FKBP περιοχή) και οι α-έλικες με μοβ (περιοχή ενεργότητας τσαπερόνης) (PDB ID: 1Q6U) (Saul et al., 2004).

Η δέσμευση στο ενεργό κέντρο τσαπερόνης των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και η ισομερίωση των πρωτεϊνών με *cis* προλίνη αποτελούν δύο ανεξάρτητες και διαφορετικές διαδικασίες οι οποίες πραγματοποιούνται στις δύο διαφορετικές δομικές περιοχές. Αυτό συμβαίνει διότι οι δύο δομικές περιοχές βρίσκονται σε παράθεση, γεγονός που τους επιτρέπει να δρουν ή να αλληλεπιδρούν συγχρόνως με διαφορετικά υποστρώματα (Ramm and Pluckthun, 2001). Τα ευρήματα αυτά αντικρούονται με την έρευνα των Saul et al. 2004 κατά την οποία το ενεργό κέντρο της τσαπερόνης απαιτεί την ελεύθερη κατάσταση του ενεργού κέντρου της ΡΡιάσης.

Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *fkrA*, η οποία φέρει μόνο τη δεύτερη δομική περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου διατηρεί την ενεργότητα ΡΡιάσης ενώ χάνει ολοκληρωτικά την ενεργότητα της μοριακής συνοδού. Αντίθετα, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *fkrA*, η οποία φέρει μόνο την πρώτη δομική περιοχή του αμινοτελικού άκρου διατηρεί την ενεργότητα της μοριακής συνοδού (Saul et al., 2004). Τα δεδομένα της έρευνας αντικρούουν προηγούμενα, τα οποία περιγράφουν ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης και η ενεργότητα τσαπερόνης εδράζονται στην ίδια δομική περιοχή, δηλαδή στο καρβοξυτελικό άκρο.

#### **A.1.6.2 Η FkA είναι συντηρημένη**

Η ακολουθία της *EcfkA* εμφανίζει ομολογία με τουλάχιστον 16 μέλη της οικογένειας των FKBP πρωτεϊνών, που προέρχονται από τα θηλαστικά, τις ζύμες και τα βακτήρια (Galat, 1993). Η ευθυγράμμιση της *EcfkA* με την, γνωστής αλληλουχίας, hFKBP12 ανέδειξε τα τρία συντηρημένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, το ασπαρτικό οξύ στη θέση 182, το αμινοξύ ισολευκίνη στη θέση 199 και το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 225 (Horne and Young, 1995).

Η αμινοξική ακολουθία της πρωτεΐνης *EcfkA* εμφανίζει υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες MIP, των παθογόνων βακτηρίων *Legionella pneumophila*, (34.3% ομολογία), *Chlamydia trachomatis* (30% ομολογία), *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Trypanosoma cruzi* και *Legionella micdadei* (34% ομολογία) (Kohler et al., 2003).

Η διμερής πρωτεΐνη *LpMIP* του *Legionella pneumophila*, όπως η *EcfkA*, αποτελείται από δύο δομικές περιοχές: το αμινοτελικό της άκρο εμφανίζει 24% ομολογία, ενώ το καρβοξυτελικό της άκρο εμφανίζει 43.4% ομολογία με την *EcfkA* (Saul et al., 2004).

Αξιοσημείωτη ομολογία της *fkrA* (46% συνολικά) εμφανίζεται με την πρωτεΐνη *fkrY*, που προέρχεται από τον αρνητικό κατά Gram μικροοργανισμό *Haemophilus influenzae*. Το καρβοξυτελικό άκρο της *fkrA* εμφανίζει 60% ομολογία ενώ το αμινοτελικό της άκρο εμφανίζει 34% ομολογία με τα αντίστοιχα της *HifkY* (Ramm and Pluckthun, 2001).



### A.1.6.3 Ο ρόλος της FkpA στην αναδίπλωση πρωτεϊνών

Η υπερέκφραση της fkpA αποτρέπει *in vivo* και *in vitro* τη συσσωμάτωση της μη αναδίπλωμένης πρωτεΐνης πρόσδεσης της μαλτόζης (*maltose-binding protein-MBP*) MalE, επανενεργοποιεί τη συνθάση του κιτρικού οξέος (*citrate synthase*) (Arie et al., 2001) και συμβάλλει στην αναδίπλωση της ριβονουκλεάσης T<sub>1</sub> (Ribonuclease T<sub>1</sub>), η οποία διαθέτει δύο *cis* προλίνες εκ των συνολικά τεσσάρων (Ramm and Pluckthun, 2001).

Έχει βρεθεί, επίσης, ότι η συνέκφραση των περιπλαστικών fkpA και surA βοηθούν στην αναδίπλωση της Bj-xtrIT β-scorpion νευροτοξίνης (εκκρινόμενη από τον σκορπιό) (O'Reilly et al., 2013).

Η πρωτεΐνη fkpA διαθέτει τη δυνατότητα, *in vivo* αλλά και *in vitro*, όπως αποδείχθηκε μεταγενέστερα (Saul et al., 2004), αναδίπλωσης των απλών αλυσίδων μεταβλητής περιοχής (*single chain Fv-scFv*) των αντισωμάτων (Bothmann and Pluckthun, 2000) ακόμα και πρωτεϊνών χωρίς *cis*-προλίνη (Bothmann and Pluckthun, 2000; Ramm and Pluckthun, 2001). Έχει δειχθεί ότι η δυνατότητα αυτή πιθανότατα οφείλεται στην αλληλεπίδραση της fkpA με ενδιάμεσα αναδίπλωσης αποτρέποντας τη συσσωμάτωση τους και στην επανενεργοποίηση ανενεργών πρωτεϊνών προσδένοντας σε μερικώς μη-αναδίπλωμένες πρωτεΐνες (Bothmann and Pluckthun, 2000).

Η fkpA συνεισφέρει στην αναδίπλωση και ενεργοποίηση της colicin M στον περιπλαστικό χώρο (Hullmann et al., 2008). Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα η ενεργότητα της ΡΡιάσης η κυτταροπλασματική FkpA ισομεριώνει την *cis* προλίνη των ελαφριών αλυσίδων και πριν την μεταφορά τους στο περίπλασμα μέσω του SEC μονοπατιού έκκρισης (Levy et al., 2013). Τέλος, η fkpA παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης ιδιαίτερα όταν τα κύτταρα υπόκεινται σε θερμική καταπόνηση (Ge et al., 2014)

### A.1.7 Η προκαρυωτική FkpB

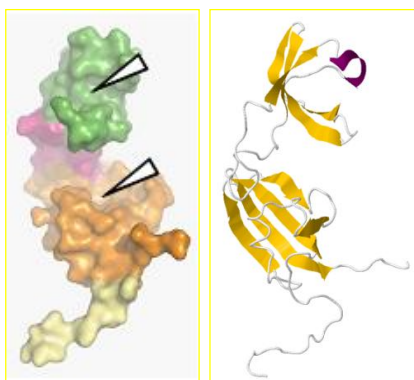
Η fkpB (ή slpA) είναι ίσως η λιγότερο μελετημένη πρωτεΐνη της FKBP οικογένειας. Ανήκει στο ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο ORF149, το οποίο απαντάται στον μικροοργανισμό *E. coli*, αλλά και στον μικροοργανισμό *Enterobacter aerogenes* (Isaki et al., 1990), ανάμεσα από τα γονίδια *IspA* και *ispH*. Αποτελείται από 149 αμινοξέα και εμφανίζει αμινοξική ομολογία 25–31% με την FKBP12s των θηλαστικών, των μυκήτων και των προκαρυωτικών οργανισμών, ενώ εμφανίζει 33.5% ομολογία με την hFKBP12 του ανθρώπου (Hottenrott et al., 1997). Η *EcfkpB* έχει μέγεθος 16 kDa, δεν διαθέτει πεπτίδιο οδηγό και συνεπώς εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου *E. coli*. Η μεταγραφή του γονιδίου που κωδικοποιεί για την θερμοεπαγόμενη πρωτεΐνη fkpB ρυθμίζεται από τον παράγοντα  $\sigma^{32}$  (Novaka et al., 2006). Ενώ η ενεργότητα ΡΡιάσης της fkpB έχει προσδιοριστεί το έτος 1997 με τη μέθοδο της χυμοθρυψίνης, όπου η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilide (φαινυλαλανίνη) ανέρχεται στα  $7.400 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  και με τη μέθοδο της τρυψίνης, όπου η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Suc-Ala-Phe-Pro-Arg-4-NA ανέρχεται στα  $6.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , έκτοτε δεν έχουν δημοσιευθεί δεδομένα που να αφορούν στη λειτουργία ή στο βιολογικό της ρόλο. Κατά την ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι το FK506 συγκέντρωσης 25mM, η CsA συγκέντρωσης 100 mM και το NiCl<sub>2</sub> συγκέντρωσης 100 mM δεν μπόρεσαν να μειώσουν την ενεργότητα ΡΡιάσης της fkpB (Hottenrott et al., 1997). Η πρωτεΐνη *EcfkpB*, παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα τσαπερόνης (Quistgaard et al., 2012).

Από όλα τα συντηρημένα αμινοξέα των FKBP πρωτεϊνών η fkrB διαθέτει το χαμηλότερο αριθμό συντηρημένων αμινοξέων. Σχεδόν το σύνολο των αμινοξέων της FKBP περιοχής έχει αντικατασταθεί κατά την εξέλιξη, ενώ έχουν παραμείνει συντηρημένα τα αμινοξέα αλανίνη στη θέση 82, ισολευκίνη στη θέση 92 και φαινυλαλανίνη στη θέση 100 (Hottenrott et al., 1997).

#### A.1.7.1 Η δομή της *Ec*fkpB

Η fkrB ανήκει, μαζί με την slyD, στις πρωτεΐνες των FKBP στις οποίες η ενεργότητα PPIάσης (FKBP περιοχή) και η ενεργότητα τσαπερόνης (IF περιοχή, insert-in-flap) εδράζονται στην ίδια δομική περιοχή (Quistgaard et al., 2012). Η IF περιοχή συνήθως αποτελείται από 40-50 αμινοξέα και ουσιαστικά αποτελεί υπό-περιοχή της κύριας και ευρύτερης FKBP περιοχής. Μπορεί η FKBP και η IF περιοχή να μην τοποθετούνται σε παράθεση αλλά να επικαλύπτονται κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ωστόσο διαχωρίζονται δομικά και λαμβάνουν διαφορετική θέση στο χώρο (Zoldák et al., 2009). Χαρακτηριστικό της IF περιοχής αποτελεί η υδρόφοβη επιφάνειά της, η οποία προσδένεται στις μη αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καλύπτοντας τις υδρόφοβες περιοχές τους και προστατεύοντάς τες με αυτόν τον τρόπο, από τη συσσωμάτωση (Suzuki et al., 2003). Η IF περιοχή παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση για τις μη αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, από την FKBP περιοχή. Παρόλο που η μελέτη του ρόλου της IF περιοχής των PPIασών έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια, ο μηχανισμός με τον οποίο μεταφέρονται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες από την IF περιοχή στην FKBP περιοχή ή τον τρόπο με τον οποίο αυτές αναγνωρίζονται από την IF περιοχή παραμένει αινιγματικός. Η πρωτεΐνη slyD αποτελεί ένα ιδιαίτερα μελετημένο παράδειγμα μιας πρωτεΐνης που αποτελείται από τις δύο αυτές δομικές περιοχές, η οποία, αντίθετα με την fkrB, διαθέτει επιπρόσθετα και μια περιοχή πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων στο καρβοξυτελικό της άκρο (Hottenrott et al., 1997). Η όμοια δομή της fkrB με την slyD, της προσέδωσε την ονομασία slyD-like protein (slpA).

Η δομή της *Ec*fkpB, έχει προσδιορισθεί σε διακριτικότητα 1.35Å, όπου διακρίνονται τέσσερις δομικές. Η IF περιοχή αποτελεί το πρώτο σημείο, η FKBP περιοχή αποτελεί το δεύτερο σημείο, οι λούπες που συνδέουν τις δύο δομικές περιοχές είναι το τρίτο και το τέταρτο αποτελεί μέρος του αμινοτελικού άκρου στο οποίο έχει εισαχθεί η επίτοπος έξι ιστιδινών (His-6 tag) (Εικόνα A. 1.9.).



**Εικόνα A.1.9.** Η *Ec*fkpB του *E. coli* σε τρισδιάστατη (A) και σε δευτεροταγή δομή (B). Διακρίνονται με βέλη η IF περιοχή (πράσινο χρώμα), η FKBP περιοχή (πορτοκαλί χρώμα), η λούπα που συνδέει τις δύο δομικές περιοχές (μοβ χρώμα) και η ουρά έξι ιστιδινών (υποκίτρινο χρώμα) (PDB ID: 4DT4) (Quistgaard et al., 2012).

Τα πιο συντηρημένα αμινοξέα της πρωτεΐνης βρίσκονται και στις δύο δομικές περιοχές. Η FKBP περιοχή της πρωτεΐνης *Ec*fkpB έχει την ίδια τοπολογία με την FKBP περιοχή της πρωτεΐνης *EcslyD*, εκτός από την παρουσία μιας α έλικας.

Η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών στην FKBP περιοχή της *Ec*fkpB γίνεται κατά όμοιο τρόπο με την *EcslyD*, λόγω υψηλής ομολογίας. Η πρόσδεση πρωτεϊνών με *cis* προλίνη πραγματοποιείται εντός μιας

μικρής υδρόφοβης κοιλότητας. Αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται να είναι ενζυμικά εξειδικευμένη, αφού η προλίνη είναι στενά προσδεμένη εντός της κοιλότητας, ενώ τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας αποκλείονται εκτός αυτής (Quistgaard et al., 2012). Όμως, τα μη αναδιπλωμένα ή μερικώς αναδιπλωμένα υποστρώματα της *EcfkrB* δεν προσδέονται εντός της κοιλότητας της υδρόφοβης IF περιοχής, αλλά τυλίγονται εκτεταμένα γύρω από αυτήν. Όπως έχει ανακοινωθεί στο παρελθόν, η παρουσία μιας περιοχής τσαπερόνης σε μια PPIάση, αυξάνει 1000 φορές την εξειδίκευση έναντι υποστρωμάτων τα οποία περιέχουν υδρόφοβα αμινοξέα που προηγούνται της προλίνης (Jakob et al., 2009).

#### **A.1.7.2 Ο ρόλος της FkrB στην αναδίπλωση πρωτεϊνών**

Μελέτη απομόνωσης με τη μέθοδο *pull down* ανέδειξε την αλληλεπίδραση της *EcfkrB* με την συνθάση του κιτρικού οξέος, καθώς και με έναν υψηλό αριθμό ριβοσωμικών πρωτεϊνών (L1, L14, L19, S2, S3 και S16), με τη σταθερά  $K_d$  να ανέρχεται στα 18–100  $\mu\text{M}$ , γεγονός που αποκαλύπτει μια, μέχρι πρότινος άγνωστη, συνεργασία της με το ριβόσωμα. Δεν υπάρχουν δεδομένα που να αφορούν στην αλληλεπίδραση της *EcslyD* με πρωτεΐνες του ριβοσώματος, γεγονός που διαφοροποιεί τις λειτουργίες των δύο πρωτεϊνών. Κοινό στοιχείο των δύο πρωτεϊνών αποτελεί η αλληλεπίδρασή τους με το πεπτιδιο οδηγό Tat (twin-arginine translocation pathway) της πρωτεΐνης hip (high-potential iron-sulfur protein), του μικροοργανισμού *Allochrochromatium vinosum* (Quistgaard et al., 2012).

#### **A.1.8 Η προκαρυωτική FklB**

Η απομόνωση και ταυτοποίηση της βακτηριακής *fklB* (ή FKBP22) και συγκεκριμένα από τον μικροοργανισμό *E. coli* πραγματοποιήθηκε αρχικά από τον Rahfeld το 1996. Το μοριακό της βάρος υπολογίστηκε στα 22 kDa και διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για ένα ομοδιμερές μόριο (Rahfeld et al., 1996). Η *EcfklB* παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης καθώς η σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-4-nitroanilide (λευκίνη) υπολογίστηκε στα  $1.332.500 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Rahfeld et al., 1996) και στα  $0.87 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Suzuki et al., 2004). Διερευνώντας την επίδραση του FK506 και της CsA στην ενζυμική ενεργότητα της *EcfklB* διαπιστώθηκε ότι αναχαιτίζεται μόνο από το FK506 με τη σταθερά  $K_i$  να είναι ίση με  $25 \pm 3.4 \text{ nM}$ , τιμή τυπική άλλων FKBP (Rahfeld et al., 1996).

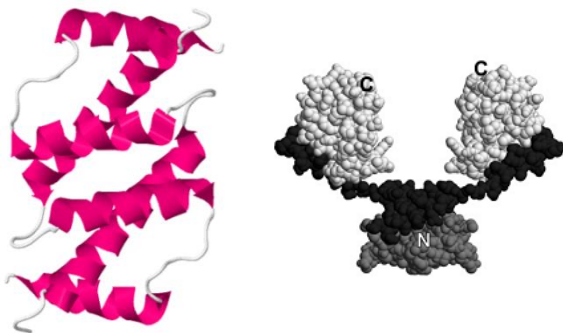
Η αμινοξική ακολουθία της *EcfklB* παρουσιάζει αξιοσημείωτη ομολογία με τις πρωτεΐνες MIP των παθογόνων *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Rochalimaea quintana*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Xanthomonas campestris*, *Chlamydia trachomatis* και του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* (Rahfeld et al., 1996).

Η *fklB*, ομοίως με την *fkrA*, εκτός από το βακτήριο *E. coli*, εντοπίζεται και σε άλλα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, όπως τα γένη *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, τα βακτήρια *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* και *Serratia marescens*. Η ομόλογή της στο ψυχρόφιλο μικροοργανισμό *Shewanella* sp. SIB1 ονομάζεται FKBP22 και ανήκει στην οικογένεια των MIP (Suzuki et al., 2004). Είναι κατά 56% ομόλογη με την *EcfklB* του *E. coli*, 20% ομόλογη με την FKBP22 του *Neurospora crassa*, 43% ομόλογη με την *EcfkrA* του *E. coli* και 41% ομόλογη με την MIP του *L. pneumophila* (Budiman et al., 2011). Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *FKBP22* αυξάνονται με τη

μείωση της θερμοκρασίας επομένως συμπεραίνεται ότι η FKBP22 συμβάλλει στην απόκτηση ανθεκτικότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες, μέσω της αναδίπλωσης πρωτεϊνών (Budiman et al., 2011).

#### A.1.8.1 Η δομή της FkIB

Η επίλυση της δομής της fklB, πραγματοποιήθηκε από το μικροοργανισμό *Shewanella* sp. SIB1. Η πρωτεΐνη FKBP22 είναι διμερής, έχει την μορφή V (V shaped) και αποτελείται από δύο δομικές περιοχές ανά μονομερές (Budiman et al., 2011). Η πρώτη δομική περιοχή του αμινοτελικού άκρου (N-terminal) (αμινοξέα 1-68) είναι ουσιαστικά υπεύθυνη για τη δημιουργία του διμερούς, αφού αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του δεύτερου μονομερούς (Budiman et al., 2009). Η ενδιάμεση μικρή περιοχή (αμινοξέα 69-101) αποτελεί ουσιαστικά το συνδετικό κρίκο των μονομερών. Η δεύτερη δομική περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου (C-terminal) αποτελεί τη συντηρημένη περιοχή ενεργότητας PPIάσης (FKBP περιοχή), η οποία αρχίζει στο αμινοξύ 102 (γλυκίνη) αφού εμφανίζει υψηλή ομολογία με την hFKBP12 (Budiman et al., 2011). Η FKBP22, όπως και η *EcFkpA*, αλληλεπιδρά με ενδιάμεσα αναδίπλωσης, μια ιδιότητα που αποδίδεται στο αμινοτελικό της άκρο (Suzuki et al., 2005). Η τριτοταγής δομή της διμερούς πρωτεΐνης FKBP22 του *Shewanella* sp. SIB1 αποικονίζεται στην εικόνα A.1.10.



**Εικόνα A.1.10.** Η τριτοταγής δομή της διμερούς πρωτεΐνης FKBP22 του *Shewanella* sp. SIB1. Διακρίνονται ανά μονομερές οι  $\alpha$ -έλικες (PDB ID: 3B09) (Saul et al., 2003; Suzuki et al., 2004).

Μέσω της ευθυγράμμισης της αμινοξικής αλληλουχίας της *EcFklB* με αυτήν της περιπλασμικής *EcFkpA* προέκυψε ότι η περιοχή καρβοξυτελικού άκρου αποτελεί την πιο συντηρημένη, στην οποία εντοπίζεται 49% ομολογία μεταξύ τους. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής αυτής της *EcFklB* είναι κατά 60% όμοια με την αντίστοιχη της *EcFkpA*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι καρβοξυτελικές τους περιοχές των δύο πρωτεϊνών προέρχονται από ένα κοινό αρχέγονο γονίδιο. Αντίθετα, οι περιοχές του αμινοτελικού άκρου των δύο πρωτεϊνών εμφανίζουν 21% αμινοξική ομολογία και 53% νουκλεοτιδική ομολογία, υποδηλώνοντας ότι το αμινοτελικό άκρο δεν είναι συντηρημένο (Rahfeld et al., 1996).

#### A.1.9 Η προκαρυωτική SlyD

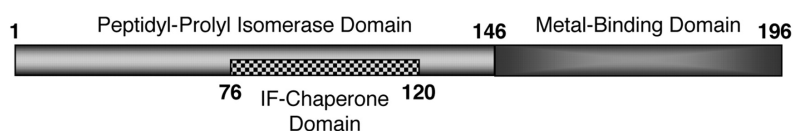
Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης slyD πραγματοποιήθηκε τυχαία καθώς εντοπιζόταν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης ως ένας επίμονος μολυσματικός παράγοντας ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών κατά την απομόνωσή τους, με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας (Porath, 1988; Arnold, 1991 ; Wulfing et al., 1994).

Η κυτταροπλασματική slyD αποτελείται από 196 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 20.8 kDa και παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης με χαμηλή ή μηδενική εξειδίκευση σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες που φέρουν προλίνη (Wulfing et al., 1994), η οποία καταστέλλεται μόνο σε πολύ υψηλή συγκέντρωση του ανοσοκατασταλτικού FK506 (Scholtz et al., 2006). Η σταθερά εξειδίκευσης kcat/Km έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Phe-Pro-Arg-4-nitroanilide έχει υπολογιστεί στα  $29.600 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Hottenrott et al., 1997). Επίσης, η slyD παρουσιάζει σχετικά υψηλή ενεργότητα τσαπερόνης όπως διαπιστώθηκε με τη χρήση της μεθόδου της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Scholtz et al., 2006). Η slyD παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση ικών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της υδροφобης πρωτεΐνης E, κατά το λυτικό κύκλο του βακτηριοφάγου φX174 (Roof and Young, 1995; Roof et al., 1997; Bernhardt et al., 2002), γεγονός στο οποίο οφείλεται η ονομασία της (Sensitive to lysis D).

Το πλούσιο, στα αμινοξέα κυστεΐνη και ιστιδίνη, καρβοξυτελικό της άκρο, της προσδίδει την ικανότητα δέσμευσης σε κατιόντα όπως τα  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Co}^{2+}$  (Wulfing et al., 1994) ενώ η δέσμευση στο  $\text{Ni}^{2+}$  καταστέλλει, αντιστρεπτά την ενεργότητα PPIάσης (Hottenrott et al., 1997).

#### A.1.9.1 Η δομή της *EcSlyD*

Η *EcSlyD* αποτελείται από δύο δομικές περιοχές (Εικόνα A.1.11.). Στο αμινοτελικό άκρο (1-146 αμινοξέα) εδράζεται η ενεργότητα PPIάσης (FKBP περιοχή) (Wulfing et al., 1994), αλλά και η ενεργότητα τσαπερόνης (IF περιοχή, insert-in-flap), (Hottenrott et al., 1997). Οι δύο ενεργότητες που φέρει η *EcSlyD* δομικά λαμβάνουν διαφορετική διαμόρφωση στο χώρο. Όπως παρατηρείται στην εικόνα A1.11, η IF περιοχή τοποθετείται σε αρκετή απόσταση από την FKBP περιοχή, ώστε να επιτρέπεται η δέσμευση και αλληλεπίδραση με τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (Weininger et al., 2009b). Στο καρβοξυτελικό της άκρο εδράζεται η πλούσια σε κυστεΐνη και ιστιδίνη περιοχή (146-196 αμινοξέα) (Hottenrott et al., 1997), η οποία ενισχύει την ενεργότητα τσαπερόνης (Leach et al., 2007).



**Εικόνα A.1.11.** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης *EcSlyD*. Διακρίνονται η δομική περιοχή FKBP, στην οποία περιλαμβάνεται η IF περιοχή και η δομική περιοχή δέσμευσης μεταλλικών ιόντων (Zhang et al., 2005).

Η *EcSlyD* εμφανίζει υψηλότερη ενεργότητα PPIάσης από την ομόλογη hFKBP12 ενώ η απομονωμένη FKBP περιοχή της παρουσιάζει χαμηλότερη ενεργότητα PPIάσης από την αντίστοιχη περιοχή της hFKBP12. Η απάντηση στο ερώτημα γιατί συμβαίνει αυτό έγκειται στην παρουσία της IF περιοχής στη δομή της *EcSlyD*, η οποία απουσιάζει από την hFKBP12. Η IF περιοχή, αποτελούμενη από 44-45 αμινοξέα στην ακολουθία της *EcSlyD* αυξάνει το εύρος της ενζυμικής εξειδίκευσής της προς τις μη αναδιπλωμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καθώς παίζει ρόλο στην πρόσβαση αυτών στο ενεργό της κέντρο (Callebaut and Morion, 1995). Επομένως δρα συνεργιστικά με την FKBP περιοχή μετατρέποντας την *EcSlyD* σε μια πρωτεΐνη με μεγαλύτερη ενεργότητα PPIάσης (Weininger et al., 2009b).

### A.1.9.2 Ο ρόλος της SlyD στην αναδίπλωση πρωτεϊνών

Μελέτες αναφέρουν τη συμμετοχή της HpslyD, του μικροοργανισμού *Helicobacter pylori*, στην ωρίμανση της υδρογονάσης και της ουρεάσης, δύο σημαντικών ενζύμων για την επιβίωσή του σε οξειδωτικό περιβάλλον καθώς και για την παθογένειά του. Συγκεκριμένα, η HpslyD συμβάλλει στη βιοσύνθεση της NiFe υδρογονάσης, μέσω της αλληλεπίδρασης της IF περιοχής με την πρωτεΐνη HphyrB και με το πεπτιδιο οδηγό Tat (*twin-arginine translocation pathway*) της πρωτεΐνης HphyrA (Cheng et al., 2012; Cheng et al., 2013; Ge et al., 2013). Στο μικροοργανισμό *E. coli*, αντίθετα με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, η πρωτεΐνη EchyrB δεν φέρει την περιοχή ιστιδινών, η οποία της επιτρέπει να δεσμεύει και να μεταφέρει ιόντα νικελίου στην υδρογονάση ενώ η αδυναμία της αυτή παρακάμπτεται με τη βοήθεια της EcslyD, η οποία σχηματίζοντας σύμπλοκο μαζί της, αποτελεί τον κύριο προμηθευτή νικελίου. Στελέχη *E. coli* στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *slyD*, εμφανίζουν μειωμένη συσσώρευση νικελίου και μειωμένη ενεργότητα υδρογονάσης (Zhang et al., 2005). Επίσης, σημειώνεται ότι η δραστηριότητα PPIάσης δε φαίνεται να παίζει ρόλο στην ωρίμανση της EchyrB (Zhang et al., 2007).

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι η HpslyD εμφανίζει διαφορετικό αριθμό γονιδίων σε απομονωμένα *Helicobacter pylori* στελέχη του πεπτικού συστήματος που προκαλούν καρκίνο και σε απομονωμένα στελέχη του πεπτικού συστήματος που προκαλούν γαστρίτιδα, για αυτό τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης (Gong et al., 2011).

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί η συμμετοχή της EcslyD στην κυτταρική διαίρεση, καθώς βρέθηκε ότι σχετίζεται με τον σχηματισμό των νηματοειδών κυττάρων (*filaments*). Συγκεκριμένα η υπερέκφρασή της στο βακτήριο *E. coli* προκαλεί καταστολή του σχηματισμού των διαφραγμάτων (*septa*), επομένως οδηγεί σε παύση της κυτταρικής διαίρεσης, γεγονός που αποδόθηκε στην ενεργότητα PPIάσης της (Roof et al., 1997).

### A.1.10 Η προκαρυωτική Trigger Factor (TF)

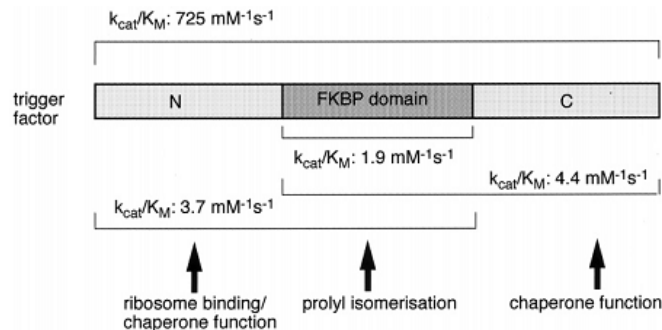
Η αναδίπλωση νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων του κυτταροπλάσματος προκαρυωτικών κυττάρων υποβοηθείται από τις εξής τρεις σημαντικές τσαπερόνες: την groEL, την dnaK και την trigger factor (Hartl and Hayer-Hartl, 2002).

Η αναδιπλάση trigger factor (tig) ανακαλύφθηκε από τους Crooke και Wickner, το έτος 1987, ως μια κυτταροπλασμική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 48 kDa, η οποία είχε την ικανότητα πρόσδεσης και σταθεροποίησης μιας πρόδρομης μορφής της πορίνης A (pro-OmpA) πριν τη μεταφορά της στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου *E. coli* (Crooke and Wickner, 1987). Η δράση της tig παρέμεινε αινιγματική καθώς μετέπειτα διαπιστώθηκε ότι η pro-OmpA του μεταλλαγμένου στελέχους, στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *tig*, ήταν απόλυτα λειτουργική (Guthrie and Wickner, 1990).

Λίγο αργότερα, αποδείχθηκε ότι η τσαπερόνη tig έφερε ενεργότητα PPIάσης, με την σταθερά εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_m$  έναντι του συνθετικού τετραπεπτιδίου Succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-NH-Np να ανέρχεται στα  $0.43 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ενώ παράλληλα είχε την ικανότητα πρόσδεσης στην μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος (Stoller et al., 1995).

Η πρόσδεση της tig στη 50S ριβοσομική υπομονάδα έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα της διαμόρφωσής της πιθανά για τη διευκόλυνση της συ-μεταφραστικής αλληλεπίδρασης με

νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Το ελάχιστο μήκος της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας που αλληλεπιδρά με την tig αποτελείται από 57 κατάλοιπα αμινοξέων. Η απελευθέρωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας από την tig δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την υδρόλυση της ATP (Hoffmann et al., 2010).



**Εικόνα A.1.12.** Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των δομικών περιοχών της πρωτεΐνης tig με την αναγραφή των σταθερών εξειδίκευσης  $k_{cat}/K_M$  έναντι της RNase T1. Η ικανότητα δέσμευσης στο ριβόσωμα εδράζεται στην αμινοτελική περιοχή. Στην ενδιάμεση περιοχή εδράζεται η ενεργότητα ΡΡιάσης. Στην καρβοξυτελική περιοχή εδράζεται η ενεργότητα τσαπερόνης (Gothel and Marahiel, 1999).

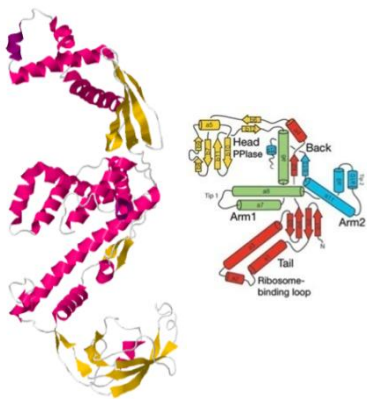
Παρόλο που η πρωτεΐνη tig έχει ενεργότητα ΡΡιάσης *in vitro*, δεν έχει την ικανότητα δέσμευσης του FK506 ενώ αναγνωρίζει και νεοσυντιθέμενα πολυπεπτιδικά στόχους, τα οποία δε φέρουν κατάλοιπα προλίνης (Stoller et al., 1995). Ένα από τα πιο ενδιαφέροντα γνωρίσματα της πρωτεΐνης tig είναι η προτίμησή της σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες που περιέχουν αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους ή υδρόφοβα αμινοξέα (Patzelt et al., 2001). Η υψηλή ενεργότητα ΡΡιάσης που εκδηλώνει η tig οφείλεται στη μειωμένη τιμή της σταθεράς  $K_M$ , η οποία κυμαίνεται από 0.5 έως 1  $\mu\text{M}$ , και η οποία αποτελεί ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση με τις νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες είναι αρκετά στενή. Η ενεργότητα ΡΡιάσης της *Ectig* αυξάνεται ιδιαίτερα παρουσία της πρώτης ή της τρίτης δομικής περιοχής, κάτι που υποδηλώνει τη «συνεργασία» όλων των δομικών περιοχών (Εικόνα A.1.12) (Scholz et al., 1997b; Gothel and Marahiel, 1999).

Περίπου το 15% των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων αναδιπλώνεται συ-μεταφραστικά από την tig και μετά-μεταφραστικά από την τσαπερόνη dnaK (της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp70) ενώ το 10% αυτών αναδιπλώνεται μετά-μεταφραστικά από την τσαπερόνη groEL (της οικογένειας πρωτεϊνών Hsp90) (Deuerling et al., 1999; Houry et al., 1999; Teter et al., 1999). Η πρωτεΐνη tig φαίνεται να προωθεί την πρωτεϊνική αναδίπλωση δρώντας συνεργιστικά με την πρωτεΐνη dnaK αλλά και με την groEL (Liu et al., 2005a; Kandror et al., 1997). Πράγματι, στο βακτήριο *E.coli* η συνδυασμένη απενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις tig και dnaK και όχι η μεμονωμένη του ενός εκ των δύο, έχει θανάσιμες επιπτώσεις για το *E.coli* σε θερμοκρασία ανώτερη των 30°C (Teter et al., 1999).

Η πρωτεΐνη tig 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 (Patzelt et al., 2002).

### A.1.10.1 Η δομή της *EcTig*

Η *Ectig* αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές. Η πρώτη δομική περιοχή (1-118 κατάλοιπα αμινοξέων) εδράζεται στο αμινοτελικό άκρο της και είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο ριβόσωμα. Στο βακτήριο *E. coli*, η πρωτεΐνη *Ectig* προσδένεται στο σημείο διόδου ή εξόδου (μεγέθους 80-100 Å) των πεπτιδίων του ριβοσώματος μέσω της αλληλεπίδρασης με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L23 και L29 και δρα ως η πρώτη τσαπερόνη. Η δεύτερη δομική περιοχή (145-247 κατάλοιπα αμινοξέων) παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης (FKBP περιοχή). Η τρίτη δομική περιοχή της *Ectig* (248-432 κατάλοιπα αμινοξέων), ενώ επί μακρό χρονικό διάστημα παρέμενε αινιγματική (Hesterkamp and Bukau, 1996; Hesterkamp et al., 1997), παρουσιάζει ενεργότητα τσαπερόνης, αφού η αφαίρεσή της από το γονίδιο προκάλεσε ολοκληρωτική απώλεια της ενεργότητας τσαπερόνης (Merz et al., 2006). Η τριτοταγής της *EcTig* αποικονίζεται στην εικόνα A.1.13.



**Εικόνα A.1.13.** Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης *Ectig* του *E. coli*. Διακρίνονται η «κεφαλή» (FKBP περιοχή), τα «χέρια» (περιοχή τσαπερόνης) και η «ουρά» (περιοχής δέσμευσης ριβοσώματος) (PDB ID: 1W26) (Ferbitz et al., 2004).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται μια σειρά σημειακών μεταλλάξεων της πρωτεΐνης *tig*, στη δεύτερη δομική περιοχή, η οποία αντιστοιχεί στην ενεργότητα PPIάσης και που οδήγησαν στην κατασκευή τεσσάρων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών *Ectig*. Η μεταλλαγμένη *Ectig*<sub>G178V</sub>, όπου το αμινοξύ γλυκίνη στη θέση 178 έχει αντικατασταθεί από βαλίνη και η μεταλλαγμένη *Ectig*<sub>T221F</sub>, όπου το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 221 έχει αντικατασταθεί από φαινυλαλανίνη, εμφανίζουν μειωμένη ενεργότητα PPIάσης. Η μεταλλαγμένη *Ectig*<sub>F233L</sub>, όπου το αμινοξύ στη θέση 233 έχει αντικατασταθεί από λευκίνη εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα PPIάσης έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων αλλά διατηρεί την ενεργότητα έναντι της RNase T1. Τέλος, η μεταλλαγμένη *Ectig*<sub>F198A</sub>, όπου το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στη θέση 198 έχει αντικατασταθεί από αλανίνη, χάνει την ικανότητα πεπτίδουλ-πρόλυλ *cis-trans* ισομερίωσης έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων αλλά και πρωτεϊνικών υποστρωμάτων ωστόσο διατηρεί την ενεργότητα τσαπερόνης (Kramer et al., 2004). Τα αποτελέσματα αυτά εδειξαν ότι ρόλος της *tig* ως μοριακής συνοδού δεν επηρεάζεται από την απώλεια της PPIάσης ενεργότητας.

### A.1.10.2 Η ρόλος της *Tig* στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη *tig* φαίνεται να προστατεύει νεοσυντιθέμενα πολυπεπτιδία και να προωθεί τη διαμόρφωσή τους στο χώρο (Stoller et al., 1995). Για παράδειγμα, η τσαπερόνη *Ectig* του *E. coli* αποτρέπει τη συσσωμάτωση της αποδιατεταγμένης GAPDH (D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Scholz et al., 1997b). Η *SpropA* του *Streptococcus pyogenes*, ομόλογη πρωτεΐνη της *tig*,



φαίνεται να εμπλέκεται στην απελευθέρωση και μετά-μεταφραστική αναδίπλωση μιας πρωτεΐδας, της *SpsrB*. Μεταλλαγμένα στελέχη, στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *ropA*, δε δύνανται να εκκρίνουν την πρωτεΐδα (Lyon and Cararon, 2003). Μια άλλη *ropA*, του μικροοργανισμού *Streptococcus mutans*, υπεύθυνου για τον σχηματισμό πλάκας στα δόντια, εμπλέκεται στην αντίστασή του έναντι στο οξειδωτικό στρες (Wen et al., 2005).

Η πρωτεΐνη *tig* σχετίζεται επίσης και με την αντίσταση των μικροοργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης, καθώς βρέθηκε ότι τα μειωμένα επίπεδα της προκαλούν μειωμένη βιωσιμότητα στο *E.coli*, σε χαμηλές θερμοκρασίες (Kandror and Goldberg, 1997). Η ιδιότητα αυτή της *tig* επιβεβαιώθηκε και κατά τη μελέτη της ομόλογής της στον παθογόνο μικροοργανισμό *Streptococcus suis*. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Sstig* προκάλεσε την απώλεια της αιμολυτικής δράσης του στελέχους, μείωσε τη θερμοανθεκτικότητα αλλά και την οξειδωτική ανθεκτικότητα ενώ παράλληλα επηρέασε την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεια του μικροοργανισμού (*epf*, *cps*, *adh*, *rpb*, *fbps*, *hyl*, *sly* και *mpr*), μειώνοντας τα επίπεδα των μεταγραφημάτων τους (Wu et al., 2011).

Η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων έκφρασης της *Ectig* του *E. coli* έχει ως συνέπεια την ανατροπή του φυσιολογικού φαινοτύπου και τη δημιουργία επιμηκυμένων κυττάρων γνωστών ως νηματοειδή κύτταρα (*filaments*), καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η *tig* προωθεί την αναδίπλωση ορισμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με την κυτταρική διαίρεση (Guthrie and Wickner, 1990).

## A.2 Η κινητικότητα των βακτηρίων

### A.2.1 Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η μέχρι πρότινος επικρατούσα άποψη όσον αφορά στην ανάπτυξη των βακτηρίων θεωρούνταν η πλανκτονική μορφή ζωής. Δηλαδή, μονοκύτταροι οργανισμοί που αναπτύσσονται ως μεμονωμένες οντότητες. Η άποψη αυτή έχει αλλάξει καθώς διαπιστώθηκε ότι τα βακτήρια, υπό συνθήκες, συμπεριφέρονται ως πολυκύτταρες ομάδες που αναπτύσσονται σε επιφάνειες σχηματίζοντας βιοϋμένια, εκκρίνοντας μια πολυσακχαριτική βλέννα. Ο φαινότυπος αυτός απασχολεί μια σειρά από τομείς, συμπεριλαμβανομένης της οικολογίας, της γεωργίας, της βιοϊατρικής, της βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας. Οι αρχές αυτής της αναδυόμενης συμπεριφοράς της μικροβιακής αυτο-οργάνωσης μπορούν να εφαρμοστούν σε ερευνητικούς τομείς που εκτείνονται πέρα από τη βιολογία και τη μικροβιολογία.

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε επιφάνειες έχουν εξελίξει εναλλακτικούς τρόπους κίνησης ώστε να διασπείρονται και να μεταναστεύουν σε αυτές. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται ομαδική κίνηση σε επιφάνεια (*swarming motility*) και αποτελεί έναν ανταγωνιστικό και διαφορετικά ρυθμιζόμενο μηχανισμό από αυτόν του βιοϋμενίου (Verstraeten et al., 2008).

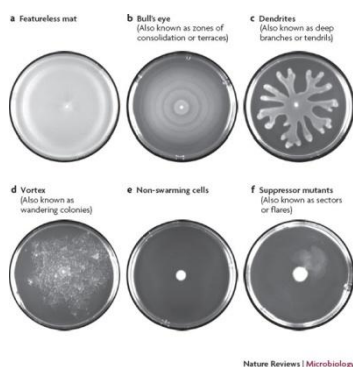
Η ομαδική κίνηση δεν αποτελεί ένα υποχρεωτικό στάδιο ανάπτυξης ούτε είναι αποτέλεσμα μειωμένης πηγής θρεπτικών υλικών (Raurich et al., 1996). Ωστόσο, είναι μια ριζική αλλά αναστρέψιμη μεταβολή της συμπεριφοράς σε απόκριση προς το περιβάλλον της ανάπτυξης των βακτηρίων. Η φύση της κίνησης αυτής δείχνει ότι οφείλεται σε ερεθίσματα όπως τα εξωκυτταρικά σήματα (αίσθηση κυτταρικής πυκνότητας, αμινοξέα, πεπτίδια, λιπαρά οξέα, σίδηρος), τους ενδοκυτταρικούς παράγοντες

(αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης, συγκέντρωση κατιόντων, cyclic di-GMP) και την επαφή με την επιφάνεια ή ενδεχομένως σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις (Fraser and Hughes, 1999).

Η ικανότητα ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια αποτελεί έναν ταχύ τρόπο εξάπλωσης των βακτηρίων σε μια επιφάνεια και υποβοηθείται από τα περιστρεφόμενα μαστιγία. Εντούτοις, εναλλακτικά της ομαδικής κίνησης έχουν εντοπιστεί και άλλοι τύποι κίνησης των βακτηρίων σε επιφάνεια. Ένας πρόσθετος τύπος κίνησης, ο οποίος μελετήθηκε και στην παρούσα διατριβή, είναι η κολυμβητική κίνηση (*swimming motility*). Η κολυμβητική κίνηση περιλαμβάνει την περιστροφή των μαστιγίων αλλά διαφοροποιείται από την ομαδική στο ότι, σε αυτή τη περίπτωση, τα κύτταρα δρουν και κινούνται μεμονωμένα, σε υδαρές περιβάλλον.

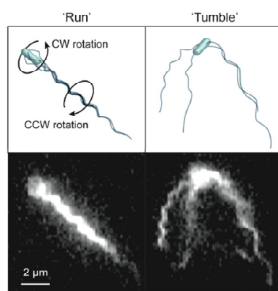
### A.2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση απαιτεί ένα στερεό θρεπτικό μέσο, συγκέντρωσης σε άγαρ 0.5% και ενεργειακά πλούσιο, ανάλογα με τον μικροοργανισμό που αναπτύσσεται (Εικόνα A 2.1.). Αναγκαίες λοιπές προϋποθέσεις της ομαδικής κίνησης είναι η παρουσία ενός επιφανειοδραστικού παράγοντα, η αυξημένη βιοσύνθεση μαστιγίων, η κυτταρική επιμήκυνση και η διακυτταρική επικοινωνία (Turner et al., 2010). Η πιο σημαντική παράμετρος της ομαδικής κίνησης αποτελεί η παρουσία υγρασίας στην επιφάνεια, καθώς καθορίζει την περιστροφή των μαστιγίων, την παραγωγή βιομορίων και τα μεταβολικά μονοπάτια που συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία. Η δεύτερη πιο σημαντική παράμετρος, που έχουν να αντιμετωπίσουν οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι συμμετέχουν στην ομαδική κίνηση, είναι η επιφανειακή τριβή. Για να υπερβούν την αντίσταση της επιφάνειας, τα βακτήρια πρέπει να λιπάνουν τη διεπιφάνεια με τη βοήθεια των βιομορίων που παράγουν και να αυξήσουν την ώθησή τους με την αύξηση της ισχύος του κινητήρα των μαστιγίων τους (Partridge and Harshey, 2013). Η στενή επαφή των κυττάρων συμβάλλει στη συντονισμένη και ταχύτερη ανάπτυξη και εξάπλωση της αποικίας *swarming* ενώ, όπως συμβαίνει και κατά το σχηματισμό του βιοϋμενίου, επάγεται μια διαφορετική γονιδιακή έκφραση, με στόχο τη διαμόρφωσή τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης (*swarmer cells*) (Harshey, 1994). Ο ερευνητής Turner και οι συνεργάτες του παρατήρησαν τέσσερα είδη κίνησης των βακτηρίων μιας αποικίας *swarming*: την έμπροσθεν ή ευθεία κίνηση (*straight*), την βραδύνουσα (*stalling*), την πλάγια (*lateral*) και την αντίστροφη (*reversal*). Η αντίστροφη κίνηση είναι η πιο ενδιαφέρουσα καθώς το βακτήριο αναστρέφει την κίνησή του, με τη βοήθεια των μαστιγίων του, τα οποία μετατρέπουν τη ροπή τους καθιστώντας την «ουρά», το «κεφάλι» (Turner et al., 2010). Τα κύτταρα της εξωτερικής ζώνης μιας αναπτυσσόμενης αποικίας *swarming* είναι ταχύτερα (*highly motile*) από τα κύτταρα του εσωτερικού και επιτελούν, ομαδικά και συγχρονισμένα, μια ελικοειδή κίνηση.



**Εικόνα A.2.1.** Μοτίβα ομαδικής κίνησης μικροοργανισμών: (a) Ακανόνιστο (Featureless) μοτίβο ομαδικής κίνησης του *Bacillus subtilis* 3610 (b) Μοτίβο Bull's eye του *Proteus mirabilis* PM7002 (c) Δενδρίτης (Dendritic) του *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (d) Στρόβιλος (Vortex) *Paenibacillus vortex* (e) και (f) Κατασταλμένη ομαδική κίνηση (*non-swarming*) μεταλλαγμένου στελέχους *Bacillus subtilis* 3610 (Kearns, 2010).

Τα βακτήρια σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης κινούνται σε αλλεπάλληλα μοτίβα αναπήδησης και βραδείας ταχύτητας (*smooth runs and tumbles*) με την αναστροφή των μαστιγίων ή υπακούοντας στους νόμους της κίνησης Brown. Η εναλλαγή και η διάρκεια των δύο κινήσεων ρυθμίζεται χημειοτακτικά καθώς η μία καταστέλλει την άλλη (Baker et al., 2006). Όταν μεμονωμένα κύτταρα *E. coli* εκτελούν την κολυμβητική κίνηση σε ένα ημί-στερέο μέσο χρησιμοποιούν τα μαστίγια τους, τα οποία περιστρέφονται από τη βάση του κινητήρα (*motor*). Όταν ο κινητήρας περιστρέφεται αντίθετα της φοράς των δεικτών του ρολογιού (CCW), δηλαδή αριστερόστροφα, τα βακτήρια προωθούνται ομαλά, με ταχύτητα 30 μm ανά δευτερόλεπτο, σε σχεδόν ευθεία γραμμή (Εικόνα A.2.2). Η μεταβολή της φοράς τους σε δεξιόστροφη (CW) προκαλεί μια συγκεχυμένη ή τυχαία κίνηση, αυξημένης ταχύτητας (*tumbling*). Η φορά της κίνησης των μαστιγίων του βακτηρίου (CCW/CW) καθορίζεται από το χημειοτακτισμό και τα μονοπάτια μεταγωγής σημάτων (Hazelbauer et al., 2008). Όπως στην ομαδική κίνηση, έτσι και στην κολυμβητική, τα βακτήρια χρησιμοποιούν τα μαστίγια για να προωθηθούν σε μια επιφάνεια, επιτυγχάνοντας όμως μεγαλύτερη ταχύτητα που φτάνει έως τα 40 μm ανά δευτερόλεπτο.



**Εικόνα A.2.2.** Μικροσκοπική παρατήρηση *E. coli* κυττάρων που εκτελούν κολυμβητική κίνηση. Η δεξιόστροφη περιστροφή των μαστιγίων προκαλεί το φαινόμενο “tumbling” ενώ η αριστερόστροφη το φαινόμενο “running” (Copeland and Weibel, 2009).

#### A.2.1.2 Είδη μικροοργανισμών ικανών για ομαδική κίνηση

Η ικανότητα της ομαδικής κίνησης έχει διακριβωθεί σε ένα περιορισμένο αριθμό γενών των μικροοργανισμών. Παρόλο το μικρό αριθμό γενών βακτηρίων που εκδηλώνουν το συγκεκριμένο τύπο κίνησης, πιστεύεται ότι είναι υποτιμημένος. Η κίνηση αυτή μπορεί συχνά να εμποδιστεί εξαιτίας τυπικών εργαστηριακών συνθηκών ή της χρήσης τυπικού θρεπτικού υλικού (Kearns, 2010).

Η ομαδική κίνηση αποτελεί μια στρατηγική επιβίωσης για τους μικροοργανισμούς που αποικίζουν μια επιφάνεια. Η κίνηση και ο σχηματισμός μια αποικίας *swarming* επιτελείται και από ετερογενείς ομάδες μικροοργανισμών. Έχει παρατηρηθεί ότι σε αυτές συμμετέχουν τα γένη *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodospirillum*, *Salmonella*, *Serratia*, *Vibrio* και *Yersinia* (Verstraeten et al., 2008).

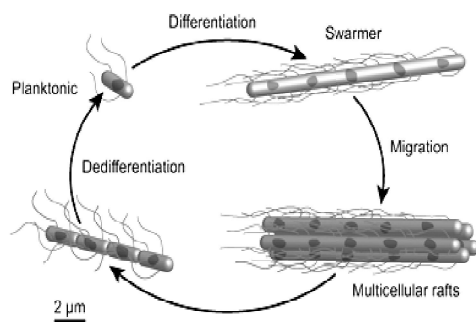
Αρχικά, η κίνηση περιγράφηκε στο βακτήριο *Proteus mirabilis*, ενώ παρατηρήθηκε σε αρνητικά και σε θετικά κατά Gram βακτήρια του γένους *Vibrio*, *Bacillus* και *Clostridium* (Allison and Hughes, 1991). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, εκδηλώνουν την ικανότητα της ομαδικής κίνησης σε θρεπτικό μέσο συγκέντρωσης σε άγαρ 1-2% ενώ ο μικροοργανισμός *Serratia marcescens*, σε άγαρ 0.5-0.8% (Alberti and Harshey, 1990). Επίσης, ο μικροοργανισμός *E. coli*, ο οποίος αποτελεί το πρότυπο μελέτης της παρούσας διατριβής και συγκεκριμένα το στέλεχος K-12, βρέθηκε ότι εκδηλώνει την ικανότητα της ομαδικής κίνησης σε θρεπτικό μέσο συγκέντρωσης σε άγαρ 0.5% (Harshey and Matsuyama, 1994).

### A.2.1.3 Μορφολογική διαφοροποίηση των κυττάρων κατά την ομαδική κίνηση

Μολονότι τα τελευταία χρόνια η έρευνα εντείνεται προς τον τομέα της μελέτης της κίνησης των βακτηρίων ως μια στρατηγική επιβίωσης και αποικισμού επιφανειών και καθώς παρατηρούνται ολοένα και αυξανόμενες ομάδες μικροοργανισμών ικανών της ομαδικής κίνησης, παραμένουν περιορισμένες οι γνώσεις που αφορούν στο μηχανισμό και στη δυναμική των κυττάρων αυτών.

Αρκετά είδη βακτηρίων που εκδηλώνουν την ομαδική κίνηση, αν και διαφέρουν στις λεπτομέρειες του μηχανισμού της, μοιράζονται κάποια γενικά χαρακτηριστικά. Αρχικά, τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε συνθήκες ομαδικής κίνησης διατηρούν, για αρκετές γενιές, τη μορφολογία των πλανκτονικών κυττάρων, δηλαδή εκείνη των ραβδοειδών. Έπειτα μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης (*swarmers*), δηλαδή εμφανίζουν αυξημένη βιοσύνθεση πλευρικών μαστιγίων (*extensive lateral flagellation*) και έντονη κυτταρική επιμήκυνση (*filamentation*) ως αποτέλεσμα της αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης (εξαιρούνται του φαινομένου ορισμένα βακτήρια) (Allison and Hughes, 1991; Verstraeten et al., 2008). Η παραγωγή και έκκριση εξωπολυσακχαριδίων είναι, επίσης, ένας σημαντικός παράγοντας της ανάπτυξης σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, καθώς με αυτόν τον τρόπο διατηρείται η υγρασία της επιφάνειας και διευκολύνεται η εξάπλωση του βακτηριακού πληθυσμού. Μικροσκοπικά παρατηρηθέντα κύτταρα εμφανίζουν συντονισμένη κίνηση προς την ίδια κατεύθυνση.

Τα επιμέρους και μεμονωμένα κύτταρα της ομαδικής κίνησης σε μια επιφάνεια δεν εμφανίζουν κινητικότητα. Μόλις ο πληθυσμός των βακτηρίων πολλαπλασιαστεί και υπερβεί ένα ανώτατο όριο, τότε τα κύτταρα παρουσιάζουν μια συλλογική κινητικότητα. Το χρονικό όριο στο οποίο συμβαίνει αυτό το φαινόμενο δεν είναι γνωστό για όλα τα είδη και γένη των μικροοργανισμών, αλλά πιστεύεται ότι η έναρξη της κινητικότητας εξαρτάται από τη ρευστότητα του θρεπτικού μέσου ανάπτυξης (Bees et al., 2002). Της «λανθάνουσας» αυτής φάσης της ανάπτυξης των κυττάρων προηγούνται η κυτταρική διαίρεση, η μορφολογική διαφοροποίηση και η δυναμική οργάνωση τους σε πολυκύτταρες ομάδες, ικανές για διασπορά σε επιφάνειες (Rauprich et al., 1996)(Εικόνα A.2.3.).



**Εικόνα A.2.3.** Ο κύκλος ζωής και η διαφοροποίηση των πλανκτονικών κυττάρων σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης. Το μήκος και ο αριθμός των μαστιγίων ανά κύτταρο αναπαρίσταται σε μειωμένα επίπεδα για βέλτιστη απεικόνιση της μορφολογίας του κυττάρου. Οι κουκκίδες αντιπροσωπεύουν το χρωμόσωμα των βακτηρίων (Copeland and Weibel, 2009).

Κατά την ανάπτυξη σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, η επιμήκυνση των κυττάρων και ο αυξημένος αριθμός των μαστιγίων του μικροοργανισμού *P. mirabilis* του προσδίδει την ικανότητα σχηματισμού ομαδικής ανάπτυξης και σχηματισμού πολυκύτταρης «σχεδίας» (rafts). Ο σχηματισμός των «σχεδίων» προκαλείται από την ελικοειδούς μορφής σύνδεση μεταξύ των κυττάρων στην οποία εμπλέκονται τα μαστίγια. Ανά περιόδους, ωστόσο, τα κύτταρα επανέρχονται στην αρχική τους μορφή. Η επαναλαμβανόμενη εναλλαγή μεταξύ των δύο καταστάσεων προκαλεί ένα φαινόμενο που αποκαλείται “*terraced colonies*” (Rather, 2005). Εκτός από τον μικροοργανισμό *P. mirabilis*, τον ίδιο φαινόμενο εμφανίζει και το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus* ενώ είδη όπως τα *P. aeruginosa*,

*Rhizobium etli*, *Serratia liquefaciens*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* και το *E. coli*, δεν αναπτύσσονται με παρόμοια μοτίβα, καθώς η κίνησή τους είναι συνεχής (Kearns and Losick, 2003). Ο μικροοργανισμός *P. mirabilis* μεταβάλλει την κυτταρική του μορφολογία αυξάνοντας το μήκος από 1 έως 2 μm σε 20 έως 80 μm και αυξάνει τον αριθμό των μαστιγίων του από 10 σε 5.000, ενώ ο μικροοργανισμός *E. coli* αυξάνει τον αριθμό των μαστιγίων του και το μήκος των κυττάρων του σε διπλάσιο ή τριπλάσιο του αρχικού (Harshey, 1994).

Ο μικροοργανισμός *P. mirabilis* αναπτύσσει μια αποικία *swarming* με την αίσθηση της πυκνότητας των κυττάρων, ενώ η ανάπτυξή του διεγείρεται παρουσία ορισμένων πεπτιδίων και αμινοξέων, κυρίως της γλουταμίνης (Rauprich et al., 1996). Η ικανότητα του *S. enteritidis* να αναπτύσσεται σε συνθήκες ομαδικής κίνησης οφείλεται στην κυτταρική του επιμήκυνση και στην αύξηση της βιοσύνθεσης των μαστιγίων (Guard-Petter, 1998). Οι εξωκυττάριοι αυτοεπαγωγείς *N-acyl-homoserine lactones* (AHLs) διεγείρουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης του μικροοργανισμού *S. liquefaciens* ενώ δεν είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* (McCarter, 1998).

#### **A.2.1.4 Παράγοντες που ευνοούν την ομαδική και κολυμβητική κίνηση**

##### *Χημειοτακτισμός*

Το σύστημα του χημειοτακτισμού συνίσταται στην ενεργοποίηση αισθητήριων υποδοχέων, μέσω φωσφορυλίωσης, το οποίο μεταβάλλει την ροπή του κινητήρα του μαστιγίου και κατευθύνει τα κύτταρα σε ευνοϊότερο, για την επιβίωσή τους, περιβάλλον (Hazelbauer et al., 2008). Μολονότι ο χημειοτακτισμός αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της κολυμβητικής κίνησης, δεν ισχύει το ίδιο για την ομαδική.

Το κεντρικό ερώτημα που σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση κατά την ομαδική κίνηση είναι η φύση των σηματοδοτικών μορίων και ο τρόπος με τον οποίον αυτά χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς. Αν και αυτά τα σηματοδοτικά μόρια, ακόμα στην πλειοψηφία τους, είναι άγνωστα για τους μικροοργανισμούς *E. coli* και *S. typhimurium*, ωστόσο είναι ξεκάθαρο ότι κάποια συστατικά του συστήματος του χημειοτακτισμού και όχι ο ίδιος ο χημειοτακτισμός, παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, δηλαδή στην αύξηση της βιοσύνθεσης των μαστιγίων (Burkart et al., 1998). Η εξάπλωση μιας αποικίας *swarming*, πιθανότατα, δεν οφείλεται σε χημειοτακτισμό, αλλά σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και σε δυναμικές αναστροφές της ροπής των μαστιγίων (Darnton et al., 2010). Ωστόσο, παράγοντες που ανήκουν στο μονοπάτι του χημειοτακτισμού είναι απαραίτητοι για την ικανότητα ομαδικής κίνησης των μικροοργανισμών *P. mirabilis* και *S. marcescens* (Belas et al., 1991; O'Rear et al., 1992). Αν και οι παράγοντες αυτοί δεν είναι απαραίτητοι για την μορφολογική διαφοροποίηση των μικροοργανισμών *Vibrio parahaemolyticus* και *Rhodospirillum centenum*, είναι όμως αναγκαίοι για την εξάπλωση σε μια επιφάνεια (Sar et al., 1990; Jiang et al., 1998).

Έρευνα κατέδειξε ότι στελέχη *E. coli* και *S. typhimurium*, τα οποία φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που συμμετέχουν στο σύστημα του χημειοτακτισμού, *cheA*, *cheW*, *cheR* και *cheY* (*chemotaxis response regulators*), δεν στερούνται της ικανότητας της ομαδικής κίνησης και τα κύτταρά τους δεν διαφοροποιούνται μορφολογικά (Mariconda, et al., 2006; Harshey and Matsuyama, 1994). Σύμφωνα με τον Wang, στα κύτταρα *E. coli* της ομαδικής κίνησης, επάγονται μόνο τα «όψιμα» γονίδια (*late genes*), της βιοσύνθεσης των μαστιγίων όπως το γονίδιο μαστιγίνης του μαστιγίου, *fliC* (*flagellin*), τα γονίδια που συμμετέχουν στην προώθηση του κινητήρα του βακτηρίου, *motA* και *motB* αλλά και τα γονίδια που

συμμετέχουν στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος του χημειοτακτισμού (Wang et al., 2004). Αναφέρονται επίσης και τα γονίδια που συμμετέχουν στο χημειοτακτισμό του μικροοργανισμού *P. mirabilis* *motB*, *cheZ*, *motA* και *cheY*, τα οποία εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης, σε σύγκριση με τα πλανκτονικά κύτταρα (Pearson et al., 2010).

#### Βιοσύνθεση μαστιγίων

Κατά την κολυμβητική κίνηση, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα μαστίγια ώστε να μετακινηθούν σε περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξή τους. Τα μαστίγια συμβάλλουν στην παθογένεια κάποιων στελεχών καθώς υποβοηθούν στην διαδικασία της προσκόλλησης και δημιουργίας βιοϋμενίου σε επιφάνειες. Τα κύτταρα *E. coli* κύτταρα που επιτελούν την κολυμβητική κίνηση είναι περίτριχα και διαθέτουν έξι έως οκτώ μαστίγια ανά κύτταρο (Manson et al., 1998). Η κυτταρική διαφοροποίηση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης έγκειται στην αύξηση της βιοσύνθεσης των μαστιγίων, καθώς ο αριθμός των μαστιγίων κατά την ομαδική κίνηση ξεπερνά τον αντίστοιχο της κολυμβητικής. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται σε σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών ή σε μια διακυτταρική επικοινωνία, μέσω των οποίων αυξάνεται ο αριθμός των μεταγραφημάτων των γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μαστίγια του βακτηρίου. Η μεταγραφή των γονιδίων αυτών προχωρά μέσω της ενεργοποίησης άλλων ρυθμιστικών γονιδίων, όπως το *flhDC* στο γένος *Enterobacteriaceae*, το *fleQ* στο μικροοργανισμό *P. aeruginosa* και το *flrA* στο *Vibrio spp.*

Η βιοσύνθεση των μαστιγίων στο βακτήριο *E. coli* έχει μελετηθεί εκτενώς καθώς αναφέρονται περισσότερα από 50 γονίδια που διακρίνονται σε τρεις ομάδες. Η πρώτη ομάδα των πρώιμων γονιδίων (*class I master operon/early genes*) περιλαμβάνει το *flhDC* οπερόνιο (γονίδια *flhD* και *flhC*), το οποίο ρυθμίζει τη μεταγραφή των υπόλοιπων δύο ομάδων. Ρυθμιστικοί παράγοντες της έκφρασης της πρώτης ομάδας αποτελούν ορισμένα σήματα που δρουν είτε ανασταλτικά, όπως το ρυθμιστικό γονίδιο *ompR* σε συνθήκες υψηλής όσμωσης, είτε διεγερτικά, όπως η διακυτταρική επικοινωνία μέσω του *qseCB* (*two-component system*). Ωστόσο, η αυξημένη βιοσύνθεση μαστιγίων που παρατηρείται στο *S. typhimurium*, παραδόξως, δεν οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή των γονιδίων των μαστιγίων. Η λειτουργία αυτή παραμένει άγνωστη αλλά αποδίδεται σε κάποιους μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς που οδηγούν στην αύξηση των μαστιγίων στα βακτήρια, όπως η παρουσία υγρασίας στην επιφάνεια ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Wang et al., 2004).

Η δεύτερη ομάδα των ενδιάμεσων γονιδίων (*class II genes/middle genes*) ρυθμίζει την έκφραση του κυρίως σώματος του μαστιγίου και του άγκιστρου καθώς και του παράγοντα  $\sigma^{28}$  (*fliA*) (*class 3 promoter sigma factor*) και της πρωτεΐνης-καταστολέα *flgM* (*anti-sigma factor, flgM*) της έκφρασης των «όψιμων» γονιδίων που επάγονται από τον παράγοντα  $\sigma^{28}$  (Copeland and Weibel, 2009).

Η τρίτη ομάδα των όψιμων γονιδίων (*class III genes*) επάγεται αφού σχηματισθεί το κυρίως σώμα του μαστιγίου και του άγκιστρου και έπειτα από την απελευθέρωση, εκτός του κυττάρου, της πρωτεΐνης *flgM*, επιτρέποντας έτσι στον παράγοντα  $\sigma^{28}$  (*sigma factor*  $\sigma^{28}$ ) να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή τους (Chilcott and Hughes, 2000). Η αυξημένη έκκριση της *flgM* οδηγεί σε αυξημένη βιοσύνθεση μαστιγίων και συμβάλλει στη διαφοροποίηση των κυττάρων της ομαδικής κίνησης από τα πλανκτονικά.

Το μαστίγιο αποτελείται από τους MS, P και L δακτυλίους της εσωτερικής μεμβράνης, του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης και της εξωτερικής μεμβράνης, αντίστοιχα (Εικ.Α.2.4). Ο

κυτταροπλασματικός C δακτύλιος (C ring) (απεικονίζεται με πράσινο) αποτελεί το «διακόπτη» της βιοσύνθεσης των μαστιγίων και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες *fliM*, *fliC* και *fliN* (Verstraeten et al., 2008).

Στον παθογόνο μικροοργανισμό *P. mirabilis* διαπιστώθηκε, μέσω της μεθόδου μικροσυστοιχιών DNA, ότι τα περισσότερα γονίδια, των οποίων η έκφραση φαίνεται να αυξάνεται κατά την ομαδική κίνηση συγκριτικά με την πλανκτονική φάση, συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των μαστιγίων όπως τα *fliA*, *fliE*, *flgB*, *flgC*, *flgF*, *fliM*, *flgG*, *flgI*, *flgL*, *flaD*, *flgE*, *fliL*, *fliN*, *fliG*, *fliS*, *flgK*, *flgN* και *fliK* (Pearson et al., 2010).

#### Έκκριση επιφανειοδραστικών ουσιών

Τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης μετακινούνται σε μια επιφάνεια με μια διαδικασία που υποβοηθείται από την παρουσία υγρού στην επιφάνεια ανάπτυξης των βακτηρίων. Η εξωκυττάρια έκκριση βιομορίων επηρεάζει την ομαδική κίνηση μειώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ του υποστρώματος και του μικροοργανισμού, ώστε να επιτρέπεται η εμβάπτιση των κυττάρων στο υγρό της επιφάνειας (Harshey, 2003). Τα εκκρινόμενα βιομόρια διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες:

#### Πολυσακχαρίτες

Τα κύτταρα κατά την ομαδική κίνηση εκκρίνουν ένα μείγμα από πολυσακχαρίτες, πεπτίδια, πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια (Mireles et al., 2001). Οι πολυσακχαρίτες είναι το κύριο συστατικό του εκκρινόμενου υγρού από τον μικροοργανισμό *P. mirabilis* (Stahl et al., 1983) ενώ βρέθηκε ότι μεταλλαγμένο στέλεχος που φέρει απαλοιφή του υπεύθυνου γονιδίου για την παραγωγή πολυσακχαριτών απώλεσε την ικανότητα της ομαδικής κίνησης (Gygi et al., 1995). Αντιθέτως, η αύξηση της παραγωγής πολυσακχαριτών του μικροοργανισμού *V. parahaemolyticus* οδήγησε στη μείωση της ικανότητας της ομαδικής κίνησης ενώ παράλληλα συνέβαλλε στην αύξηση της ικανότητας αποικισμού επιφανειών. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η παραγωγή πολυσακχαριτών επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο την ικανότητα της ομαδικής κίνησης ανά μικροοργανισμό (Boles and McCarter, 2002).

#### Λιποπολυσακχαρίτες (LPS)

Ο ερευνητής Toguchi και η ομάδα του εντόπισαν στελέχη του μικροοργανισμού *S. typhimurium*, μη ικανά της ομαδικής κίνησης, στα οποία η βιοσύνθεση των λιποπολυσακχαριτών ήταν ελλιπής, καθώς έφεραν απαλοιφή του γονιδίου *wasG* που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση των λιποπολυσακχαριτών. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι λιποπολυσακχαρίτες επηρεάζουν την ικανότητα ομαδικής κίνησης του μικροοργανισμού *S. typhimurium* επιδρώντας στην υγρασία της επιφάνειας ανάπτυξης (Toguchi et al., 2000).

#### Λιποπρωτεΐνες/Λιποπεπτίδια

Ο μικροοργανισμός *B. subtilis*, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης σε άγαρ, εκκρίνει ένα λιποπεπτίδιο, την *surfactin*, μια ισχυρή επιφανειοδραστική ένωση (Ron and Rosenberg, 2001). Οι ερευνητές Kearns και Losick έδειξαν ότι η *surfactin* είναι απαραίτητη για την ομαδική κίνηση σε επιφάνεια του μικροοργανισμού *B. subtilis* (Kearns and Losick, 2003). Μεταλλαγμένα στελέχη που φέρουν απαλοιφή του γονιδίου *sfp* που κωδικοποιεί για τη βιοσύνθεση της *surfactin* καθώς και/ή απαλοιφή του *srf* οπερονίου που αποτελείται από τα γονίδια *srfAA*, *srfAB*, και *srfAC* που κωδικοποιούν για τη συνθάση της *surfactin*, δεν επιτελούν την ομαδική κίνηση *swarming* (Nakano et al., 1992; Cosmina et al., 1993).

Ο μικροοργανισμός *Serratia liquefaciens* MG1 χρησιμοποιεί την Serrawettin W2 ως επιφανειοδραστικό παράγοντα ώστε να εξαπλώνεται σε μια επιφάνεια. Η Serrawettin W2 αποτελεί ένα κυκλικό λιποπενταπεπτίδιο (*cyclic lipodepsipeptide*) που μειώνει την επιφανειακή τάση του νερού. Παρατηρήθηκε ότι η εξωγενής της προσθήκη στο μέσο ανάπτυξης του μεταλλαγμένου στελέχους *S. liquefaciens* το οποίο φέρει απαλοιφή των γονιδίων *swrI/swrA* που κωδικοποιούν για τη σύνθεσή της, είχε ως αποτέλεσμα την ανάκτηση της ικανότητας της ομαδικής κίνησης (Lindum et al., 1998).

#### Γλυκολιπίδια

Τα ραμνολιπίδια είναι γλυκολιπίδια που παράγονται από αρνητικά κατά Gram, παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα βακτήρια, όπως το *P. aeruginosa*, εκκρίνονται στο εξωκυτταρικό χώρο και δρουν ως μολυσματικοί παράγοντες και ως επιφανειοδραστικές ουσίες. Είναι υπεύθυνα για το φαινότυπο της αποικίας *swarming* του *P. aeruginosa* που ομοιάζει με σπειροειδή μοτίβα (*tendrils*) (Caiazza et al., 2005). Τα δι-ραμνολιπίδια (*dirhamnolipids*), τα οποία εκκρίνονται από το βακτήριο *P. aeruginosa*, προσελκύουν τα κύτταρα της ομαδικής κίνησης, ωστόσο τα αλκανοϊκά οξέα (HAA) λειτουργούν ως απωθητικά των κυττάρων αυτών ενώ βρέθηκε ότι δεν επηρεάζουν την κολυμβητική κίνηση (Tremblay et al., 2007).

#### A.2.1.5 Αντίστροφη σχέση μεταξύ της ομαδικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου

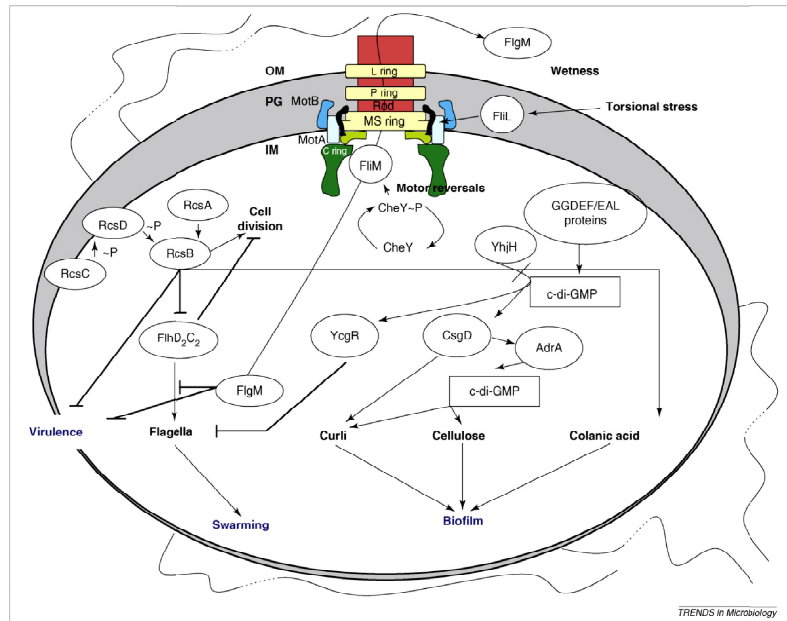
Ο σύνδεσμος μεταξύ της ομαδικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου τείνει να είναι περίπλοκος, διότι παρά τις διαφορές τους περιλαμβάνουν κοινά χαρακτηριστικά σε ορισμένα στάδια ή προϋποθέτουν συγκεκριμένες συνθήκες. Για παράδειγμα, η απαρχή του σχηματισμού βιοϋμενίου προϋποθέτει τη συμμετοχή των μαστιγίων (μέσω του *flhDC* οπερονίου) αφού η κίνηση των βακτηρίων είναι ζωτικής σημασίας για την αρχιτεκτονική ενός βιοϋμενίου (Boles et al., 2005; O'Toole and Kolter, 1998).

Επίσης, λοιπά κοινά στοιχεία είναι το σύστημα χημειοτακτισμού μόνο για την εναλλαγή της φοράς συστροφής των μαστιγίων και το σύστημα αίσθησης της πληθυσμιακής πυκνότητας. Το Rcs σύστημα των μικροοργανισμών του γένους *Enterobacteriaceae*, το οποίο μέχρι πρότινος ήταν γνωστό για το ρόλο του στη ρύθμιση της σύνθεσης του πολυσακχαρίτη κολανικού οξέος, δείχθηκε ότι κατέχει και ένα δεύτερο ρόλο στην αίσθηση του περιπλαστικού στρες και της ωσμωτικής κατάστασης. Όμως, το *RcsCDB* σύστημα διεγείρει την παραγωγή του κολανικού οξέος και καταστέλλει την ομαδική και κολυμβητική κίνηση (Wang et al., 2007). Εντούτοις, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα επιλογής μεταξύ των δύο μηχανισμών για τον αποικισμό και την επιβίωσή τους σε μια επιφάνεια. Η επιλογή αυτή είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς ανταλλαγής σημάτων ή ρυθμιστικών μονοπατιών.

Το σηματοδοτικό μόριο c-di-GMP λειτουργεί ως δεύτερος διαβιβαστής σε απόκριση στα εξωκυτταρικά σήματα ρυθμίζοντας την κινητικότητα ή την παθογένεια πολλών μικροοργανισμών. Σε γενικές γραμμές, οι υψηλές συγκεντρώσεις του c-di-GMP σχετίζονται με αυξημένη προσκόλληση σε επιφάνειες και μειωμένη κινητικότητα ή λοιμογόνο δράση. Έχειδειχθεί ότι πολλές πρωτεΐνες φέρουν στην αμινοξική τους ακολουθία τα μοτίβα GGDEF ή EAL (κυκλάσες ή φωσφοδιεστεράσες αντίστοιχα) οι οποίες καθορίζουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του c-di-GMP. Για παράδειγμα ο μικροοργανισμός *S.typhimurium* διαθέτει 19 τέτοιες πρωτεΐνες και ο *P. aeruginosa* διαθέτει 38. Επομένως τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του c-di-GMP συχνά καθορίζουν το μηχανισμό αποικισμού μιας επιφάνειας και



είναι κρίσιμα για την επιλογή μεταξύ ομαδικής κίνησης ή σχηματισμού βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα αυτά είναι που επάγουν την παραγωγή των κροσσών, της κυτταρίνης ή των αμυλοειδών και καταστέλλουν τη βιοσύνθεση των μαστιγίων προωθώντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό βιοϋμενίου (Εικόνα Α.2.4) (Verstraeten et al., 2008).



**Εικόνα Α.2.4.** Ρυθμιστικοί μηχανισμοί της ομαδικής κίνησης, του σχηματισμού βιοϋμενίου και της παθογένειας του μικροοργανισμού *E. coli* και του *S. typhimurium* (Verstraeten et al., 2008).

Στον μικροοργανισμό *S. typhimurium* η πρωτεΐνη flgM, που εκκρίνεται με την παρουσία πλεονάζουσας υγρασίας στο περιβάλλον, επιτρέπει την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων της τρίτης ομάδας (class III genes) και των γονιδίων της παθογένειας. Η πρωτεΐνη flhL εκτιμάται ότι εδράζεται στον MS δακτύλιο, μεταξύ του AB κινητήρα (motAB stator). Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη cheY αλληλεπιδρώντας με την fliM, προάγει την περιστροφή του μαστιγίου. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι RCS η κινάση rcsC μεταφέρει μια φωσφορική ομάδα, από την rcsD στη rcsB. Η φωσφορυλιωμένη πλέον rcsB ενεργοποιεί την κυτταρική διαίρεση και την σύνθεση του κολανικού οξέος, καταστέλλει την παθογένεια του στελέχους και την κίνηση μέσω μαστιγίων, μόνη της ή σε σύμπλοκο με την rcsA. Τουλάχιστον έξι από τις κυκλάσες ή φωσφοδιεστεράσες οι οποίες συμμετέχουν στη βιοσύνθεση ή αποικοδόμηση του c-di-GMP, επηρεάζουν την έκφραση της csgD. Η csgD ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *adrA*, που κωδικοποιεί για μια κυκλάση (*Diguanylate cyclase*, DGC), η οποία ενεργοποιεί μετά-μεταγραφικά την κυτταρίνη και μερικώς την έκφραση των ινιδίων. Η πρωτεΐνη ycgR, δρώντας ανταγωνιστικά με την yhjH, καταστέλλει τη σύνθεση των μαστιγίων (Verstraeten et al., 2008).

#### A.2.1.6 Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην ομαδική κίνηση

Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση 3.985 γονιδίων (single gene knock-out) του μικροοργανισμού *E. coli* και χαρακτηρισμός του φαινοτύπου του κάθε στελέχους σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια, βρέθηκε ότι 216 εξ αυτών εμπλέκονται στο συγκεκριμένο φαινότυπο. Η σάρωση υπέδειξε ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την ομαδική

κινητικότητα συμμετέχουν, μεταξύ άλλων, στον κύκλο του Krebs, στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στη μεταγωγή σήματος και στη βιοσύνθεση λιποσακχαριτών (Inoue et al., 2007). Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για τους μικροοργανισμούς *P. aeruginosa* (Overhage et al., 2007; Tremblay and Déziel, 2010), *Bacillus cereus* (Salveti et al., 2011), *Pseudomonas fluorescens* (Mastroaolo et al., 2012) και *Variovorax paradoxus* (Pehl et al., 2012).

Συγκεκριμένα, κατά την ομαδική κίνηση του *P. aeruginosa* και από δείγμα RNA που προήλθε από το άκρο της αναπτυσσόμενης *swarming* αποικίας, διαπιστώθηκε ότι αυξάνονται τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγραφημάτων γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην παραγωγή ριβοσωμικών πρωτεϊνών και στην παραγωγή ενέργειας, δηλαδή στη σύνθεση του ATP ενώ μειώνονται τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγραφημάτων γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με την έκκριση παραγόντων παθογένειας ή γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στη βιοσύνθεση σιδηροφόρων. Από δείγμα RNA που προήλθε από το κέντρο της αναπτυσσόμενης *swarming* αποικίας, διαπιστώθηκε ότι αυξάνονται τα μεταγραφήματα γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση σε οξειδωτικό στρες (Tremblay and Déziel, 2010).

Όσον αφορά στα γονίδια του μικροοργανισμού *P. aeruginosa* PAO1, για τα οποία παρατηρείται αύξηση των επιπέδων μεταγραφημάτων τους κατά την ομαδική κίνηση, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των περισσότερων αυξάνεται και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Κατά τη σάρωση στελεχών με φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις ως προς την ομαδική κινητικότητα, απομονώθηκε ένας μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων με ενθέσεις τρανσποζονίου Tn5, σε πολλά και διαφορετικά γονίδια. Εκτός από μεταλλάξεις στο γονίδιο μαστιγίνη (*flagellin*), στα IV τριχίδια (Type IV pili), στα γονίδια που μετέχουν στη βιοσύνθεση ραμνολιπιδίων, εντοπίστηκε επίσης και Tn5 ένθεση σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στο μεταβολισμό αμινοξέων, νουκλεοτιδίων, λιπαρών οξέων ή φωσφολιπιδίων, καθώς και σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται στην αντιγραφή ή τροποποίηση του DNA και στη σύνθεση ή αποδόμηση του RNA (Overhage et al., 2007).

Κατά τη μελέτη της ομαδικής κίνησης του *B. cereus* ATCC 14579, αναλύθηκε το μεταγραφικό προφίλ των κυττάρων αυτών και διαπιστώθηκε ότι μεταβάλλεται η έκφραση των γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, ωστόσο δεν τροποποιείται δραματικά η έκφραση των γονιδίων, τα οποία εμπλέκονται στο βασικό μεταβολισμό των κυττάρων. Δεδομένα μικροσυστοιχιών DNA υπέδειξαν, επίσης, διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη μεταφορά του καλίου, γονιδίων προφάγων και ορισμένων συντηρημένων υποθετικών γονιδίων, η λειτουργία των οποίων δεν έχει καθοριστεί (Salveti et al., 2011).

Το γονίδιο *AdnA* του *P. fluorescens*, ένα ορθόλογο του γονιδίου *FleQ* στον μικροοργανισμό *P. aeruginosa*, είναι υπεύθυνο για την κινητικότητά του και για την προσκόλληση σε επιφάνειες. Η χρήση μικροσυστοιχιών στο στέλεχος, στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *AdnA*, είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό δύο γονιδίων, των Pfl01\_1508 και Pfl01\_1517, τα οποία επηρεάζουν την κινητικότητα του βακτηρίου *P. fluorescens* O1, ωστόσο επιδρούν διαφορετικά στον σχηματισμό του βιοϋμενίου. Τα γονίδια αυτά πιθανότατα κωδικοποιούν για πρωτεΐνες, όμοιες με τις γλυκοσυλ-τρανσφεράσες FgtA1 και FgtA2, οι οποίες εμπλέκονται στην παθογένεια και στην κινητικότητα του *P. syringae* (Mastroaolo et al., 2012).

Τέλος, στο μικροοργανισμό του εδάφους *V. paradoxus* EPS, χρησιμοποιώντας ως κριτήρια την ικανότητα της ομαδικής κίνησης και το σχηματισμό βιοϋμενίου, παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο *wbuB*

(Varpa\_4680), το οποίο κωδικοποιεί για μια ακετυλομεταφοράσης (N-acetyl-l-fucosamine transferase) εμπλέκεται σε αυτούς τους μηχανισμούς. Η πρωτεΐνη *wbuB* είναι σημαντική για την παραγωγή ενός εξωπολυσακχαρίτη, ο οποίος συντελεί στην κίνηση σε επιφάνειες, όμως δρα ανασταλτικά στο σχηματισμό του βιοϋμενίου. Επίσης, στο μηχανισμό της ομαδικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου εμπλέκεται και το γονίδιο *tfp* (Varpa\_5900), το οποίο κωδικοποιεί για μια υποθετική πρωτεΐνη, που είναι ορθόλογη της PiliY1 σε άλλους οργανισμούς, η οποία κατέχει ένα ρυθμιστικό ρόλο στο σχηματισμό των IV τριχιδίων (Pehl et al., 2012).

#### **A.2.1.7 Ο ρόλος των πεπτιδουλ-πρόλυλ *cis/trans* ισομερασών στην ομαδική κίνηση και στον σχηματισμό βιοϋμενίου**

Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη στο μικροοργανισμό *E.coli*, τα γονίδια τα οποία σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα, κωδικοποιούν, εκτός από τα προαναφερθέντα και για τσαπερόνες ή για πρωτεΐνες αναδίπλωσης πρωτεϊνών όπως οι PPIάσες (Inoue et al., 2007). Η μετάβαση των πλανκτονικών σε κύτταρα βιοϋμενίου απαιτεί τη συντονισμένη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξή του. Η μελέτη και η διερεύνηση του περίπλοκου δικτύου της μεταγωγής σήματος που οδηγεί στην πρωτεϊνική έκφραση οδηγεί στην κατανόηση και χαρτογράφηση του μηχανισμού της δημιουργίας βιοϋμενίου (Prüß et al., 2006). Επομένως, ο ρόλος των PPIάσων στη δημιουργία ενός βιοϋμενίου είναι σύνθετος και έμμεσος και πιθανότατα προκύπτει μέσω της αναδίπλωσης ή της *cis/trans* ισομερίωσης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο βιοϋμένιο (Inoue et al., 2007).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλα μεμονωμένα ευρήματα στα οποία συσχετίζονται η ομαδική κίνηση και ο σχηματισμός βιοϋμενίου με τις PPIάσες. Συγκεκριμένα, το ομόλογο γονίδιο του *tig*, από το *E. coli*, στο *Streptococcus mutants*, ένα βακτήριο που σχηματίζει βιοϋμένιο και είναι σημαντικός παράγοντας της οδοντικής πλάκας, το *gorA*, βρέθηκε ότι εμπλέκεται στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων και στον σχηματισμό του βιοϋμενίου. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί προσδίδει στο βακτήριο ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH και σε οξειδωτικό στρες και δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη της οδοντικής πλάκας (Wen et al., 2005).

Επίσης, η μελέτη των Niba et al. (2007) στην οποία σαρώθηκαν εκατοντάδες μεταλλαγμένων στελεχών της *E. coli* για την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοϋμενία κατέδειξε ότι οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (*outer membrane proteins*-OMPs) συμμετέχουν στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Η πρωτεΐνη *surA*, μέλος της οικογένειας των παρβουλινών, όπως προαναφέρθηκε, συμβάλλει στη βιοσύνθεση των OMPs. Το στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου *surA* έχει μειωμένα επίπεδα των OMPs και επομένως βρέθηκε ότι απώλεσε την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.

Τέλος, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη BPSS1823, η οποία ανήκει στις προαναφερθείσες πρωτεΐνες MIPs αποτελεί ένα λοιμογόνο παράγοντα του παθογόνου μικροοργανισμού *Burkholderia pseudomallei*. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *BPSS1823* στο *B. pseudomallei* προκάλεσε, μεταξύ άλλων, μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης (Norville et al., 2011).

## A.2.2 Βιοϋμένια

### A.2.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά του σχηματισμού βιοϋμενίου

Τα βακτήρια έχουν εξελίξει σύνθετους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην προσκόλληση και αποίκιση τους σε αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες. Οι βακτηριακές αυτές κοινότητες, γνωστές ως βιοϋμένια ή βιομεμβράνες (*biofilms*), μπορούν να προκαλέσουν χρόνιες λοιμώξεις στον άνθρωπο και μολύνσεις σε τρόφιμα. Βιοϋμένια, επίσης, σχηματίζονται στις επιφάνειες των φυτικών ιστών (Costerton et al., 1995).

Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου έχει μια χαρακτηριστική δομή που αποτελείται από το σχηματισμό ενός βλενώδους πλέγματος, στο εσωτερικό του οποίου παράγονται και εκκρίνονται πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, και πολυσακχαρίτες.

Σε αυτό το πολύπλοκο δίκτυο βιοϋμενίου, τα κύτταρα δρουν λιγότερο ως μεμονωμένες οντότητες και περισσότερο ως ένα οργανωμένο σύστημα ζωής. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτό το δίκτυο είναι πιο ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις ή στη δράση των αντιβιοτικών, από τα πλανκτονικά κύτταρα (Donlan, 2002; Stoodley et al., 2002; Sauer, 2003). Η μετάβαση των κυττάρων από το πλανκτονικό μοτίβο στην οργάνωση του βιοϋμενίου, απαιτεί τη διαμόρφωση ενός δικτύου ανταλλαγής πληροφοριών, μέσω χημικών σημάτων. Γονιδιωματικές και πρωτεωμικές μελέτες έδειξαν ότι η γονιδιακή ρύθμιση καθώς και η πρωτεϊνική έκφραση των βακτηρίων που απαρτίζουν ένα βιοϋμένιο διαφέρουν από τις αντίστοιχες των φυσιολογικών πλανκτονικών κυττάρων (Sauer, 2003). Επίσης, τα πλανκτονικά κύτταρα, από τα κύτταρα που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του βιοϋμενίου, διαφέρουν ως προς τη φυσιολογία και τη μορφολογία (Antoniani et al., 2009).

### A.2.2.2 Ιστορική αναδρομή

Στα μέσα του 17<sup>ου</sup> αιώνα, ο Anton van Leeuwenhoek παρατήρησε για πρώτη φορά με το αρχέγονο μικροσκόπιό του, βακτηριακό βιοϋμένιο που ονόμασε "*animalculi*" (μικρά ζώα) και ήταν η αιτία σχηματισμού της οδοντικής πλάκας.

Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, το 1933, ο μικροβιολόγος Arthur Henrici επεσήμανε ότι τα βακτήρια που παρατήρησε σε λιμνάζοντα νερά δεν είχαν την ικανότητα να αιωρούνται αλλά σχημάτιζαν κατά τόπους επιφάνειες βιοϋμενίου στην επιφάνεια του νερού. Λίγο αργότερα, το 1940, οι ερευνητές Heukelekian και Heller καθώς και Claude ZoBell περιέγραφαν τα κύρια χαρακτηριστικά της βακτηριακής κοινότητας οργανωμένης σε βιοϋμένιο.

Στα τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα, το ερευνητικό ενδιαφέρον προς τη διερεύνηση της πολύπλοκης βακτηριακής μορφής ζωής είχε γίνει εντονότερο και αρκετά άρθρα είχαν δημοσιευθεί στις επιστημονικές επιθεωρήσεις. Η πρώτη αναφορά του όρου «βιοϋμένιο» έλαβε χώρα στη Σουηδική επιθεώρηση Vatten από τον ερευνητή Harremoës το 1977 με τίτλο επιστημονικής ανακοίνωσης "*Half-order reactions in biofilm and filter kinetics*".

Τη δεκαετία του 1970 παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση από την πλανκτονική μορφή των βακτηρίων σε αυτή του βιοϋμενίου ενώ μια δεκαετία αργότερα, τη δεκαετία του 1980, διαπιστώθηκε ότι οι μικροοργανισμοί που προσκολλούνται σε επιφάνειες, αβιοτικές και μη, βρίσκονται οργανωμένοι

σε μια πολύπλοκη μορφή συμβίωσης. Από νωρίς, το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στις επιπτώσεις του βιοϋμενίου που αναπτύσσεται σε λύματα, σε επιφάνειες βιομηχανικού εξοπλισμού και την οδοντική πλάκα. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε ιατρικές συσκευές, που σχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις, παραμένει ένα υπαρκτό και καίριο πρόβλημα για την υγεία.

### A.2.2.3 Στάδια ανάπτυξης

Η ανάπτυξη ενός βιοϋμενίου περιλαμβάνει τα εξής πέντε στάδια (Stoodley et al., 2002):

#### Στάδιο 1<sup>ο</sup>: Αναστρέψιμη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνεια.

Η προσκόλληση των κυττάρων σε μια επιφάνεια πραγματοποιείται μέσω φυσικοχημικών και ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ του κυτταρικού φακέλου και της επιφάνειας προσκόλλησης και διευκολύνεται από την έκκριση μιας εξωκυττάριας βλενώδους ουσίας (Dunne, 2002). Η αναστρέψιμη προσκόλληση των κυττάρων σε μια επιφάνεια εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία, οι ιοντικές δυνάμεις της επιφάνειας, αλλά και η φύση της επιφάνειας, καθώς έχει παρατηρηθεί αυξημένη προσκόλληση σε υδρόφοβες από υδρόφιλες επιφάνειες (Donlan, 2002).

#### Στάδιο 2<sup>ο</sup>: Μη αναστρέψιμη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνεια μέσω του σχηματισμού εξωκυτταρικού υλικού.

Η μη αναστρέψιμη προσκόλληση των κυττάρων σε επιφάνεια περιλαμβάνει τη συμμετοχή τριών τύπων κροσσών (*fimbriae*): τους κροσσούς τύπου 1 (*type 1 fimbriae*), τα αμυλοειδή (*curli*) και τα συζευκτικά τριχίδια (*conjugative pili*).

- Κροσσοί τύπου 1: Πρόκειται για πρωτεϊνικής φύσης νηματοειδείς προσκολλητίνες (*filamentous proteinaceous adhesins*), που εκφράζονται από παθογόνα και μη στελέχη του βακτηρίου *E. coli* (Sauer et al. 2000). Τα βακτήρια που εκφράζουν τις εν λόγω πρωτεΐνες, διαθέτουν στη μεμβράνη τους περί των 100 έως 500 κροσσών, των οποίων η διάμετρος είναι 5-7 nm και το μήκος τους κυμαίνεται μεταξύ 0.2 και 2 μm. Οι κροσσοί, που αποτελούν παράγοντες παθογένειας, εξαρτώνται από το μονοσακχαρίτη μαννόζη για την αποτελεσματική προσκόλλησή τους σε μόρια-υποδοχείς στην επιφάνεια ευκαρυωτικών κυττάρων (Kaper et al. 2004). Τα στελέχη του *E. coli* που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *fimA* και *fimH* που κωδικοποιούν για τους κροσσούς, βρέθηκε ότι έχουν μειωμένη ικανότητα αρχικής προσκόλλησης σε αβιοτικές επιφάνειες (Pratt and Kolter, 1998). Η έκφραση των γονιδίων, που κωδικοποιούν για κροσσούς τύπου 1, επηρεάζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης (*outer membrane proteins-OMPs*) όπως είναι οι *btuB*, *EF-Tu*, *ompA*, *ompX*, *slp* και *tolC* (Otto et al., 2001).
- Αμυλοειδείς κροσσοί: Παράγονται από την οικογένεια των εντεροβακτηρίων όπως τα γένη *Shigella*, *Citrobacter* και *Enterobacter* ενώ εντοπίστηκαν για πρώτη φορά στο βακτήριο *E. coli* (Smyth et al., 1996). Οι αμυλοειδείς κροσσοί σχηματίζουν σύμπλοκα στην επιφάνεια του κυττάρου, διαμέτρου 6 έως 12 nm και μήκους 0.5 έως 1 μm και συμβάλλουν στη δημιουργία ενός βιοϋμενίου, διευκολύνοντας τη διεπιφανειακή προσκόλληση αλλά και τη διακυτταρική αλληλεπίδραση (Uhlich et al., 2006). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μέρος δύο ξεχωριστών

οπερονίων: του *csgBA* οπερονίου, που κωδικοποιεί για τα δομικά στοιχεία που συνθέτουν τον αμυλοειδή κροσσό και το *csgDEFG* οπερόνιο, που κωδικοποιεί για το μεταγραφικό παράγοντα *CsgD* αλλά και για το σύστημα *CsgE-G* (Vidal et al., 1998). Η ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες των αμυλοειδών κρωσσών πραγματοποιείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπίδρασης μεταγραφικών παραγόντων όπως οι *crxR*, *rscCDB*, *groS*, *H-NS*, *IHF*, *crl* και *mlrA* (Prigent-Combaret et al., 2001).

- Συζευκτικά τριχίδια: Έχει βρεθεί ότι η εισαγωγή πλασμιδίου σύζευξης, τεχνητά ή φυσικά, σε μεικτές καλλιέργειες *E. coli*, συμβάλλει στην αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου (Reisner et al., 2003). Στην ίδια έρευνα αποδείχθηκε ότι τα F-συζευκτικά τριχίδια (*F conjugative pilus*) μπορούσαν να συμπληρώσουν τη δράση των υπόλοιπων παραγόντων προσκόλλησης όπως των τριχιδίων τύπου1, του Ag43 ή των αμυλοειδών κρωσσών.

### **Στάδιο 3<sup>ο</sup>: Σχηματισμός μικροαποικιών (*microcolonies*) και απαρχή της ωρίμανσης του βιοϋμενίου.**

Ο σχηματισμός των μικροαποικιών αρχίζει με την έκφραση των IV τριχιδίων (Type IV pili). Τα IV τριχίδια, στο βακτήριο *P. aeruginosa*, σχετίζονται με την κινητικότητα των κυττάρων, που επιτελούν έναν συγκεκριμένο τύπο κίνησης, το τίναγμα (*twitching*). Αυτή ακριβώς η ιδιότητά τους συντελεί στη δημιουργία μικροαποικιών και συνεπώς στην απαρχή της βιοϋμενικής ωρίμανσης. Έπειτα από την αποίκιση των βακτηρίων στην επιφάνεια, ακολουθεί η ενεργοποίηση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Μερικά από αυτά είναι τα *algC*, *algD* και *algU*, τα οποία είναι απαραίτητα για την παραγωγή των εξωπολυσακχαριδίων (EPS). Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι οι μικροοργανισμοί αντιλαμβάνονται την προσκόλληση σε μια επιφάνεια και επομένως επιτρέπουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (O'Toole and Kolter, 1998).

### **Στάδιο 4<sup>ο</sup>: Σχηματισμός του ώριμου τρισδιάστατου βιοϋμενίου με κυτταρική δομή οργανωμένη σε κανάλια μέσω των οποίων επιτρέπεται η μεταφορά νερού και θρεπτικών στοιχείων.**

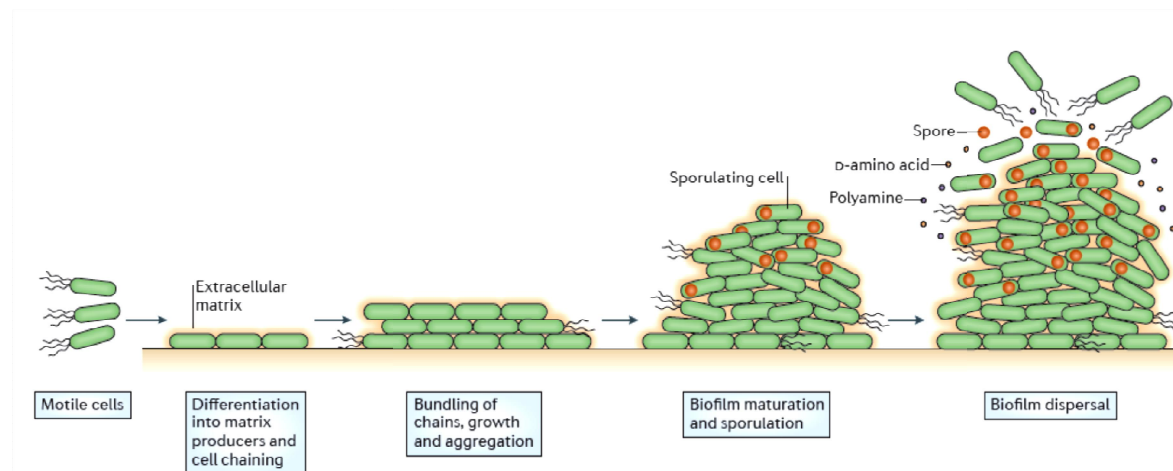
Στο ώριμο τρισδιάστατο βιοϋμένιο παρατηρούνται διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και μεταφορά γενετικής πληροφορίας, η οποία συμβάλει στη μεταβολή της φυσιολογίας των κυττάρων, από πλανκτονικά σε κύτταρα βιοϋμενίου. Βασική προϋπόθεση της διαδικασίας αυτής είναι η δημιουργία μίας εξωκυττάριας δομής ή ενός πλέγματος (*biofilm matrix*), που συνθέτει την αρχιτεκτονική ενός βιοϋμενίου (Starkey et al., 2004). Τα συστατικά τα οποία συνθέτουν το πλέγμα του βιοϋμενίου είναι 97% νερό, εξωπολυσακχαρίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια ή φωσφολιπίδια και μεταβολίτες (Ghannoum and O'Toole, 2001). Το πλέγμα βιοϋμενίου ουσιαστικά αποτελεί ένα υδάτινο «φράγμα» ενάντια στην ξήρανσή του ή σε κάθε εισβολή μικροοργανισμών ή αντιβιοτικών με στόχο την αποσύνθεσή του, ενώ παράλληλα, αποτρέπει την ανοσοποιητική απόκριση του οργανισμού-ξενιστή (Starkey et al., 2004).

### **Στάδιο 5<sup>ο</sup>: Αποκόλληση και διασπορά κυττάρων από το βιοϋμένιο και απαρχή νέου σχηματισμού βιοϋμενίου. Τα κύτταρα που συμμετέχουν στη δημιουργία του νέου βιοϋμενίου θεωρούνται πλανκτονικά.**

Τα βακτήρια έχουν μηχανισμούς, που τους επιτρέπουν να αποκολλούνται από το βιοϋμένιο, ώστε να διασπείρονται τα κύτταρα σε αναζήτηση νέας επιφάνειας προς αποίκισμό και να εντάσσονται

σε ένα νέο κύκλο ανάπτυξης βιοϋμενίου. Όπως στην ωρίμανση, έτσι και στη διασπορά του βιοϋμενίου, η μετάδοση χημικών σημάτων αποτελεί το εφαλτήριο της διακυτταρικής επικοινωνίας και της απελευθέρωσης πλανκτονικών κυττάρων (Εικόνα Α.2.5).

Ένας πιθανός μηχανισμός, που χρησιμοποιείται από τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis* για την αποκόλληση και διασπορά του βιοϋμενίου, είναι η απελευθέρωση των D-αμινοξέων, όπως τα d-τυροσίνη, d-λευκίνη, d-τρυπτοφάνη και η d-μεθειονίνη, ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται και σε άλλα είδη. Η απελευθέρωση αυτών των αμινοξέων ελέγχεται από τα ένζυμα ρακεμάσες (*racemase enzymes*), που καταλύουν την στερεοχημική μετατροπή των l-αμινοξέων σε d-αμινοξέα. Τα d-αμινοξέα αποσυνθέτουν το βιοϋμένιο, μέσω της ενσωμάτωσής τους στη πεπτιδογλυκάνη με αποτέλεσμα να απορυθμίζουν την αλληλεπίδραση ορισμένων πρωτεϊνών, όπως η *tapA*, με την εξωτερική μεμβράνη. Έτσι, ακολουθεί η απελευθέρωση των *tasA* αμυλοειδών (*amyloid fibres*) από το κύτταρο (Kolodkin-Gal et al., 2010).



**Εικόνα Α.2.5.** Ο κύκλος ζωής ενός βιοϋμενίου του βακτηρίου *Bacillus subtilis* (Vlamakis et al., 2013).

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της βακτηριακής ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου, συγκαταλέγονται η προστασία των βακτηρίων έναντι παραγόντων καταστολής της ανάπτυξής τους, όπως είναι τα αντιβιοτικά και τα βιοκτόνα, στα οποία εμφανίζουν εξαιρετική ανθεκτικότητα, το χημικό στρες (pH και οξυγόνο), καθώς και το φυσικό στρες (αυξημένη ατμοσφαιρική πίεση, αυξημένη ή μειωμένη θερμοκρασία) και η διαμόρφωση του πλέγματος, έτσι ώστε να ευνοείται η δημιουργία ενός υδαρούς περιβάλλοντος και να αποτρέπεται η αφυδάτωση του. Τα βακτήρια που συμμετέχουν στο βιοϋμένιο αντιμετωπίζουν αποτελεσματικότερα πιθανούς μικροοργανισμούς-ανταγωνιστές, σε απόπειρα εισβολής τους σε αυτό (Lewis, 2001).

Τέλος, καθώς τα βακτήρια βρίσκονται σε αρκετά κοντινή απόσταση μεταξύ τους, επιτρέπουν ευκολότερα τη διακίνηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, εξωπολυσακχαριδίων (*Extracellular Polysaccharides* - EPS), όπως κυτταρίνη, PGA (πολυσακχαρίτης beta-1,6-GlcNAc ή poly-GlcNAc), κολανικό οξύ, μεταβολιτών, καθώς και γενετικού υλικού, για την ευνοϊκότερη ανάπτυξή τους (Davey and O'Toole, 2000; Watnick and Kolter, 2000; Donlan, 2002; Trachoo, 2003).

Τα γονίδια *psl*, *pel* και *alg* συμμετέχουν ενεργά στην διαμόρφωση ενός ώριμου βιοϋμενίου, καθώς είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των εξωπολυσακχαριδίων (Vasseur et al., 2005). Ωστόσο, σύμφωνα με αποτελέσματα της έρευνας με επικεφαλής τον Nemoto που αφορούσαν την ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου τεσσάρων στελεχών του μικροοργανισμού *P. aeruginosa*, η μεταχείριση ενός

ώριμου βιοϋμενίου με Δνάση προκαλεί την αποδόμησή του, καθώς ο κυριότερος παράγοντας σχηματισμού του είναι το εξωκυττάριο DNA, το οποίο διακινείται μεταξύ των κυττάρων (Nemoto et al., 2003).

#### **A.2.2.4 Είδη μικροοργανισμών ικανών για σχηματισμό βιοϋμενίου**

Τα βιοϋμένια αποτελούνται από ένα ετερογενή βακτηριακό πληθυσμό, ωστόσο μπορούν να σχηματιστούν από ένα και μοναδικό γένος βακτηρίων (Donlan, 2002; Stoodley et al., 2002). Έχει μελετηθεί εκτενώς ο σχηματισμός βιοϋμενίου στα βακτήρια *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, και *S. marcescens* (Davey and O'Toole, 2000).

Έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια *Pseudomonas fluorescens* και *Bacillus cereus* αλληλεπιδρούν σχηματίζοντας βιοϋμένιο, σε επιφάνεια ανοξειδωτου ατσάλιου (Lindsay et al., 2002).

Ικανοί μικροοργανισμοί για πρόκληση λοιμώξεων είναι οι *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus epidermidis* και εντεροβακτήρια.

Εντονότατη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί *Legionella pneumophila*, *P. mirabilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Candida parapsilosis* και *Vibrio cholerae* (Wilson, 2001).

#### **A.2.2.5 Επιφάνειες προσκόλλησης**

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση τροφικών δηλητηριάσεων, η οποία οφείλεται σε βακτηριακή μόλυνση φρούτων και λαχανικών (Sivaralasingam et al., 2004). Το γεγονός αυτό προσέλκυσε το ερευνητικό ενδιαφέρον αρκετών επιστημόνων διεθνώς και στάθηκε η αφορμή για εστίαση της έρευνας, τόσο σε μικροβιολογικό, όσο και σε γονιδιωματικό επίπεδο.

Σε αντίθεση με παλαιότερα δεδομένα, έχει βρεθεί ότι παθογόνα στελέχη βακτηρίων διαβιούν για μεγάλες χρονικές περιόδους στο νερό, στο έδαφος, στην επιφάνεια φυτών και έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε φυτικούς ιστούς. Οι Lindow και Brandl αναφέρουν ότι το ποσοστό των βακτηρίων που ζουν στην επιφάνεια φυτών και είναι οργανωμένα σε βιοϋμένια κυμαίνεται μεταξύ 30%-80%. Το γεγονός αυτό αποτελεί στρατηγική επιβίωσης για αυτά, καθώς τους δίνεται η δυνατότητα να ανθίστανται στο εχθρικό περιβάλλον που επικρατεί στην επιφάνεια του φυτού, όπως οι θερμοκρασιακές μεταβολές, οι υπεριώδεις ακτίνες και το οξειδωτικό στρες (Lindow and Brandl, 2003).

#### **A.2.2.6 Μηχανισμός διακυτταρικής επικοινωνίας (Quorum Sensing)**

Η διακυτταρική επικοινωνία, γνωστή ως *Quorum Sensing*, διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του βιοϋμενίου. Η επιτυχής προσκόλληση ενός γένους βακτηρίων ή ακόμα και διαφορετικών σε μία επιφάνεια, οφείλεται στην μεταξύ τους ανταλλαγή χημικών σημάτων.

Μέσω της διακυτταρικής επικοινωνίας ρυθμίζεται η έκφραση των βακτηριακών γονιδίων και εξαρτάται από την συγκέντρωση ή την πυκνότητα των κυττάρων, μέσω της ανταλλαγής χημικών σημάτων. Όταν ο βακτηριακός πληθυσμός προσεγγίσει ένα ανώτατο οριακό σημείο συγκέντρωσης, τότε επάγεται ένας μηχανισμός, όπου μόρια ή σήματα αποκαλούμενα ως αυτοεπαγωγείς (*autoinducers*) δεσμεύονται στον κατάλληλο μεταγραφικό παράγοντα και ακολουθεί ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση κάποιων



γονιδίων-στόχων. Η συντονισμένη αυτή απόκριση των μικροοργανισμών, που συμμετέχουν στο βιοϋμένιο, πραγματοποιείται προς όφελος του συνολικού πληθυσμού (Smith et al., 2004).

Ο QS μηχανισμός διευκολύνει την πρόσβαση σε θρεπτικά στοιχεία και συμβάλλει στην δημιουργία ενός ευνοϊότερου περιβάλλοντος, για την ανάπτυξη του βιοϋμενικού βακτηριακού πληθυσμού, που δρα ανταγωνιστικά σε άλλους μικροοργανισμούς. Εκτός από τον σχηματισμό του βιοϋμενίου, οι συμβιωτικές σχέσεις μικροοργανισμών, η σύζευξη πλασμιδίων, η σπορογένεση, η σύνθεση αντιμικροβιακών πεπτιδίων ή αντιβιοτικών, καθώς και η ρύθμιση της παθογένειας μέσω της παραγωγής τοξινών, αποτελούν παραδείγματα μεταβολικών διεργασιών που ρυθμίζονται μέσω του QS μηχανισμού (Han et al., 2013).

Ο QS μηχανισμός επιτρέπει την διακυτταρική επικοινωνία, το σύστημα μετάδοσης σήματος δύο συστατικών (*two-component system*, 2CS), επιτρέπει την απόκριση των κυττάρων σε περιβαλλοντικά σήματα (Galperin, 2010). Το βακτήριο *E. coli* K-12 διαθέτει 37 2CS συστήματα, προκειμένου να αντιλαμβάνεται την ποικιλία των σημάτων του περιβάλλοντός του (Zhou et al., 2003) ενώ τα παθογόνα στελέχη διαθέτουν επιπλέον 2CS, τα οποία είναι υπεύθυνα της ρύθμισης των γονιδίων της παθογένειας (Tobe, 2008). Ένα από τα 2CS συστήματα που χρησιμοποιεί το *E. coli* είναι το σύστημα των EnvZ/OmpR, μέσω του οποίου το βακτήριο αντιλαμβάνεται τις μεταβολές της ωσμωτικότητας του περιβάλλοντος με αποτέλεσμα να ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων OmpF και OmpC, που κωδικοποιούν για τις προαναφερθείσες OMPs (Igo et al., 1990). Άλλα παραδείγματα του 2CS συστημάτων αποτελούν τα RcsCDB (Gottesman et al., 1985), EnvZ/OmpR (Prigent-Combaret et al., 2001), CpxA/CpxR (Dorel et al., 1999; Hung et al., 2001), BarA/UvrY (Suzuki et al., 2002; Sakamoto et al., 2012), BasS/BasR (Ogasawara et al., 2012) και QseC/QseB (Rasko et al., 2008; Kostakioti et al., 2009). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολυάριθμα 2CS συστήματα, τα οποία εμπλέκονται και στον QS μηχανισμό, όπως είναι το QseC/QseB του *E. coli*. Ο ενδοκυτταρικός σχηματισμός βιοϋμενίου, από το παθογόνο στέλεχος UPEC, είναι εξαρτώμενος από τη δραστηριότητα φωσφατάσης της QseC, καθώς η αποφωσφορυλιωμένη QseB είναι απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για κροσσούς τύπου 1, για αμυλοειδής κροσσούς και για μαστίγια (Kostakioti et al., 2009).

#### **A.2.2.7 C-di-GMP**

Η μετάβαση των πλανκτονικών σε κύτταρα του βιοϋμενίου ρυθμίζεται μέσω περιβαλλοντικών και φυσιολογικών ερεθισμάτων ή χημικών σημάτων των κυττάρων, των λεγόμενων δευτερευόντων διαβιβαστών (*second messengers*) και μέσω προϊόντων μεταβολικών μονοπατιών, όπως η ινδόλη (Martino et al., 2003) ή η ουρακίλη (Ueda et al., 2009). Το κυκλικό-di-GMP (c-di-GMP) ή bis-(3',5')-cyclic diguanylic acid, αποτελεί ένα διαβιβαστή και συμμετέχει σε αρκετές διαδικασίες που συνδέονται με τη δημιουργία βιοϋμενίου, όπως η παραγωγή των εξωπολυσακχαριδίων (EPS) και των παραγόντων προσκόλλησης σε επιφάνειες (Weber et al., 2006). Ωστόσο, επιδρά και σε άλλες διαδικασίες, όπως είναι η κυτταρική διαφοροποίηση και η κυτταρική βιωσιμότητα.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του c-di-GMP ρυθμίζονται μέσω των κυκλασών (*diguanylate cyclases*, DGCs), οι οποίες χαρακτηρίζονται από το μοτίβο GGDEF στην πρωτεϊνική τους αλληλουχία και των c-di-GMP-φωσφοδιεστερασών, οι οποίες προκαλούν την υδρόλυση του c-di-GMP (Tamayo et al., 2007).

Τα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του c-di-GMP είναι συντηρημένα σε όλα τα ευβακτήρια και συναντώνται σε υψηλό αριθμό αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Το βακτήριο *E. coli* διαθέτει 19 πρωτεΐνες με το χαρακτηριστικό μοτίβο GGDEF (Méndez-Ortiz et al., 2006). Αντίθετα, τα γονίδια που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του c-di-GMP συναντώνται σπανίως στα αρχαία και ευκαρυωτικά κύτταρα με αποτέλεσμα να αποτελούν στόχους για την παραγωγή αντιμικροβιακών παραγόντων ή παραγόντων καταστολής του βιοϋμενίου (Galperin, 2004).

#### **A.2.2.8 Τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στον σχηματισμό βιοϋμενίου**

Με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA μελετήθηκε η μεταβολή της έκφρασης των γονιδίων, υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου, του βακτηρίου *E. coli* K-12. Διαπιστώθηκε ότι το 10% των γονιδίων του βακτηρίου εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης, σε σύγκριση με την εκθετική φάση ανάπτυξης του βακτηρίου σε υγρή καλλιέργεια. Αυτά τα γονίδια συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες. Συγκεκριμένα, 26 γονίδια κωδικοποιούν για πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην μεταγραφή, μετάφραση και αντιγραφή του DNA, 45 γονίδια συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος, στη μεταφορά ανόργανων ιόντων, στη βιοσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης και στην έκκριση, στην κυτταρική διαίρεση, σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών ή ακόμα και στην αναδίπλωση πρωτεϊνών από τσαπερόνες. Τα υπόλοιπα 60 γονίδια εμπλέκονται στη μεταφορά υδατανθράκων και αμινοξέων, στον μεταβολισμό λιπιδίων και συνενζύμων, στην παραγωγή ενέργειας και στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών ενώ 119 γονίδια που εντοπίστηκαν είναι αγνώστου λειτουργίας (Beloin et al., 2004). Παρόμοιες μελέτες διερεύνησης της γενετικής βάσης του σχηματισμού βιοϋμενίου έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα άλλα είδη βακτηρίων (Schembri et al., 2003; Hancock and Klemm, 2007; Domka et al., 2007). Το κοινό στοιχείο όλων των ερευνών αποτελεί το εύρημα ότι επάγονται τα γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Παραδείγματος χάριν, σε κύτταρα τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο, εντοπίστηκαν 42 γονίδια, τα οποία σχετίζονται με τη καταπόνηση (Domka et al., 2007). Επιπλέον, το γονίδιο *rpoS* παίζει έναν καθοριστικό ρόλο στον σχηματισμό του βιοϋμενίου, καθώς κωδικοποιεί για τον  $\sigma$  παράγοντα ( $\sigma$  factor), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη καταπόνηση. Εντοπίστηκε, επίσης, το *yeaGH*, ένα γονίδιο το οποίο σχετίζεται με την καταπόνηση, δεδομένου ότι η έκφρασή του ρυθμίζεται από το *rpoS* στο *Salmonella enterica* (Schembri et al., 2003). Κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, βρέθηκε ότι επάγονται οι μεταγραφικοί παράγοντες *cspABFGI* (cold-shock) και ο μεταγραφικός παράγοντας *htgA* (heat-shock) (Domka et al., 2007). Σύμφωνα με τη μελέτη των Hancock και Klemm, κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli*, παρατηρήθηκε ότι επάγονται τα γονίδια *cspAGH*, *ibpAB*, *rphA*, *soxS*, και *yfiD* (Hancock and Klemm, 2007).

Πρόσφατη μελέτη, κατά την οποία εντοπίστηκαν τα γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϋμενίου ενός παθογόνου *E. coli* στελέχους, βρέθηκε ότι επάγεται η έκφραση πολλών γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης. Μια πρωτεΐνη, εξ αυτών, είναι η YaeT, επίσης γνωστή ως BamA, ένα συντηρημένο μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών YaeT/Omp85, οι οποίες απαιτούνται για την βιογένεση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (OMPs). Επίσης, εντοπίστηκαν τα γονίδια *YceP* (BssS) και *YliH* (BssR), τα οποία ρυθμίζουν την παραγωγή της

ινδόλης και την πρόσληψη και εξαγωγή του AI-2 αυτοεπαγωγέα, μέσω ενός cAMP εξαρτώμενου μονοπατιού (Da Re et al., 2013).

#### **A.2.2.9 Βιοϋμένιο του *E. coli***

Το *E. coli* διαθέτει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε επιφάνειες όπως το γυαλί, το ανοξείδωτο ατσάλι, το πολυαιθυλένιο, το πολυαμίδιο, το πολυβινυλοχλωρίδιο, το πολυστυρένιο κ.α. (Hancock and Klemm, 2007). Εκτιμάται ότι τα γονίδια του μικροοργανισμού *E. coli*, τα οποία εμπλέκονται ή συμμετέχουν στο σχηματισμό ενός βιοϋμενίου ανέρχονται στα 250 (Domka et al., 2007). Το βακτήριο *E. coli* χρησιμοποιεί τον QS μηχανισμό μέσω του αυτοεπαγωγέα 2 (LuxS/AI-2) (Walters and Sperandio, 2006b), ο οποίος αυξάνει την κινητικότητα και διεγείρει τον σχηματισμό του βιοϋμενίου στο αγρίου τύπου στέλεχος K-12 (Gonzalez Barrios et al., 2006). Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με νεότερα των Yoon και Sofos (Yoon and Sofos, 2008), σύμφωνα με τα οποία στέλεχος το οποίο φέρει απαλοιφή του αυτοεπαγωγέα 2 (AI-2), παραμένει το ίδιο ικανό για σχηματισμό βιοϋμενίου, όσο το στέλεχος αγρίου τύπου. Τα διαφορετικά ευρήματα συνιστούν ότι το σύστημα LuxS/AI-2 βρίσκεται σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

Η πρωτεΐνη *sdiA* (Regulatory protein) βρέθηκε να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του βιοϋμενίου, καθώς η παρουσία της είναι προαπαιτούμενη, ώστε να μειωθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του αγρίου τύπου *E. coli* (Lee et al., 2007).

Σημαντικό ρόλο στην καταστολή του βιοϋμενίου διαδραματίζει επίσης και η ινδόλη, η οποία αποτελεί προϊόν της τρυπτοφάνης μέσω της δράσης του ενζύμου της τρυπτοφανάσης και εκκρίνεται σε μεγάλη συγκέντρωση μέσω της ανάπτυξης του *E. coli* σε πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα μειωμένα επίπεδά της, εντός και εκτός του κυττάρου, οδηγούν στην αυξημένη κινητικότητα και ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η προσθήκη ινδόλης στο στέλεχος αγρίου τύπου, είχε ως συνέπεια την μείωση της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου αλλά και την επαγωγή της πρωτεΐνης *sdiA*, όπως αποδείχθηκε με τη χρήση των μικροσυστοιχιών γονιδίων. Η προσθήκη ινδόλης στο στέλεχος που φέρει απαλοιφή του γονιδίου, που κωδικοποιεί για την *sdiA*, είχε ελάχιστη επίδραση στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου αλλά προκάλεσε μείωση της κινητικότητας του *E. coli* (Lee et al., 2007).

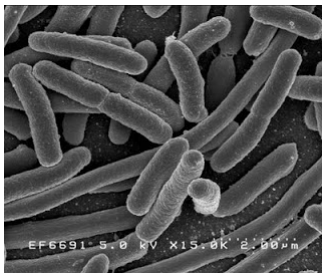
#### **A.2.3 Οι μικροοργανισμοί *E. coli* και *A. vinelandii***

##### **A.2.3.1 Ο μικροοργανισμός *E. coli***

Το βακτήριο *E. coli* είναι ένα γ-πρωτεοβακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Πρόκειται για έναν προαιρετικά αναερόβιο μικροοργανισμό και αρνητικό κατά Gram, ο οποίος φυσιολογικά ζει στην εντερική οδό ανθρώπων και ζώων. Είναι ραβδοειδούς σχήματος και το μήκος του κυμαίνεται από 1 έως 5 μm, ωστόσο παρατηρούνται μορφολογίες κόκκων και νηματοειδών κυττάρων. Τα είδη του *E. coli* περιλαμβάνουν πάνω από 250 σεροτύπους, οι οποίοι ποικίλουν από αβλαβή στελέχη-μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου έως εντεροπαθογόνα στελέχη, τα οποία προκαλούν γαστροεντερικές λοιμώξεις. Το παθογόνο στέλεχος O157:H7, που

προσβάλλει τον άνθρωπο, είναι υπεύθυνο για την αιμορραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (ΑΟΣ) και μολύνει νερό και τρόφιμα.

Το *E. coli* είναι ευέλικτο και ευπροσάρμοστο στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Είναι ικανό να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη ως το μοναδικό οργανικό συστατικό καθώς έχει τη δυνατότητα μετατροπής της σε όλα τα μακρομοριακά συστατικά που συνθέτουν το κύτταρο (Hooper and Gordon, 2001). Εκτός από γλυκόζη και λακτόζη, έχει τη δυνατότητα ζύμωσης και άλλων σακχάρων (μαλτόζη, μαννιτόλη, ξυλόζη), κατά την οποία παράγονται οξέα και αέρια. Επίσης, παράγει ινδόλη ενώ δε χρησιμοποιεί το κιτρικό νάτριο ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Ανταποκρίνεται εξόχως αποτελεσματικά σε περιβαλλοντικά σήματα, όπως διάφορα χημικά, το pH, η θερμοκρασία, η ωσμωτικότητα και άλλα, δεδομένου ότι αποτελεί ένα μονοκύτταρο οργανισμό. Για παράδειγμα, έχει την ικανότητα αίσθησης της παρουσίας ή απουσίας χημικών ουσιών και αερίων στο περιβάλλον ανάπτυξής του, πλησιάζοντας προς ή μακριά από αυτές, με την κολυμβητική κίνηση. Εναλλακτικά αναπτύσσει κροσσούς που το βοηθούν στον αποικισμό μιας επιφάνειας (Sousa, 2006). Αρκετά αρνητικά κατά Gram βακτήρια παράγουν βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες του *E. coli* ονομάζονται κολισίνες, οι οποίες είναι βακτηριοκτόνες ουσίες, όπως τα αντιβιοτικά και δρουν σε στελέχη του ίδιου ή συγγενούς είδους. Το *E. coli* αναπτύσσεται σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 10 έως 45°C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C και άριστο pH 7.2. Η ορολογική ταξινόμηση του *E. coli* γίνεται με βάση τα αντιγόνα O, K και H.



**Εικόνα A.2.6.** Μικροσκοπική απεικόνιση του μικροοργανισμού *E. coli*. Πηγή: (National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services).

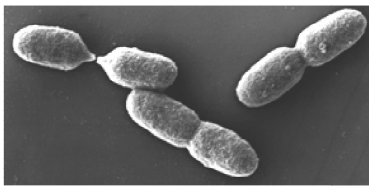
Λόγω της μακράς ιστορίας της καλλιέργειας και της ευκολίας χειρισμού του, το *E. coli* παίζει σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη μικροβιολογία και βιοτεχνολογία. Αποτελεί τον καταλληλότερο μικροοργανισμό για την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Ο υψηλός ρυθμός ανάπτυξής του, η παραγωγή υψηλής κυτταρικής βιομάζας, η απλή γενετική, η υψηλού ρυθμού μεταγραφή κλωνοποιημένων γονιδίων, καθώς φέρουν πολλαπλά αντίγραφα πλασμιδιακών φορέων έκφρασης ετερόλογων πρωτεϊνών και το ευρύ φάσμα γενετικών μεθόδων και εργαλείων που μπορούν να εφαρμοσθούν στο *E. coli* αποτελούν λίγα από τα πλεονεκτήματα. Έχει, επίσης, αλληλουχηθεί το γονιδίωμα δεκάδων στελεχών της *E. coli*.

#### **A.2.3.2 Ο μικροοργανισμός *A. vinelandii***

Το *A. vinelandii* είναι ένα γ-πρωτεοβακτήριο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Πρόκειται για έναν ελεύθερης διαβίωσης, υποχρεωτικά αερόβιο, ραβδοειδούς σχήματος μικροοργανισμό και αρνητικό κατά Gram. Εξαιρετικά ευπροσάρμοστο στις περιβαλλοντικές μεταβολές, χρησιμοποιείται ευρέως ως πρότυπος μικροοργανισμός για βιοχημικές, φυσιολογικές και γενετικές μελέτες, κυρίως όσον αφορά στη βιολογική δέσμευση του αζώτου (Dixon and Kahn, 2004).

Το *A. vinelandii* διαθέτει τρία συστήματα βιοσύνθεσης της νιτρογενάσης. Το πρώτο σύστημα, που χρησιμοποιείται και από άλλους μικροοργανισμούς όπως οι *Klebsiella pneumoniae* και *Rhizobium leguminosarum*, είναι μέσω της βιοσύνθεσης ενζύμων τα οποία περιέχουν μολυβδαίνιο. Ωστόσο, χρησιμοποιεί και δύο εναλλακτικά συστήματα βιοσύνθεσης των ενζύμων της νιτρογενάσης, τα οποία περιέχουν βανάδιο αντί για μολυβδαίνιο ή μόνο σίδηρο.

Παρά την ευαισθησία του ενζυμικού συστήματος της νιτρογενάσης παρουσία οξυγόνου, το *A. vinelandii* έχει την ικανότητα αερόβιας αζωτοδέσμευσης, λόγω της υψηλής συχνότητας αναπνοής του (Post et al., 1983), σε συνδυασμό με την ικανότητα σχηματισμού μεταβολικά αδρανών κύστεων εξασφαλίζοντας ουσιαστικά ένα ανοξικό περιβάλλον, παρά το γεγονός ότι η ενέργειά του προέρχεται από αερόβιο μεταβολισμό. (Sadoff, 1975).



**Εικόνα A.2.7.** Μικροσκοπική απεικόνιση του μικροοργανισμού *A. vinelandii*. Φωτογ. Pau R. Πηγή: (azotobacter.org).

Όμοιος με τον μικροοργανισμό *K. pneumoniae* και αντιθέτως με μικροοργανισμούς του γένους *Rhizobium*, δεν είναι συμβιωτικό με τους φυτικούς οργανισμούς. Ένα σημαντικό ενδιαφέροντος χαρακτηριστικό που παρουσιάζει το *A. vinelandii* είναι η ικανότητά του να βιοσυνθέτει τουλάχιστον τρία βιομόρια που έχουν σημαντικές βιοτεχνολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές: Ο ενδοκυτταρικός πολυεστέρας πολυ-β-υδροξυβουτυρικό (poly-β-hydroxybutyrate, PHB), ο εξωκυτταρικός αλγινικός πολυσακχαρίτης και ενώσεις κατεχόλης (σιδηροφόρα) (Díaz-Barrera and Soto, 2010). Το πλήρες γονιδίωμα του *A. vinelandii* είναι αποκωδικοποιημένο (Setubal et al., 2009). Σε αυτό συναντώνται συνολικά οκτώ γονίδια που κωδικοποιούν για PPIάσες.

## **B. Υλικά και μέθοδοι**

## **B. Υλικά και μέθοδοι**

### **B.1 *In silico* μελέτη των FKBP πρωτεϊνών**

Η αναζήτηση των γονιδίων των μικροοργανισμών *A. vinelandii* και *E. coli* που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Η αναζήτηση των τρισδιάστατων δομών των PPIακών πραγματοποιήθηκε μέσω του διαδικτυακού ιστότοπου PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Η πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών, που κωδικοποιούν για τις FKBP, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ClustalO ενώ η φυλογενετική σχέση των αμινοξικών αλληλουχιών, που κωδικοποιούν για τις FKBP του *A. vinelandii*, με τις FKBP που έχουν μελετηθεί στο μικροοργανισμό *E. coli*, εξήχθη από το δένδρογραμμα, το οποίο δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος TreeView (v.1.6.6). Η πρόβλεψη του υποκυτταρικού εντοπισμού των πιθανών FKBP των μικροοργανισμών *A. vinelandii* και *E. coli* πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα PSORT-B (<http://www.psort.org/psortb/>) ενώ ο εντοπισμός του πεπτιδίου οδηγού έγινε μέσω του προγράμματος SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Ο εντοπισμός πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις FKBP του μικροοργανισμού *E. coli*, πραγματοποιήθηκε μέσω της βάσης δεδομένων IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/main.xhtml>), η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίστηκαν μετά από την υπερέκφραση γονιδίων στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων που σχηματίστηκαν, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.

### **B.2 Ανάπτυξη μικροοργανισμών**

Ο μικροοργανισμός *E. coli* αναπτύσσεται είτε σε υγρό θρεπτικό υλικό LB (1% w/v bacto-tryptone, 0.5% w/v yeast extract και 1% w/v NaCl) είτε σε στερεό θρεπτικό υλικό LB το οποίο περιέχει επιπλέον 1.5% w/v άγαρ, στους 30°C, με την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25 µg/ml καναμυκίνη, 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη, 50 µg/ml στρεπτομυκίνη ή 25 µg/ml αμπικιλίνη) ανάλογα με τον ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης που φέρει. Τα στελέχη *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι τα BL21 DE3, XL-Blue και BW25113.

Ο μικροοργανισμός *A. vinelandii* στέλεχος DJ αναπτύσσεται είτε σε υγρό θρεπτικό υλικό Rennie (βλ. παράρτημα) (Rennie, 1981) είτε σε στερεό, το οποίο περιέχει επιπλέον 1.5% w/v άγαρ, στους 30°C.

#### **B.2.1 Καμπύλες ανάπτυξης**

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών πραγματοποιείται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης της καλλιέργειας με τη χρήση του φωτομέτρου. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πολλαπλασιάζονται αναπαρίσταται ως ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο. Αρχικά, 20 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25 µg/ml καναμυκίνη, 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη ή 25 µg/ml αμπικιλίνη), εμβολιάζονται με μια αποικία μεταλλαγμένων στελεχών *E. coli* (*ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*) ή μετασηματισμένων στελεχών με τον κατάλληλο ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης. Η

προκαλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες. Έπειτα, 2 mL της προκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 200 mL αποστειρωμένου LB που περιέχει την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών και την κατάλληλη συγκέντρωση IPTG (0 έως 0.5 mM). Έγιναν τρεις επαναλήψεις σε κάθε καμπύλη ανάπτυξης. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ -Optical Density) έγινε σε σύνολο 30 ωρών και άρχισε την στιγμή του εμβολιασμού ενώ κατά το πρώτο οκτάωρο λαμβανόταν κάθε 2 ώρες (0, 2, 4, 6, 8, 20, 26 και 30 ώρες). Για τη μέτρηση λαμβανόταν 1 mL καλλιέργειας. Για την πιο αξιόπιστη μέτρηση της απορρόφησης της κάθε καλλιέργειας γίνονται διαδοχικές αραιώσεις.

Σε κάθε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας λαμβάνεται 1 mL καλλιέργειας μέρος του οποίου χρησιμοποιείται για την επίστρωση σε τρυβλίο. Συγκεκριμένα, 1 mL καλλιέργειας αραιώνεται με αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό LB ώστε να προκύψουν οι αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  ή  $10^{-8}$ . Έπειτα 10  $\mu$ L της αραιωμένης πλέον καλλιέργειας επιστρώνονται σε στερεό θρεπτικό υλικό LB το οποίο περιέχει την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών, χωρίς την προσθήκη IPTG. Τα τρυβλία επωάζονται για 20 ώρες στους 30°C και έπειτα λαμβάνονται οι μετρήσεις των αποικιών οι οποίες προέρχονται από ένα μοναδικό κύτταρο. Για την πιο αξιόπιστη μέτρηση του αριθμού των αποικιών γίνεται καταμέτρηση μόνο στα τρυβλία στα οποία έχουν αναπτυχθεί από 30 έως 300 αποικίες. Ο αριθμός των ζώντων κυττάρων ανά mL (CFU/mL) αρχικού διαλύματος υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των αποικιών ανά τρυβλίο με τον παράγοντα αραιώσης.

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών προκύπτει από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) ή των CFUs, κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Συγκεκριμένα, η προέκταση της ευθείας που σχηματίζεται κατά την εκθετική ανάπτυξη έχει μια κλίση, έναντι του χρόνου ανάπτυξης. Η κλίση αυτής της ευθείας είναι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του οργανισμού, ο οποίος είναι ένα μέτρο του αριθμού των διαιρέσεων ανά κύτταρο ανά μονάδα χρόνου. Λαμβάνοντας την ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου ως 100%, δηλαδή την κλίση της ευθείας που σχηματίζει το στέλεχος αγρίου τύπου κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης ως άριστη τιμή και ανάγοντας την κλίση της ευθείας που σχηματίζουν τα υπόλοιπα στελέχη επί τοις %, εξήχθη ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των υπό μελέτη στελεχών.

Επίσης τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά. Λαμβάνονται 10  $\mu$ L από την καλλιέργεια μεταφέρονται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες. Στη συνέχεια μονιμοποιούνται πάνω από φλόγα του λύχνου προσεκτικά, μέχρι να εξατμιστεί το νερό. Στις αντικειμενοφόρες πλάκες πραγματοποιήθηκε χρώση DAPI κατά την οποία χρωματίζεται το DNA με τη χρωστική 4',6-diamidino-2-phenylindole. Συγκεκριμένα, διαβρέχεται το μονιμοποιημένο παρασκεύασμα με 100  $\mu$ L τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu$ g/mL διαλύματος 4',6-diamidino-2-phenylindole. Στη συνέχεια εφαρμόζεται πάνω στο παρασκεύασμα μια καλυπτρίδα και ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού με μεγέθυνση 40x.



## B.3 Μοριακή μελέτη

### B.3.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Tissue Kit). Αρχικά 5 mL θρεπτικού υλικού LB, με την κατάλληλη δόση αντιβιοτικών, εμβολιάζονται με μια αποικία μετασχηματισμένων με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 30°C για 20 ώρες. Από την καλλιέργεια αυτή 1 mL μεταφέρεται σε σωλήνα errendorf και φυγοκεντρείται στις 10.000 στρ./λεπτό για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 180 µL διαλύματος T1 (lysis buffer) και αμέσως προστίθενται 25 µL διαλύματος πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O). Ακολουθεί μηχανική ανακίνηση (vortex) και επώαση στους 56°C για 1 έως 5 ώρες ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων (έως ότου το εναιώρημα να καταστεί διαυγές) κατά την οποία το δείγμα ανακινείται συχνά. Έπειτα προστίθενται 200 µL διαλύματος B3 και επώαση στους 70°C για 10 λεπτά υπό συχνή ανακίνηση. Ακολουθεί προσθήκη 210 µL 100% v/v αιθανόλης, το δείγμα ανακινείται, μεταφέρεται σε κολώνα NucleoSpin Tissue column και φυγοκεντρείται στις 10.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό. Έπειτα ακολουθεί έκπλυση του δείγματος με 500µL διαλύματος BW και φυγοκέντρηση στις 10.000 στρ./λεπτό για 1 λεπτό. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 20-30 µL ddH<sub>2</sub>O και το απομονωμένο DNA αποθηκεύεται στους -20°C.

### B.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

#### B.3.2.1 Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του DNA. Οι συνθήκες που ορίζονται για μια αντίδραση PCR προσαρμόζονται στις απαιτήσεις του πειράματος. Η συγκέντρωση του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα μιας αντίδρασης PCR εξαρτάται από το είδος του καθώς όταν πρόκειται για πλασμιδιακό DNA προστίθεται από 1 pg έως 10 ng ανά 50 µL αντίδρασης ενώ όταν πρόκειται για γονιδιωματικό DNA προστίθεται από 50 έως 500 ng. Η τελική συγκέντρωση των εκκινητών μιας αντίδρασης PCR κυμαίνεται από 0.5 έως 1 µM ανά 50 µL αντίδρασης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται ανάλογα με το μήκος τους σε νουκλεοτίδια, τη θερμοκρασία υβριδισμού, το περιεχόμενο σε GC και τη μεταξύ τους συμπληρωματικότητα. Συγκεκριμένα η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται κάθε φορά από τη θερμοκρασία τήξεως τους (T<sub>m</sub>). Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά μιας τυπικής αντίδρασης PCR.

DNA Μήτρα	1 µL
Πρόσθιος εκκινητής (30 µM)	1 µL
Ανάστροφος εκκινητής (30 µM)	1 µL
Μίγμα dNTPs (10 mM)	1 µL
DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο)	2.5 µL
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR (10x)	5 µL

DNA Πολυμεράση (1 u/μL) 1 μL  
ddH<sub>2</sub>O ως τελικό όγκο 50 μL

Αφού τοποθετηθούν τα παραπάνω συστατικά σε σωλήνα erpendorf ακολουθεί καλή ανάδευση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή (MJ Mini, PTC-1148, Biorad). Μια τυπική αντίδραση PCR περιλαμβάνει:

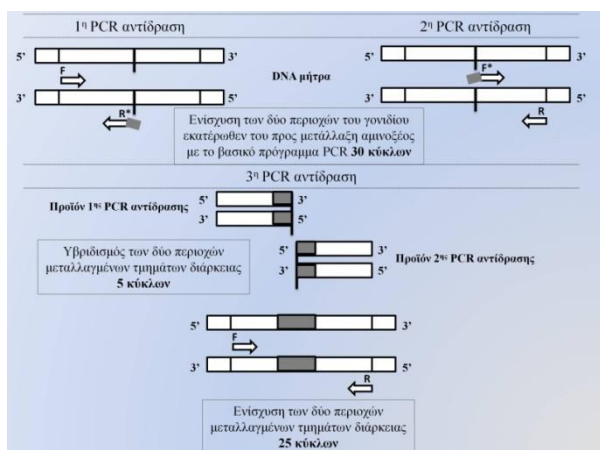
Αρχική αποδιάταξη	94°C 4 λεπτά	} 30 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C 1 λεπτό	
Υβριδισμός εκκινητών	58°C 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72°C 10 λεπτά	

Το πρόγραμμα δυο σταδίων (PCR *site-directed mutagenesis*) ή SOE (*Splicing by Overlap Extension*) (Horton, 1995) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση σημειακής μετάλλαξης στο ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης της κάθε FKBP πρωτεΐνης είναι το εξής:

Αρχική αποδιάταξη	94°C 4 λεπτά	} 5 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C 1 λεπτό	
Υβριδισμός τμημάτων DNA	54°C 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C 1 λεπτό	} 25 κύκλοι
Αποδιάταξη	94°C 1 λεπτό	
Υβριδισμός εξωτερικών εκκινητών	58°C 1 λεπτό	
Επιμήκυνση	72°C 1 λεπτό	
Τελική επιμήκυνση	72°C 10 λεπτά	

Οι εσωτερικοί εκκινητές (F\* και R\*) είναι σχεδιασμένοι κατάλληλα ώστε να υβριδίζουν σε θέσεις εκατέρωθεν του προς μετάλλαξη αμινοξέος. Κατά τη μέθοδο SOE εφαρμόζονται συνολικά 3 PCR αντιδράσεις. Οι δύο πρώτες αντιδράσεις περιλαμβάνουν την ενίσχυση των δύο περιοχών του γονιδίου εκατέρωθεν του προς μετάλλαξη αμινοξέος, με την προσθήκη ενός εξωτερικού και ενός εσωτερικού εκκινητή ανά αντίδραση. Η τρίτη αντίδραση περιλαμβάνει την ένωση των δύο περιοχών που ενισχύθηκαν κατά τους πρώτους 5 κύκλους χρησιμοποιώντας σαν μήτρες τα προϊόντα των προηγούμενων PCR αντιδράσεων. Κατά τους 25 κύκλους που ακολουθούν πραγματοποιείται ενίσχυση των μεταλλαγμένων πλέον DNA αλυσίδων, με την προσθήκη των εξωτερικών εκκινητών (F και R). Μετά το πέρας της μιας PCR αντίδρασης τα δείγματα αναλύονται σε πήκτωμα αγαρόζης.

Το σχεδιάγραμμα απεικονίζει αναλυτικά τα δύο στάδια των συνολικά τριών PCR αντιδράσεων που ακολουθούνται κατά το πρόγραμμα SOE (Εικόνα Β.1).



**Εικόνα Β.1.** Σχεδιαγραμματική αναλυτική απεικόνιση των δύο σταδίων εκ των συνολικά τριών PCR αντιδράσεων που ακολουθούνται κατά το πρόγραμμα SOE.

Στον πίνακα Β.1. που ακολουθεί αναφέρονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

**Πίνακας Β.1.** Κατάλογος εκκινητών:

Γονίδιο/Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητών
<i>Avin.42970.S.F</i>	5'-GGGCATATGGGAAAAATCATCGGTATCGATC-3'
<i>Avin.42970.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTTGTTCGCCCTTGCTGTCCTTG-3'
<i>Avin.11800.H.F</i>	5'-AAAGGATCCTGAGCTGCGCATCGGTCCCGATC-3'
<i>Avin.11800.H.R</i>	5'-ACCAAGCTTGACGGCCCTGACCTCGAGGATTTCC-3'
<i>Avin.46820.S.F</i>	5'-AGGCATATGAGCGTGC GGCGCTTCGCCCTC-3'
<i>Avin.46820.S.R</i>	5'-AAAGGTACCCCGGCCGGTGCTCATCCGGTAG-3'
<i>Avin.44220.H.F</i>	5'-AAAGGATCCCAGCGAACTGCAGATCGAGGAC-3'
<i>Avin.44220.H.R</i>	5'-AAAAAGCTTGTGTCGCCGCGTCAGCACTTCC-3'
<i>Avin.35210.H.F</i>	5'-CCAGGATCCCTTGGTGGGTCTGGTTCTTTCCG-3'
<i>Avin.35210.H.R</i>	5'-AAAAAGCTTCTGGCCTTGGGCTTCGCCCTGC-3'
<i>Avin.42940.S.F</i>	5'-GGGCATATGACTAAGCCAGCCATTCTCGCC-3'
<i>Avin.42940.S.R</i>	5'-AAAGGTACCGCGACGCTTGGCCATCTCGGC-3'
<i>Avin.45210.S.F</i>	5'-GGGATTAATGAAAGCAGGTCTGTACCATCCTGAAG-3'
<i>Avin.45210.S.R</i>	5'-AAAAGATCTTGC GGGTTGGCGGGGTGCTGGAAAG-3'
<i>Avin.42940.H.F</i>	5'-GGCGAATTCGACTAAGCCAGCCATTCTCGCC-3'
<i>Avin.42940.H.R</i>	5'-AAAAAGCTTGC GACGCTTGGCCATCTCGGCG-3'
<i>Avin.11810.S.F</i>	5'-CCCCATATGCACATCAAGCTTGCCAATCCCC-3'
<i>Avin.11810.S.R</i>	5'-AAAGGTACCGTCCGACGACACCACCCGCAAC-3'
<i>Avin.11770.S.F</i>	5'-AAACATATGGGCCTGCCAGTTGCGTGGTGA-3'
<i>Avin.11770.S.R</i>	5'-AAAGGTACCTCGTTGTTCCGGGCTCGTGAGTA-3'
<i>Avin.35210.Y194A.F</i>	5'-CCCAGTGATCTGGAAGCAGGCGAGCAAAGCCCG-3'
<i>Avin.35210.Y194A.R</i>	5'-CGGGCTTTGCTCGCCTGCTTCCAGATCACTGGG-3'
<i>Avin.44220.Y84A.F</i>	5'-CCGGCCCCGCTCGCCGAGGCGAGCGGCAGGTC-3'
<i>Avin.44220.Y84A.R</i>	5'-GACCTGCCGCTCGCCTGGGCGAGGCGGGCCGG-3'
<i>Avin.42940.P358A.F</i>	5'-CACCCGGAGGCCAGCGCAGGCCCGCATGACGTG-3'
<i>Avin.42940.P358A.R</i>	5'-CACGTCATGCGGGCTGCGCTGGCCTCCGGGTG-3'
<i>AvOP.Δ35210.pK18.F1</i>	5'-GGGGAATTCTAGAATGCGCCCCACTTCGAGAGC-3'
<i>AvOP.Δ35210.pK18.R1</i>	5'-CCTTGGGCTTCGCCCTGCTCCACAGCAACCCGAAAGAACCAGACCCAC-3'
<i>AvOP.Δ35210.pK18.F2</i>	5'-GTGGGTCTGGTCTTTCCGGGTTGCTGTGGAGCAGGGCGAAGCCCAAGG-3'

<i>AvOP.Δ35210.Pk18.R2</i>	5'-AACAAGCTTTTCTCCACGCCACCAGGCCAGGCA-3'
<i>Avin.35120.S.F</i>	5'-AAACATATGGCCCAAGATCCTCGTAGTCACTTCCG-3'
<i>Avin.35120.S.R</i>	5'-AAAGATATCTCGGGCCTCCGAACAAGCGTTGC-3'
<i>Avin.27700.S.F</i>	5'-GGGCATATGCCCGTCATCAATACCAACATCACG-3'
<i>Avin.27700.S.R</i>	5'-AAAGATATCCCCAGCAGCGACAGTACCGATTGC-3'
<i>Avin.24340.S.F</i>	5'-GGGCATATGGATATCACCGATTTCTACGACACC-3'
<i>Avin.24340.S.R</i>	5'-AAAGGTACCTGACGGCATCGGCTCCTGTTCCGG-3'
<i>Avin.12650.S.F</i>	5'-GGGCATATGTTCAAGAACTCCGTGGCATGTT-3'
<i>Avin.12650.S.R</i>	5'-AAAGGTACCCTCGGTGGAGAGCAGATCCATGC-3'
<i>Ec.b0014.S.F</i>	5'-GGGCATATGGGTAATAATTGGTATCGACC-3'
<i>Ec.b0014.S.R</i>	5'-GGGCTCGAGTTTTTTGTCTTTGACTTCTTCA-3'
<i>Ec.b3989.S.F</i>	5'-GGGCATATGGTTTACTCCTATACCGAGAAA-3'
<i>Ec.b3989.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTCGTCTTCCAGTTCGATGTTG-3'
<i>Ec.b0028.H.F</i>	5'-CCAGGATCCGTCTGAATCTGTACAGAGCAATAG-3'
<i>Ec.b0028.H.R</i>	5'-AAAAAGCTTTTACGCCTCCAGTGCCGGATCG-3'
<i>Ec.b0032.S.F</i>	5'-GGGCATATGATTAAGTCAGCGCTATTGGTTC-3'
<i>Ec.b0032.S.R</i>	5'-AAACTCGAGCTTAGCGTTTTTACGGTACTGC-3'
<i>Ec.b0029.S.F</i>	5'-AGGATTAATATGCAGATCCTGTTGGCCAACC-3'
<i>Ec.b0029.S.R</i>	5'-AAACTCGAGATCGACTTACGAATATCGACA-3'
<i>Ec.b3347s.H.F</i>	5'-CGCCTGCAGGAAGCTGCAAAACCTGCTACA-3'
<i>Ec.b3347s.H.R</i>	5'-CGCAAGCTTTTATTTTTTAGCAGAATCTGCGGC-3'
<i>Ec.b3347.H.F</i>	5'-GGGCCATGGAATCACTGTTTAAAGTAACGC-3'
<i>Ec.b3347.H.R</i>	5'-GTGCTCGAGTTTTTTAGCAGAATCTGCGGC-3'
<i>Ec.b4207.H.F</i>	5'-CCAGGATCCGACCACCCCACTTTTGACACC-3'
<i>Ec.b4207.H.R</i>	5'-CGCAAGCTTTTAGAGATTTCCAGCAGTTC-3'
<i>Ec.b3349.H.F</i>	5'-CCCGGATCCGAAAGTAGCAAAAGACCTGGTG-3'
<i>Ec.b3349.H.R</i>	5'-CGCAAGCTTTTAGTGGCAACCGCAACCGCC-3'
<i>Ec.b0436.H.F</i>	5'-CCCGGATCCGCAAGTTTCAGTTGAAACCACTC-3'
<i>Ec.b0436.H.R</i>	5'-CGCAAGCTTTTACGCCTGCTGGTTCATCAGC-3'
<i>Ec.b3347.Y225A.F</i>	5'-CCACCAGAACTGGCTGCCGGCAAAGCGGGTGT-3'
<i>Ec.b3347.Y225A.R</i>	5'-AACACCCGCTTTGCCGGCAGCCAGTTCTGGTGG-3'
<i>Ec.b4207.Y181A.F</i>	5'-CCGCAGGAAGTGGCAGCTGGCGAGCGCGGCA-3'
<i>Ec.b4207.Y181A.R</i>	5'-TGCGCCGCGCTCGCCATATGCCAGTTCCTGCGG-3'
<i>Ec.b0028.D119A.F</i>	5'-CGCGAAATTAACGGCGCCTCCATTACCGTTGAT-3'
<i>Ec.b0028.D119A.R</i>	5'-ATCAACGGTAATGGAGGCGCGGTTAATTTGCGG-3'
<i>Ec.b3349.F132A.F</i>	5'-GGTCAGAACCTGAAAGCCAACGTTGAAGTTGTG-3'
<i>Ec.b3349.F132A.R</i>	5'-CACAACCTCAACGTTGGCTTTCAGGTTCTGACC-3'
<i>Ec.b0436.V66G.F</i>	5'-CTGTACGCCAGGACGGCCTGGGTGACCTGATGA-3'
<i>Ec.b0436.V66G.R</i>	5'-TCATCAGGTCACCCAGGCCGTCCTGGCGTACAG-3'
<i>Ec.b0029.P8A.F</i>	5'-AAAATTAATATGCAGATCCTGTTGGCCAACGCGGTGG-3'
<i>Ec.b0029.P32A.F</i>	5'-GCCATTTACGGCGCAGCGATATATGTCCGTAC-3'
<i>Ec.b0029.P32A.R</i>	5'-GTGACGGACATATATCGCTGCGCCGTAATGGC-3'
<i>Ec.b0436.F198A.F</i>	5'-CGTATGATCCCGGGCGCTGAAGACGGTATCAAA-3'
<i>Ec.b0436.F198A.R</i>	5'-TTTGATACCGTCTTCAGCGCCCCGGGATCATACG-3'
<i>Ec.b0958.S.F</i>	5'-AAACATATGTACTTTCAGGCTATGCACATC-3'
<i>Ec.b0958.S.R</i>	5'-CCCCAATTGTGATACAAATTAGAGTGAATTT-3'
<i>Ec.b2412.S.F</i>	5'-CCGCATATGATGCAGGATTTGCGTCTGATAT-3'
<i>Ec.b2412.S.R</i>	5'-AAACAATTGGCGTTGGCGTCTTTGACTTCGC-3'
<i>Ec.b0890.S.F</i>	5'-GGGCATATGAGCCAGGAATACATTGAAGACAAAG-3'

<i>Ec.b0890.S.R</i>	5'-AAAGGTACCGTCAAACGGCGGTGGGGCCAGC-3'
<i>Ec.b0093.S.F</i>	5'-AAAATTAATTCGCAGGCTGCTCTGAACACGC-3'
<i>Ec.b0093.S.R</i>	5'-GGGCAATTGTGTGTTCTGCCTGTGCCTGAT-3'
<i>Ec.b1176.S.F</i>	5'-AAACATATGTCAAACACGCCAATCGAGCTTA-3'
<i>Ec.b1176.S.R</i>	5'-AAACAATTGTTTAACGGTTGAACGGTCAAAG-3'
<i>Ec.b0095.S.F</i>	5'-GGGCATATGTTTGAACCAATGGAACCTTACC-3'
<i>Ec.b0095.S.R</i>	5'-AAACAATTGTCAGCTTGCTTACGCAGGAATG-3'

### B.3.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

Για την ανάλυση τμημάτων του DNA διαφορετικού μεγέθους και διαφορετικών διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA είναι ανάλογος του μεγέθους των μορίων DNA μέγεθός τους. Η αναλυτική ικανότητα της πηκτής αγαρόζης είναι ανάλογη της περιεκτικότητας της σε αγαρόζη:

Αγαρόζη (%w/v)	Εύρος διαχωρισμού τμημάτων DNA (kb)
0.5	10-30
0.75	8-12
1	0.5-10
1.25	0.4-7
1.5	0.2-3
2	0.01-0.5

Για την προετοιμασία της πηκτής αγαρόζης, κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης προστίθεται σε 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM οξικό οξύ και 1 mM EDTA). Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι τους 50°C και έπειτα προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.001% v/v. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης ενώ παράλληλα εφαρμόζεται το κατάλληλο κάθετο καλούπι (κτένα) ώστε να σχηματιστούν οι θέσεις φόρτωσης και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή και απομακρυνθεί η κτένα, τοποθετείται εντός της συσκευής και προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE μέχρι να καλυφθεί όλη η πηκτή. Στα DNA δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθενται 1/10 του όγκου του δείγματος, διάλυμα φόρτωσης (0.25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% w/v κυανόλη του ξυλενίου και 30% v/v γλυκερόλη). Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις φόρτωσης και η συσκευή τίθεται σε λειτουργία με τάση ηλεκτρικού πεδίου που δεν ξεπερνά τα 5 Vcm<sup>-1</sup> και χρόνος εφαρμογής ανάλογο των δειγμάτων. Τα μόρια του DNA γίνονται ορατά στην πηκτή αγαρόζης επειδή το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων και φθορίζει υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας.

### B.3.4 Απομόνωση τμήματος DNA από πηκτή αγαρόζης

Για την απομόνωση προϊόντος ενίσχυσης μέσω PCR από πηκτή αγαρόζης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Gel and PCR Clean-up). Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1.5% το τμήμα το οποίο περιέχει την επιθυμητή ζώνη DNA κόπτεται μηχανικά με τη χρήση νυστεριού. Το τμήμα αυτό τοποθετείται σε σωλήνα

erpendorf και ζυγίζεται. Στον σωλήνα erpendorf μεταφέρονται για κάθε 100 mg του τμήματος πηκτής αραρόζης, 200 μL διαλύματος NT1. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50 °C για 5–10 λεπτά ή έως ότου διαλυθεί πλήρως το τμήμα της πηκτής. Έπειτα μεταφέρεται σε στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column και φυγοκεντρείται στις 11.000 στρ/λεπτό για 1 λεπτό. Το υγρό που εκλύεται από τη στήλη απομακρύνεται και προστίθενται 700 μL Buffer NT3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11.000 στρ/λεπτό για 1 λεπτό, έπειτα το υγρό που εκλύεται από τη στήλη απομακρύνεται και η στήλη φυγοκεντρείται ξανά στις 11.000 στρ/λεπτό για 2 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί περίσσεια του διαλύματος που προστέθηκε. Έπειτα στη στήλη, η οποία μεταφέρεται σε νέο erpendorf, προστίθενται 50 μL ddH<sub>2</sub>O. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 11.000 στρ/λεπτό για 1 λεπτό. Το υγρό που συγκεντρώνεται περιέχει το προς απομόνωση DNA. Ακολουθεί υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, με τη βοήθεια φωτομετρικής συσκευής (NanoDrops ND-1000).

### **B.3.5 Πέψη DNA με τη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού**

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού πραγματοποιούν την τμήση του DNA κατά την οποία παράγουν είτε τυφλά είτε κολλώδη άκρα. Τα ένζυμα περιορισμού επιλέγονται με βάση τη θέση στην οποία επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε ένα τμήμα DNA σε ένα πλασμιδιακό φορέα έκφρασης. Η διαδικασία έχει ως εξής: σε σωλήνα erpendorf τοποθετείται το δείγμα του DNA, η ενδονουκλεάση περιορισμού, το ρυθμιστικό διάλυμα που απαιτείται για τη δράση του ενζύμου και ο απαραίτητος όγκος ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 25-30 μL. Για κάθε μg δείγματος DNA χρησιμοποιείται μια μονάδα ενζύμου (1 unit). Μια τυπική αντίδραση πέψης περιλαμβάνει:

Δείγμα DNA	10-20 μL (τελικής συγκέντρωσης 200-500 ng)
Ένζυμο περιορισμού	1 μL
10x ρυθμιστικό διάλυμα ενδονουκλεάσης	2 μL
ddH <sub>2</sub> O	ως τελικό όγκο 25-30 μL

Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 2-3 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία (30 ή 37°C). Μετά το πέρας της αντίδρασης τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή αραρόζης.

### **B.3.6 Ενοποίηση τμημάτων DNA με τη χρήση DNA λιγάσης**

Με τη χρήση της T4 DNA λιγάσης καταλύεται ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ μιας 5' φωσφορικής ομάδας και μιας 3' υδροξυλομάδας νουκλεοτιδίων δίκλωνου μορίου DNA. Για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας επιτυχούς ενοποίησης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης, η αναλογία άκρων πλασμιδίου και ένθετου DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του DNA ένθεσης χρησιμοποιείται ο εξής τύπος:

(ng πλασμιδιακού φορέα \* kb DNA ένθεσης / kb πλασμιδιακού φορέα) \* 3 = ng DNA ένθεσης.

Μια τυπική αντίδραση ενοποίησης τμημάτων DNA σε πλασμιδιακό φορέα περιλαμβάνει:

Ένθετο DNA	x μL
Πλασμιδιακός φορέας	x μL

10x ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	1.5 μL
T4 DNA λιγάση (1 u/μL)	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	ως τελικό όγκο 10 μL

Το δείγμα αναμιγνύεται και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 4°C. Ακολουθεί μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* XL-Blue με τα δείγματα για τον πολλαπλασιασμό των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Έπειτα από την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, η επιτυχής ενοποίηση διαπιστώνεται μέσω πέψης του με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

### B.3.7 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε από τον Jahn (Jahn et al., 2008). Αρχικά εμβολιάζονται 5 mL LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 μg/ml καναμυκίνη ή 25 μg/ml χλωραμφαινικόλη ή 50 μg/ml στρεπτομυκίνη), με την κατάλληλη αποικία *E. coli* και επωάζονται, υπό συνεχή ανακίνηση, για περίπου 20 ώρες στους 37°C. Από τα 5 mL της καλλιέργειας χρησιμοποιείται 1 mL για τον εμβολιασμό 100 mL LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C, για περίπου 2 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD<sub>600nm</sub>-Optical Density) να ανέλθει περίπου στα 0.3-0.4. Από την καλλιέργεια 10 mL μεταφέρονται σε σωλήνες και φυγοκεντρώνονται στις 10.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 800 μL διαλύματος λύσης (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA και 10 μL λυσοζύμη 50 mg/mL), αμέσως προστίθενται 80 μL διαλύματος 10% SDS w/v και αφού αναδευτεί επωάζεται στους 64°C για 2 λεπτά. Προστίθενται 88 μL NaOAc pH 5.2 και ίσος όγκος φαινόλης ενώ ακολουθεί επώαση στους 64°C για 6 λεπτά η οποία συνοδεύεται από συχνή ανάδευση κάθε 40 δευτερόλεπτα. Τα δείγματα μεταφέρονται στον πάγο και φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στρ./λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C. Η υδατική φάση αναμιγνύεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου και φυγοκεντρείται άμεσα στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C. Η υδατική φάση που προκύπτει αναμιγνύεται με 1/10 του αρχικού όγκου NaOAc 3M pH 5.2, 1M EDTA αλλά και αιθανόλη 100% v/v σε διπλάσιο του αρχικού όγκου. Τα δείγματα αναδεύονται και αποθηκεύονται στους -80°C επί 16-18 ώρες. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στρ./λεπτό για 25 λεπτά, στους 4°C. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου, έκπλυση του ιζήματος με 80% v/v παγωμένη αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και οι σωλήνες erpendorf αφήνονται ανοιχτοί στον πάγο για περίπου 10 λεπτά ώστε η περίσσεια αιθανόλης να εξατμιστεί. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 100 μL ddH<sub>2</sub>O, το οποίο είναι απαλλαγμένο από RNάση. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά και η ποιότητα του RNA διαπιστώνεται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2%.

### B.3.8 Χειρισμός ολικού RNA και καθαρισμός με φαινόλη

Στην συνέχεια ακολουθεί απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA και καθαρισμός του RNA με φαινόλη. Στην αντίδραση χρησιμοποιούνται 4-5 μg RNA σε όγκο 20 μL (σε ddH<sub>2</sub>O). Προστίθενται 10 μL διαλύματος DNάσης το οποίο έχει προετοιμαστεί σε όγκο επαρκή του αριθμού των δειγμάτων. Το διάλυμα DNάσης περιέχει τα εξής:

1 μL DNάσης

0.5  $\mu\text{L}$  RNase inhibitor (παρεμποδιστής)

3  $\mu\text{L}$  10x ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης (400 mM Tris-HCl pH 7.5 και 60 mM  $\text{MgCl}_2$ )

5.5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O

Έπειτα ακολουθεί απενεργοποίηση της DNάσης και καθαρισμός με φαινόλη. Συγκεκριμένα στο δείγμα προστίθεται αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι ίσος με 200  $\mu\text{L}$ . Στο δείγμα προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου 1:1 και αναδεύεται και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα errendorf και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου και αναδεύεται ενώ έπειτα φυγοκεντρείται στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C. Η υδατική φάση που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση αναμιγνύεται με 1/10 του αρχικού όγκου NaOAc 3M pH 5.2, 1M EDTA αλλά και αιθανόλη 100% v/v σε διπλάσιο του αρχικού όγκου. Τα δείγματα αναδεύονται και αποθηκεύονται στους -80°C επί 16-18 ώρες. Έπειτα, τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 στρ./λεπτό για 25 λεπτά, στους 4°C. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου, έκπλυση του ιζήματος με 80% v/v παγωμένη αιθανόλη και φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά, στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και οι σωλήνες errendorf αφήνονται ανοιχτοί στον πάγο για περίπου 10 λεπτά ώστε η περίσσεια αιθανόλης να εξατμιστεί. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, το οποίο είναι απαλλαγμένο από RNάση. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA προσδιορίζεται φωτομετρικά και η ποιότητα του RNA διαπιστώνεται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2%.

### **B.3.9 Προσδιορισμός συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε σε φωτόμετρο NanoDrop ND-1000. Το δείγμα των νουκλεϊκών οξέων βρίσκεται διαλυμένο σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O.

### **B.3.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription polymerase chain reaction) πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη μεταγραφή σε cDNA του απομονωμένου και καθαρού RNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε το απομονωμένο ολικό RNA του μικροοργανισμού *A. vinelandii* και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι τυχαίοι (εξαμερή).

Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά σε μια τυπική αντίδραση RT-PCR.

RNA Μήτρα (1 ng-5 $\mu\text{g}$ )	1 $\mu\text{L}$
Εκκινητές (250 ng/mL)	1 $\mu\text{L}$
Μίγμα dNTPs (10 mM)	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	ως τελικό όγκο 12 $\mu\text{L}$

Η αποδιάταξη του RNA πραγματοποιείται με επώαση στους 65°C για 5 λεπτά. Έπειτα μεταφέρεται στον πάγο. Ακολουθεί προσθήκη των:



RNase out (40 u/μL)		1 μL
DTT (0.1 M)		2 μL
5x Ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης αλυσίδας		4 μL
Αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II RT (Invitrogen) (200 u/μL)		1 μL
ddH <sub>2</sub> O	ως τελικό όγκο	20 μL

Το μείγμα επωάζεται στους 25 °C για 10 λεπτά, έπειτα στους 42°C για 50 λεπτά ενώ η αντίδραση διακόπτεται στους 70°C για 15 λεπτά. Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C.

### **B.3.11 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)**

Ο βέλτιστος τρόπος μέτρησης της ποσότητας των προϊόντων DNA και κατ' επέκταση της παρακολούθησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου στόχου κατά τη διάρκεια μιας PCR αντίδρασης είναι με τη χρήση ποσοτικοποιημένων μεθόδων πραγματικού χρόνου (Real-time quantitative PCR). Η παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης βασίζεται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ουσίας (SYBR Green), η οποία έχει την ιδιότητα φθορισμού κατά την πρόσδεσή της σε δίκλινα μόρια DNA. Συγκεκριμένα, κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA η χρωστική SYBR Green βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή με συνέπεια να μη φθορίζει. Κατά την πρόσδεση των εκκινητών και την επιμήκυνση, όπου δημιουργείται δίκλινο μόριο DNA, η SYBR Green προσδέεται σε αυτό με αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση του φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ανίχνευση του φθορισμού πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 520 nm. Η μέθοδος με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και απαιτεί ιδιαίτερα προσεκτικούς χειρισμούς για την ορθή λήψη μετρήσεων φθορισμού, καθώς η χρωστική έχει την ικανότητα να προσδέεται σε οποιοδήποτε δίκλινο μόριο DNA ή σε διμερή εκκινητών που δημιουργούνται σε μια τυπική αντίδραση PCR.

Με τη χρήση ποσοτικού πραγματικού χρόνου RT-qPCR, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1*, *AvfkbA2* και *Ancara*. Τα κύτταρα ελήφθησαν κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο Burk με και χωρίς προσθήκη επιπλέον αζώτου. Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το *AvrecA* (*Avin\_38560*). Οι μετρήσεις των επιπέδων του φθορισμού της χρωστικής SYBR Green πραγματοποιήθηκαν στο τέλος κάθε κύκλου της αντίδρασης με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή Mx3005P (Stratagene) και η ανάλυση έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα MxPro-3005P. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν μέσω της διαδικτυακής μηχανής Primer-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ώστε να έχουν ίση θερμοκρασία αποδιάταξης (60°C).

Παρακάτω αναφέρονται τα συστατικά σε μια τυπική αντίδραση RT-qPCR:

cDNA (έως 20 ng)		1 μL
Πρόσθιος εκκινητής (10 μM)		2 μL
Ανάστροφος εκκινητής (10 μM)		2 μL
2x SYBR Green Master Mix		5 μL

Τελικός όγκος 10  $\mu$ L

Τα παραπάνω συστατικά τοποθετούνται σε ειδικές πλάκες 96 θέσεων ενώ ακολουθεί καλή ανάδευση. Όταν ετοιμαστεί η πλάκα των 96 δειγμάτων, αυτή επικαλύπτεται με το κατάλληλο καπάκι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση της πλάκας για 3-4 λεπτά. Επίσης χρησιμοποιούνται ως δείγματα ελέγχου, δείγματα τα οποία δεν έχουν υποστεί αντίστροφη μεταγραφή (RT), καθώς και δείγματα στα οποία αντί για cDNA προστίθεται ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Το βασικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του DNA είναι το εξής:

Ενεργοποίηση πολυμεράσης	95°C 10 λεπτά	} 40 κύκλοι
Αποδιάταξη	95°C 45 δευτερόλεπτα	
Επιμήκυνση	60°C 1 λεπτό	

Κατά το τελευταίο στάδιο τα δείγματα από τους 60°C θερμαίνονται στους 95°C. Από το στάδιο αυτό λαμβάνεται η καμπύλη τήξης στην οποία η παρουσία μιας κορυφής υποδηλώνει ότι έχει ενισχυθεί ένα μόνο προϊόν. Έπειτα ακολουθεί ανάλυση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v για τη διαπίστωση της εξειδίκευσης των εκκινητών ή τον σχηματισμό διμερών.

Η σχετική έκφραση των γονιδίων σε θρεπτικό υλικό Burk, σε σχέση με την έκφραση σε θρεπτικό υλικό LB με ποσοτικοποίηση ως προς το γονίδιο *Anreca* (REF), υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο, ο οποίος περιγράφηκε από τον Pfaffl, 2001:

$$R = E_{GOI}^{(Ct_{CONTROL} - Ct_{SAMPLE})_{GOI}} / E_{REF}^{(Ct_{CONTROL} - Ct_{SAMPLE})}$$

Η αποδοτικότητα E της PCR αντίδρασης για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε από τη γραμμική συνάρτηση του λογαρίθμου της απορρόφησης ανά κύκλο αντίδρασης με τη χρήση του λογισμικού LinRegPCR (Ruijter et al., 2009). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA μέσω του Tukey's Multiple Comparison Test (GraphPad Software, San Diego, CA).

Στον πίνακα Β.2 που ακολουθεί αναφέρονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

**Πίνακας Β.2.** Κατάλογος εκκινητών:

Avin.40820.RT-qPCR.F	5'-TTACAGCACGTCCAGCAGTTCGAC-3'
Avin.40820.RT-qPCR.R	5'-GCGGCAGCAAATGGCGTCTTT-3'
Avin.11800.RT-qPCR.F	5'-GATCGGGAAGTCACCCTGCATTTGCG-3'
Avin.11800.RT-qPCR.R	5'-ATTGCCATCGCCAACCCGGAAG-3'
Avin.35210.RT-qPCR.F	5'-TTCGCCCTGCTCCACATCAGGA-3'
Avin.35210.RT-qPCR.R	5'-AGCCCCTCCATCCCTGCCAATT-3'
Avin.44220.RT-qPCR.F	5'-TGATCACCACCCAGTACAACGGCT-3'
Avin.44220.RT-qPCR.R	5'-TTGCCGCGATCGTAGGAGGAGT-3'
Avin.38560.RT-qPCR.F	5'-TCCGGGTTGCCGAACATCACA-3'
Avin.38560.RT-qPCR.R	5'-TGCGCAAGATCACCCGCAACA-3'

## B.4 Μετασηματισμός κυττάρων

### B.4.1 Δημιουργία κυττάρων *E. coli* ικανών για μετασηματισμό μέσω θερμικού σοκ

Αρχικά εμβολιάζονται 5 mL LB, με το κατάλληλο αντιβιοτικό (25 µg/ml καναμυκίνη ή 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη ή 50 µg/ml στρεπτομυκίνη), με την κατάλληλη αποικία *E. coli* και επωάζονται, υπό συνεχή ανακίνηση, για περίπου 20 ώρες στους 37°C. Από τα 5 mL της καλλιέργειας χρησιμοποιούνται 2 mL για τον εμβολιασμό 200 mL LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 37°C, για περίπου 2 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα ( $OD_{600nm}$ -Optical Density) να ανέλθει περίπου στα 0.3-0.4. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ/λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων, αφού επαναδιαλυθεί με ήπια ανάδευση σε 50 mL 0.1 M  $CaCl_2$ , αφήνεται για επώαση στον πάγο επί 45 λεπτά και έπειτα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 6.000 στρ/λεπτό. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 25 mL 0.1 M  $CaCl_2$  και διατηρείται σε πάγο για 45 λεπτά, στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 6.000 στρ/λεπτό. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 10 mL 0.1 M  $CaCl_2$  και προστίθεται γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 15% v/v. Τα κύτταρα αφού μοιραστούν σε σωλήνες erpendorf (50-200 µl) αποθηκεύονται στους -80°C.

### B.4.2 Μετασηματισμός κυττάρων *E. coli* μέσω θερμικού σοκ

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 μετασηματισμό 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 mL LB με ελαφρά ανακίνηση και αφήνεται για επώαση επί 60 λεπτά, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Έπειτα, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υλικό LB με το κατάλληλο, για την επιλεγμένη ανάπτυξη των κυττάρων. Τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C, για 15-20 ώρες.

### B.4.3 Δημιουργία κυττάρων ικανών για μετασηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης

Αρχικά εμβολιάζονται 5 mL LB, με μια αποικία *A. vinelandii* DJ και επωάζονται, υπό συνεχή ανακίνηση, για περίπου 20 ώρες στους 30°C. Από τα 5 mL της καλλιέργειας χρησιμοποιούνται 2 mL για τον εμβολιασμό 200 mL LB. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 30°C, μέχρι η οπτική πυκνότητα ( $OD_{600nm}$ -Optical Density) να ανέλθει περίπου στα 0.4-0.5. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6.000 στρ/λεπτό για 10 λεπτά, στους 4°C. Ακολουθούν ξεπλύματα με επαναδιάλυση σε ίσο όγκο  $dH_2O$  (200 mL) χαμηλής θερμοκρασίας και το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές. Στο τελευταίο στάδιο, η επαναδιάλυση των κυττάρων πραγματοποιείται σε κρύο και αποστειρωμένο  $dH_2O$  όγκου 20 mL. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 6.000 στρ/λεπτό, στους 4°C και τα κύτταρα επαναδιαλύονται με 1/50 του αρχικού όγκου κρύο και αποστειρωμένο  $dH_2O$  που περιέχει 10% γλυκερόλη v/v. Αφού διαμοιραστούν σε erpendorf σε κλάσματα των 60 µL αποθηκεύονται στους -80°C (Ghigo, 2004).

#### **B.4.4 Μετασηματισμός κυττάρων για ομόλογο ανασυνδυασμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης (electroporation)**

Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια απλή και ταχεία διαδικασία με την οποία το DNA (π.χ. πλασμίδιο) μπορεί να μεταφερθεί εντός των κυττάρων. Ουσιαστικά, εφαρμόζονται παλμοί υψηλής τάσης σε ένα εναιώρημα κυττάρων με αποτέλεσμα να σχηματίζονται πόροι στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των οποίων το DNA μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο. Η εφαρμογή των παλμών είναι τέτοια ώστε οι πόροι που έχουν διαμορφωθεί να κλείνουν με αποτέλεσμα να συνεχίζονται οι φυσιολογικές λειτουργίες των κυττάρων (Spencer, 1991).

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για το μετασηματισμό μέσω ηλεκτροδιάτρησης ήταν το *A. vinelandii* DJ, τα κύτταρα του οποίου είχαν καταστεί ηλεκτροδιαπερατά. Τα κύτταρα αρχικά, μεταφέρονται από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  στον πάγο και αφήνονται για 10 λεπτά ώστε να ξεπαγώσουν. Σε περίπου 40  $\mu\text{L}$  βακτηριακού εναιωρήματος προσθέτονται έως 300 ng/ $\mu\text{L}$  πλασμιδιακού DNA (το πλασμίδιο pK18mobsacB περιέχει ομόλογες περιοχές της νουκλεοτιδικής ακολουθίας του γονιδίου), όγκου 1  $\mu\text{L}$  και αφού αναδευτούν, τοποθετούνται σε μια κυβέττα η οποία περιέχει θρεπτικό υλικό Rennie-N (βλ. παράρτημα) και αφήνονται για επώαση 1 λεπτό. Η κυβέττα η οποία περιέχει το βακτηριακό εναιώρημα τελικού όγκου 40  $\mu\text{L}$  τοποθετείται στη συσκευή της ηλεκτροδιάτρησης και εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός με τα εξής χαρακτηριστικά: 25  $\mu\text{F}$ , 1.8 kV και 200  $\Omega$ , για 5 msec. Έπειτα τα κύτταρα αφαιρούνται από την κυβέττα, τοποθετούνται σε 1 mL θρεπτικού υλικού Rennie-N και αφήνονται για επώαση στους  $30^{\circ}\text{C}$ , με ήπια ανάδευση. Μετά από την έλευση τουλάχιστον 3 ωρών τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 4.000 στρ/λεπτό επί 3 λεπτά, και αφαιρούνται 950  $\mu\text{L}$  από το υπερκείμενο. Το διάλυμα που παραμένει χρησιμοποιείται για την επαναιώρηση των κυττάρων και την επίστρωση σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Rennie-N που περιέχει καναμυκίνη για την επιλογή των μετασηματισμένων κυττάρων και το οποίο αφήνεται για επώαση 20 ώρες (overnight), στους  $30^{\circ}\text{C}$ . Τα βακτήρια που επιβιώνουν σχηματίζουν μοναδιαίες αποικίες καθεμία από τις οποίες προέρχεται από ένα μοναδικό βακτηριακό κύτταρο. Ο έλεγχος του επιτυχούς μετασηματισμού με ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιείται με την ανάπτυξη αποικιών στην επιφάνεια των τρυβλίων και την τεχνική PCR. Ο πρώτος ανασυνδυασμός προϋποθέτει την παρουσία ολόκληρου του γονιδίου π.χ. *AvfkbA1* και των ομόλογων περιοχών του γονιδίου που εισήχθησαν στο γενωματικό DNA του βακτηρίου, η οποία επιβεβαιώνεται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Τα κύτταρα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο πρώτος ανασυνδυασμός εμβολιάζονται σε υγρή καλλιέργεια θρεπτικού υλικού Rennie-N και αφήνονται για επώαση 20 ώρες στους  $30^{\circ}\text{C}$ . Η καλλιέργεια μετά από διαδοχικές αραιώσεις επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό Rennie-N το οποίο περιέχει 5-10% w/v σακχαρόζη και αφήνεται για επώαση 20 ώρες (overnight), στους  $30^{\circ}\text{C}$ . Στα κύτταρα που επιζούν έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς ο δεύτερος ανασυνδυασμός καθώς η παρουσία σακχαρόζης προκαλεί θάνατο σε αυτά τα οποία συνεχίζουν να εκφράζουν το γονίδιο *sacB* λόγω παραμονής του πλασμιδίου στο γονιδίωμα. Η επιτυχία του δεύτερου ανασυνδυασμού έγκειται στην ανάπτυξη αποικιών στην επιφάνεια των τρυβλίων και πιστοποιείται με την τεχνική PCR και την παρουσία μόνον των ομόλογων περιοχών του γονιδίου *AvfkbA1* που εισήχθησαν στο γονιδιοματικό DNA του βακτηρίου σε πηκτή αγαρόζης.

#### **B.4.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA ακολουθούνται δύο μέθοδοι: Η μέθοδος miniprep και η μέθοδος βρασμού (boiling prep).

#### **B.4.6 Μέθοδος miniprep**

Για την απομόνωση γενωματικού DNA ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο, όπως ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Plasmid Kit). Η μέθοδος miniprep χρησιμοποιείται στην περίπτωση που το προς απομόνωση πλασμίδιο θα αποσταλεί για αλληλούχιση. Αρχικά 5 mL θρεπτικού υλικού LB, με την κατάλληλη δόση αντιβιοτικών, εμβολιάζονται με μια αποικία μετασχηματισμένων με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 30°C για 20 ώρες. Από την καλλιέργεια αυτή 3 mL μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται 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 λύσης P2 (lysis buffer: 200 mM NaOH, 1% w/v SDS) και ακολουθεί ελαφρά ανακίνηση. Έπειτα, προστίθενται επιπλέον 350 µL διαλύματος N3 (Neutralization buffer: 4.2 M GuHCl, 0.9 M KAc, pH 4.8) και αμέσως αναστρέφεται ο σωλήνας 4-6 φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10.000 στρ./λεπτό. 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 (wash/binding buffer: 5.0 M GuHCl, 30% v/v isopropanol) 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 ddH<sub>2</sub>O, αφήνεται για 1 λεπτό και τέλος, φυγοκεντρείται για 1 λεπτό, οπότε λαμβάνεται το καθαρό πλασμιδιακό DNA. Το απομονωμένο πλασμίδιο αποθηκεύεται στους -20°C.

#### **B.4.7 Μέθοδος βρασμού (boiling prep)**

Πέντε mL θρεπτικού υλικού LB, με την κατάλληλη δόση αντιβιοτικών, εμβολιάζονται με μια αποικία μετασχηματισμένων με το προς απομόνωση πλασμίδιο, κυττάρων *E. coli*. Ακολουθεί επώαση με ανακίνηση στους 30°C για 20 ώρες. Από την καλλιέργεια αυτή 3 mL μεταφέρονται σε σωλήνα erpendorf και φυγοκεντρώνονται στις 10.000 στρ./λεπτό για 2 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως και έπειτα προστίθενται 150 µL Stet buffer (8% w/v σακχαρόζη, 0.1% v/v Triton-X100, 0.5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl). Αμέσως μετά προστίθεται 1 µL λυσοζύμης (50 mg/mL), το δείγμα επωάζεται στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στρ./λεπτό για 7 λεπτά. Το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθενται 300 µL αιθανόλης 70% v/v και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά. Έπειτα με τη βοήθεια της πιπέτας αφαιρείται η αιθανόλη και οι σωλήνες erpendorf αφήνονται ανοιχτοί ώστε να εξατμιστεί η περίσσεια αιθανόλης. Το ίζημα επαναδιαλύεται με 20-30 µL ddH<sub>2</sub>O και το απομονωμένο πλασμίδιο αποθηκεύεται στους -20°C.

## B.5 Βιοχημική μελέτη

Το κεφάλαιο της βιοχημικής μελέτης περιλαμβάνει την έκφραση πρωτεϊνών σε κύτταρα *E. coli*, την απομόνωσή τους, την ανάλυσή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τέλος την μέτρηση της *in vitro* ενζυμικής τους ενεργότητας.

### B.5.1 Επαγωγή της έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

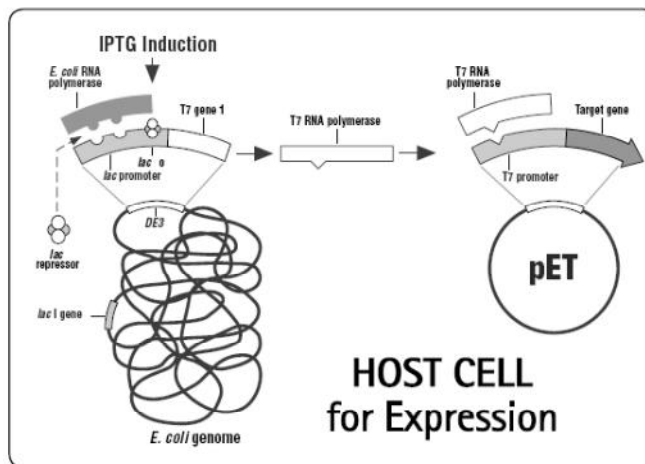
Η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών είναι μια διαδικασία κατά την οποία διεγείρεται η μεταγραφή και η γονιδιακή πληροφορία σε γονιδιακά προϊόντα. Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που φέρουν τον 6-His επίτοπο (έξι ιστιδινών) στο αμινοτελικό τους άκρο πραγματοποιείται σε κύτταρα *E. coli* στελέχους BL21 DE3:

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* στέλεχος B, με τον DE3, ένα λ προφάγο που περιέχει το γονίδιο T7 RNA πολυμεράσης και το *lacI<sup>q</sup>*.
- Μετασηματισμένοι πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι 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



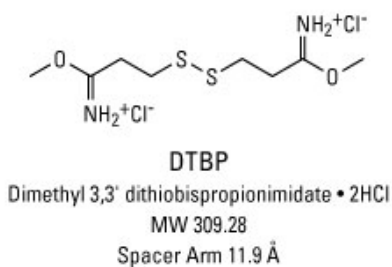
Εικόνα B.2. Επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών σε κύτταρα *E.coli* BL21 DE3.

Συγκεκριμένα, 20 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25 µg/ml καναμυκίνη, 25 µg/ml χλωραμφαινικόλη ή 50 µg/ml στρεπτομυκίνη), εμβολιάζονται με μια αποικία μετασηματισμένων 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. Έπειτα, 10 mL της προκαλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 200 mL αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών. Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση στους 30°C και τη στιγμή που η οπτική πυκνότητα

(OD<sub>600nm</sub>-Optical Density) κυμαίνεται από 0.4-0.6, προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0.25 mM. Η καλλιέργεια επώαζεται σε αναδευτήρα θερμοκρασίας 30°C για 4-6 ώρες. Ακολούθως, η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρείται σε 3.500 στρ./λεπτό επί 10 λεπτά, σε θερμοκρασία 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C είτε χρησιμοποιούνται για τα παρακάτω στάδια.

### B.5.2 Διασύνδεση πρωτεϊνών *in vivo* με τη χρήση του διασυνδετή DTBP

Ως διασύνδεση ορίζεται η διαδικασία της χημικής σύνδεσης δύο ή περισσότερων μορίων με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία της διασύνδεσης φέρουν ενεργές ομάδες, οι οποίες αντιδρούν με ομάδες των μορίων στόχων (π.χ. αμινοομάδες). Το DTBP (dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate) έχει την ικανότητα να διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη του *E. coli* και οι δύο ενεργές του ομάδες σχηματίζουν ιμιδοεστερικούς δεσμούς με τις αμινοομάδες πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται κοντά ή μια στην άλλη. Ο βραχίονας του διασυνδετή DTBP έχει μήκος 11 Å. Τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών είναι σταθερά αλλά μπορούν να αποδιαταχθούν παρουσία 1 M Tris pH 7.6, στους 37°C για 30 λεπτά.



**Εικόνα B.2.** Η χημική δομή του DTBP.

Έπειτα από την επαγωγή της έκφρασης των επιθυμητών πρωτεϊνών επιτελείται η φυγοκέντρωση των κυττάρων στις 3.500 στρ./λεπτό για δέκα λεπτά και επαναδιαλύεται το ίζημα με 2-3 mL ρυθμιστικού διαλύματος τριαιθανολαμίνης (0.2M triethanolamine, pH 8.0). Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3.500 στρ./λεπτό για 10 λεπτά και το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται 3 φορές. Επαναδιαλύεται το ίζημα με 2-3 mL διαλύματος τριαιθανολαμίνης και έπειτα προστίθεται σε αυτό ο διασυνδετής DTBP, διαλυμένος στο ίδιο διάλυμα και σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Τα δείγματα επώαζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, υπό ήπια ανάδευση κάθε 5 λεπτά. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστίθεται ο ανάλογος όγκος Tris-HCl pH 7.6 (1 M τελική συγκέντρωση). Το δείγμα αφήνεται για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα μεταφέρονται σε σωληνάκι και φυγοκεντρούνται στις 3.500 στρ./λεπτό για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

### B.5.3 Απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας

Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν HIS επίτοπο γίνεται με τη μέθοδο της χρωματογραφίας συγγενείας. Σφαιρίδια αγαρόζης είναι φορτισμένα με νικέλιο (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) στο οποίο δεσμεύεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εξ' αίτιας της δημιουργίας συμπλόκου ανάμεσα στο νικέλιο και το εξαπεπτίδιο ιστιδίνης.

Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 3 mL διαλύματος λύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM ιμιδαζόλιο) ανά gr κυττάρων. Αμέσως προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 50 mg/ml και ακολουθεί επώαση στον πάγο διάρκειας 30 λεπτών. Ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπέρηχους (5 φορές για 10 δευτερόλεπτα με ενδιάμεση παύση 10 δευτερολέπτων) και φυγοκέντρηση στις 10.000 στρ./λεπτό για 20 λεπτά, στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και αναμιγνύεται με 0.5 mL 50% v/v Ni-NTA. Το μίγμα αναδεύεται ήπια επί μια ώρα, στους 4°C και τοποθετείται σε ειδική στήλη χρωματογραφίας. Το δείγμα που διαπερνά τη στήλη (flow through) συλλέγεται και φυλάσσεται για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί διπλός καθαρισμός της στήλης με 4 mL διαλύματος πλύσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM ιμιδαζόλιο), από το οποίο επίσης συλλέγονται και φυλάσσονται δύο δείγματα για ανάλυση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί έκλουση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης από τη στήλη με 0.5 mL διάλυμα έκλουσης (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM ιμιδαζόλιο), επί τέσσερις φορές. Τα δείγματα συλλέγονται σε τέσσερις διαφορετικούς σωλήνες erpendorf για ανάλυση SDS-PAGE.

#### **B.5.4 Διαπίδυση**

Τα δείγματα του σταδίου της έκλουσης που περιέχουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη υποβάλλονται σε διαπίδυση, συνολικά δύο φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα διαπίδυσης (50 mM HEPES buffer pH:8 και 100 mM NaCl). Η διαπίδυση πραγματοποιείται με τη χρήση ημιπερατής μεμβράνης κυτταρίνης. Η διαδικασία διαρκεί 16-20 ώρες στους 4°C, υπό συνεχή και ήπια ανάδευση.

Οι μεμβράνες διαπίδυσης πριν από τη χρήση τους υπόκεινται σε βρασμό σε διάλυμα (5 g EDTA /L και 8.5 g NaHCO<sub>3</sub>/ L) για 1 ώρα. Ακολουθεί ξέπλυμα με dH<sub>2</sub>O και φύλαξη στους 4°C σε δοχείο που περιέχει αποστειρωμένο dH<sub>2</sub>O.

#### **B.5.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης παρουσία δωδεκανοθειϊκού 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 μέγεθος 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 δωδεκανοθειϊκού νατρίου στη πηκτή διαχωρισμού προσδίδει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες. Το 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 τη μάζα της πρωτεΐνης και επομένως, ο διαχωρισμός τους γίνεται με βάση το μοριακό τους μέγεθος με γραμμική σχέση.

Η ανάλυση των 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.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού και της πηκτής επιστοιβάξης (Πίνακας B.3).



**Πίνακας Β.3:** Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης (ml) συναρτήσει τελικής συγκέντρωσης ακρυλαμίδης.

		Πηκτή διαχωρισμού							Πηκτή επιστοιβάξης
		7.5%	10%	12.5%	15%	17.5%	20%	25%	
1	Ακρυλαμίδη 30%	7.5	10	12.5	15	17.5	20	25	1.3
2	Bis-ακρυλαμίδη 1%	5.2	3.9	3.1	2.6	2.2	1.9	1.5	1
3	3M Tris (pH: 8.8)	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	-
4	1M Tris (pH: 6.8)	-	-	-	-	-	-	-	1.25
5	SDS 10%	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1
6	dH <sub>2</sub> O	13.04	11.85	10.14	8.14	6.04	3.84	-	6.24
7	TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
8	10% APS	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 πηκτή επιστοιβάξης, η οποία παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο με τη διαφορά ότι περιέχει το αντιδραστήριο 4 και όχι το 3. 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 περίπου 30 λεπτά (25°C). Μετά τον πολυμερισμό και της πηκτής επιστοιβάξης, η πηκτή τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Στη συσκευή προστίθεται το SDS ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (144 g/L γλυκίνη, 30 g/L Tris και 10 g/L SDS).

Τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος μετουσίωσης 2x (4% w/v SDS, 10% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 20% v/v γλυκερόλη, 0.1 M Tris pH 6.8 και 0.0005% w/v χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης) και θερμαίνονται στους 100°C, για 10 λεπτά. Αμέσως μετά φυγοκεντρώνονται στις 13.000 στρ./λεπτό για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρείται προσεκτικά ο υποδοχέας (χτένα) και τα δείγματα φορτώνονται στα κανάλια εισαγωγής των δειγμάτων. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε ηλεκτρικό πεδίο εντάσεως 110 V όσο βρίσκονται στην πηκτή επιστοιβάξης και με 160 V μέχρις ότου η χρωστική φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής διαχωρισμού. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (10% v/v οξικό οξύ, 45% v/v μεθανόλη, 0.25% w/v Coomassie brilliant blue R250) για 30 λεπτά στους 60°C, με ελαφρά ανακίνηση. Ακολούθως, η πηκτή αποχρωματίζεται με την εμβάπτισή της σε διάλυμα αποχρωματισμού (30% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ) σε θερμοκρασία δωματίου, με ελαφρά ανακίνηση. Το διάλυμα αποχρωματισμού αντικαθίσταται ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρις ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών να είναι ευδιάκριτες.

### **B.5.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει το μήκος κύματος, όπου παρουσιάζει τη μέγιστη απορρόφηση, όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465 nm, ενώ το σύμπλοκο χρωστική-πρωτεΐνη έχει χρώμα μπλε και απορροφά στα 595 nm. Η μέθοδος εφαρμόζεται σε πρωτεϊνικά δείγματα συγκέντρωσης 0.02-0.2 mg/mL ενώ για μέτρηση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων θα πρέπει να αραιώνονται κατάλληλα.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης το πυκνό αντιδραστήριο Bradford (0.1 mg Coomassie Blue G250 και 100 mL πυκνό φωσφορικό οξύ συγκέντρωσης 85% w/w σε 100 mL υδατικό διάλυμα μεθανόλης συγκέντρωσης 50% v/v) αραιώνεται με νερό σε αναλογία 1:5 και από το διάλυμα που προκύπτει αναμιγνύονται 950 μL διαλύματος εργασίας Bradford και 50 μL αραιωμένου δείγματος της πρωτεΐνης, ώστε η συγκέντρωσή της να βρίσκεται εντός του εύρους 2-10 μg. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος, για 20-35 λεπτά. Ακολούθως, λαμβάνεται η απορρόφηση για κάθε ένα από τα δείγματα. Η συγκέντρωση του δείγματος σε πρωτεΐνη υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, εφαρμόζοντας τον εξής τύπο:

$ABS = \epsilon * d * c$ , όπου:

ABS: απορρόφηση διαλύματος ή μάρτυρα

$\epsilon$ : η συγκέντρωση της πρωτεΐνης

d: το πλάτος της κυβέτας

c: σταθερά που υπολογίζεται μέσω της δημιουργίας της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται με βάση την απορρόφηση στα 595 nm, ως προς τη συγκέντρωση σε πρωτεΐνη του τελικού δείγματος. Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι γνωστής συγκέντρωσης (συνήθως μητρικό διάλυμα BSA τελικής συγκέντρωσης 0.2 mg/mL).

### **B.5.7 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και αποτύπωση κατά Western**

Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, είναι δυνατή η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση ειδικής συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, με σκοπό την ανίχνευση του επίτοπου των πρωτεϊνών (His-tag ή S-tag), μέσω εξειδικευμένων αντισωμάτων. Η πηκτή πολυακρυλαμίδης και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 10 λεπτά σε διάλυμα μεταφοράς (3x ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης), υπό ήπια ανάδευση. Στις διαστάσεις της πηκτής κόβονται 10 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3 MM καθώς και ένα φύλλο νιτροκυτταρίνης. Αρχικά, τοποθετούνται προσεκτικά 5 φύλλα χαρτιού Whatman στην κάτω επιφάνεια της συσκευής (στον θετικό πόλο), αφού έχουν εμποτιστεί στο διάλυμα μεταφοράς. Επάνω στα φύλλα τοποθετείται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επάνω σε αυτά η πηκτή πολυακρυλαμίδης. Στη συνέχεια τα υπόλοιπα 5 φύλλα χαρτιού Whatman, τα οποία είναι και αυτά εμποτισμένα στο διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούνται πάνω από την πηκτή, η συσκευή κλείνει και τίθεται σε λειτουργία εφαρμόζοντας τάση 32 V για 1 ώρα. Εν ώρα λειτουργίας τη συσκευή διατρέχει νερό για την αποφυγή υπερθέρμανσης.

Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ξεπλένεται δύο φορές σε διάλυμα TBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα TBS, το οποίο περιέχει επιπλέον 0.5% v/v Tween 20 και 2% v/v Triton X-100, στο οποίο ξεπλένεται δύο φορές. Η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά σε διάλυμα TBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS με 3% BSA που περιέχει το αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1/1000 ή 1/2000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν δύο ξεπλύματα σε διάλυμα TBS με 0.5% v/v Tween 20 και 2% v/v Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα TBS με 3% BSA που περιέχει το δεύτερο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση (1/5000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη ξεπλένεται 4 φορές σε διάλυμα TBS με 0.5% v/v Tween 20 και 2% v/v Triton X-100 για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα ανίχνευσης AP (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM Mg<sub>2</sub>Cl και 500 mL διαλύματος BCIP/NBT, το οποίο προστίθεται χωριστά και τελευταίο), σε σκοτεινό θάλαμο, μέχρις ότου εμφανιστούν οι ζώνες ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνών. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη dH<sub>2</sub>O και η μεμβράνη φωτογραφίζεται αμέσως.

### B.5.8 Διερεύνηση της ενεργότητας PPIάσης

Για την ανίχνευση της ενεργότητας PPIάσης μιας πρωτεΐνης χρησιμοποιείται μια μέθοδος, κατά την οποία μετράται η συσσώρευση του χρωμοφόρου μορίου pNA, το οποίο προκύπτει από την πέψη με χυμοθρυψίνη, της *trans* διαμόρφωσης συνθετικών πεπτιδίων της μορφής Suc-AXaaPF-pNA (succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-4-nitroanilides) (Kofron et al., 1991). Παρουσία των PPIασών, ο δεσμός Xaa-Pro μετατρέπεται ταχύτερα στην *trans* μορφή, ο οποίος διασπάται από τη χυμοθρυψίνη με συνέπεια το σχηματισμό ενός χρωματικού συμπλόκου.

Σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 4°C τοποθετείται διάλυμα πεπτιδίου (Suc-AXaaPF-pNA) 5 mM αρχικής συγκέντρωσης. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 50 mM Hepes buffer pH:8.0 και 100 mM NaCl με 50 μg χυμοθρυψίνη (διαλυμένη σε 1 mM HCl; Fluka). Αμέσως μέσα στο μίγμα αυτό τοποθετείται ο κατάλληλος όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος PPIάσης (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford), ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 1 mL, αναδεύονται γρήγορα με την πιπέτα και αμέσως τοποθετούνται στην κυβέττα η οποία περιέχει το πεπτίδιο. Οι τιμές της απορρόφησης λαμβάνονται στα 390 nm στους 4°C μέχρι το πέρας των 100 δευτερολέπτων περίπου. Παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των PPIασών λαμβάνονται τα κινητικά δεδομένα και υπολογίζεται η κλίση της ευθείας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ενζύμων και του ρυθμού κατάλυσης της αντίδρασης. Επίσης καταγράφονται οι διαφορές των σταθερών του ρυθμού ισομερίωσης *k<sub>obs</sub>* και *k<sub>o</sub>* που αντιπροσωπεύουν τις καταλυόμενες και μη αντιδράσεις, καθώς και η σταθερά *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* που ισοδυναμεί με την κλίση της ευθείας. Ο υπολογισμός της σταθεράς εξειδίκευσης πραγματοποιείται με τον τύπο  $k_{cat}/K_m = (k_{obs} - k_o)/[PPIάση]$ . Η προσθήκη πρωτεΐνης BSA δεν επηρέασε την ενεργότητα PPIάσης των FKBP πρωτεϊνών.

### **B.5.9 Διερεύνηση της ενεργότητας ΡΡΐάσης παρουσία πρωτεϊνών στόχων**

Για την ανίχνευση της ενεργότητας ΡΡΐάσης μιας πρωτεΐνης, παρουσία πρωτεϊνών στόχων, χρησιμοποιείται η ίδια μέθοδος της πέψης με χυμοθρυψίνη, της *trans* διαμόρφωσης συνθετικών πεπτιδίων της μορφής Suc-ΑΧααPF-pNA (succinyl-Ala-Χαα-Pro-Phe-4-nitroanilides).

Συγκεκριμένα προσδιορίζεται *in vitro* η ενεργότητα της ΡΡΐάσης ( $\Delta rate$ ) των FKBP, απουσία και παρουσία ισομοριακής συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης στόχου. Σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 4°C τοποθετείται διάλυμα πεπτιδίου (Suc-ΑΧααPF-pNA) 5 mM αρχικής συγκέντρωσης. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 50 mM HEPES buffer pH:8.0 και 100 mM NaCl με 50  $\mu$ g χυμοθρυψίνη (διαλυμένη σε 1 mM HCl; Fluka). Αμέσως μέσα στο μίγμα αυτό τοποθετείται ο κατάλληλος όγκος του πρωτεϊνικού διαλύματος ΡΡΐάσης (ανάλογα με τη συγκέντρωση η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford) και ακολούθως προστίθεται ο κατάλληλος όγκος πρωτεϊνικού διαλύματος πρωτεΐνης στόχου, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 1 mL, αναδεύονται γρήγορα με την πιπέτα και αμέσως τοποθετούνται στην κυβέττα η οποία περιέχει το πεπτιδίιο. Οι τιμές της απορρόφησης λαμβάνονται στα 390 nm στους 4°C μέχρι το πέρας των 1000 δευτερολέπτων περίπου. Τα κινητικά δεδομένα και η κλίση της ευθείας υπολογίζονται όπως αναφέρεται ανωτέρω.

### **B.5.10 Διερεύνηση της ενεργότητας τσαπερόνης**

Η διερεύνηση της ενεργότητας τσαπερόνης των ενζύμων πραγματοποιείται με τη μέθοδο της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Η μέθοδος στηρίζεται στην παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C), παρουσία πρωτεΐνης η οποία φέρει ενεργότητα τσαπερόνης. Η δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά.

Σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 45°C τοποθετείται η συνθάση του κιτρικού οξέος, της οποίας η τελική συγκέντρωση είναι ίση με 0.25  $\mu$ M. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 40 mM HEPES pH 7.5 με τον κατάλληλο όγκο πρωτεϊνικού διαλύματος τσαπερόνης, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι ίσος με 1 mL. Αμέσως αναδεύονται γρήγορα με την πιπέτα και τοποθετούνται στην κυβέττα η οποία περιέχει τη συνθάση του κιτρικού οξέος. Οι τιμές της απορρόφησης λαμβάνονται στα 500 nm στους 45°C μέχρι το πέρας 20 λεπτών. Η αύξηση της απορρόφησης είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η προσθήκη πρωτεΐνης BSA δεν επηρέασε τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος.

### **B.5.11 Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της *AncarA***

Η ενζυμική δραστηριότητα της *AncarA* προσδιορίστηκε σύμφωνα με την μέθοδο του Miles (Miles et al., 1998) μέσω της παραγωγής γλουταμινικού κατά την *carA* καταλυόμενη υδρόλυση της γλουταμίνης.

Συγκεκριμένα, σε κυβέττα που βρίσκεται μέσα στο φασματοφωτόμετρο στους 28°C τοποθετείται διάλυμα που περιέχει 100 mM HEPES, 10 mM ATP, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM γλουταμίνης, 40 mM NaHCO<sub>3</sub>,

100 mM KCl, 10 mM ορνιθίνης, 1 mM APAD (3-acetylpyrimidine adenine nucleotide- APAD,  $\epsilon_{363}=8.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) και 20 μονάδες αφυδρογονάση του γλουταμινικού, τελικό pH 7.6. Σε erpendorf αναμιγνύεται το διάλυμα της αντίδρασης που περιέχει 100 mM HEPES pH 7.6 με την πρωτεΐνη AncaA της οποίας η τελική συγκέντρωση είναι ίση με 1  $\mu\text{M}$ . Αμέσως μετά τοποθετείται στην κυβέττα, αναμιγνύεται με το παραπάνω διάλυμα και λαμβάνονται οι τιμές της απορρόφησης της αντίδρασης στα 363 nm. Για τον υπολογισμό της ενεργότητας της AncaA παρουσία των FKBP πρωτεϊνών, ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι προστίθενται μέσα στην κυβέττα 10  $\mu\text{M}$  των πρωτεϊνών AnfkbA1, AnfkbA2, AnfkbA1<sub>Y194A</sub> και AnfkbA2<sub>Y84A</sub>. Ακολουθεί καλή ανάδευση με τη βοήθεια μιας πιπέτας και η λήψη των τιμών της απορρόφησης της αντίδρασης στα 363 nm.

### **B.5.12 Διερεύνηση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης**

Για τη διερεύνηση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης αρχικά εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25  $\mu\text{g/ml}$  καναμυκίνη, 25  $\mu\text{g/ml}$  χλωραμφαινικόλη, 50  $\mu\text{g/ml}$  στρεπτομυκίνη ή 25  $\mu\text{g/ml}$  αμπικιλίνη), με μια αποικία, είτε των μεταλλαγμένων στελεχών (π.χ. των *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*) είτε μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 με τους εκάστοτε πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν. Η προκαλλιέργεια επώαζεται στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες (overnight). Έπειτα, 3  $\mu\text{L}$  της παραπάνω καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό της επιφάνειας στερεού θρεπτικού μέσου LB (swarming τρυβλίο) που περιέχει άγαρ και γλυκόζη με τελική συγκέντρωση 0.5% w/v το καθένα, περιέχει επίσης την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών και IPTG τελικής συγκέντρωσης 0 έως 0.5 mM. Για τη διερεύνηση της κολυμβητικής κίνησης ακολουθείται η ίδια αρχική διαδικασία, ωστόσο διαφοροποιείται. Συγκεκριμένα, 3  $\mu\text{L}$  καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό με διάτρηση ενός ημιστερεού θρεπτικού μέσου LB (swimming τρυβλίο) που περιέχει άγαρ με τελική συγκέντρωση 0.3% (w/v), περιέχει επίσης την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών και IPTG τελικής συγκέντρωσης 0 έως 0.5 mM. Ο εμβολιασμός και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιείται στο κέντρο των τρυβλίων. Η διερεύνηση της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης προήλθε από τρεις βιολογικές επαναλήψεις, ανά στέλεχος. Έπειτα τα τρυβλία επώαζονται για 20 ώρες στους 30°C και αμέσως μετά το πέρας των 20 ωρών φωτογραφίζονται. Ο υπολογισμός του εμβαδού που καταλαμβάνει η εκάστοτε αναπτυσσόμενη αποικία γίνεται σε τετραγωνικά εκατοστά ( $\text{cm}^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r.

### **B.5.13 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση**

Αφού φωτογραφηθούν τα *swarming* και *swimming* τρυβλία στη συνέχεια λαμβάνονται κύτταρα από το άκρο της αναπτυσσόμενης *swarming* αποικίας ή από το εσωτερικό της αναπτυσσόμενης *swimming* αποικίας με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας και διασπείρονται σε γυάλινες αντικειμενοφόρες πλάκες προσθέτοντας 2-3  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια μονιμοποιούνται πάνω από φλόγα του λύχνου προσεκτικά, μέχρι να εξατμιστεί το νερό. Η μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, κατά την οποία χρωματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων με τις χρωστικές κρυσταλλικό ιώδες και σαφρανίνη. Συγκεκριμένα διαβρέχεται το μονιμοποιημένο παρασκεύασμα με κρυσταλλικό ιώδες για 1 λεπτό. Στη συνέχεια προστίθεται ιώδιο για 1 λεπτό, το οποίο σχηματίζει σύμπλοκο με το κρυσταλλικό ιώδες, με αποτέλεσμα τη στερέωση της

χρώσης. Έπειτα γίνεται έκπλυση του παρασκευάσματος με αιθυλική αλκοόλη. Τέλος, στο παρασκεύασμα προστίθεται η χρωστική σαφρανίνη η οποία καθιστά τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ερυθρά. Η παρατήρηση των κυττάρων έπειτα από τη χρώση Gram πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο ορατού.

Επίσης τα κύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά έπειτα από χρώση DAPI κατά την οποία χρωματίζεται το DNA με τη χρωστική 4',6-diamidino-2-phenylindole. Συγκεκριμένα, διαβρέχεται το μονιμοποιημένο παρασκεύασμα με 100  $\mu$ L τελικής συγκέντρωσης 5  $\mu$ g/mL διαλύματος 4',6-diamidino-2-phenylindole. Στη συνέχεια εφαρμόζεται πάνω στο παρασκεύασμα μια καλυπτρίδα και ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού.

#### **B.5.14 Διερεύνηση σχηματισμού βιοϋμενίου**

Για τη διερεύνηση του σχηματισμού βιοϋμενίου αρχικά εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25  $\mu$ g/ml καναμυκίνη, 25  $\mu$ g/ml χλωραμφαινικόλη ή 25  $\mu$ g/ml αμπικιλίνη), με μια αποικία είτε των μεταλλαγμένων στελεχών (π.χ. των *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*) είτε μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες. Σε ειδικούς σωλήνες errendorf τοποθετούνται 495  $\mu$ L υγρού θρεπτικού υλικού LB το οποίο περιέχει την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών και την κατάλληλη τελική συγκέντρωση του IPTG (0 έως 0.5 mM). Στη συνέχεια προστίθενται 5  $\mu$ L από την κάθε καλλιέργεια και ακολουθεί καλή ανάδευση. Σε κάθε πηγαδάκι (well) μιας 96 well θήκης (microtiter dish) πολυστυρενίου τοποθετούνται 100  $\mu$ L της ανακαλλιέργειας, έπειτα εφαρμόζεται μια αυτοκόλλητη ταινία και αμέσως μετά το καπάκι της πλάκας. Οι πλάκες επωάζονται για 20 ώρες στους 30°C. Έπειτα από το πέρας των 20 ωρών, με τη βοήθεια μιας πιπέτας απομακρύνεται από κάθε εσοχή της πλάκας η αναπτυσσόμενη καλλιέργεια και τοποθετείται σε κυβέττα, η οποία περιέχει 900  $\mu$ L υγρού θρεπτικού υλικού LB με σκοπό τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 600 nm ( $OD_{600nm}$ -Optical Density). Αφού διαπιστωθεί η ανάπτυξη των καλλιεργειών, ακολουθεί πλύση των πλακών με τριπλή ήπια εμβάπτιση σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O. Οι πλάκες αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να στεγνώσουν και έπειτα σε κάθε εσοχή τοποθετούνται 200  $\mu$ L της χρωστικής crystal violet (0.1% w/v) η οποία παραμένει για 20 λεπτά. Ακολουθεί πλύση των θηκών (πηγαδάκια) με πολλαπλή ήπια εμβάπτιση σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα της χρωστικής crystal violet. Τα κύτταρα τα οποία έχουν σχηματίσει βιοϋμένιο βρίσκονται προσκολλημένα σε κάθε πηγαδάκι και έχουν χρωματιστεί με τη χρωστική crystal violet. Οι θήκες έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να στεγνώσουν και ακολούθως σε κάθε εσοχή τοποθετούνται 200  $\mu$ L διαλύματος AA το οποίο περιέχει 80% καθαρή αιθανόλη και 20% ακετόνη και παραμένουν για 20 λεπτά. Με τη βοήθεια της πιπέτας από κάθε εσοχή απομακρύνεται το διάλυμα, τοποθετείται σε κυβέττα η οποία περιέχει 800  $\mu$ L του διαλύματος AA και λαμβάνονται οι τιμές της οπτικής πυκνότητας στα 550 nm ( $OD_{550nm}$ -Optical Density) (O'Toole and Kolter, 1998).

#### **B.5.15 Διερεύνηση της συμμετοχής πρωτεϊνών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης**

Για την εξέταση της επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αρχικά εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση του αντιβιοτικού (25  $\mu$ g/ml

καναμυκίνη), με μια αποικία των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες (overnight). Έπειτα, 5 μL των ίδιων καλλιεργείων διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) εμβολιάζονται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB και έπειτα επωάζονται για 20 ώρες στους 42°C. Τέλος, τα τρυβλία φωτογραφίζονται και η ανάπτυξη του κάθε στελέχους συγκρίνεται με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

Για την εξέταση της επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής αλατότητας πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία του εμβολιασμού των προκαλλιεργείων, ωστόσο 5 μL των ίδιων καλλιεργείων διαφόρων αραιώσεων ( $10^{-1}$  έως  $10^{-6}$ ) εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου LB το οποίο περιείχε 2% και 5% w/v χλωριούχο νάτριο και έπειτα επώστηκαν για 20 ώρες στους 30°C. Έπειτα τα τρυβλία φωτογραφήθηκαν και η ανάπτυξη του κάθε στελέχους συγκρίθηκε με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113.

### **B.5.16 Ενδοκυτταρικός εντοπισμός πρωτεϊνών με GFP επίτοπο**

Για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν τον GFP επίτοπο, αρχικά εμβολιάζονται 5 ml θρεπτικού διαλύματος LB, στο οποίο έχει προστεθεί η κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25 μg/ml καναμυκίνη, 25 μg/ml χλωραμφαινικόλη), με μια αποικία είτε του μεταλλαγμένου στελέχους *ΔfkrB* είτε μετασηματισμένων κυττάρων *E. coli* BW25113 ή *ΔfkrB* με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης που χρησιμοποιήθηκαν (GFP.pCA24N). Η προκαλλιέργεια επωάζεται στους 30°C, υπό συνεχή ανάδευση, για περίπου 15-20 ώρες. Έπειτα, 100 μL της προκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό 20 mL αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος LB που περιέχει την κατάλληλη δόση των αντιβιοτικών (25 μg/ml καναμυκίνη, 25 μg/ml χλωραμφαινικόλη) και IPTG τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Η καλλιέργεια αφήνεται για επώαση υπό συνεχή ανάδευση στους 30°C μέχρι τη στιγμή που η οπτική πυκνότητα ( $OD_{600nm}$ -Optical Density) κυμαίνεται από 0.4-0.5 δηλαδή όταν η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Έπειτα, γίνεται η προετοιμασία των αντικειμενοφόρων πλακών για τη μικροσκοπική παρατήρηση (Rines et al., 2011). Συγκεκριμένα, στην επιφάνεια της κάθε αντικειμενοφόρου πλάκας, πριν από την επίστρωση των κυττάρων τοποθετούνται περίπου 100 μL διαλύματος 2-3% w/v αγαρόζης (σε ddH<sub>2</sub>O) το οποίο έχει θερμανθεί ώστε να καταστεί ομοιογενές. Αμέσως μετά η αντικειμενοφόρος πλάκα καλύπτεται με μια άλλη ώστε να σχηματιστεί ένα λεπτό και λείο στρώμα αγαρόζης. Αφού κρυώσει και στερεοποιηθεί αφαιρείται η επάνω αντικειμενοφόρος και τοποθετούνται επάνω στο στερεό στρώμα αγαρόζης 100 μL από κάθε καλλιέργεια ενώ αμέσως καλύπτονται με μια καλυπτρίδα. Η παρατήρηση των κυττάρων και ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός των πρωτεϊνών με GFP επίτοπο πραγματοποιείται σε μικροσκόπιο φθορισμού.

## **Γ. Αποτελέσματα**



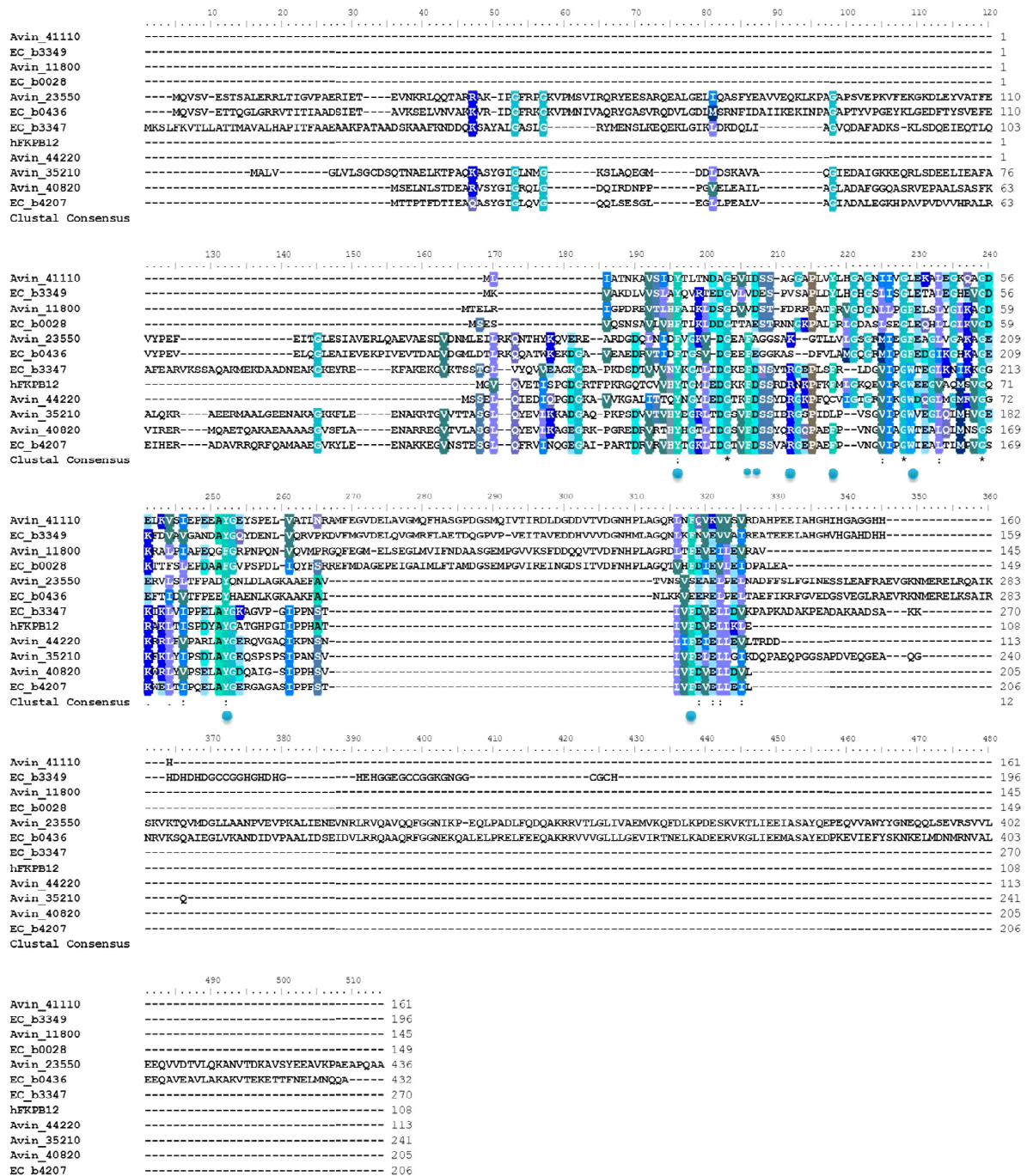
## Γ. Αποτελέσματα

### Γ.1 Οι FKBP's του *A. vinelandii*

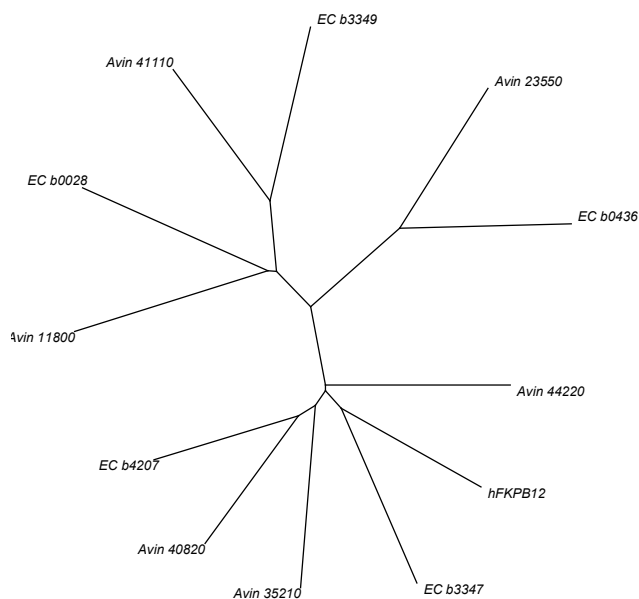
#### Γ.1.1 *In silico* εντοπισμός των γονιδίων που κωδικοποιούν για FKBP's στο βακτήριο *A. vinelandii*

Το γονιδίωμα του *A. vinelandii* (*Avin*) αναλύθηκε μέσω του αλγορίθμου BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), για τον εντοπισμό γονιδίων, τα οποία πιθανώς κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες. Η έρευνα είχε ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό έξι γονιδίων που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP's και τα οποία έχουν χαρακτηριστεί στο μικροοργανισμό *E. coli* (Εικόνα Γ.1.1). Πρόκειται για τα γονίδια *Avin\_40820*, *Avin\_11800*, *Avin\_41110*, *Avin\_23550*, *Avin\_35210* και *Avin\_44220*.

Με στόχο την διερεύνηση της φυλογενετικής σχέσης των FKBP πρωτεϊνών του *A. vinelandii* σε σχέση με τις FKBP πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί ή χαρακτηριστεί *in silico* στο *E. coli*, κατασκευάστηκε το δενδρόγραμμα της εικόνας Γ.1.2, χρησιμοποιώντας την αμινοξική ακολουθία των *Avin\_40820*, *Avin\_11800*, *Avin\_41110*, *Avin\_23550*, *Avin\_35210* και *Avin\_44220* από το *A. vinelandii* και των *Ec\_b0028* (*fkpB*), *Ec\_b3349* (*slyD*), *Ec\_b3347* (*fkpA*), *Ec\_b4207* (*fkIB*) και *Ec\_b0436* (*trigger factor, tig*) από το *E. coli*. Το γονίδιο *Avin\_40820*, σύμφωνα με την εικόνα Γ.1.2, είναι ομόλογο με το γονίδιο *Ec\_b4207* (*fkIB*) του *E. coli*, ενώ τα γονίδια *Avin\_35210* και *Avin\_44220* είναι ομόλογα με τα γονίδια *Ec\_b4207* (*fkIB*) και *Ec\_b3347* (*fkpA*) του *E. coli*. Τα γονίδια *Avin\_11800*, *Avin\_41110* και *Avin\_23550* είναι ομόλογα με τα γονίδια *Ec\_b0028* (*fkpB*), *Ec\_b3349* (*slyD*) και *Ec\_b0436* (*tig*), αντίστοιχα. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί περιγράφεται ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών *Avin\_11800* (*AvfkbX*), *Avin\_40820* (*AvfkbB*), *Avin\_35210* (*AvfkbA1*) και *Avin\_44220* (*AvfkbA2*). Η *AvfkbB* και η *AvfkbA1* διαθέτουν μια συντηρημένη περιοχή δέσμευσης του FK506 (FKBP περιοχή, cl11587), η οποία εδράζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ενώ οι πρωτεΐνες *AvfkbX* και *AvfkbA2* περιλαμβάνουν στο αμινοτελικό τους άκρο μια επιπρόσθετη περιοχή αγνώστου λειτουργίας (*pfam01346*) (CDD searches - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).



**Εικόνα Γ.1.1.** Πολλαπλή ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών που πιθανώς κωδικοποιούν για τις *E. coli* και *A. vinelandii* FKBP με την μέθοδο ClustalO. Οι αμινοξικές ακολουθίες ανήκουν στις: Avin\_40820, Avin\_11800, Avin\_41110, Avin\_23550, Avin\_35210 και Avin\_44220 από το *A. vinelandii* και στις Ec\_b0028 (fkrB), Ec\_b3349 (slyD), Ec\_b3347 (fkrA), Ec\_b4207 (fklB) και Ec\_b0436 (trigger factor, tig) από το *E. coli*. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία hFKBP12 του ανθρώπου για την ευθυγράμμιση αλλά και τον εντοπισμό των αμινοξών που πιθανώς συμμετέχουν στην ενεργότητα ΡΡιάσης των υπολοίπων βακτηριακών FKBP πρωτεϊνών. Οι κύκλοι επισημαίνουν τα αμινοξέα που μετέχουν στην ενεργότητα ΡΡιάσης.



**Εικόνα Γ.1.2.** Φυλογενετική σχέση των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν για τις FKBP's του *A. vinelandii* με τις FKBP's που έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί στον μικροοργανισμό *E. coli*. Το δενδρόγραμμα δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος TreeView έπειτα από την ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών με τη μέθοδο ClustalO. Οι αμινοξικές ακολουθίες ανήκουν στις: *Avin\_40820*, *Avin\_11800*, *Avin\_41110*, *Avin\_23550*, *Avin\_35210* και *Avin\_44220* από το *A. vinelandii* και οι *Ec\_b0028* (fkrB), *Ec\_b3349* (slyD), *Ec\_b3347* (fkrA), *Ec\_b4207* (fkIB) και *Ec\_b0436* (trigger factor, tig) από το *E. coli* καθώς και στην hFKBP12 του ανθρώπου.

Το γονίδιο *AvfkbX* αποτελείται από 437 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν 145 αμινοξέα, το *AvfkbB* αποτελείται από 617 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν 205 αμινοξέα, το *AvfkbA1* αποτελείται από 726 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν 241 αμινοξέα, ενώ το γονίδιο *AvfkbA2* αποτελείται από 342 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν 113 αμινοξέα. Σύμφωνα με το πρόγραμμα PSORT-B (<http://www.psort.org/psortb/>), οι πρωτεΐνες *AvfkbX*, *AvfkbB* και *AvfkbA2* εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου. Επιπλέον, μέσω του προγράμματος SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) στη πρωτεΐνη *AvfkbA1* εντοπίζεται ένα πεπτίδιο οδηγός 18 αμινοξέων.

### Γ.1.2 Ενζυμική ενεργότητα των *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2*

Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡιάσης των *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2* (Πίνακας Γ.1.1.). Η υπερέκφραση των γονιδίων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2*, πραγματοποιήθηκε με χρήση των πλασμιδίων *AvfkbX.H.pCDFDuet-1*, *AvfkbB.H.pCDFDuet-1*, *AvfkbA1.H.pCDFDuet-1* και *AvfkbA2.H.pCDFDuet-1* και με την προσθήκη 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι πρωτεΐνες *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2* φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Καθώς η *AvfkbA1* φέρει ένα πεπτίδιο οδηγό στο αμινοτελικό της άκρο, δεν ήταν δυνατή η απομόνωσή της. Ωστόσο, με την τεχνική PCR υποκλωνοποιήθηκε η κωδική περιοχή χωρίς το πεπτίδιο οδηγό αποτελούμενο από 18 αμινοξέα. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2* έγινε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας με τη χρήση σφαιριδίων αγαρόζης φορτισμένων με νικέλιο.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ΡΡιάσης των ανασυνδυασμένων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2* πραγματοποιήθηκε με μια μέθοδο, κατά την οποία μετράται η συσσώρευση του χρωμοφόρου

μορίου pNA, το οποίο προκύπτει από την πέψη με χυμοθρυψίνη, της *trans* διαμόρφωσης συνθετικών πεπτιδίων της μορφής succinyl-Ala-Xaa-Pro-Phe-pNA (Kofron et al., 1991). Παρουσία των PPIασών, ο δεσμός Xaa-Pro μετατρέπεται ταχύτερα στην *trans* μορφή, ο οποίος διασπάται από τη χυμοθρυψίνη με συνέπεια το σχηματισμό ενός χρωματικού συμπλόκου. Παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών AvfkbX, AvfkbB, AvfkbA1 και AvfkbA2 ελήφθησαν τα κινητικά δεδομένα και υπολογίσθηκε η κλίση της ευθείας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των ενζύμων και του ρυθμού κατάλυσης της εκάστοτε αντίδρασης. Κατεγράφησαν οι διαφορές του ρυθμού ισομερίωσης *k<sub>cat</sub>* και *k<sub>o</sub>* που αντιπροσωπεύουν την καταλυόμενη και μη αντιδράση, καθώς και η σταθερά *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* που ισοδυναμεί με την κλίση της εκάστοτε ευθείας.

Για την πρωτεΐνη AvfkbB, παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη τιμή *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* προκύπτει από τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Leu, λευκίνη) ενώ για την πρωτεΐνη AvfkbX παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη τιμή *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* προκύπτει από τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (Phe, φαινυλαλανίνη). Με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Ala, αλανίνη) παρατηρήθηκαν χαμηλές τιμές *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* και για τις δύο πρωτεΐνες. Όσον αφορά την AvfkbA1, παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη τιμή *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>* προήλθε από τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Leu, λευκίνη), ενώ για την AvfkbA2 από τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Ala, αλανίνη). Επίσης, για την πρωτεΐνη AvfkbA2, παρατηρήθηκε ότι το πεπτιδίιο της φαινυλαλανίνης (Phe) ισομερειωνόταν σε ικανοποιητικά αλλά χαμηλότερα επίπεδα τιμών *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*.

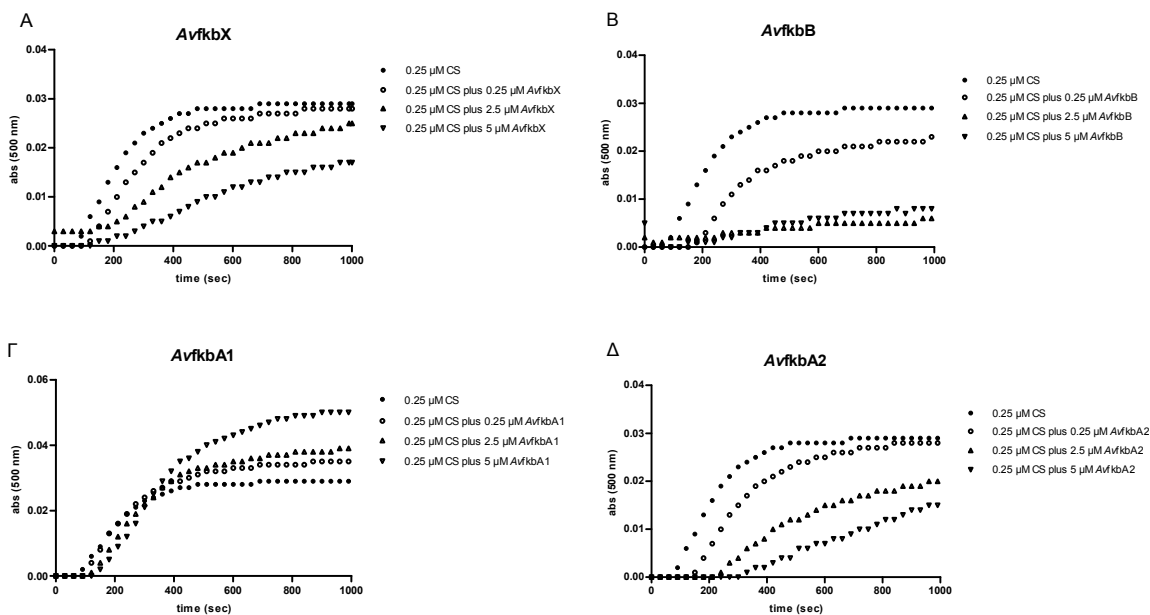
**Πίνακας Γ.1.1.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων AvfkbX, AvfkbB, AvfkbA1 και AvfkbA2 έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

Substrate (-Xaa-)	AvfkbX	AvfkbB	AvfkbA1	AvfkbA2
<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )				
-Leu-	nd	<b>29.55 ± 4.18</b>	<b>2.938 ± 0.784</b>	1.298 ± 0.276
-Ala-	21.70 ± 5.63	1.14 ± 0.52	0.583 ± 0.133	<b>2.538 ± 0.176</b>
-Phe-	<b>123.17 ± 41.82</b>	7.39 ± 1.57	0.636 ± 0.307	0.494 ± 0.287

Ακολούθως, διερευνήθηκε εάν οι πρωτεΐνες AvfkbX, AvfkbB, AvfkbA1 και AvfkbA2 παρεμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998), με τη μέθοδο της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η *in vitro* παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C), λόγω της παρουσίας μιας πρωτεΐνης, υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή έχει πιθανότατα ενεργότητα τσαπερόνης. Η πορεία δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες, παρακολούθηθηκε φωτομετρικά.

Παρατηρήθηκε ότι οι δύο πρωτεΐνες, AvfkbX και AvfkbB, κατέστειλαν μερικώς τη θερμική συσσωμάτωσή της (Εικόνα Γ.1.3Α και 3Β). Η πρωτεΐνη AvfkbB επέδειξε υψηλή ενεργότητα τσαπερόνης, μόνο σε συγκεντρώσεις 10x και 20x της συγκέντρωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος.

Στην πρωτεΐνη AvfkbA1 δεν εντοπίστηκε ενεργότητα τσαπερόνης (Εικόνα Γ.1.3Γ) ενώ το ένζυμο AvfkbA2 κατέστειλε μερικώς τη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού, σε 10x έως 20x της μοριακής συγκέντρωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος στο τελικό διάλυμα (Εικόνα Γ.1.3Δ).



**Εικόνα Γ.1.3.** Η επίδραση των πρωτεϊνών AnfkBΧ, AnfkBΒ, AnfkBΑ1 και AnfkBΑ2 στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κυτρινικού οξέος. (Α) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μΜ συνθάσης του κυτρινικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●) παρουσία 0.25 μΜ της AnfkBΧ (○), 2.5 μΜ της AnfkBΧ (▲) και 5 μΜ της AnfkBΧ (▼). (Β) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μΜ συνθάσης του κυτρινικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●) παρουσία 0.25 μΜ της AnfkBΒ (○), 2.5 μΜ της AnfkBΒ (▲) και 5 μΜ της AnfkBΒ (▼). (Γ) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μΜ συνθάσης του κυτρινικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μΜ της AnfkBΑ1 (○), 2.5 μΜ της AnfkBΑ1 (▲) και 5 μΜ της AnfkBΑ1 (▼). (Δ) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μΜ συνθάσης του κυτρινικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μΜ της AnfkBΑ2 (○), 2.5 μΜ της AnfkBΑ2 (▲) και 5 μΜ της AnfkBΑ2 (▼).

### Γ.1.3 Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης των πρωτεϊνών AnfkBΑ1 και AnfkBΑ2

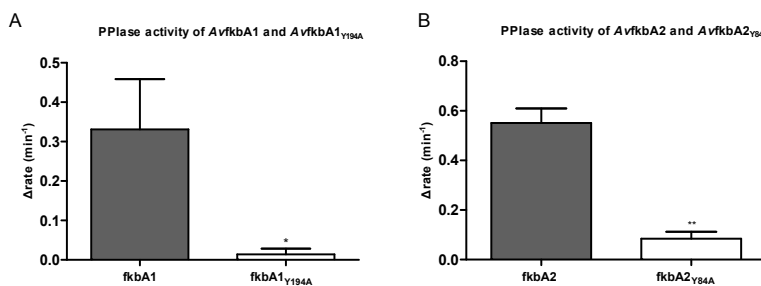
Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ενεργότητα ΡΡΙΑσης και η ενεργότητα τσαπερόνης εδράζονται στην ίδια περιοχή της κάθε πρωτεΐνης και εάν σχετίζονται λειτουργικά, πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη στο πιθανό ενεργό κέντρο της ενεργότητας ΡΡΙΑσης των πρωτεϊνών AnfkBΑ1 και AnfkBΑ2. Για τον εντοπισμό των πιθανών αμινοξέων του ενεργού κέντρου ΡΡΙΑσης των πρωτεϊνών AnfkBΑ1 και AnfkBΑ2, ευθυγραμμίστηκε η συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία hFKBP12 του ανθρώπου, της οποίας τα αμινοξέα που μετέχουν στο ενεργό κέντρο είναι γνωστά (Ikura and Ito, 2007, Tradler et al., 1997, De Cenzo et al., 1996), με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών AnfkBΑ1 και AnfkBΑ2 (Εικόνα Γ.1.1). Το αμινοξύ τυροσίνη στη θέση 194 της AnfkBΑ1 και στη θέση 84 της AnfkBΑ2 αντικαταστάθηκε με αλανίνη.

Η αντικατάσταση των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια. Για τη σημειακή μετάλλαξη στο πιθανό ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης της κάθε FKBP πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μεταλλαξιγένεσης σημειακής στόχευσης με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δυο σταδίων (PCR site-directed mutagenesis) ή SOE (*Splicing by Overlap Extension*), η οποία περιγράφηκε από τον Horton (Horton, 1995). Τα μεταλλαγμένα γονίδια που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCDFDuet-1, αφού προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη της κάθε FKBP πρωτεΐνης.

#### Γ.1.4 Ενζυμική ενεργότητα των *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub>

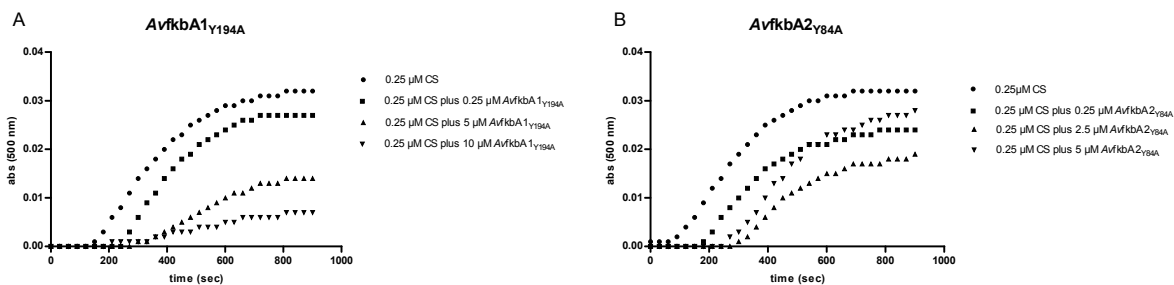
Έπειτα πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της διαφοράς της ενεργότητας ΡΡιάσης των μεταλλαγμένων *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub>, από την αντίστοιχη των πρωτεϊνών αγρίου τύπου *AvfkbA1* και *AvfkbA2* (Εικ. Γ.1.4). Η υπερέκφραση των γονιδίων *AvfkbA1*, *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub>, *AvfkbA2* και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> πραγματοποιήθηκε με χρήση των πλασμιδίων *AvfkbA1*.H.pCDFDuet-1, *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub>.H.pCDFDuet-1, *AvfkbA2*.H.pCDFDuet-1 και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub>.H.pCDFDuet-1, με την προσθήκη 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι πρωτεΐνες *AvfkbA1*, *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub>, *AvfkbA2* και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους ενώ το πεπτίδιο οδηγός της πρωτεΐνης *AvfkbA1* έχει. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων *AvfkbA1*, *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub>, *AvfkbA2* και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> έγινε με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.

Παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Leu, λευκίνη), το ένζυμο *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> διατήρησε μόνο το 3% της ενεργότητας ΡΡιάσης (Εικόνα Γ.1.4.). Κατ' αναλογία προσδιορίστηκε η ενεργότητα ΡΡιάσης της μεταλλαγμένης *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Ala, αλανίνη). Διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> διατήρησε περίπου το 15% της ενεργότητας ΡΡιάσης (Εικόνα Γ.1.4.B).



**Εικόνα Γ.1.4.** (A) Η ενεργότητα της ΡΡιάσης (Δrate) της *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *AvfkbA1* και της (B) *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *AvfkbA2*. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και μέσω του Unpaired t test (P<0.05).

Ακολούθως μελετήθηκε εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης των *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Από την εικόνα Γ.1.5 διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> κατέστειλε τη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος, ειδικά σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως του 10x και 20x της μοριακής συγκέντρωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος στο τελικό διάλυμα (Εικ. Γ.1.5A), ενώ η μεταλλαγμένη *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> αν και εμφάνισε μειωμένη ενεργότητα ΡΡιάσης, ωστόσο επέδειξε την ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος ακόμη και σε 10x ή 20x της μοριακής συγκέντρωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος στο τελικό διάλυμα (Εικόνα Γ.1.5B). Η παρουσία της BSA πρωτεΐνης δεν επηρέασε την κινητική θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος.



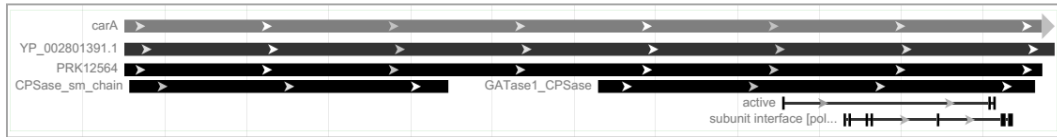
**Εικόνα Γ.1.5.** Η επίδραση των πρωτεϊνών AvfkbA1<sub>Y194A</sub> και AvfkbA2<sub>Y84A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. (Α) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μM της AvfkbA1<sub>Y194A</sub> (○), 2.5 μM της AvfkbA1<sub>Y194A</sub> (▲) και 5 μM της AvfkbA1<sub>Y194A</sub> (▼). (Β) Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μM της AvfkbA2<sub>Y84A</sub> (○), 2.5 μM της AvfkbA2<sub>Y84A</sub> (▲) και 5 μM της AvfkbA2<sub>Y84A</sub> (▼).

### Γ.1.5 Αναζήτηση πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με τις AvfkbA1 και AvfkbA2

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση των FKBP πρωτεϊνών, συγκεκριμένα των AvfkbA1 και AvfkbA2, με πρωτεΐνες στόχους και καθώς δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα στη βιβλιογραφία που να αφορούν στην αλληλεπίδραση πρωτεϊνών του μικροοργανισμού *A. vinelandii*, έγινε χρήση μεθόδων βιοπληροφορικής, μέσω της βάσης δεδομένων IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/main.xhtml>) (Hermjakob et al., 2004). Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες οι οποίες εντοπίστηκαν μετά από την υπερέκφραση του γονιδίου *Ecfkpa.H* (His-6 επίτοπο) στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων της *Ecfkpa.H* με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, έπειτα απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκλούνται από την στήλη Ni-NTA αγαρόζης ταυτόχρονα με την *Ecfkpa.H* ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους (Arifuzzaman et al., 2006, Butland et al., 2005).

Μεταξύ των υποψηφίων πρωτεϊνών, που ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *Ecfkpa* από το *E. coli* (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005), είναι η συνθετάση του καρβαμυλο-φωσφορικού οξέος, *AncarA* (carbamoyl-phosphate synthetase, *Avin\_42940*). Η επιλογή της *AncarA* έγινε με κριτήριο την παρουσία μιας προλίνης στην αμινοξική της ακολουθία, η οποία διατηρεί τη *cis* διάταξη, καθώς η κρυσταλλική δομή της είναι γνωστή. Η *AncarA* διαθέτει το αμινοξύ προλίνη με την *cis* διάταξη στη θέση 358, επομένως αποτελεί πιθανό στόχο των PPIακών.

Η συνθετάση του καρβαμυλο-φωσφορικού οξέος καταλύει τον σχηματισμό του καρβαμυλο-φωσφορικού από ένα μόριο διττανθρακικού, δύο μόρια  $Mg^{2+}$  ATP και από ένα μόριο γλουταμίνης ή αμμωνίας ως πηγής αζώτου (Anderson, 1995). Η συνθετάση του καρβαμυλο-φωσφορικού οξέος είναι μια α,β-ετεροδιμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από μια μικρή υπομονάδα (*AncarA*) η οποία καταλύει την υδρόλυση της γλουταμίνης και μια μεγάλη υπομονάδα η οποία καταλύει αντιδράσεις φωσφορυλίωσης.

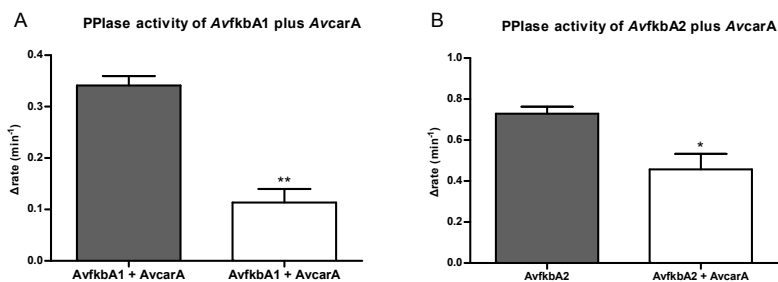


**Εικόνα Γ.1.6.** Η δομική περιοχή της *AncaA* του αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *A. vinelandii*. Διακρίνονται η υπομονάδα υδρόλυσης της γλουταμίνης καθώς και το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Το αμινοξύ προλίνη (358<sup>ο</sup> αμινοξύ), το οποίο διατηρεί τη *cis* μορφή του, ενώ θεωρείται υψηλά συντηρημένο σε πολλά βακτηριακά είδη (Thoden et al., 1999). Καθώς η *cis/trans* ισομερίωση θεωρείται μια αργή διαδικασία για το κύτταρο, διερευνήθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *AncaA* με τις πρωτεΐνες αναδίπλωσης *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, καθώς θεωρήθηκε ότι αυτές πιθανώς θα συνέβαλλαν στην επιτάχυνση της ισομερίωσης, λόγω της δράσης τους ως ΡΡιάσες.

### Γ.1.6 Επίδραση της *AncaA* στην μετρούμενη ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*

Η πιθανή αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών *AnfkbA1* και *AnfkbA2* με πρωτεΐνες στόχους υποδηλώνει ότι η παρουσία τους μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*. Η ετερόλογη υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις *AnfkbA1*, *AnfkbA2* και *AncaA* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των πλασμιδίων *AnfkbA1.H.pCDFDuet-1*, *AnfkbA2.H.pCDFDuet-1* και *AncaA.H.pCDFDuet-1*, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι πρωτεΐνες *AnfkbA1*, *AnfkbA2* και *AncaA* φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους ενώ το πεπτιδίο οδηγός της πρωτεΐνης *AnfkbA1* έχει απαλοιφθεί. Η απομόνωσή τους έγινε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Ακολούθως προσδιορίστηκε *in vitro* η ενεργότητα της ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Leu-pNA (Phe, φαίνυλαλανίνη), απουσία και παρουσία ισομοριακής συγκέντρωσης είτε με την *AnfkbA1*. Παρουσία της *AncaA* διαπιστώθηκε μείωση της ενεργότητας ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, της τάξεως του 67% και 37%, αντίστοιχα (Εικόνα Γ.1.7).



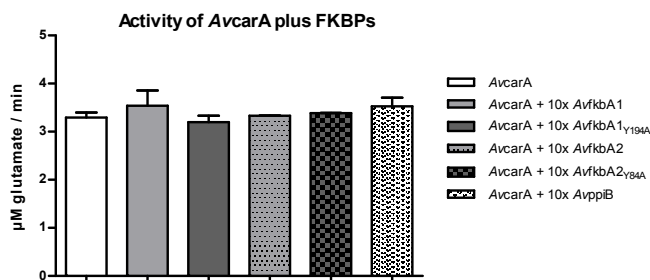
**Εικόνα Γ.1.7.** Επίδραση της *AncaA* στην ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*. (Α) Η ενεργότητα ΡΡιάσης της *AnfkbA1* σε συγκέντρωση 2μM απουσία και παρουσία της *AncaA* σε συγκέντρωση 2μM. (Β) Η ενεργότητα ΡΡιάσης της *AnfkbA2* σε συγκέντρωση 2μM απουσία και παρουσία της *AncaA* σε συγκέντρωση 2μM. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και μέσω του Unpaired t test ( $P < 0.05$ ). Η παρουσία της BSA πρωτεΐνης δεν επηρέασε την ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*.



### Γ.1.7 Επίδραση των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* στην μετρούμενη ενζυμική ενεργότητα της *AncarA*

Η ενεργότητα της *AncarA* υπολογίστηκε με τη μέθοδο της υδρόλυσης του γλουταμινικού (glutamate dehydrogenase coupling assay), καθώς πρόκειται για μια αμινοτρανσφεράση που καταλύει χημικές αντιδράσεις, στις οποίες μια αμινομάδα μεταφέρεται από ένα μόριο-δότη σε ένα μόριο-αποδέκτη. Η μέθοδος στηρίζεται στον σχηματισμό γλουταμινικού από το διουκλεοτίδιο της 3-ακέτυλο-πυριδίνης (3-acetylpyridine dinucleotide- APAD), μέσω της υδρολάσης του γλουταμινικού, η οποία (αντίδραση) μπορεί να παρακολουθηθεί φασματοφωτομετρικά.

Η μέτρηση της ενεργότητας της *AncarA* με συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  πραγματοποιήθηκε παρουσία και απουσία των πρωτεϊνών *AnfkbA1*, *AnfkbA2*, καθώς και των *AnfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AnfkbA2*<sub>Y84A</sub>, σε συγκέντρωση έως 10  $\mu\text{M}$ . Εφόσον διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεΐνες *AnfkbA1*, *AnfkbA2*, *AnfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AnfkbA2*<sub>Y84A</sub> δεν επηρεάζουν την ενεργότητα της υδρόλυσης του γλουταμινικού της *AncarA* (Εικόνα Γ.1.8), πιθανώς εμπλέκονται στην αναδίπλωση ή στην σταθερότητα του μορίου της τελευταίας. Μηδενική επίδραση στην ενεργότητα της *AncarA* είχε η κυκλοφιλίνη ΑνρριΒ αλλά και η BSA, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδράσεις ελέγχου.



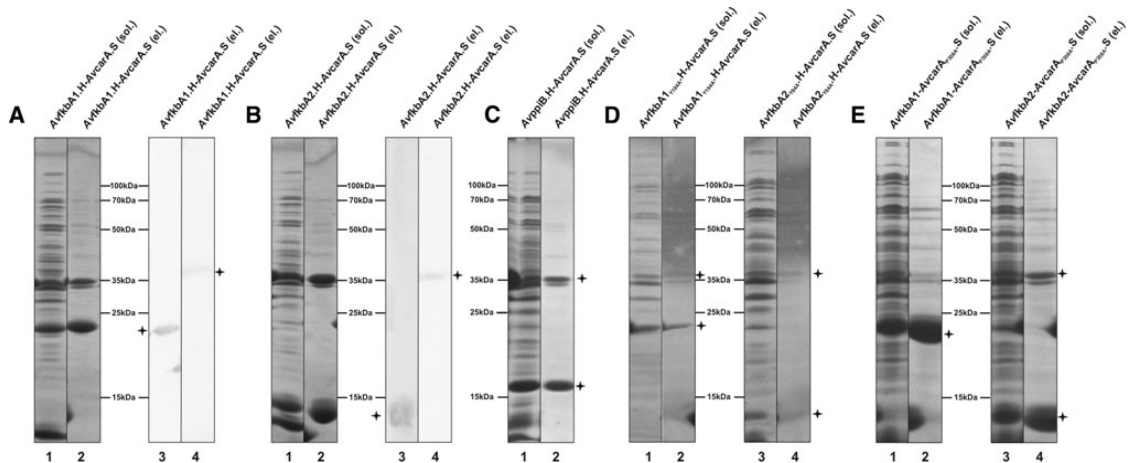
**Εικόνα Γ.1.8.** Η επίδραση των *AnfkbA1*, *AnfkbA2*, *AnfkbA1*<sub>Y194A</sub>, *AnfkbA2*<sub>Y84A</sub> και της ΑνρριΒ στην ενεργότητα της *AncarA*. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA μέσω του Tukey's Multiple Comparison Test.

#### Γ.1.7.1 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* με την *AncarA*

Η μείωση της ενεργότητας ΡΡΙΑσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* λόγω της παρουσίας της πρωτεΐνης στόχου αποτελεί ένδειξη ότι λαμβάνει χώρα μια αλληλεπίδραση μεταξύ τους στην οποία εμπλέκεται το ενεργό κέντρο του κάθε ενζύμου. Προκειμένου να εξακριβωθεί η φύση της αλληλεπίδρασης διερευνήθηκε εάν σχηματίζονται σταθερά συμπλέγματα *in vivo* μεταξύ της *AnfkbA1* ή της *AnfkbA2*, και της πρωτεΐνης στόχου, όταν και οι δύο πρωτεΐνες συνεκφράζονται στο *E. coli*. Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνέκφραση του *AncarA* με τα *AnfkbA1* και *AnfkbA2* με χρήση των πλασμιδίων *AnfkbA1*.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1, *AnfkbA2*.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 και *AncarA*.H.pCDFDuet-1. Οι *AnfkbA1* και *AnfkbA2* φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους (N-terminal) ενώ η *AncarA* φέρει τον S επίτοπο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο της (C-terminal). Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *AnfkbA1* και *AnfkbA2* έγινε με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας. Η αλληλεπίδραση της *AncarA* με τις *AnfkbA1* και *AnfkbA2* διαπιστώθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15% (Εικόνα Γ.1.9Α και Β) και με αποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του επιτοπίου των έξι ιστιδινών (His-6) και του S επιτοπίου (S-tag).

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η ενεργότητα ΡΡΙΑσης των *AvfkbA1* και *AvfkbA2* είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με την *AncarA*, πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνέκφραση του *AncarA* με τα *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> στις προαναφερθείσες συνθήκες (Εικόνα Γ.1.9D). Διαπιστώθηκε μέσω της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, ότι τα αμινοξέα αυτά δεν ευθύνονται για την αλληλεπίδραση της *AncarA* με τις *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub> και *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub> καθώς η αλληλεπίδραση παρέμεινε.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε η αντικατάσταση της προλίνης, η οποία αποτελεί το 358ο αμινοξύ της πρωτεΐνης *AncarA*, σε αλανίνη, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η προλίνη, η οποία βρίσκεται σε *cis* μορφή, αποτελεί σημείο πρόσδεσης των FKBP πρωτεϊνών. Η αντικατάσταση του αμινοξέος πραγματοποιήθηκε με πρόκληση σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο *AncarA*, με τη μέθοδο SOE. Το μεταλλαγμένο γονίδιο που προέκυψε κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCDFDuet-1 (*AncarA*<sub>P358A</sub>-S.pCDFDuet-1) ενώ προσδιορίστηκε η αλληλουχία του ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη. Διαπιστώθηκε, μέσω της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, ότι η προλίνη 358 αποτελεί σημείο πρόσδεσης μόνο της *AvfkbA1* και όχι της *AvfkbA2* καθώς η αλληλεπίδραση της *AncarA* με την *AvfkbA2* παρέμεινε (Εικόνα Γ.1.9E).



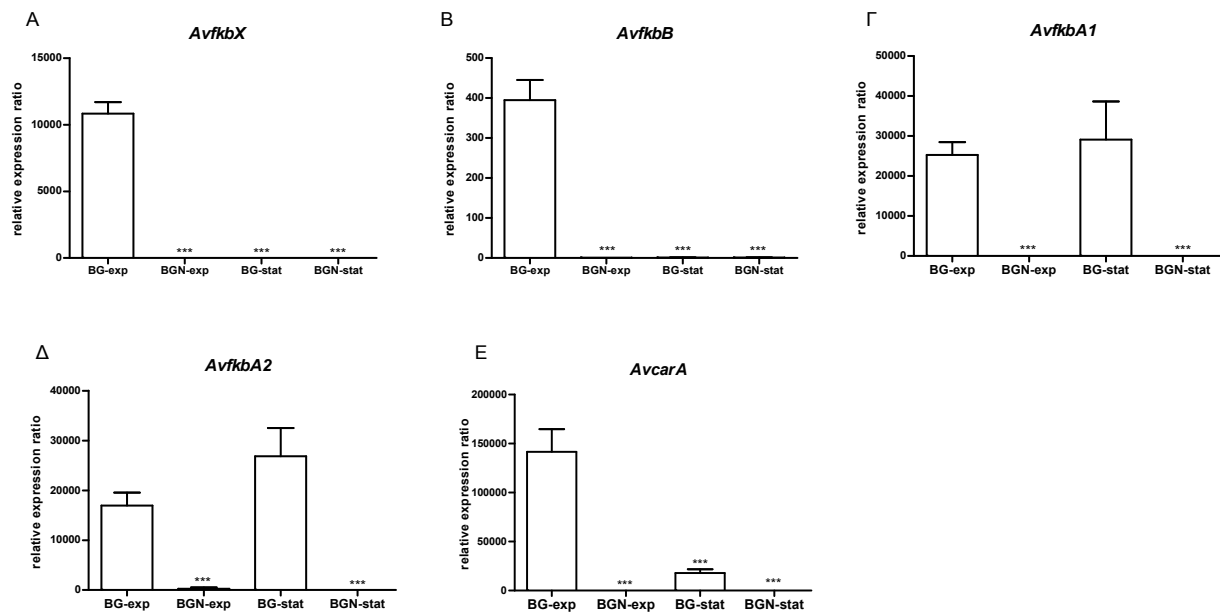
**Εικόνα Γ.1.9.** Αλληλεπίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *AvfkbA1* και *AvfkbA2* με την *AncarA*. (A) Έκφραση του *AvfkbA1*.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Η ανάλυση του διαλυτού κλάσματος (1) και του κλάσματος έκλουσης (2) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Αποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του His-6 επίτοπου του κλάσματος έκλουσης μετά την Ni-NTA απομόνωση του *AvfkbA1*.H-*AncarA*.S (3) και με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του S επιτοπίου μετά την Ni-NTA απομόνωση του *AvfkbA1*.H-*AncarA*.S (4). (B) Έκφραση του *AvfkbA2*.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Αποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του His-6 επίτοπου του κλάσματος έκλουσης μετά την Ni-NTA απομόνωση του *AvfkbA2*.H-*AncarA*.S (3) και με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του S επιτοπίου μετά την Ni-NTA απομόνωση του *AvfkbA2*.H-*AncarA*.S (4). (C) Έκφραση του *AvrpiB*.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. (D) Έκφραση του *AvfkbA1*<sub>Y194A</sub>.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 και του *AvfkbA2*<sub>Y84A</sub>.H-*AncarA*.S.pCDFDuet-1 σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. (E) Έκφραση του *AvfkbA1*.H-*AncarA*<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1 και του *AvfkbA2*.H-*AncarA*<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1 σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3.

### Γ.1.8 Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1*, *AvfkbA2* και *AncarA*

Με τη χρήση ποσοτικού RT-qPCR πραγματικού χρόνου και προκειμένου να διαπιστωθεί εάν τα γονίδια *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1*, *AvfkbA2* και *AncarA* συνεκφράζονται υπό τις ίδιες συνθήκες

υπολογίστηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασής τους. Οι μετρήσεις των επιπέδων έκφρασης ελήφθησαν κατά την εκθετική και στατική φάση ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο Burk με την προσθήκη και χωρίς την προσθήκη επιπλέον αζώτου. Για την κανονικοποίηση χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το *AvrecA* (*Avin\_38560*).

Διαπιστώθηκε ότι, κατά τη διάρκεια της εκθετικής ή στατικής φάσης ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο Burk που περιέχει γλυκόζη, όλα τα γονίδια εκφράζονται ενώ η έκφρασή τους μειώθηκε δραματικά όταν προστέθηκε εξωγενώς άζωτο στο μέσο ανάπτυξης (Εικόνα Γ.1.10).



**Εικόνα Γ.1.10.** Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (Α) *AvfkbX*, (Β) *AvfkbB*, (Γ) *AvfkbA1*, (Δ) *AvfkbA2* και (Ε) *AvcarA* του *A. vinelandii*, συγκριτικά με το γονίδιο αναφοράς το *AvrecA*, σε θρεπτικό μέσο Burk με γλυκόζη (BG) και άζωτο (BGN). Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.05$ ).

Εφόσον η έκφραση των γονιδίων *AvfkbX*, *AvfkbB*, *AvfkbA1* και *AvfkbA2* αυξάνεται κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης μόνον απουσία αζώτου, συμπεραίνεται ότι η παρουσία τους είναι απαραίτητη κατά την μετατροπή του αζώτου σε αμμωνία από το μικροοργανισμό *A. vinelandii*. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *AvcarA* είναι αυξάνεται σημαντικά όταν η γλουταμίνη συντίθεται από την αμμωνία, η οποία παράγεται από το άζωτο που δεσμεύεται σε φυσιολογικές συνθήκες και όχι όταν αυτό προστίθεται εξωγενώς.

### Γ.1.9 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης *AvfkbX* με τις *AnriB*, *AnisrH*, *AnrpxA*, *AvdnaK*, *AnmreB*, *AvminD*, *AventE*, *AvfliC* και *AvglTB* πιθανές πρωτεΐνες στόχους

Με τη χρήση μεθόδων βιοπληροφορικής και μέσω της βάσης δεδομένων IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/main.xhtml>) (Hermjakob et al., 2004), συγκεντρώθηκαν οι υποψήφιες πρωτεΐνες που ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *EcFkpB* από το *E. coli* (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίστηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του

γονιδίου *EcfcprB*.H (His-6 επίτοπο) στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων της *EcfcprB*.H με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, έπειτα απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκλούνται από τη στήλη αγαρόζης-Ni ταυτόχρονα με την *EcfcprB*. Η ενώ ακολούθως προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους. Ανάμεσά τους είναι η *EcRibF* (*Avin\_11770*) (bifunctional riboflavin kinase/FMN adenyltransferase) η οποία καταλύει τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό της ριβοφλαβίνης, η *EcispH* (*Avin\_11810*) (4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase) η οποία καταλύει τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, ισοπρενίων και τερπενίων, η *EcprdxA* (*Avin\_46820*) η οποία καταλύει την NAD(P)-εξαρτώμενη οξειδωση της 4-(phosphohydroxy)-L-θρεονίνης (HTP) σε 2-άμινο-3-όξο-4-(φωσφοϋδροξυ) βουτυρικό οξύ, η *EcdnaK* (*Avin\_42970*) η οποία αποτελεί μια κυτταροπλασματική τσαπερόνη και η *EcmtreB* (*Avin\_12650*) που συμμετέχει στην κυτταρική μορφογένεση και στην κυτταρική διαίρεση. Επίσης, αποκτήθηκε η *EcminD* (*Avin\_35120*) ρυθμίζει την ενδοκυτταρική τοποθέτηση του σημείου σχηματισμού διαφράγματος (*septum site*), η *EcmtE* (*Avin\_21210*) συμμετέχει στη βιοσύνθεση σιδηροφόρων, η *EcflcC* (*Avin\_27700*) η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση της φλαγγελίνης και η *EcglbB* (*Avin\_45210*) η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση του γλουταμινικού οξέος.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση της *AvfkbX* με τις παραπάνω πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνέκφραση του γονιδίου *AvfkbX* με τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις εννέα πιθανές αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες, ως ανεξάρτητα ζευγάρια πρωτεϊνών, με χρήση του φορέα έκφρασης pCDFDuet-1. Η *AvfkbX* φέρει επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της (N-terminal) ενώ οι *AvribF*, *AvispH*, *AvprdxA*, *AvdnaK*, *AvmtreB*, *AvminD*, *AvmtE*, *AvfliC* και *AvglbB* φέρουν το S επίτοπο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (C-terminal). Η έκφραση των εννέα πλασμιδικών φορέων έκφρασης *AvfkbX.H-AvribF.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvispH.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvprdxA.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvdnaK.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvmtreB.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvminD.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvmtE.S.pCDFDuet-1*, *AvfkbX.H-AvfliC.S.pCDFDuet-1* και *AvfkbX.H-AvglbB.S.pCDFDuet-1* έγινε ανεξάρτητα και σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *AvfkbX* έγινε με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Μέσω της ηλεκτροφόρησης σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, με την οποία εντοπίζονται τα σταθερά σύμπλοκα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, δεν ανιχνεύθηκε αλληλεπίδραση της *AvfkbX* με τις *AvribF*, *AvispH*, *AvprdxA*, *AvdnaK*, *AvmtreB*, *AvminD*, *AvmtE*, *AvfliC* και *AvglbB*.

### Γ.1.10 Χρωμοσωμικές μεταλλαγές μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού

Ένας τρόπος ανίχνευσης του βιολογικού ρόλου των πρωτεϊνών στη λειτουργία του κυττάρου είναι μέσω γονιδιακής απαλοιφής. Με στόχο την απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες στο μικροοργανισμό *A. vinelandii*, επιχειρήθηκε η τεχνική του ομόλογου ανασυνδυασμού. Έγινε χρήση του πλασμιδίου αυτοκτονίας (*Suicide vectors*), στα οποία εισήχθη ομόλογη περιοχή του γονιδιωματικού DNA, ώστε να προκύψουν στοχευμένες διαγραφές των επιθυμητών γονιδίων.

Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pK18mobsacB (Schäfer et al., 1994), στο οποίο εισήχθησαν τμήματα του γονιδίου *AvfkbA1*. Το πλασμίδιο pK18mobsacB περιέχει το RP4 σύστημα (RP4 origin of replication) το οποίο απαιτεί για τη λειτουργία του μια πρωτεΐνη που ονομάζεται PI που

κωδικοποιείται από το γονίδιο *pir*. Το πλασμίδιο περιέχει επίσης ένα τμήμα το οποίο κωδικοποιεί την *mob* περιοχή του RP4. Έτσι, το πλασμίδιο pK18mobsacB μόλις μεταφερθεί στο γένωμα δεν είναι σε θέση να αντιγράφεται σε παραλήπτες που δεν φέρουν την πρωτεΐνη P1. Εκτός από την *mob* περιοχή φέρει επίσης και το γονίδιο *sacB* από το *Bacillus subtilis*. Η έκφραση του γονιδίου *sacB* έχει τοξικές συνέπειες για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όταν καλλιεργούνται παρουσία 5-10% σακχαρόζης. Το πλασμίδιο pK18mobsacB φέρει επιπλέον και ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Kan<sup>R</sup>), ώστε όσα κύτταρα έχουν μετασχηματιστεί από το πλασμίδιο επιβιώνουν στο θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού ενώ όσα κύτταρα δεν έχουν μετασχηματιστεί από το πλασμίδιο πεθαίνουν.

Το πλασμίδιο pK18mobsacB, το οποίο φέρει ομόλογες περιοχές του γονιδίου *AnfkbA1* εισέρχεται με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation) στα κύτταρα του *A. vinelandii* και ενσωματώνεται στο γενωματικό DNA του κυττάρου με ομόλογο ανασυνδυασμό. Κατά τον πρώτο ανασυνδυασμό, τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία του αντιβιοτικού, ώστε να επικρατήσουν αυτά στα οποία εισήχθη επιτυχώς το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη του πλασμιδίου. Κατά τον δεύτερο ανασυνδυασμό τα κύτταρα αναπτύσσονται παρουσία σακχαρόζης, οπότε αυτά στα οποία έχει γίνει ένθεση του πλασμιδίου αυτοκτονίας πεθαίνουν διότι το γονίδιο *sacB* του πλασμιδίου μετατρέπει την σακχαρόζη σε τοξικό παραπροϊόν για το κύτταρο. Η επαλήθευση του ομόλογου ανασυνδυασμού πραγματοποιείται με την τεχνική PCR και την αλληλούχιση του DNA.

Λόγω του μη επιτυχούς ομόλογου ανασυνδυασμού, ο οποίος επιχειρήθηκε με στόχο την απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες στο *A. vinelandii*, αποκτήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη *E. coli*. Στο κάθε *E. coli* στέλεχος έχει απενεργοποιηθεί το κάθε ένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες, με συνέπεια να προκύψουν τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί, μελετήθηκε ο φαινότυπος των μεταλλαγμένων στελεχών σε συνθήκες ομαδικής κίνησης (*Swarming motility*), κολυμβητικής κίνησης (*Swimming motility*) και σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου (*Biofilm formation*), προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των FKBP πρωτεϊνών.

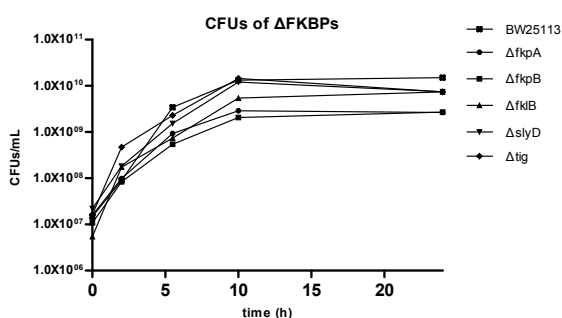
## Γ.2 Οι FKBP του *E. coli*

Τα μέλη της οικογένειας των FKBP πρωτεϊνών απαντώνται σε όλους τους προκαρυωτικούς οργανισμούς και η αμινοξική τους αλληλουχία είναι φυλογενετικά συντηρημένη. Στον μικροοργανισμό *E. coli*, μέσω της αναζήτησης στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του, εντοπίζονται πέντε γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP. Πρόκειται για τα γονίδια *EcfkpA* (b3347/JW3309), *EcfkpB* (b0028/JW0026), *EcfkIB* (b4207/JW5746), *EcslyD* (b3349/JW3311) και *Ectig* (b0436/JW0426). Προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των FKBP πρωτεϊνών, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη τα οποία φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες (*ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*).

### Γ.2.1 Καμπύλη ανάπτυξης των *EcΔFKBP* στελεχών

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο, στους 30°C ως συνάρτηση των μονάδων σχηματισμού αποικιών (Colony Forming Units, CFUs) του στελέχους αγρίου τύπου BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*.

Στην εικόνα Γ.2.1 παρατηρήθηκε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* εμφανίζουν φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης, όμοιο με του στελέχους αγρίου τύπου.



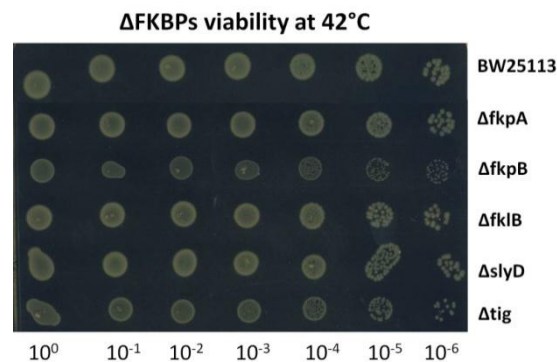
**Εικόνα Γ.2.1.** Οι μονάδες σχηματισμού αποικιών/ ml (Colony Forming Units-CFUs) των στελεχών *ΔfkpA* (●), *ΔfkpB* (■), *ΔfklB* (▲), *ΔslyD* (▼) και *Δtig* (◆), σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 (\*).

### Γ.2.2 Διερεύνηση της συμμετοχής των *EcFKBP* πρωτεϊνών στην απόκριση σε παράγοντες καταπόνησης

Πολυάριθμες μελέτες έχουν καταδείξει τη συμμετοχή των PPIασών στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε συνθήκες καταπόνησης. Οι κυκλοφιλίνες είναι ζωτικής σημασίας για την κυτταρική προσαρμογή, υπό την επίδραση καταπόνησης (Roset et al., 2013), ενώ έχει αναφερθεί ότι εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στη μεταγωγή σήματος, στη μεταγραφική ρύθμιση (Gothel and Marahiel, 1999) και στην παθογένεια ζυμών (Ren et al., 2005). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μεταλλαγμένο στέλεχος *Brucella abortus*, στο οποίο έχουν απενεργοποιηθεί τα γονίδια *cyrA* και *cyrB* (*ΔcyrAB*) εμφανίζει μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε στρεσογόνους παράγοντες όπως είναι η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου και το χαμηλό pH (Roset et al., 2013). Από την οικογένεια των παρβουλινών, η πρωτεΐνη *surA* έχει συσχετιστεί με την απόκριση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων

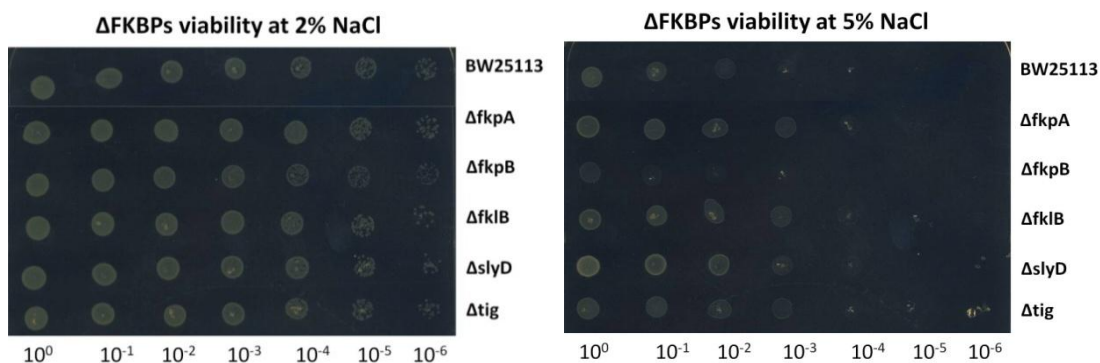
σε συνθήκες καταπόνησης. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι είναι αναγκαία για την ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό στρες και στην παθογένεια του μικροοργανισμού *Yersinia pseudotuberculosis* (Obi et al., 2011). Από την οικογένεια των FKBP πρωτεϊνών αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη *tig* επηρεάζει την ανθεκτικότητα αλλά και την παθογένεια του *Streptococcus suis* σερότυπου 2 (Wu et al., 2011) ενώ παράλληλα η έκφραση της περιπλασμικής *EcfkA* μειώνει την απόκριση σε εξωκυτταρικούς στρεσογόνους παράγοντες (Narayanan and Chou, 2008). Όσον αφορά τη συμμετοχή των FKBP πρωτεϊνών στην παθογένεια βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη MIP, είναι απαραίτητη για την προσκόλληση και την εισβολή εντός του επιθηλιακού φραγμού (Köhler et al., 2003).

Με σκοπό την διερεύνηση της συμμετοχής των FKBP πρωτεϊνών σε παράγοντες καταπόνησης, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfkIB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας στους 30°C και κύτταρα από την εκθετική φάση αραιώθηκαν διαδοχικά και τοποθετήθηκαν σε LB τρυβλία τα οποία επώαστηκαν σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (42°C). Παράλληλα έγινε εμβολιασμός σε τρυβλία τα οποία περιείχαν 2% και 5% NaCl) και τα οποία επώστηκαν στους (Εικόνα Γ.2.2 και Γ.2.3).



**Εικόνα Γ.2.2.** Η επίδραση υψηλής θερμοκρασίας (42°C) στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfkIB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Η φωτογραφία απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB έπειτα από επώαση 20h, στους 42°C.

Από την εικόνα Γ.2.2 διαπιστώνεται ότι μόνο το στέλεχος *ΔfkrB* παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως συμπεραίνεται ότι η πρωτεΐνη *EcfkrB* πιθανώς συμμετέχει στην απόκριση του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης.



**Εικόνα Γ.2.3.** Η επίδραση 2% και 5% χλωριούχου νατρίου στην επιβίωση του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Η φωτογραφία απεικονίζει την ανάπτυξη του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών σε στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχε 2% και 5% χλωριούχο νάτριο έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C.

Από την εικόνα Γ.2.3 παρατηρείται ότι η επιβίωση των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* διαφέρει ελάχιστα από του στελέχους αγρίου τύπου, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας. Ωστόσο, διακρίνεται το στέλεχος *ΔfkrB*, το οποίο παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επίσης, παρατηρείται ότι το στέλεχος *ΔslyD* παρουσιάζει αυξημένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες *EcfkrB* και *EcslyD*, πιθανώς, συμμετέχουν με διαφορετικό τρόπο στην απόκριση του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

### **Γ.2.3 Τα μέλη της *EcFKBP* οικογένειας επηρεάζουν την κινητικότητα των βακτηρίων και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων**

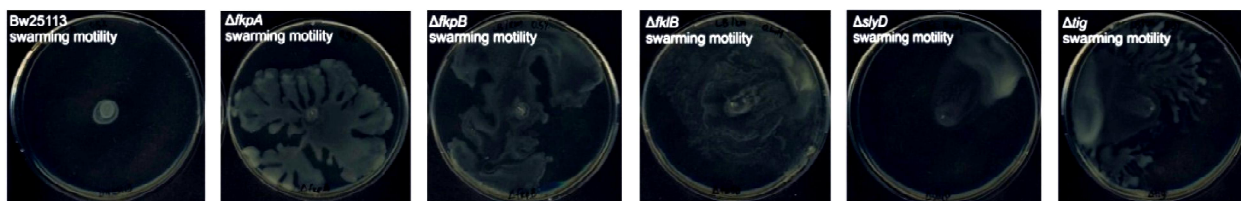
Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, όπου πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση 3.985 γονιδίων του μικροοργανισμού *E. coli* και χαρακτηρισμός του φαινοτύπου του κάθε στελέχους σε συνθήκες ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια (*swarming* τρυβλία), βρέθηκε ότι 216 εξ αυτών εμπλέκονται στον συγκεκριμένο φαινότυπο. Η σάρωση υπέδειξε ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την ομαδική κινητικότητα συμμετέχουν, μεταξύ άλλων, στον κύκλο του Krebs, στον μεταβολισμό της γλυκόζης, στη μεταγωγή σήματος και στη βιοσύνθεση λιποσακχαριτών ή ότι κωδικοποιούν για τσαπερόνες ή για πρωτεΐνες αναδίπλωσης όπως οι ΡΡ1άσες (Inoue et al., 2007).

Τα μέλη της οικογένειας των ΡΡ1άσων αλλά και οι τσαπερόνες επηρεάζουν την κινητικότητα του βακτηρίου *E. coli*, πιθανότατα έμμεσα, καθώς αναδιπλώνουν ή αποτρέπουν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν ενεργά στο μηχανισμό της κινητικότητας (Inoue et al., 2007). Προκειμένου να διερευνηθεί ο φυσιολογικός ρόλος των FKBP πρωτεϊνών στη λειτουργία και κινητικότητα του κυττάρου, χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* και ο φαινότυπός τους χαρακτηρίστηκε σε συνθήκες ομαδικής κίνησης (*swarming*), κολυμβητικής κίνησης (*swimming*) και σε συνθήκες βιοϋμενίου (*biofilm*).

#### **Γ.2.3.1 Ικανότητα ομαδικής κίνησης (*swarming*) των *EcΔFKBPs* στελεχών**

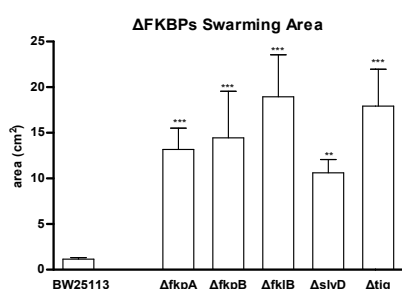
Ο ρόλος των FKBP στην επιφανειακή ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *E. coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* σε *swarming* τρυβλία (τα τρυβλία περιέχουν θρεπτικό υλικό LB, συγκέντρωσης σε άγαρ 0.5% και σε γλυκόζη 0.5% (w/v)) (Εικόνα Γ.2.4). Η ανάπτυξή τους καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r.





**Εικόνα Γ.2.4.** Ο φαινότυπος του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

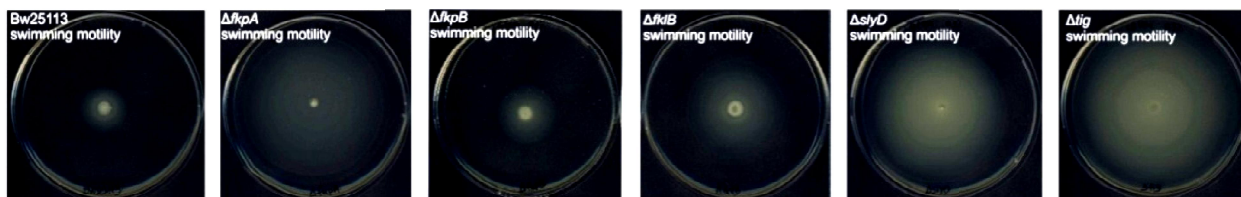
Διαπιστώθηκε, ότι τα στελέχη που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *EcfkrA*, *EcfkrB*, *EcfklB* και *Ectig* εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ομαδικής κινητικότητας σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα στέλεχη *ΔfkrA* και *ΔfkrB* αναπτύχθηκαν, σε τετραγωνικά εκατοστά, σχεδόν δέκα φορές περισσότερο από το στέλεχος αγρίου τύπου ενώ τα στελέχη *ΔfklB* και *Δtig*, είκοσι φορές περισσότερο, σημειώνοντας μια στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα Γ.2.4). Αντίθετα, το στέλεχος *ΔslyD* επέδειξε τη μικρότερη ικανότητα ομαδικής κίνησης συγκριτικά με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη, όμως ο φαινότυπος του διέφερε από του αγρίου τύπου καθώς αναπτύχθηκε σχεδόν δέκα φορές περισσότερο. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες FKBP είναι αρνητικοί ρυθμιστές (*negative regulators*) της ικανότητας ομαδικής κίνησης σε επιφάνεια.



**Εικόνα Γ.2.5.** Η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test (P<0.0001)).

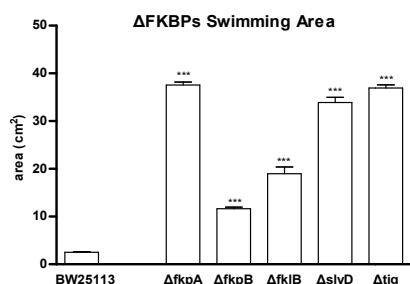
### Γ.2.3.2 Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης (*swimming*) των *EcΔFKBPs* στελεχών

Με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των FKBP πρωτεϊνών στην κολυμβητική κίνηση αξιοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες. Ειδικότερα, η ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία (τα τρυβλία περιέχουν θρεπτικό υλικό LB συγκέντρωσης σε άγαρ 0.3% (w/v)) (Εικόνα Γ.2.6) και υπολογίστηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.7).



**Εικόνα Γ.2.7.** Ο φαινότυπος του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

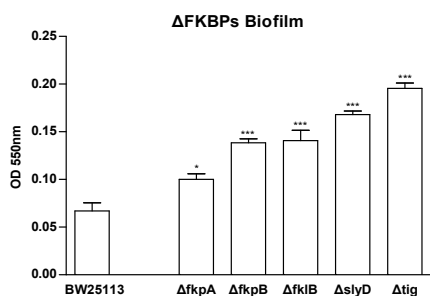
Διαπιστώθηκε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔslyD* και *Δtig* εμφανίζουν τη μεγαλύτερη κολυμβητική κίνηση, σχεδόν 30 φορές περισσότερο από την κινητικότητα του στελέχους αγρίου τύπου. Τα στελέχη *ΔfklB* και *ΔfkrB* εμφανίζουν κινητικότητα σχεδόν 20 φορές και πέντε φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη από εκείνη του αγρίου τύπου. Από τις παρατηρήσεις της κολυμβητικής ικανότητας των στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες FKBP ρυθμίζουν αρνητικά την κολυμβητική κίνηση.



**Εικόνα Γ.2.6.** Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA μέσω του (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

### Γ.2.3.3 Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (*biofilm*) των *EcΔFKBPs* στελεχών

Τέλος, η μελέτη του ρόλου των FKBP πρωτεϊνών στο σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli* διερευνήθηκε μέσω της ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου και των στελεχών που φέρουν απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP, σε συνθήκες βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* και διαπιστώθηκε έπειτα από ανάπτυξη σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100 μL υγρό θρεπτικό υλικό LB, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h με τη χρήση της χρωστικής Crystal Violet ενώ η βιομάζα του βιοϋμενίου καταγράφηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.8).



**Εικόνα Γ.2.8.** Η ικανότητα σχηματισμού του στελέχους BW25113 και των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

Παρατηρήθηκε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ειδικότερα, τα στελέχη *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* εμφανίζουν μεγάλη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και στατιστικά σημαντική ενώ το στέλεχος *ΔfkpA* εμφανίζει τη μικρότερη διαφορά από το στέλεχος αγρίου τύπου. Εφόσον απουσία των FKBP πρωτεϊνών η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου αυξάνεται, συμπερασματικά προκύπτει ότι οι FKBP πρωτεΐνες ρυθμίζουν αρνητικά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### **Γ.2.4 Ο ρόλος της ενεργότητας ΡΡΐάσης και της ενεργότητας τσαπερόνης των *EcFKBP* πρωτεϊνών στην κινητικότητα και στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του *E. coli***

##### **Γ.2.4.1 Κατασκευή κατευθυνόμενων μεταλλάξεων στο ενεργό κέντρο ΡΡΐάσης των *EcFKBP* πρωτεϊνών**

Για τον εντοπισμό των αμινοξέων που αποτελούν το ενεργό κέντρο ΡΡΐάσης της κάθε FKBP πρωτεΐνης, ευθυγραμμίστηκε η αμινοξική αλληλουχία FKBP12 του ανθρώπου, της οποίας τα αμινοξέα που μετέχουν στο ενεργό κέντρο είναι γνωστά (Ikura and Ito, 2007, Tradler et al., 1997, De Cenzo et al., 1996), με την αλληλουχία της κάθε FKBP πρωτεΐνης (Εικόνα Γ.1.1). Αφού εντοπίστηκαν, κατασκευάστηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων, τα οποία πιθανώς μετέχουν στο ενεργό κέντρο ΡΡΐάσης κάθε FKBP πρωτεΐνης. Τα αμινοξέα τυροσίνη στη θέση 225 της *Ec fkpA*, τυροσίνη στη θέση 181 της *Ec fklB*, φαινυλαλανίνη στη θέση 132 της *EcslyD* και φαινυλαλανίνη στη θέση 198 της *Ectig* αντικαταστάθηκαν με το αμινοξύ αλανίνη. Εκτός από τη σημειακή μετάλλαξη F198A στο πιθανό ενεργό κέντρο της ενεργότητας ΡΡΐάσης της πρωτεΐνης *Ectig*, κατασκευάστηκε και μια δεύτερη ανεξάρτητη σημειακή μετάλλαξη V66G, όπου το αμινοξύ βαλίνη, το οποίο εδράζεται στη θέσης δέσμησης του ριβοσώματος, αντικαταστάθηκε με το αμινοξύ γλυκίνη. Η πρωτεΐνη *Ec fkpB<sub>D119A</sub>* φέρει τρεις σημειακές μεταλλάξεις, οι οποίες ωστόσο θα αναφέρονται ως D119A. Το αμινοξύ γλουταμικό οξύ στη θέση 46 έχει αντικατασταθεί με γλυκίνη, το αμινοξύ σερίνη στη θέση 83 με προλίνη και το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ στη θέση 119 με αλανίνη. Η αντικατάσταση των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων στα αντίστοιχα γονίδια. Για την σημειακή μετάλλαξη στο πιθανό ενεργό κέντρο ΡΡΐάσης της κάθε FKBP πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος SOE. Τα μεταλλαγμένα γονίδια που προέκυψαν κλωνοποιήθηκαν είτε στον φορέα pPROEX.HTa είτε στον pCDFDuet-1 και

προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους, ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη της κάθε FKBP πρωτεΐνης.

## Γ.2.4.2 Η πρωτεΐνη *Ec*fkpA

### Γ.2.4.2.1 Ενζυμική ενεργότητα της *Ec*fkpA

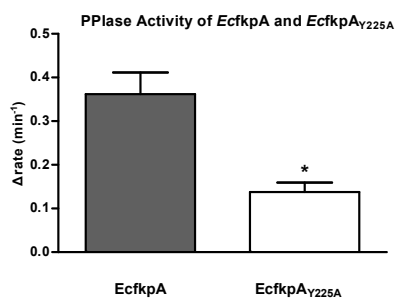
Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ec*fkpA και της μεταλλαγμένης *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> (Εικόνα Γ.2.9). Η υπερέκφραση των γονιδίων *Ec*fkpA και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των πλασμιδίων *Ec*fkpA.H.pCDFDuet-1 και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub>.H.pCDFDuet-1, με την προσθήκη 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Το πεπτιδίο οδηγός έχει αφαιρεθεί από τις *Ec*fkpA και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub>. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων *Ec*fkpA και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> έγινε με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ΡΡιάσης των ανασυνδυασμένων *Ec*fkpA και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Πίνακας Γ.2.1).

**Πίνακας Γ.2.1.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων *Ec*fkpA και *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

Substrate (-Xaa-)	<i>Ec</i> fkpA	<i>Ec</i> fkpA <sub>Y225A</sub>
	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
-Leu-	7.19 ± 0.004	2.65 ± 0.001

Όπως διαπιστώνεται από την εικόνα Γ.2.9, η οποία απεικονίζει την ανίχνευση της ενζυμικής ενεργότητας της μεταλλαγμένης *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> διαπιστώθηκε μείωση 60 έως 65% σε σχέση με την αγρίου τύπου *Ec*fkpA.

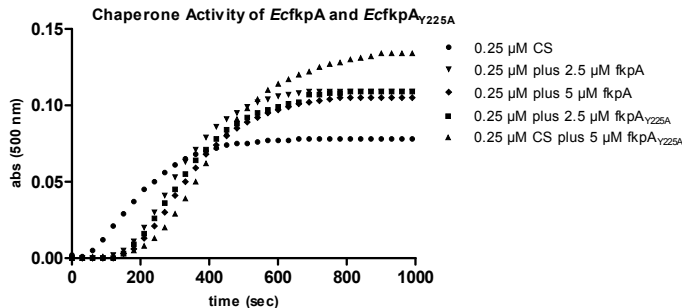


**Εικόνα Γ.2.9.** Η ενεργότητα της ΡΡιάσης (Δrate) της *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *Ec*fkpA. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0, μέσω του Unpaired t test (P<0.05).

Ακολούθως, μελετήθηκε εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ec*fkpA<sub>Y225A</sub> επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Η *in vitro* παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες (45°C) λόγω της παρουσίας μιας πρωτεΐνης υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη αυτή

πιθανότητα έχει ενεργότητα τσαπερόνης. Η πορεία δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να παρακολουθηθεί φωτομετρικά.

Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο πρωτεΐνες *Ecfk*A και *Ecfk*A<sub>Y225A</sub> δεν φαίνεται να παρεμποδίζουν τη συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.10).



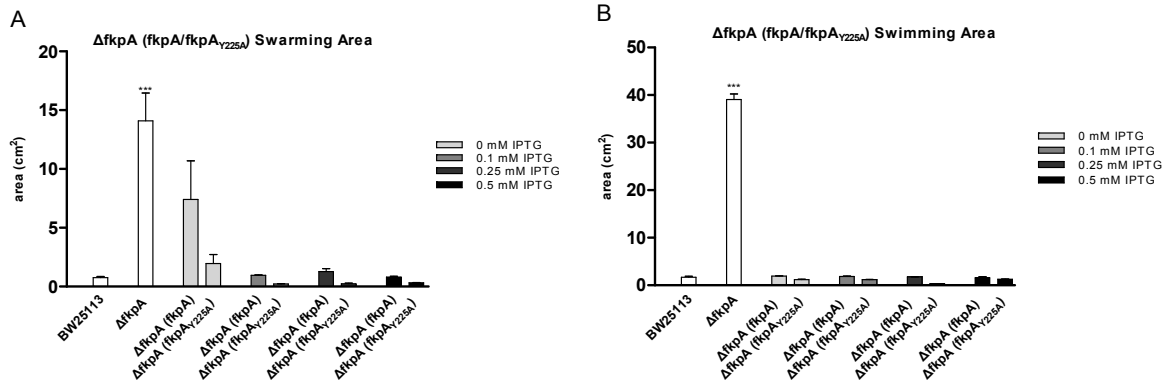
**Εικόνα Γ.2.10.** Η επίδραση των πρωτεϊνών *Ecfk*A και *Ecfk*A<sub>Y225A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 2.5 μM της *Ecfk*A (▼), 5 μM της *Ecfk*A (◆), 2.5 μM της *Ecfk*A<sub>Y225A</sub> (■) και 5 μM της *Ecfk*A<sub>Y225A</sub> (▲).

#### Γ.2.4.2.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους *Δfkr*A στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *Ecfk*A είτε το *Ecfk*A<sub>Y225A</sub>

Διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *Ecfk*A και *Ecfk*A<sub>Y225A</sub> στο στέλεχος *Δfkr*A επαναφέρει τον φαινότυπο του *Δfkr*A στα επίπεδα του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, ώστε να διαπιστωθεί εάν η ελλειψη του *fkr*A γονιδίου είναι υπεύθυνη για τον *Δfkr*A φαινότυπο και επίσης να διερευνηθεί εάν η μείωση της ενεργότητας ΡΡιάσης επηρεάζει τον φαινότυπο. Για το σκοπό αυτόν, το στέλεχος *Δfkr*A μετασηματίστηκε με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *Ecfk*A.H. pPROEX.HTa και *Ecfk*A<sub>Y225A</sub>.H.pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη *Δfkr*A(*fkr*A) και *Δfkr*A(*fkr*A<sub>Y225A</sub>), αντίστοιχα.

##### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *Δfkr*A(*fkr*A) και *Δfkr*A(*fkr*A<sub>Y225A</sub>), παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.11A και 11B).



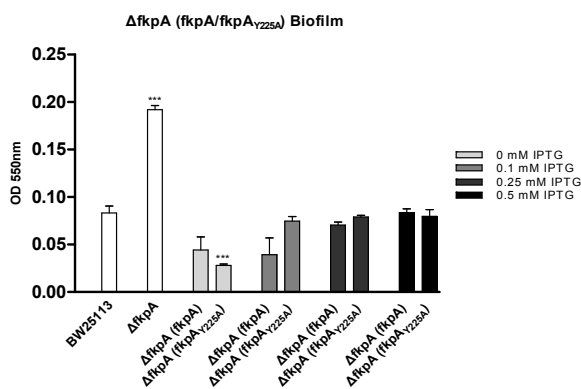
**Εικόνα Γ.2.11.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113 και  $\Delta fkrA$  καθώς και των στελεχών  $\Delta fkrA(fkrA)$  και  $\Delta fkrA(fkrA_{Y225A})$ , σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλή ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta fkrA$  μειώνεται λόγω της έκφρασης των γονιδίων  $EcfkrA$  και  $EcfkrA_{Y225A}$  καθώς επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.11A). Παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης των στελεχών  $\Delta fkrA(fkrA)$  και  $\Delta fkrA(fkrA_{Y225A})$  ακόμα και απουσία IPTG. Τούτο πιθανά οφείλεται στα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου  $EcfkrA$  λόγω της αναγνώρισης του  $trc$  προαγωγέα από την ενδογενή RNA πολυμεράση (*leaky transcription*) (Agnoli et al., 2006). Εφόσον η έκφραση του γονιδίου  $EcfkrA$ , δηλαδή η παρουσία επαρκούς ποσότητας της πρωτεΐνης  $EcfkrA$ , επαναφέρει τον φαινότυπο της ομαδικής κίνησης στα επίπεδα του αγρίου τύπου μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο φαινότυπος της υψηλής ικανότητας ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta fkrA$  οφείλεται στην απουσία του γονιδίου  $EcfkrA$  και κατ'επέκταση στην απουσία της πρωτεΐνης  $EcfkrA$ . Επίσης, η έκφραση του γονιδίου  $EcfkrA_{Y225A}$  στο στέλεχος  $\Delta fkrA$ , επαναφέρει τον φαινότυπο της ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta fkrA$  στα επίπεδα του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Εφόσον η πρωτεΐνη  $EcfkrA_{Y225A}$  έχει μειωμένη ενεργότητα ΡΡΙΑσης συμπεραίνεται ότι η πλήρης ενεργότητα ΡΡΙΑσης της  $EcfkrA$  δεν είναι αναγκαία για την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Από την εικόνα Γ.2.11B παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου  $EcfkrA$  στο στέλεχος  $\Delta fkrA(fkrA)$ , σε όλα τα επίπεδα έκφρασης (συγκεντρώσεις 0 έως 0.5 mM του IPTG), προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Η ιδιαίτερα αυξημένη κολυμβητική ικανότητα του στελέχους  $\Delta fkrA$  επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα και έπειτα από την υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου  $EcfkrA_{Y225A}$  στο στέλεχος  $\Delta fkrA(fkrA_{Y225A})$ . Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της  $EcfkrA$  δεν είναι αναγκαία για την ικανότητα της  $fkrA$  να επαναφέρει τον  $\Delta fkrA$  φαινότυπο.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τέλος, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του *fkpA* γονιδίου στο σχηματισμό βιοϋμενίου η αξιοποιήθηκαν τα στελέχη BW25113,  $\Delta fkpA$ ,  $\Delta fkpA(fkpA)$  και  $\Delta fkpA(fkpA_{Y225A})$ . Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *EcfkpA* και *EcfkpA<sub>Y225A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών  $\Delta fkpA(fkpA)$  και  $\Delta fkpA(fkpA_{Y225A})$ , παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100  $\mu$ L υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h στους 30°C και στη συνέχεια συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και  $\Delta fkpA$ . Τα σχηματισμένα βιοϋμένια οπτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με την χρωστική Crystal Violet ενώ η βιομάζα των βιοϋμενίων ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.12).



**Εικόνα Γ.2.12.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και  $\Delta fkpA$  καθώς και των στελεχών  $\Delta fkpA(fkpA)$  και  $\Delta fkpA(fkpA_{Y225A})$ , σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

Από την εικόνα Γ.2.12 παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkpA* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με την υψηλή ικανότητα του στελέχους  $\Delta fkpA$ . Δηλαδή τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *EcfkpA* στο στέλεχος  $\Delta fkpA(fkpA)$  επαναφέρουν τον φαινότυπο του αγρίου τύπου. Ομοίως, η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkpA<sub>Y225A</sub>* επαναφέρει το φαινότυπο του αγρίου τύπου. Επομένως είναι πιθανό ότι η ενεργότητα ΡΡ1άσης της *EcfkpA* δεν εμπλέκεται στο μηχανισμό σχηματισμού βιοϋμενίου του *E. coli*.

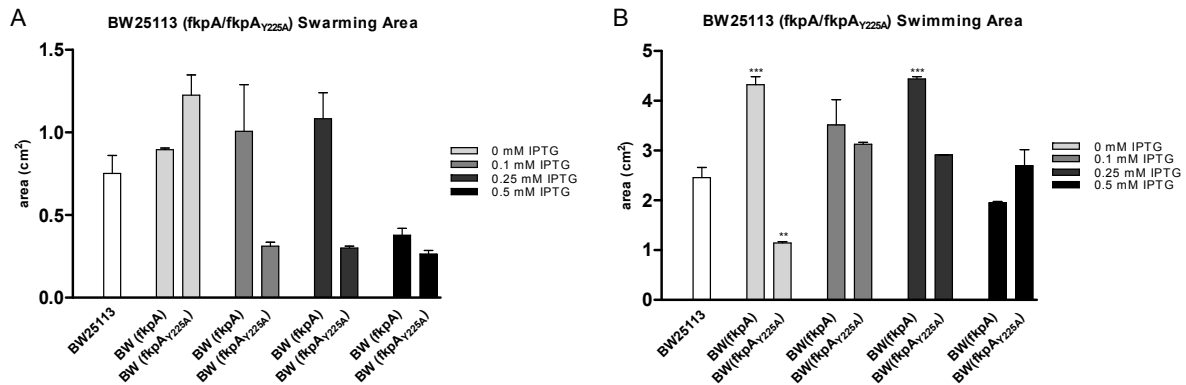
#### Γ.2.4.2.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *EcfkpA* είτε το *EcfkpA<sub>Y225A</sub>*

Διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *EcfkpA* και *EcfkpA<sub>Y225A</sub>* στο στέλεχος BW25113 επηρεάζει το φαινότυπο του κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου και να διερευνηθεί η επίδραση της ενεργότητας ΡΡ1άσης. Αντίστοιχα, τα πλασμίδια *EcfkpA.H.pPROEX.HTa* και *EcfkpA<sub>Y225A</sub>.H.pPROEX.HTa* χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του

στελέχους BW25113 με αποτέλεσμα την κατασκευή των στελεχών BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*).

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*), παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.13Α και Β).



**Εικόνα Γ.2.13.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.13Α, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *Ecfkpa* στο στέλεχος BW25113(*fkrA*) δεν φαίνεται να προκαλεί σημαντική μεταβολή του φαινοτύπου της ομαδικής κίνησης. Το στέλεχος BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*), ωστόσο, φαίνεται να παρουσιάζει μια μεγαλύτερη τάση καταστολής του φαινοτύπου. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η υπερέκφραση και των δύο γονιδίων *Ecfkpa* και *Ecfkpa<sub>Y225A</sub>* στα στελέχη BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*), αντίστοιχα, προκαλεί μερική μείωση της ικανότητας της ομαδικής κίνησης.

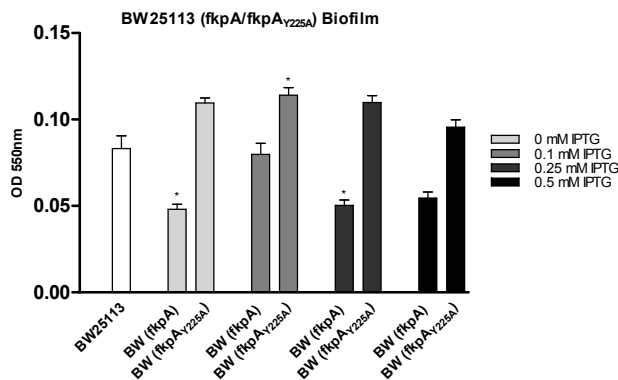
Ακολούθως, από την εικόνα Γ.2.13Β προκύπτει ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *Ecfkpa* και *Ecfkpa<sub>Y225A</sub>* στα στελέχη BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*), αντίστοιχα, δεν προκαλεί ιδιαίτερες μεταβολές της κολυμβητικής κίνησης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡ1άσης της πρωτεΐνης *Ecfkpa* πιθανότητα δεν επιδρά στον μηχανισμό της κολυμβητικής κίνησης.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τέλος, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της ενεργότητας της ΡΡ1άσης στο σχηματισμό βιοϋμενίου αξιοποιήθηκαν τα στελέχη BW25113, BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *Ecfkpa* και *Ecfkpa<sub>Y225A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA<sub>Y225A</sub>*) παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100 μl



υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h στους 30°C και έπειτα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιομενίου του στελέχους BW25113. Τα σχηματισμένα βιοϋμένια οπτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με την χρωστική Crystal Violet ενώ η βιομάζα των βιοϋμενίων ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.14).



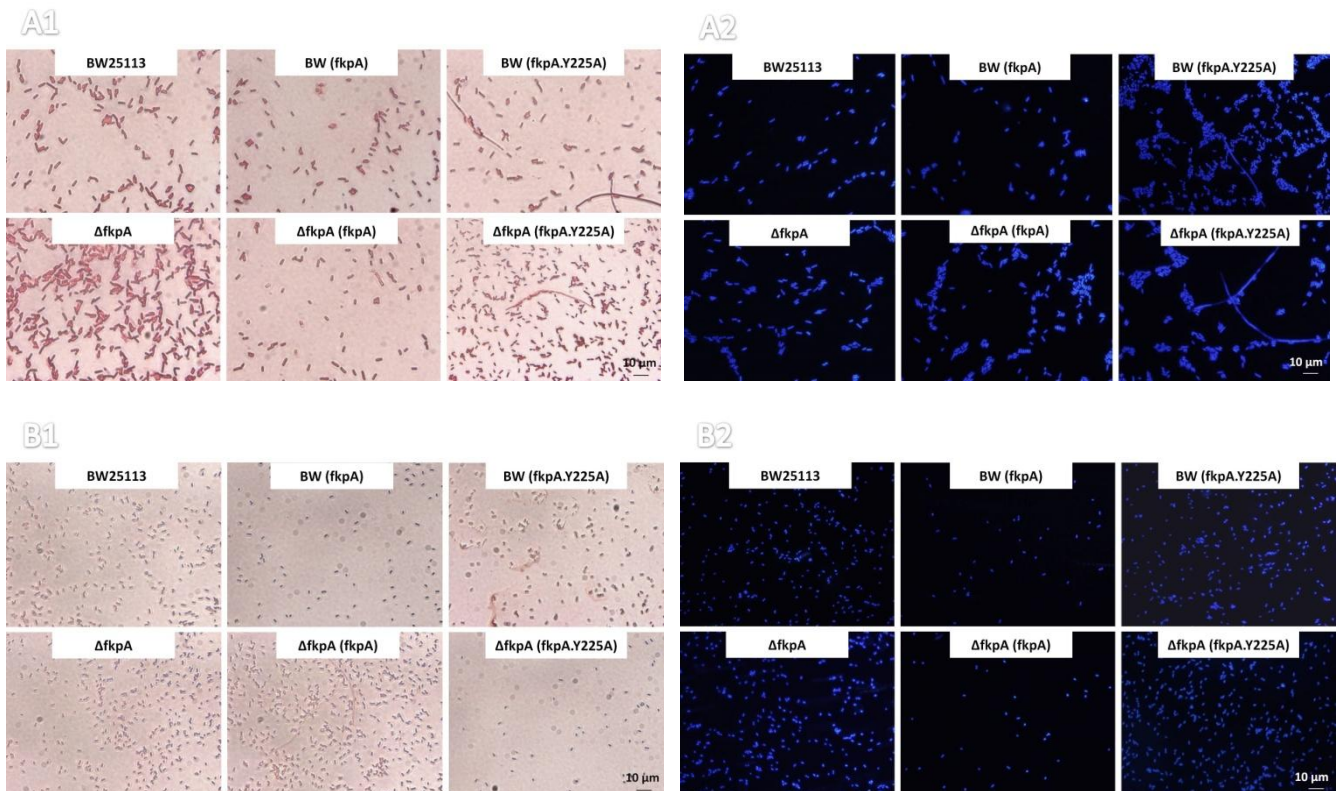
**Εικόνα Γ.2.14.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

Από την εικόνα Γ.2.14 παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkprA* στο στέλεχος BW25113(*fkrA*) μειώνει ελαφρώς το σχηματισμό του βιοϋμενίου σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG. Αντιθέτως, η έκφραση του μεταλλαγμένου *EcfkprA*<sub>Y225A</sub> στο στέλεχος BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>) δεν μεταβάλλει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου.

#### Γ.2.4.2.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο *EcfkprA* είτε το *EcfkprA*<sub>Y225A</sub>

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των παραπάνω στελεχών, δηλαδή των BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των στελεχών BW25113(*fkrA*), BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), *ΔfkrA*(*fkrA*) και *ΔfkrA*(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική κίνηση και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *EcfkprA*.H.pPROEX.HTa και *EcfkprA*<sub>Y225A</sub>.H.pPROEX.HTa πραγματοποιήθηκε με προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0 έως 0.5 mM. Συγκεκριμένα τα παραπάνω στελέχη αφού καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό LB, εμβολιάστηκαν (3μL) στην επιφάνεια τρυβλίων *swarming* και *swimming* και επώαστηκαν επί διάστημα στους 30°C για 20h. Στη συνέχεια τα κύτταρα ελήφθησαν από το εξωτερικό άκρο της αναπτυσσόμενης αποικίας *swarming* ή από το εσωτερικό του ημί-στερεού θρεπτικού υλικού όπου αναπτύχθηκε η αποικία *swimming* και μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών BW25113, *ΔfkrA*, BW25113(*fkrA*), BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), *ΔfkrA*(*fkrA*) και *ΔfkrA*(*fkrA*<sub>Y225A</sub>) πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, κατά την οποία χρωματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα με τις χρωστικές κρυσταλλικές ιώδες και σαφρανίνη και από χρώση DAPI, κατά την οποία χρωματίζεται το DNA με τη χρωστική 4',6-diamidino-2-phenylindole, σε μικροσκόπιο ορατού και φθορισμού, αντίστοιχα. Στην εικόνα Γ.2.15 ενδεικτικά

παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta fkpA$ , BW25113(*fkpA*), BW25113(*fkpA*<sub>Y225A</sub>),  $\Delta fkpA$ (*fkpA*) και  $\Delta fkpA$ (*fkpA*<sub>Y225A</sub>), έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *EcfkpA* και *EcfkpA*<sub>Y225A</sub> από 0.25mM του IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.



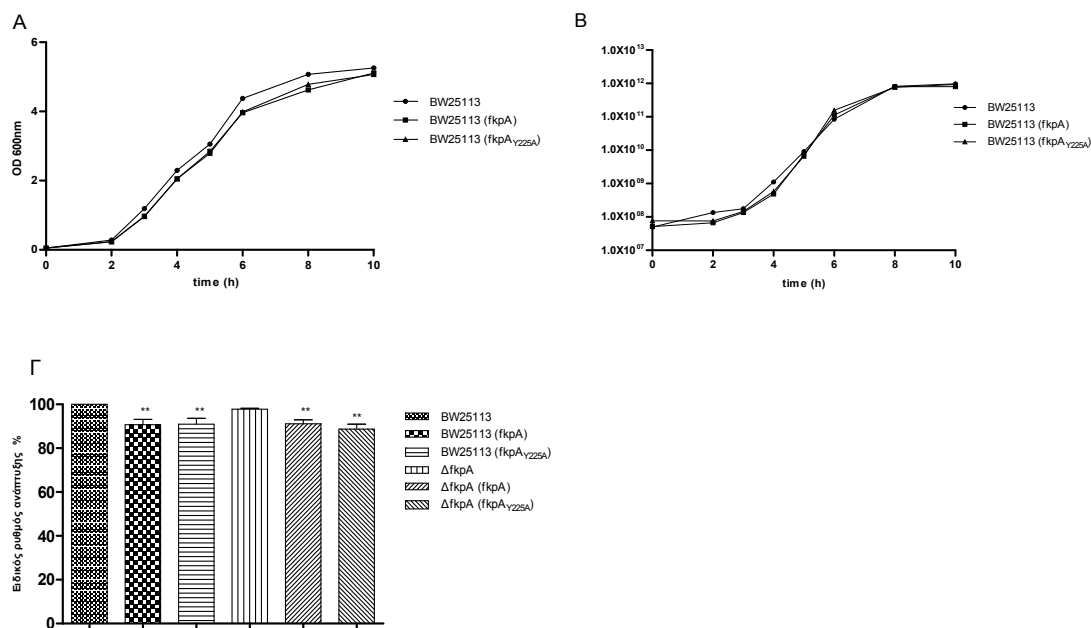
**Εικόνα Γ.2.15.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta fkpA$ , BW25113(*fkpA*), BW25113(*fkpA*<sub>Y225A</sub>),  $\Delta fkpA$ (*fkpA*) και  $\Delta fkpA$ (*fkpA*<sub>Y225A</sub>), κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram (A1) και DAPI (A2) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram (B1) και DAPI (B2) έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

Στις εικόνες Γ.2.15A1 και Γ.2.15A2 καθώς και Γ.2.15B1 και Γ.2.15B2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία της ομαδικής κίνησης και της κολυμβητικής κίνησης, αντίστοιχα των στελεχών BW25113,  $\Delta fkpA$ , BW25113(*fkpA*), BW25113(*fkpA*<sub>Y225A</sub>),  $\Delta fkpA$ (*fkpA*) και  $\Delta fkpA$ (*fkpA*<sub>Y225A</sub>) με χρώση κατά Gram και DAPI, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι τόσο η απουσία του γονιδίου *EcfkpA* (στέλεχος  $\Delta fkpA$ ) όσο και η υπερέκφραση του *fkpA* ή του *fkpA*<sub>Y225A</sub> δεν προκαλεί σημαντική κυτταρική μορφολογική διαφοροποίηση.

#### Γ.2.4.2.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων *EcfkpA* και *EcfkpA*<sub>Y225A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*

Μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου *EcfkpA* καθώς και του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkpA*<sub>Y225A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (BW25113). Για τον σκοπό αυτό μετασηματίστηκαν ανεξάρτητα τα στελέχη BW25113 και  $\Delta fkpA$  με τα πλασμίδια *EcfkpA*.H.pPROEX.HTa και *EcfkpA*<sub>Y225A</sub>.H.pPROEX.HTa, με αποτέλεσμα να

προκύπτουν τα στελέχη *BW25113(fkpA)*, *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, *ΔfkpA(fkpA)* και *ΔfkpA(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, τα οποία έπειτα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε θερμοκρασία 30°C και η ανάπτυξή τους καταγράφηκε φωτομετρικά, σε διάστημα 10 ωρών ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων για κάθε τιμή της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ). Ενδεικτικά παρατίθενται οι τιμές της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) και ο αριθμός των κυττάρων κατά την διάρκεια ανάπτυξης σε στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία 0.25mM IPTG των στελεχών *BW25113*, *BW25113(fkpA)* και *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)* (Εικόνα 8A, B). Για καλύτερη αναπαράσταση του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών *BW25113*, *BW25113(fkpA)*, *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, *ΔfkpA*, *ΔfkpA(fkpA)* και *ΔfkpA(fkpA<sub>Y225A</sub>)* ελήφθησαν οι τιμές της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης και υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός της ανάπτυξής τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται λαμβάνοντας τον ειδικό ρυθμό αύξησης του στελέχους αγρίου τύπου ως 100% (Εικόνα. Γ.2.16).

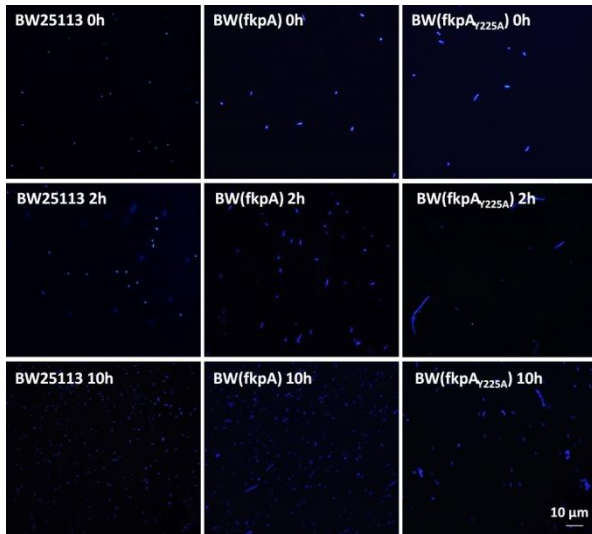


**Εικόνα Γ.2.16.** Η καμπύλη ανάπτυξης (A), ο αριθμός κυττάρων (B) των στελεχών *BW25113* (●) *BW25113(fkpA)* (■) και *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)* (▲) σε διάστημα 10 ωρών και ο ειδικός ρυθμός αύξησης (Γ) των στελεχών *BW25113*, *BW25113(fkpA)*, *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, *ΔfkpA*, *ΔfkpA(fkpA)* και *ΔfkpA(fkpA<sub>Y225A</sub>)* σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.25mM IPTG. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου θεωρείται ως 100%. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα και οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.001$ ).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών *BW25113(fkpA)*, *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, *ΔfkpA(fkpA)* και *ΔfkpA(fkpA<sub>Y225A</sub>)*, τα οποία υπερεκφράζουν τα γονίδια *EcfkpA* και *EcfkpA<sub>Y225A</sub>*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου *BW25113*. Η παρατηρούμενη ελαφρά μείωση του ρυθμού αύξησης των στελεχών αυτών, είναι συνήθης και τυπική της υπερέκφρασης γονιδίων.

Στην εικόνα Γ.2.17 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών *BW25113*, *BW25113(fkpA)* και *BW25113(fkpA<sub>Y225A</sub>)* με χρώση DAPI, στις 0, 2 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Διακρίνεται μια πολύ μικρή κυτταρική επιμήκυνση του στελέχους

BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), στις 2 και 10 ώρες ανάπτυξης, σε αντίθεση με το φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο του στελέχους BW25113(*fkrA*) το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο *EcfkrA*.



**Εικόνα Γ.2.17.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrA*) και BW25113(*fkrA*<sub>Y225A</sub>), σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG, με χρώση DAPI, στις 0, 2 και 10 ώρες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB.

### Γ.2.4.3 Η πρωτεΐνη *EcfkrB*

#### Γ.2.4.3.1 Ενζυμική ενεργότητα της *EcfkrB*

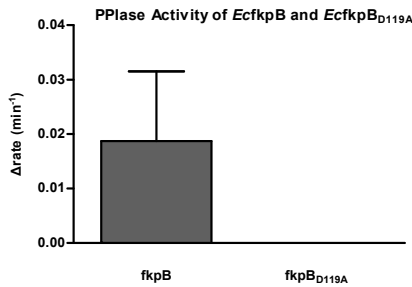
Αρχικά πραγματοποιήθηκε *in vitro* ο προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡΙΑσης της *EcfkrB* και της μεταλλαγμένης *EcfkrB*<sub>D119A</sub> (Εικόνα Γ.2.19). Η υπερέκφραση των γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB*<sub>D119A</sub> έγινε ανεξάρτητα με χρήση των πλασμιδίων *EcfkrB*.H.pPROEX.HTa και *EcfkrB*<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.HTa, με την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης από 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι κυτταροπλασμικές πρωτεΐνες *EcfkrB* και *EcfkrB*<sub>D119A</sub> φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η απομόνωση των διαλυτών πρωτεϊνών *EcfkrB* και *EcfkrB*<sub>D119A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.

Η ανίχνευση της ενεργότητας ΡΡΙΑσης των *EcfkrB* και *EcfkrB*<sub>D119A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA. (Πίνακας Γ.2.2.).

**Πίνακας Γ.2.2.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων *EcfkrB* και *EcfkrB*<sub>D119A</sub> έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

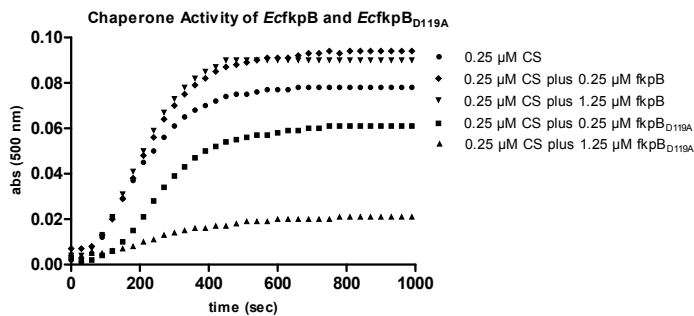
Substrate (-Xaa-)	<i>EcfkrB</i>	<i>EcfkrB</i> <sub>D119A</sub>
$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
-Phe-	0.0303 ± 0.00003	nd

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα ΡΡιάσης στη μεταλλαγμένη *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> ενώ η αγρίου τύπου *Ec*fkpB παρουσιάζει σημαντική ενεργότητα ΡΡιάσης (Πίνακας Γ.2.2., Εικόνα Γ.2.18) .



**Εικόνα Γ.2.18.** Η ενεργότητα της ΡΡιάσης (Δrate) της μεταλλαγμένης *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *Ec*fkpB.

Στην συνέχεια διερευνήθηκε εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Παρατηρήθηκε ότι, σε σύγκριση με την *Ec*fkpB, η *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> παρεμποδίζει τη συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.19). Η παρεμπόδιση της *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> στη δημιουργία συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (CS) φαίνεται ότι αυξάνεται αναλογικά της συγκέντρωσής της. Η αυξημένη ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS από την *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> σε σύγκριση με την *Ec*fkpB, αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> βελτιώνει την δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα την λειτουργία της ως τσαπερόνη.



**Εικόνα Γ.2.19.** Η επίδραση των πρωτεϊνών *Ec*fkpB και *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μM της *Ec*fkpB (◆), 1.25 μM της *Ec*fkpB (▼), παρουσία 0.25 μM *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> (■) και 1.25 μM της *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> (▲).

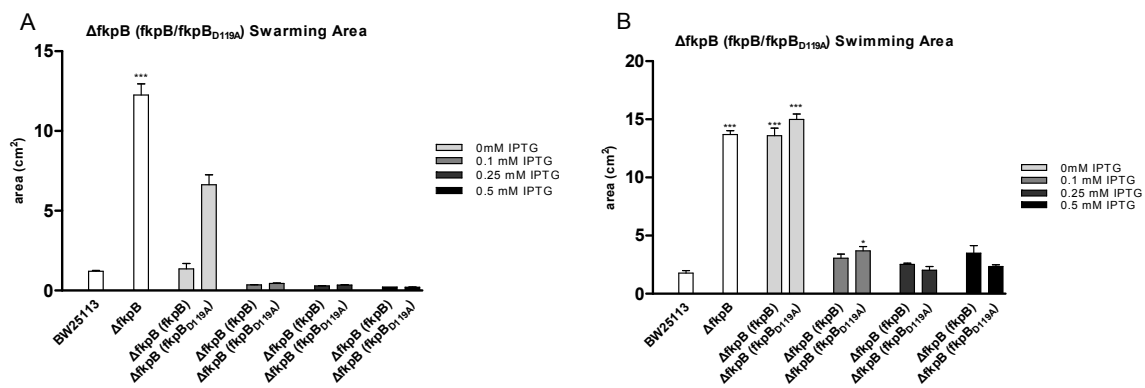
#### Γ.2.4.3.2 Διερεύνηση του φαινότυπου του στελέχους *ΔfkpB* στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *Ec*fkpB είτε το *Ec*fkpB<sub>D119A</sub>

Διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *Ec*fkpB και *Ec*fkpB<sub>D119A</sub> στο στέλεχος *ΔfkpB* επαναφέρει το φαινότυπό του *ΔfkpB* στα επίπεδα του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, ώστε να διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος του στελέχους *ΔfkpB* οφείλεται στη απώλεια του *fkpB* γονιδίου και επίσης να διερευνηθεί εάν η απώλεια

της ενεργότητας ΡΡιάσης επηρεάζει τον φαινότυπο. Για το σκοπό αυτόν, το στέλεχος *ΔfkrB* μετασηματίστηκε με τα πλασμίδια *EcfkrB*.H.ρPROEX.HTa και *EcfkrB<sub>D119A</sub>*.H.ρPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, αντίστοιχα.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.20Α και 20Β).



**Εικόνα Γ.2.20.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔfkrB* καθώς και των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

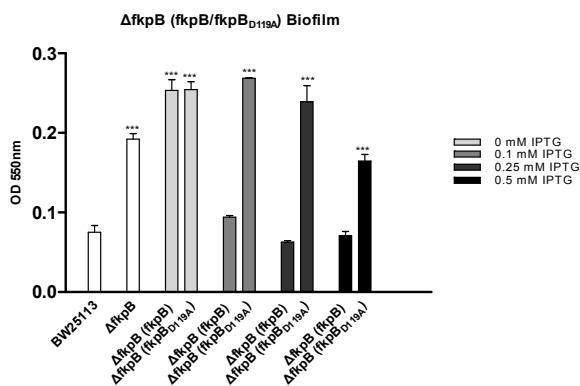
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλή ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, μειώνεται λόγω της έκφρασης του γονιδίου *EcfkrB* και επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.20Α). Ακόμα και απουσία IPTG παρατηρήθηκε μια σχετική μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης. Τούτο πιθανά οφείλεται στα εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μεταγραφής του *EcfkrB*. Εφόσον η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB*, δηλαδή η παρουσία της πρωτεΐνης *EcfkrB*, επαναφέρει το φαινότυπο της ομαδικής κίνησης στα επίπεδα του αγρίου τύπου, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο φαινότυπος της υψηλής ικανότητας ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔfkrB* οφείλεται στην απουσία του γονιδίου *EcfkrB* και κατ'επέκταση στην απουσία της πρωτεΐνης *EcfkrB*. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στο στέλεχος *ΔfkrB*, επαναφέρει το φαινότυπο της ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔfkrB* στα επίπεδα του στελέχους του αγρίου τύπου. Επιπλέον, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη *EcfkrB<sub>D119A</sub>* δεν έχει ενεργότητα ΡΡιάσης μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkrB* δεν είναι αναγκαία για την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.20Β έδειξαν ότι απουσία IPTG δεν φαίνεται να επηρεάζεται η κολυμβητική κίνηση των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*. Η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων του IPTG στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας της

κολυμβητικής κίνησης των στελεχών αυτών σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του αγρίου τύπου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η έκφραση και των δύο γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στο στέλεχος *ΔfkrB* φαίνεται να επαναφέρει τον φαινότυπο της κολυμβητικής ικανότητας του αγρίου τύπου. Επομένως, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η ενεργότητα ΡΡ1άσης της πρωτεΐνης *EcfkrB* δεν είναι αναγκαία για την ικανότητα της *fkrB* να επαναφέρει τον *ΔfkrB* φαινότυπο.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τα στελέχη *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* επίσης αξιοποιήθηκαν για να διερευνηθεί εάν η έκφραση των γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (*96-well plates*) που περιείχαν 100  $\mu$ L υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG, έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h και αυτή συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔfkrB*. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου οπτικοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής Crystal Violet ενώ η βιομάζα του βιοϋμενίου ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.21).



**Εικόνα Γ.2.21.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔfkrB* καθώς και των στελεχών *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB* στο στέλεχος *ΔfkrB(fkrB)* επαναφέρει τον φαινότυπο του αγρίου τύπου και στις τρεις συγκεντρώσεις του IPTG (0.1, 0.25 και 0.5 mM) (Εικ. Γ.2.21). Αντίθετα η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στο στέλεχος *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* δεν επαναφέρει τον φαινότυπο αγρίου τύπου παρόλο που παρατηρείται μια ελαφριά μείωση στην υψηλότερη συγκέντρωση του IPTG (0.5 mM) ενώ στις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις φαίνεται ότι διατηρεί την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του στελέχους *ΔfkrB*. Εφόσον η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB* στο στέλεχος *ΔfkrB(fkrB)* επαναφέρει τον φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου και η πρωτεΐνη διαθέτει ενεργότητα ΡΡ1άσης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η απουσία του γονιδίου *EcfkrB* δηλαδή η απουσία της πρωτεΐνης *EcfkrB*, αποτελεί τον λόγο της αυξημένης ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Επίσης, εφόσον η έκφραση του γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>*

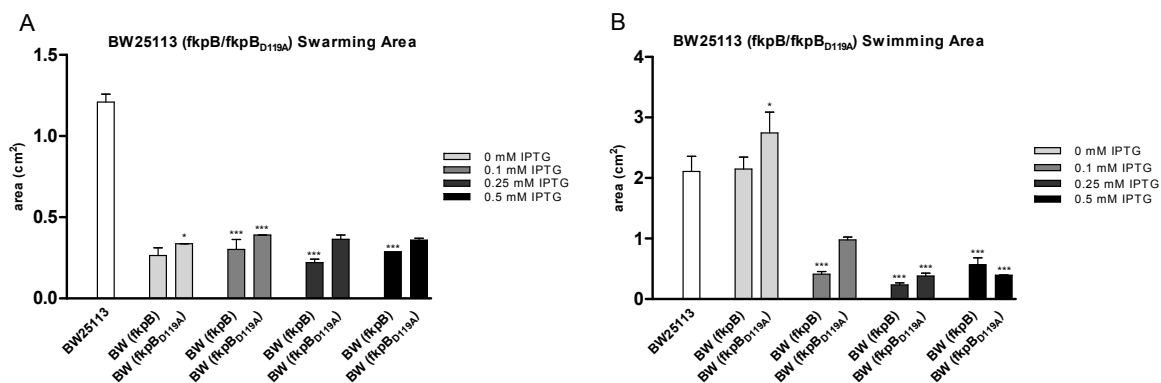
στο στέλεχος  $\Delta fkpB(fkpB_{D119A})$  διατηρεί την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στα επίπεδα του στελέχους  $\Delta fkpB$  και η παραγόμενη πρωτεΐνη  $EcfkpB_{D119A}$  δεν διαθέτει ενεργότητα ΡΡιάσης συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης είναι απαραίτητη για την ικανότητα του  $fkpB$  να επανεφέρει τον  $\Delta fkpB$  φαινότυπο.

### Γ.2.4.3.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο $EcfkpB$ είτε το $EcfkpB_{D119A}$

Ακολούθως διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων  $EcfkpB$  και  $EcfkpB_{D119A}$  στο στέλεχος BW25113 επηρεάζει το φαινότυπο της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης. Τα πλασμίδια  $EcfkpB$ .H.pPROEX.HTa και  $EcfkpB_{D119A}$ .H.pPROEX.HTa χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του στελέχους BW25113 με αποτέλεσμα την κατασκευή των στελεχών BW25113( $fkpB$ ) και BW25113( $fkpB_{D119A}$ ), αντίστοιχα.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113( $fkpB$ ) και BW25113( $fkpB_{D119A}$ ) παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $cm^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.22Α και Β).



**Εικόνα Γ.2.22.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113, BW25113( $fkpB$ ) και BW25113( $fkpB_{D119A}$ ), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $cm^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.0001$ ).

Η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους BW25113( $fkpB$ ) το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο  $EcfkpB$  διαφοροποιείται από την αντίστοιχη του στελέχους BW25113( $fkpB_{D119A}$ ) το οποίο υπερεκφράζει το γονίδιο  $EcfkpB_{D119A}$  (Εικόνα Γ.2.22Α). Η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους BW25113( $fkpB_{D119A}$ ) παρόλο που φαίνεται να είναι μειωμένη, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου, δεν είναι στατιστικά σημαντική, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test) του προγράμματος GraphPad prism v5.0. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του  $EcfkpB$

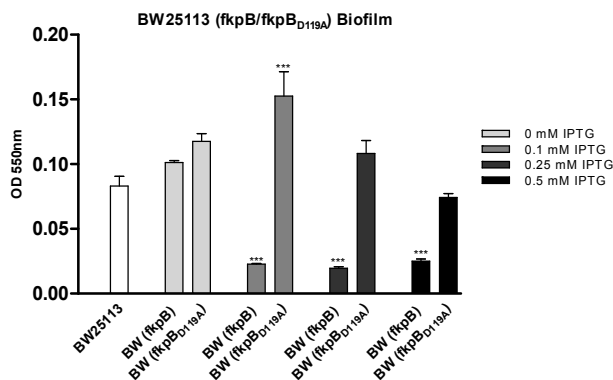


(0.1 έως 0.5 mM IPTG) στο στέλεχος BW25113(*fkrB*) επιφέρουν μείωση της ομαδικής κίνησης σε επίπεδα χαμηλότερα του αγρίου τύπου ενώ η υπερέκφραση του *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στο στέλεχος BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) (0.25 και 0.5 mM IPTG) βοηθά να διατηρηθεί η ικανότητα της ομαδικής κίνησης στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.22B έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB* στο στέλεχος BW25113, σε συγκεντρώσεις του IPTG 0.1 έως 0.5 mM, προκαλεί μια στατιστικά σημαντική μείωση της κολυμβητικής κίνησης σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα, χαμηλότερα από τα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου. Το ίδιο όμως συμβαίνει και κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>*, όπου η αυξημένη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης *EcfkrB<sub>D119A</sub>* (0.25 και 0.5 mM IPTG) στο στέλεχος BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας της κολυμβητικής κίνησης. Απουσία IPTG δεν φαίνεται να επηρεάζεται η κολυμβητική ικανότητα των στελεχών BW25113(*fkrB*) και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*). Επομένως, η σχετικά υψηλή έκφραση του γονιδίου *EcfkrB* φαίνεται να έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση ή καταστολή τόσο της ομαδικής όσο και της κολυμβητικής κίνησης του στελέχους BW25113 ανεξάρτητα από την παρουσία ενεργότητας ΡΡιάσης της πρωτεΐνης *EcfkrB*.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της ενεργότητας της ΡΡιάσης στον σχηματισμό βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*fkrB*) και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), λόγω της υπερέκφρασης των γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>*. Για τον σκοπό αυτόν αρχικά παρατηρήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*fkrB*) και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις του IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h στους 30°C και έπειτα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους αγρίου τύπου. Τα σχηματισμένα βιοϋμενία οπτικοποιήθηκαν μετά από χρώση με την χρωστική Crystal Violet ενώ η βιομάζα των βιοϋμενίων ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.23).



**Εικόνα Γ.2.23.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrB*) και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

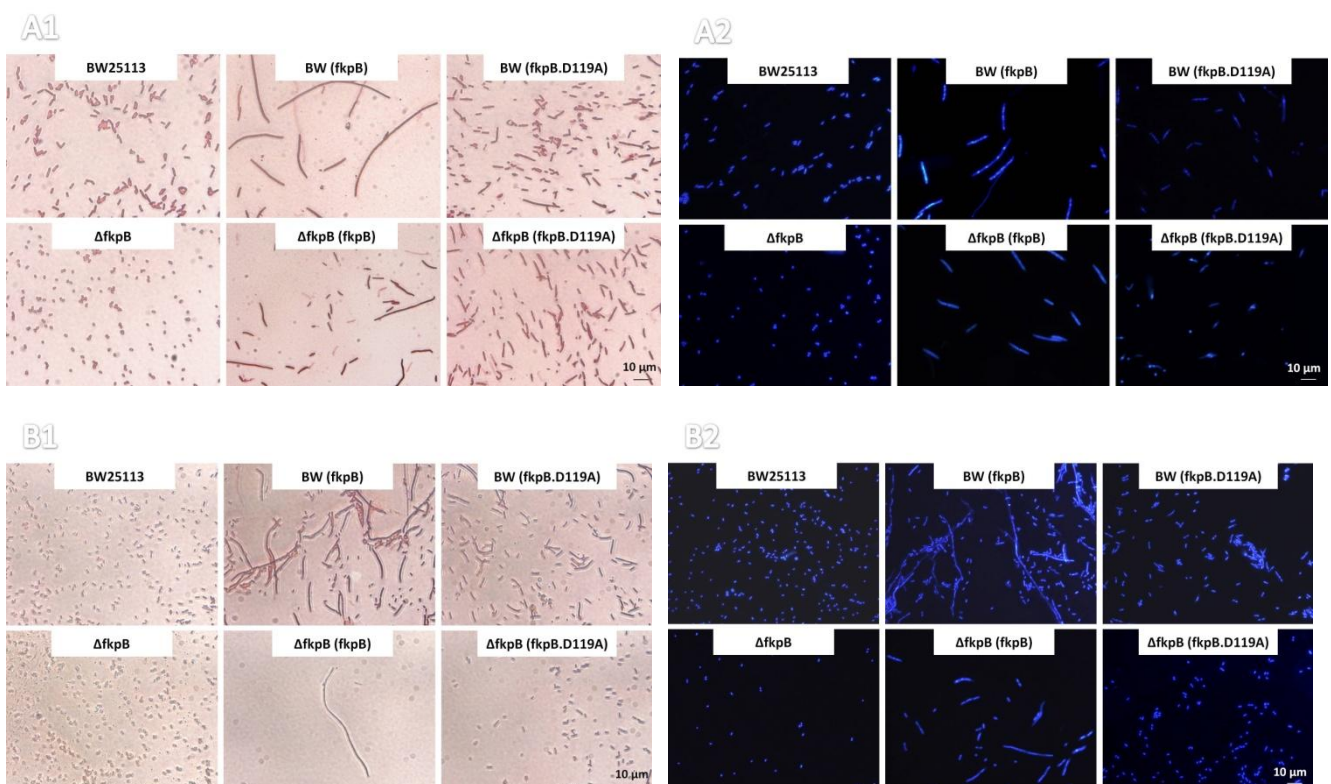
Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.23 έδειξαν ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB* στο στέλεχος BW25113(*fkrB*), και στις τρεις συγκεντρώσεις του IPTG (0.1 έως 0.5 mM), προκαλεί σημαντική

μείωση του σχηματισμού βιοϋμενίου. Αντίθετα, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* δεν προκαλεί μεταβολή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους BW25113(*fkrB*). Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της πρωτεΐνης *EcfkrB* πιθανώς να είναι αναγκαία για την αρνητική επίδραση της *fkrB* στον σχηματισμό του βιοϋμενίου.

#### Γ.2.4.3.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και *ΔfkrB* τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο *EcfkrB* είτε το *EcfkrB<sub>D119A</sub>*

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των παραπάνω στελεχών, δηλαδή των BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *EcfkrB*.H.pPROEX.HTa και *EcfkrB<sub>D119A</sub>*.H.pPROEX.HTa στο στέλεχος *ΔfkrB* πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.25 mM IPTG.

Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram και από χρώση DAPI, σε μικροσκόπιο ορατού και φθορισμού, αντίστοιχα. Στην εικόνα Γ.2.24 ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, έπειτα από ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>* από 0.25mM IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.



**Εικόνα Γ.2.24.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram (A1) και DAPI (A2) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram (B1) και DAPI (B2) έπειτα από επώαση, στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

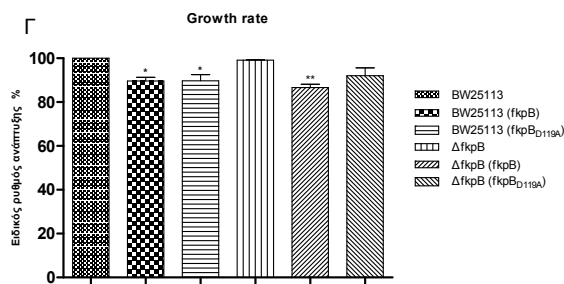
Σύμφωνα με την μελέτη των Kim et al. κατά την ομαδική κίνηση ενός μικροοργανισμού τα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά. Συνήθως αυξάνεται η βιοσύνθεση των μαστιγίων, τα κύτταρα επιμηκύνονται ενώ παρατηρούνται και πολλαπλά πυρηνοειδή (Kim et al., 2003). Στην εικόνα Γ.2.24A1 και Γ.2.24A2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, κατά την ομαδική κίνηση, με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα. Το στέλεχος *ΔfkrB* εμφανίζει κύτταρα τα οποία φαίνεται να έχουν χάσει την φυσιολογική ραβδοειδή μορφολογία αποκτώντας μια σφαιροειδή μορφή. Το γεγονός αυτό φαίνεται ότι οφείλεται στην απουσία της πρωτεΐνης *EcfkrB* καθώς τα κύτταρα που εκφράζουν το γονίδιο *EcfkrB* (σε χαμηλά επίπεδα μεταγραφημάτων) εμφανίζονται φυσιολογικά. Η υπερέκφραση όμως του γονιδίου *EcfkrB* μεταβάλλει την κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*fkrB*) και *ΔfkrB(fkrB)* μετατρέποντάς τα σε επιμηκυμένα κύτταρα τα οποία δεν διαιρούνται φυσιολογικά. Ωστόσο από την εικόνα Γ.2.24A2 διακρίνεται ότι στα κύτταρα των στελεχών BW25113(*fkrB*) και *ΔfkrB(fkrB)* επιτελείται φυσιολογικά ο διαχωρισμός του γενετικού υλικού, καθώς σχηματίζονται πολλαπλά πυρηνοειδή. Αντίθετα η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στα στελέχη BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* έχει ως αποτέλεσμα την μετάβαση σε έναν πιο φυσιολογικό αν και ελαφρώς επιμηκυμένο φαινότυπο καθώς τα κύτταρα εμφανίζονται να είναι μικρότερου μήκους από τα αντίστοιχα των στελεχών BW25113(*fkrB*) και *ΔfkrB(fkrB)*. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της πρωτεΐνης *EcfkrB* πιθανά επιδρά στην κυτταρική διαίρεση του *E. coli*.

Στην εικόνα Γ.2.24B1 και Γ.2.24B2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, κατά την κολυμβητική κίνηση, με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα, όπου παρατηρείται κυτταρική διαφοροποίηση, ομοίως με την ομαδική κίνηση. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *EcfkrB* έχει ως αποτέλεσμα ένα πιο σφαιρικό κυτταρικό φαινότυπο καθώς τα κύτταρα του στελέχους *ΔfkrB* φαίνεται ότι έχουν χάσει το ραβδοειδές σχήμα. Όμως η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB* στα στελέχη *ΔfkrB(fkrB)* και BW25113(*fkrB*) επιφέρει έναν επιμηκυμένο κυτταρικό φαινότυπο όπου φαίνεται ότι έχει διακοπεί η διαίρεση της κυτταρικής μεμβράνης αλλά όχι η διαίρεση του γενετικού υλικού. Ωστόσο, η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στα στελέχη *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) έχει ως αποτέλεσμα την ανατροπή του φαινομένου αυτού. Συγκεκριμένα ο φαινότυπος των στελεχών αυτών φαίνεται ότι έχει επανέλθει στον φυσιολογικό. Συνεπώς, μέσω της παρατήρησης αυτής συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης ή η περίσσεια ενεργότητας ΡΡιάσης, λόγω της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων της *EcfkrB*, λειτουργεί ως ένας παρεμποδιστικός παράγοντας της κυτταρικής διαίρεσης του μικροοργανισμού *E. coli* κατά την κολυμβητική κίνηση.

#### **Γ.2.4.3.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli***

Μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου *EcfkrB* καθώς και του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (BW25113). Για τον σκοπό αυτό μετασχηματίστηκαν ανεξάρτητα τα στελέχη BW25113 και *ΔfkrB* με τα πλασμίδια *EcfkrB.H.pPROEX.HTa* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.HTa*, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*), *ΔfkrB(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, τα οποία

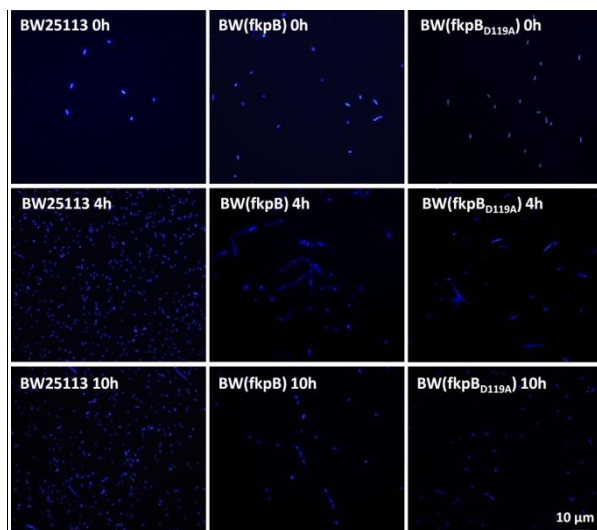
έπειτα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε θερμοκρασία 30°C και η ανάπτυξή τους καταγράφηκε φωτομετρικά, σε διάστημα 10 ωρών, ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων για κάθε τιμή της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ). Ενδεικτικά παρατίθεται ο ειδικός ρυθμός της ανάπτυξής τους επί τοις % των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*),  $\Delta$ *fkrB*,  $\Delta$ *fkrB(fkrB)* και  $\Delta$ *fkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)*, παρουσία 0.25mM IPTG, ο οποίος προκύπτει από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται λαμβάνοντας τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου ως 100% (Εικόνα Γ.2.25).



**Εικόνα Γ.2.25.** Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*),  $\Delta$ *fkrB*,  $\Delta$ *fkrB(fkrB)* και  $\Delta$ *fkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.25mM IPTG. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του στελέχους αγρίου τύπου θεωρείται ως 100%. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα και οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test )(P<0.001).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών BW25113(*fkrB*), BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*),  $\Delta$ *fkrB(fkrB)* και  $\Delta$ *fkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* τα οποία υπερεκφράζουν τα γονίδια *fkrB* και *fkrB<sub>D119A</sub>*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113. Παρατηρήθηκε μια ελαφρά μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, η οποία είναι συνήθης και τυπική της υπερέκφρασης γονιδίων.

Στην εικόνα Γ.2.26 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkrB*) και BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Διακρίνεται μια έντονη κυτταρική επιμήκυνση του στελέχους BW25113(*fkrB*), γεγονός που οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkrB* και συνεπώς στην ενεργότητα ΡΡ1άσης, σε αντίθεση με το φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο του στελέχους BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*) το οποίο υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο *EcfkrB<sub>D119A</sub>*.



**Εικόνα Γ.2.26.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkpB*) και BW25113(*fkpB<sub>D119A</sub>*), σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG, με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB.

#### Γ.2.4.4 Η πρωτεΐνη *EcfkIB*

##### Γ.2.4.4.1 Ενζυμική ενεργότητα της *EcfkIB*

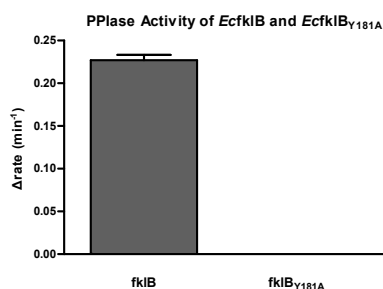
Όπως και την *EcfkρB*, πραγματοποιήθηκε αρχικά ο *in vitro* προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡΙΑσης της *EcfkIB* και της μεταλλαγμένης *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* (Εικόνα Γ.2.27). Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* έγινε ανεξάρτητα με χρήση των πλασμιδίων *EcfkIB.H.ρPROEX.HTa* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>.H.ρPROEX.HTa*, με την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης από 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι πρωτεΐνες *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η απομόνωση των διαλυτών *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ΡΡΙΑσης των *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Πίνακας Γ.2.3).

**Πίνακας Γ.2.3.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

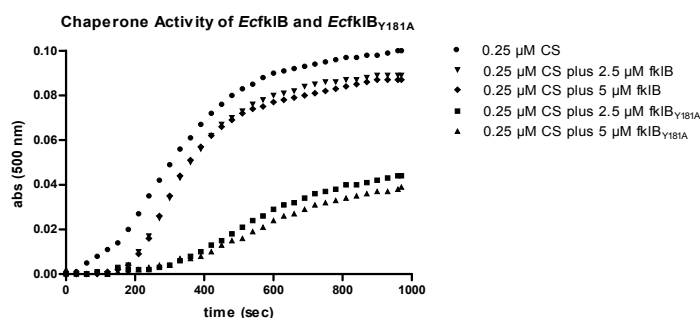
Substrate (-Xaa-)	<i>EcfkIB</i>	<i>EcfkIB<sub>Y181A</sub></i>
	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
-Phe-	1.50 ± 0.0013	nd

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, η σημειακή μετάλλαξη σε ένα από τα αμινοξέα του πιθανού ενεργού κέντρου της *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* προκάλεσε δραματική μείωση της ενεργότητας ΡΡΙΑσης με αποτέλεσμα να μην ανιχνευθεί ενεργότητα στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Αντίθετα, η αγρίου τύπου *EcfkIB* παρουσιάζει ενεργότητα ΡΡΙΑσης (Εικόνα Γ.2.27).



**Εικόνα Γ.2.27.** Η ενεργότητα της ΡΡιάσης ( $\Delta rate$ ) της *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *EcfkIB*.

Ακολούθως διερευνήθηκε εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Παρατηρήθηκε ότι, η αγρίου τύπου *EcfkIB* παρεμποδίζει τη συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.28). Η παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (CS) από την *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* φαίνεται να αυξάνεται αναλογικά της συγκέντρωσής της. Όμως, η αυξημένη ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS από την *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* σε σύγκριση με την *EcfkIB*, αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* βελτιώνει την δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα την λειτουργία της ως τσαπερόνη.



**Εικόνα Γ.2.28.** Η επίδραση των πρωτεϊνών *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0.25  $\mu\text{M}$  συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 2.5  $\mu\text{M}$  της *EcfkIB* (▼), 5  $\mu\text{M}$  *EcfkIB* (◆), 2.5  $\mu\text{M}$  της *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* (■) και 5  $\mu\text{M}$  *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* (▲).

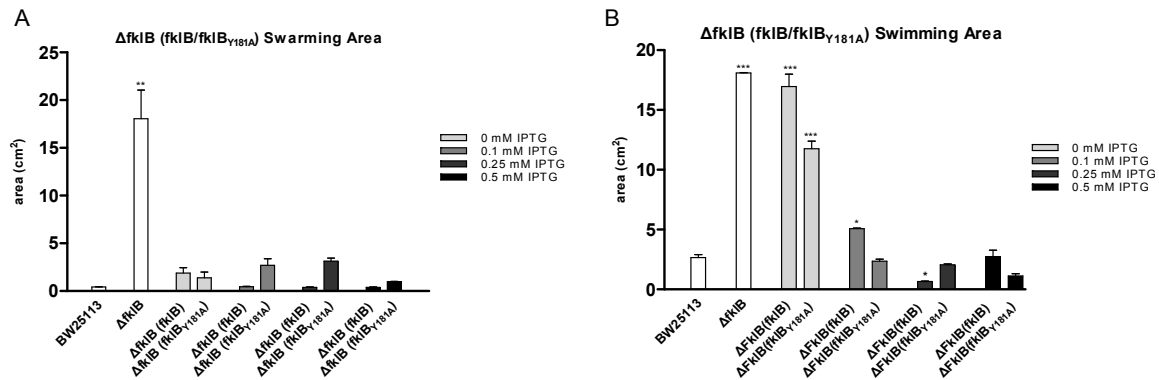
#### Γ.2.4.4.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους *ΔfklB* στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο

##### *EcfkIB* είτε το *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*

Διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>D119A</sub>* στο στέλεχος *ΔfklB* επαναφέρει το φαινότυπό του *ΔfklB* στα επίπεδα του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, ώστε να διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος του στελέχους *ΔfklB* οφείλεται στη απώλεια του *fklB* γονιδίου και επίσης να διερευνηθεί εάν η μείωση της ενεργότητας ΡΡιάσης επηρεάζει τον φαινότυπο. Συνεπώς το στέλεχος *ΔfklB* μετασηματίστηκε ανεξάρτητα με τα πλασμίδια *EcfkIB*.H.pPROEX.HTa και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*.H.pPROEX.HTa με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη *ΔfklB(fklB)* και *ΔfklB(fklB<sub>Y181A</sub>)*, αντίστοιχα.

### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών  $\Delta fkIB(fkIB)$  και  $\Delta fkIB(fkIB_{Y181A})$ , παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά ( $\text{cm}^2$ ) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46g (Εικόνα Γ.2.29A και B).



**Εικόνα Γ.2.29.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113 και  $\Delta fkIB$  καθώς και των στελεχών  $\Delta fkIB(fkIB)$  και  $\Delta fkIB(fkIB_{Y181A})$ , σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

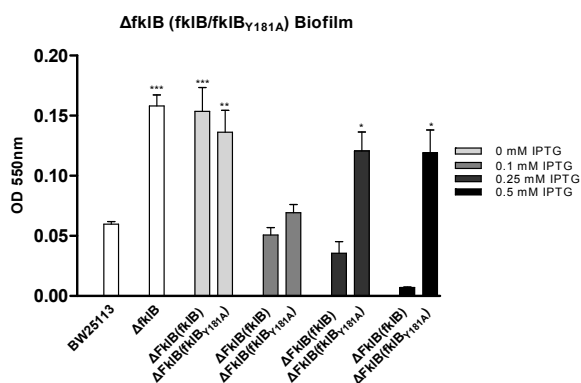
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η έκφραση του γονιδίου άγριου τύπου *EcfkIB* όσο και του *fkIB<sub>Y181A</sub>* στο στέλεχος  $\Delta fkIB(fkIB)$  προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG που χρησιμοποιήθηκαν, ακόμα και απουσία IPTG, γεγονός που όπως προαναφέρθηκε, οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα μεταγραφημάτων του γονιδίου *EcfkIB* λόγω της αναγνώρισης του *trc* προαγωγέα από την ενδογενή RNA πολυμεράση. Εφόσον η παρουσία της *EcfkIB* πρωτεΐνης προκαλεί μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης συμπεραίνεται ότι η αύξηση της ικανότητας ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta fkIB$  οφείλεται αποκλειστικά στην απουσία της *EcfkIB* πρωτεΐνης. Παρ' όλα αυτά καθώς η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους  $\Delta fkIB(fkIB_{Y181A})$  δεν διαφέρει από την αντίστοιχη του στελέχους  $\Delta fkIB(fkIB)$  συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* πρωτεΐνης πιθανώς να μην εμπλέκεται στον μηχανισμό της ομαδικής κίνησης.

Από την εικόνα Γ.2.29B φαίνεται ότι η έκφραση είτε του γονιδίου *EcfkIB* είτε του *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που εκφράζουν τα γονίδια αυτά, δηλαδή τα  $\Delta fkIB(fkIB)$  και  $\Delta fkIB(fkIB_{Y181A})$ , έχουν μειωμένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης συγκριτικά με το στέλεχος  $\Delta fkIB$ , σε όλες συγκεντρώσεις του IPTG (0.1 έως 0.5 mM) και επαναφέρουν τον φαινότυπο του αγρίου τύπου. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η παρουσία της *EcfkIB* είναι απαραίτητη για την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου της κολυμβητικής κίνησης. Ωστόσο, για το γεγονός αυτό δεν ευθύνεται η ενεργότητα ΡΡιάσης της πρωτεΐνης *EcfkIB*.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Εν συνεχεία, εξετάστηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους  $\Delta fkIB$ . Τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.30 έδειξαν

ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkIB* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου και αυτή η μείωση είναι ανάλογη της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης μορίων της πρωτεΐνης *EcfkIB* (αναλογικά της συγκέντρωσης του IPTG). Επομένως η υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔfkIB* επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα λόγω της έκφρασης του γονιδίου *EcfkIB* στο στέλεχος *ΔfkIB(fkIB)*. Αντιθέτως, η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* διαφοροποιείται από την αντίστοιχη του αγρίου τύπου αφού παραμένει στα υψηλά επίπεδα του στελέχους *ΔfkIB*. Η παρουσία της *EcfkIB* στο στέλεχος *ΔfkIB(fkIB)*, η οποία φέρει ενεργότητα ΡΡιάσης προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου ενώ η παρουσία της μεταλλαγμένης *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στο στέλεχος *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* δεν επαναφέρει τον φαινότυπο αγρίου τύπου. Άρα συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης πιθανότατα να εμπλέκεται στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου.



**Εικόνα Γ.2.30.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔfkIB* καθώς και των στελεχών *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

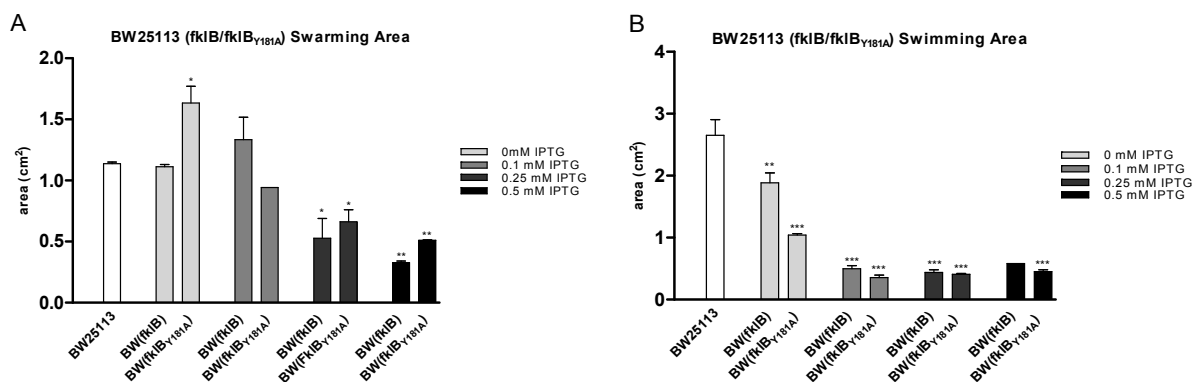
#### Γ.2.4.4.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *EcfkIB* είτε το *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*

Διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* επηρεάζει τον φαινότυπο της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης καθώς και τον σχηματισμό βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) που προέκυψαν έπειτα από τον ανεξάρτητο μετασχηματισμό του στελέχους BW25113 με τα πλασμίδια *EcfkIB*.H.pPROEX.HTa και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*.H.pPROEX.HTa.

##### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.31A και B).





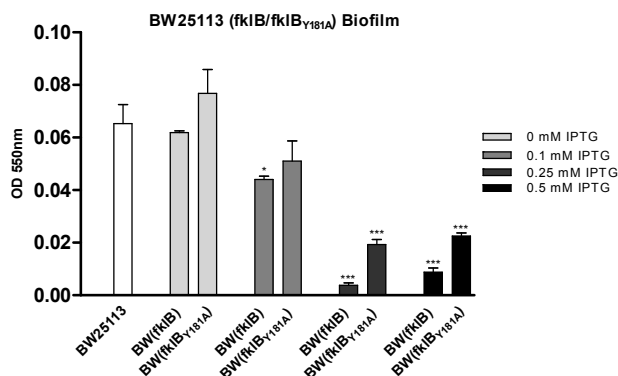
**Εικόνα Γ.2.31.** Η ικανότητα ομαδικής (A) και κολυμβητικής (B) κίνησης των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα εδειξαν, ότι η έκφραση και των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB*<sub>Y181A</sub> στα στελέχη BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>) αντίστοιχα, προκαλεί μείωση της ικανότητας ομαδικής κίνησης σε επίπεδα τα οποία υποχωρούν στο μισό της ικανότητας ομαδικής κίνησης του αγρίου τύπου. Η μείωση αυτή πραγματοποιείται έπειτα από την προσθήκη 0.25 έως 0.5 mM IPTG, οπότε οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών *EcfkIB* και *EcfkIB*<sub>Y181A</sub> και είναι στατιστικά σημαντική, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση ANOVA (Dunnet's Multiple Comparison Test) του προγράμματος GraphPad prism v5.0. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η *EcfkIB* πρωτεΐνη επιδρά στον μηχανισμό της ομαδικής κίνησης του *E. coli*, ωστόσο η ενεργότητα PPIάσης της δεν είναι ο αποκλειστικός παράγοντας αυτής της επίδρασης (Εικόνα Γ.2.31A).

Αντίστοιχα, από την εικόνα Γ.2.31B παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *EcfkIB* και *EcfkIB*<sub>Y181A</sub> οδηγεί σε καταστολή της κολυμβητικής κίνησης. Η μειωμένη κολυμβητική κίνηση των στελεχών BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>) σε επίπεδα αρκετά χαμηλότερα του στελέχους αγρίου τύπου είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση ANOVA (Dunnet's Multiple Comparison Test) και συμβαίνει σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG (0.1 έως 0.5 mM). Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη *EcfkIB* έχει την ικανότητα επίδρασης στην κολυμβητική κίνηση του *E. coli*, χωρίς ωστόσο να εμπλέκεται η ενεργότητα PPIάσης της.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τέλος, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της ενεργότητας της PPIάσης στον σχηματισμό βιοϋμενίου αξιοποιήθηκαν τα στελέχη BW25113, BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>). Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB*<sub>Y181A</sub> επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>) παρατηρήθηκε σε πλάκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100 μl υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h και έπειτα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους BW25113. Τα σχηματισμένα βιοϋμένια εντοπίστηκαν μετά από χρώση με την χρωστική Crystal Violet ενώ η βιομάζα των βιοϋμενίων υπολογίστηκε φωτομετρικά στα 550nm (Εικόνα Γ.2.32).



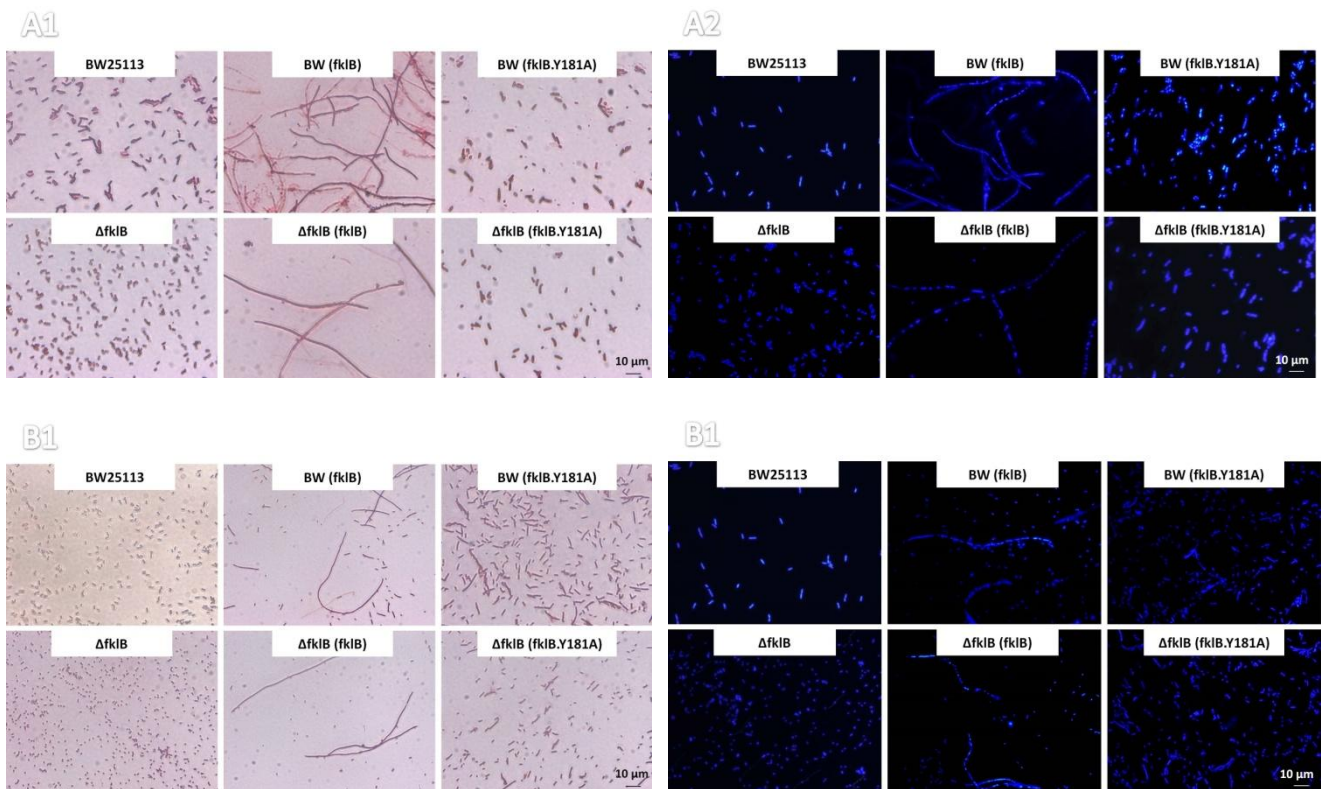
**Εικόνα Γ.2.32.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στα στελέχη BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) επιφέρει μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, διατηρώντας μια ελαφρά διαφοροποίηση μεταξύ τους στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του IPTG (0.25 και 0.5 mM)(Εικόνα Γ.2.32). Αυτή η ελαφρά διαφοροποίηση υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* είναι υπεύθυνη για την μεγαλύτερη μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* πιθανότατα να έχει κάποιον ρόλο στον μηχανισμό σχηματισμού του βιοϋμενίου.

#### Γ.2.4.4.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και *ΔfkIB* τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο *EcfkIB* είτε το *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των παραπάνω στελεχών, δηλαδή των BW25113 και *ΔfkIB* καθώς και των στελεχών BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)*, με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *EcfkIB.H.pPROEX.HTa* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>.H.pPROEX.HTa* πραγματοποιήθηκε παρουσία 0.25 mM IPTG .

Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών BW25113, *ΔfkIB*, BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, και από χρώση DAPI, σε μικροσκόπιο ορατού και φθορισμού, αντίστοιχα. Στην εικόνα Γ.2.33 ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *ΔfkIB*, BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)*, έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* από 0.25mM του IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.



**Εικόνα Γ.2.33.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta fkIB$ , BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>),  $\Delta fkIB$ (*fkIB*) και  $\Delta fkIB$  (*fkIB*<sub>Y181A</sub>) κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram (A1) και DAPI (A2) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram (B1) και DAPI (B2) έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

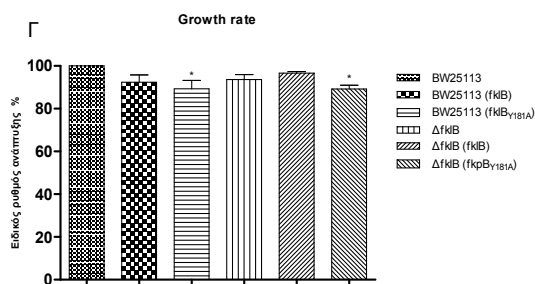
Στην εικόνα Γ.2.33A1 και Γ.2.33A2 όπου απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία της ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113,  $\Delta fkIB$ , BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>),  $\Delta fkIB$ (*fkIB*) και  $\Delta fkIB$  (*fkIB*<sub>Y181A</sub>) με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η απουσία του γονιδίου *EcfkIB* (στέλεχος  $\Delta fkIB$ ) δεν προκαλεί μια κυτταρική διαφοροποίηση από το στέλεχος αγρίου τύπου. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkIB* έχει ως αποτέλεσμα έναν φαινότυπο ο οποίος χαρακτηρίζεται από επιμηκυμένα κύτταρα, στα οποία απ' ό,τι φαίνεται έχει σταματήσει η κυτταρική διαίρεση. Όμως, από την εικόνα Γ.2.33A2 διακρίνεται ότι τα κύτταρα των στελεχών BW25113(*fkIB*) και  $\Delta fkIB$ (*fkIB*) τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *EcfkIB* σχηματίζουν πολλαπλά πυρηνοειδή. Κατά την κατάσταση αυτή πραγματοποιείται η διαίρεση του γενετικού υλικού αλλά δεν γίνεται φυσιολογικά ο σχηματισμός των κάθετων διαφραγμάτων (*septa*), ο οποίος επιτρέπει τον διαχωρισμό της κυτταρικής μεμβράνης και την διαίρεση των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται ότι ανατρέπεται έπειτα από την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkIB*<sub>Y181A</sub>. Συγκεκριμένα τα στελέχη BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>) και  $\Delta fkIB$ (*fkIB*<sub>Y181A</sub>) έχουν φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο, ο οποίος είναι παρόμοιος με τον αντίστοιχο του στελέχους αγρίου τύπου. Συνάγεται λοιπόν από τις παραπάνω παρατηρήσεις ότι, η κυτταρική επιμήκυνση του στελέχους  $\Delta fkIB$ (*fkIB*) οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου *EcfkIB* στα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *EcfkIB*, ενώ ειδικότερα είναι πιθανό να οφείλεται στην ενεργότητα ΡΡιάσης της.

Στην εικόνα Γ.2.33B1 και Γ.2.33B2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία της κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113,  $\Delta fkIB$ , BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB*<sub>Y181A</sub>),  $\Delta fkIB$ (*fkIB*) και  $\Delta fkIB$  (*fkIB*<sub>Y181A</sub>) με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι το στέλεχος  $\Delta fkIB$  δεν

διαφέρει φαινοτυπικά από το στέλεχος αγρίου τύπου. Παρόλα αυτά, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkIB* προκαλεί μια έντονη κυτταρική επιμήκυνση κατά την οποία φαίνεται να έχει ανασταλεί η κυτταρική διαίρεση. Από την εικόνα Γ.2.33B2 παρατηρείται ότι τα κύτταρα του στελέχους *ΔfkIB(fkIB)* σχηματίζουν πολλαπλά πυρηνοειδή, επομένως συμπεραίνεται ότι η διαίρεση του γενετικού υλικού πραγματοποιείται φυσιολογικά ενώ δεν επιτρέπεται ο διαχωρισμός της κυτταρικής μεμβράνης. Αντίθετα η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στα στελέχη BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* προκαλεί αναστολή του φαινομένου της κυτταρικής επιμήκυνσης, αφού τα στελέχη αυτά έχουν φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο. Επομένως συμπεραίνεται ότι η κυτταρική επιμήκυνση των στελεχών BW25113(*fkIB*) και *ΔfkIB(fkIB)* οφείλεται στην αφθονία της πρωτεΐνης *EcfkIB* και πιθανότατα στην ενεργότητα ΡΡΐάσης της.

#### Γ.2.4.4.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*

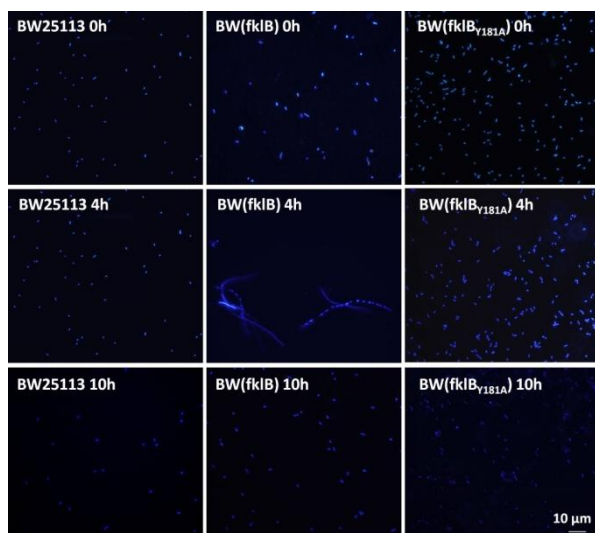
Μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου *EcfkIB* καθώς και του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkIB<sub>Y181A</sub>* στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (BW25113). Για τον σκοπό αυτό μετασχηματίστηκαν ανεξάρτητα τα στελέχη BW25113 και *ΔfkIB* με τα πλασμίδια *EcfkIB*.H.pPROEX.HTa και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*.H.pPROEX.HTa, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)*, τα οποία έπειτα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε θερμοκρασία 30°C και η ανάπτυξή τους καταγράφηκε φωτομετρικά, σε διάστημα 10 ωρών, ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων για κάθε τιμή της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ). Ενδεικτικά παρατίθεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξής τους επί τοις % των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB*, *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)*, παρουσία 0.25mM IPTG, ο οποίος προκύπτει από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας ( $OD_{600nm}$ ) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται λαμβάνοντας τον ειδικό ρυθμό αύξησης του στελέχους αγρίου τύπου ως 100% (Εικόνα. Γ.2.34).



**Εικόνα Γ.2.34.** Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.25mM IPTG.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό αύξησης των στελεχών BW25113(*fkIB*), BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), *ΔfkIB*, *ΔfkIB(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB<sub>Y181A</sub>)* (Εικόνα Γ.2.34). Η παρατηρούμενη ελαφρά μείωση του ρυθμού αύξησης των στελεχών τα οποία υπερεκφράζουν τα γονίδια *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113, είναι συνήθης και τυπική της υπερέκφρασης γονιδίων.

Στην εικόνα Γ.2.34 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Διακρίνεται η κυτταρική επιμήκυνση του στελέχους BW25113(*fkIB*), γεγονός που οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkIB* και συνεπώς στην ενεργότητα ΡΡιάσης, σε αντίθεση με το φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο του στελέχους BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*) το οποίο υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο *EcfkIB<sub>Y181A</sub>*.



**Εικόνα Γ.2.34.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkIB*) και BW25113(*fkIB<sub>Y181A</sub>*), σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG, με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB.

## Γ.2.4.5 Η πρωτεΐνη *EcslyD*

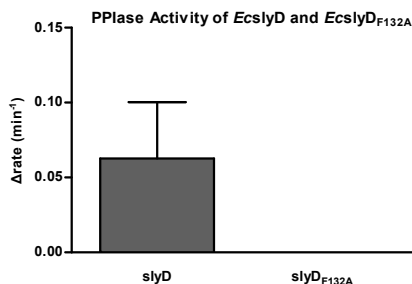
### Γ.2.4.5.1 Ενζυμική ενεργότητα της *EcslyD*

Στην περίπτωση της *EcslyD*, όπως με τις υπόλοιπες FKBP, πραγματοποιήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο *in vitro* προσδιορισμός της ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcslyD* και της μεταλλαγμένης *EcslyD<sub>F132A</sub>* (Εικόνα Γ.2.35).

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ΡΡιάσης των ανασυνδυασμένων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (Πίνακας Γ.2.4).

**Πίνακας Γ.2.4.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

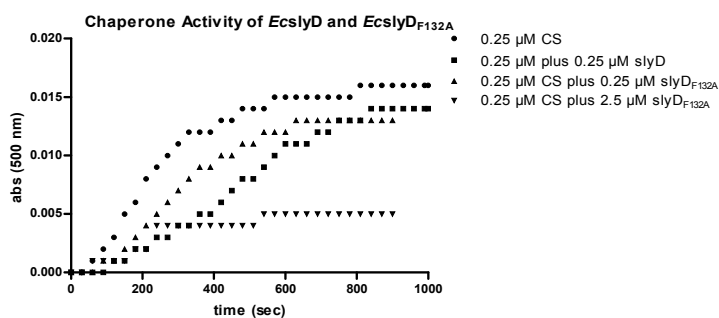
Substrate (-Xaa-)	<i>EcslyD</i>	<i>EcslyD<sub>F132A</sub></i>
	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
-Leu-	0.431 ± 0.001	nd



**Εικόνα Γ.2.35.** Η ενεργότητα της ΡΡιάσης ( $\Delta rate$ ) της *EcslyD*<sub>F132A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου *EcslyD*.

Όπως και σε προηγούμενες μετρήσεις της ενεργότητας της ΡΡιάσης των μεταλλαγμένων FKBP πρωτεϊνών δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα ΡΡιάσης στην μεταλλαγμένη *EcslyD*<sub>F132A</sub> (Εικόνα Γ.2.35)

Ακολούθως, μελετήθηκε εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcslyD*<sub>F132A</sub> επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Buchner et al., 1998). Παρατηρήθηκε ότι και οι δύο πρωτεΐνες *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> παρεμποδίζουν αποτελεσματικά την συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος (Εικόνα Γ.2.36), επομένως η απώλεια ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcslyD*<sub>F132A</sub> δεν επηρέασε την λειτουργία της ως τσαπερόνη. Η παρεμπόδιση της συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της *EcslyD*<sub>F132A</sub> καθώς στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (2.5  $\mu\text{M}$ ) η δημιουργία συσσωματωμάτων εμποδίζεται πιο αποτελεσματικά. Η παρόμοια ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS από την *EcslyD*<sub>F132A</sub> σε σύγκριση με την *EcslyD*, αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της *EcslyD*<sub>F132A</sub> δεν επηρεάζει την δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα την λειτουργία της ως τσαπερόνη.



**Εικόνα Γ.2.36.** Η επίδραση των πρωτεϊνών *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0.25  $\mu\text{M}$  συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25  $\mu\text{M}$  της *EcslyD* (■), 0.25  $\mu\text{M}$  της *EcslyD*<sub>F132A</sub> (▲) και παρουσία 2.5  $\mu\text{M}$  *EcslyD*<sub>F132A</sub> (▼).

#### Γ.2.4.5.2 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους *ΔslyD* στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο

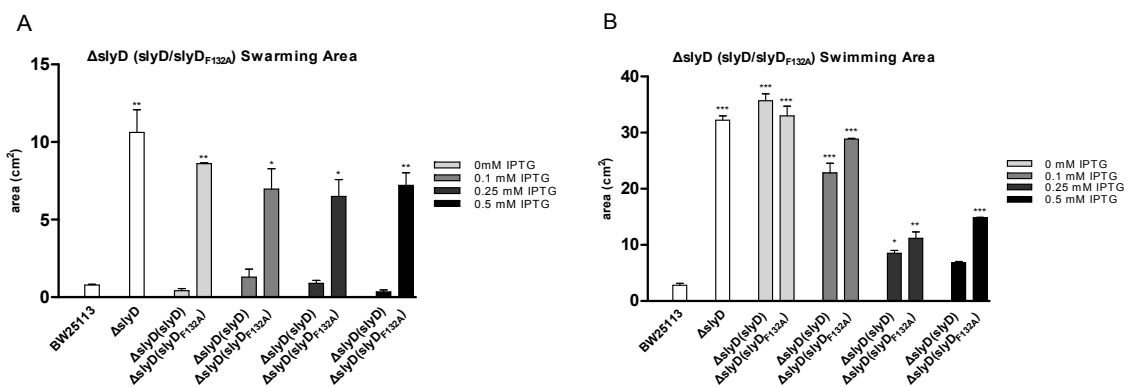
##### *EcslyD* είτε το *EcslyD*<sub>F132A</sub>

Διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> στο στέλεχος *ΔslyD* επαναφέρει το φαινότυπό του *ΔslyD* στα επίπεδα του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, ώστε να διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος του

στελέχους *ΔslyD* οφείλεται στη απώλεια του *slyD* γονιδίου και επίσης να διερευνηθεί εάν η μείωση της ενεργότητας ΡΡιάσης επηρεάζει τον φαινότυπο. Για τον σκοπό αυτόν, αξιοποιήθηκαν τα στελέχη *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)*, αντίστοιχα.

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.37Α και Β).



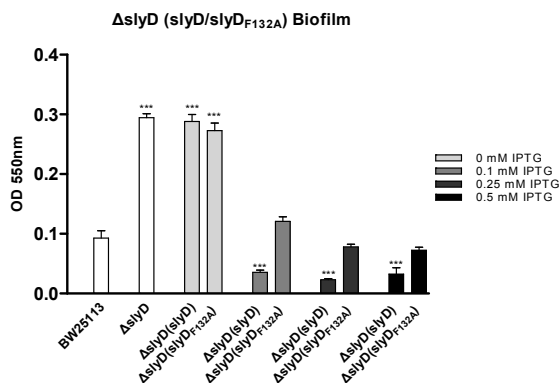
**Εικόνα Γ.2.37.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔslyD* καθώς και των στελεχών *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υψηλή ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)* μειώνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG (Εικόνα Γ.2.37Α). Εφόσον η παρουσία της πρωτεΐνης *EcslyD* επαναφέρει τον φαινότυπο της ομαδικής κίνησης στα επίπεδα του αγρίου τύπου μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο φαινότυπος της υψηλής ικανότητας ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔslyD* οφείλεται στην απουσία του γονιδίου *EcslyD*. Εφόσον η πρωτεΐνη *EcslyD<sub>F132A</sub>* δεν έχει ενεργότητα ΡΡιάσης συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcslyD* είναι αναγκαία για την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

Παρατηρώντας την εικόνα Γ.2.37Β συμπεραίνουμε ότι η έκφραση του γονιδίου *EcslyD* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου μόνο στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του IPTG, καθώς στις μικρότερες συγκεντρώσεις του IPTG η διαφορά της ικανότητας κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔslyD(slyD)* από το στέλεχος αγρίου τύπου παραμένει στατιστικά σημαντική. Αντίθετα, παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD<sub>F132A</sub>* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου, σε οποιαδήποτε συγκέντρωση του IPTG. Εφόσον παρουσία της *EcslyD* ο φαινότυπος επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα συμπεραίνεται ότι η απουσία της είναι ο λόγος της υψηλής ικανότητας κολυμβητικής κίνησης. Επίσης, εφόσον παρουσία της *EcslyD<sub>F132A</sub>* δεν επαναφέρεται ο φυσιολογικός φαινότυπος συνάγεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcslyD* ενδεχομένως να επηρεάζει την κολυμβητική κίνηση.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Ακολούθως, διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔslyD*. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100  $\mu$ L υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h και έπειτα συγκρίθηκε με την αντίστοιχη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔslyD*. (Εικόνα Γ.2.38).



**Εικόνα Γ.2.38.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔslyD* καθώς και των στελεχών *ΔslyD(slyD)* και *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Στο διάγραμμα της εικόνας Γ.2.38 παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου *EcslyD* στο στέλεχος *ΔslyD(slyD)* μειώνει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε αρκετά χαμηλά επίπεδα, χαμηλότερα από του αγρίου τύπου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου μειώνεται και κατά την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD<sub>F132A</sub>* στο στέλεχος *ΔslyD(slyD<sub>F132A</sub>)* ωστόσο δεν πρόκειται για μια στατιστικά σημαντική μείωση. Αυτή η διαφοροποίηση υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* είναι πιθανότατα υπεύθυνη για την μεγαλύτερη μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι και οι δύο πρωτεΐνες *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* είναι υπεύθυνες για την επαναφορά του αγρίου τύπου ωστόσο η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcslyD* είναι πιθανότατα απαραίτητη για την καταστολή του σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### Γ.2.4.5.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *EcslyD* είτε το *EcslyD<sub>F132A</sub>*

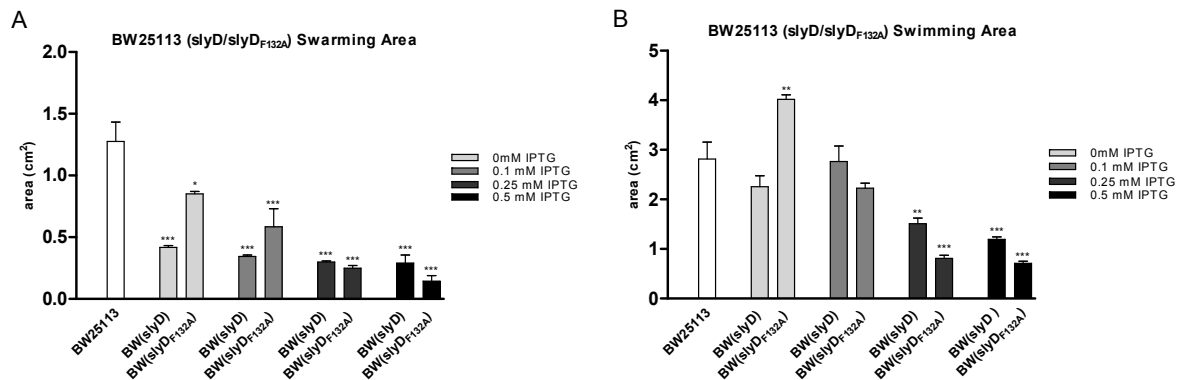
Διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* στο στέλεχος BW25113 επηρεάζει τον φαινότυπο του κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Τα πλασμίδια *EcslyD.H.pPROEX.HTa* και *EcslyD<sub>F132A</sub>.H.pPROEX.HTa* χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του στελέχους BW25113 με αποτέλεσμα την κατασκευή των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*).

#### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*), παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική



κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.39Α και 39Β).



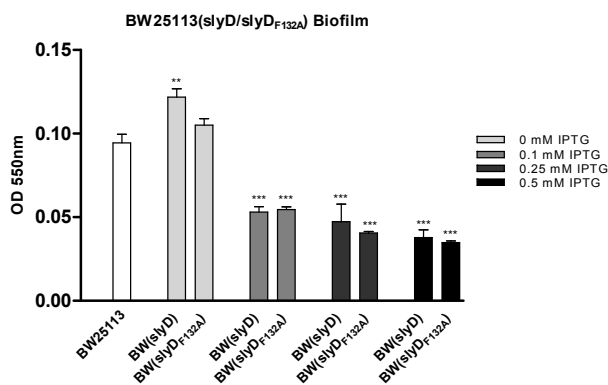
**Εικόνα Γ.2.39.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης του στελέχους BW25113 και των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Από το διάγραμμα της εικόνας Γ.2.39Α συμπεραίνεται ότι η υπερέκφραση και των δύο γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* στα στελέχη BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*) αντίστοιχα, επιφέρει σημαντική μείωση της ικανότητας της ομαδικής κίνησης, ειδικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του IPTG.

Από την εικόνα Γ.2.39Β παρατηρείται ότι η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης μειώνεται σημαντικά σε επίπεδα χαμηλότερα από του στελέχους αγρίου τύπου μετά από την έκφραση του γονιδίου αγρίου τύπου *EcslyD*. Ομοίως, παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο έπειτα από την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD<sub>F132A</sub>*. Λαμβάνοντας όμως υπόψη την μείωση της κολυμβητικής κίνησης που προκαλούν και τα δύο στελέχη Δ*slyD*(*slyD*) και Δ*slyD*(*slyD<sub>F132A</sub>*), συμπεραίνεται ότι ο μηχανισμός της κολυμβητικής κίνησης ενδεχομένως να μην επηρεάζεται από την ενεργότητα ΡΡ1άσης του γονιδίου *EcslyD*.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τέλος, διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD<sub>F132A</sub>* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*) παρατηρήθηκε σε πλάκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100 μL υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. (Εικόνα Γ.2.40).



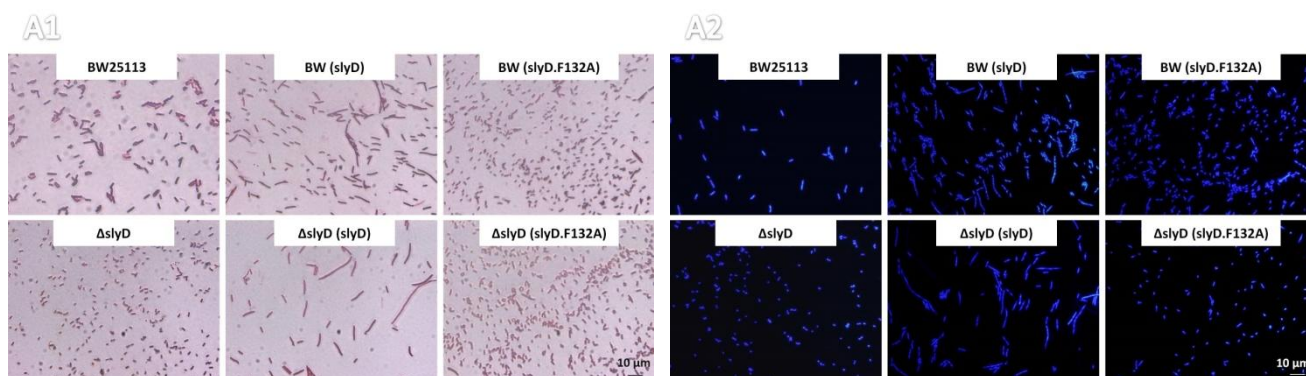
**Εικόνα Γ.2.40.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

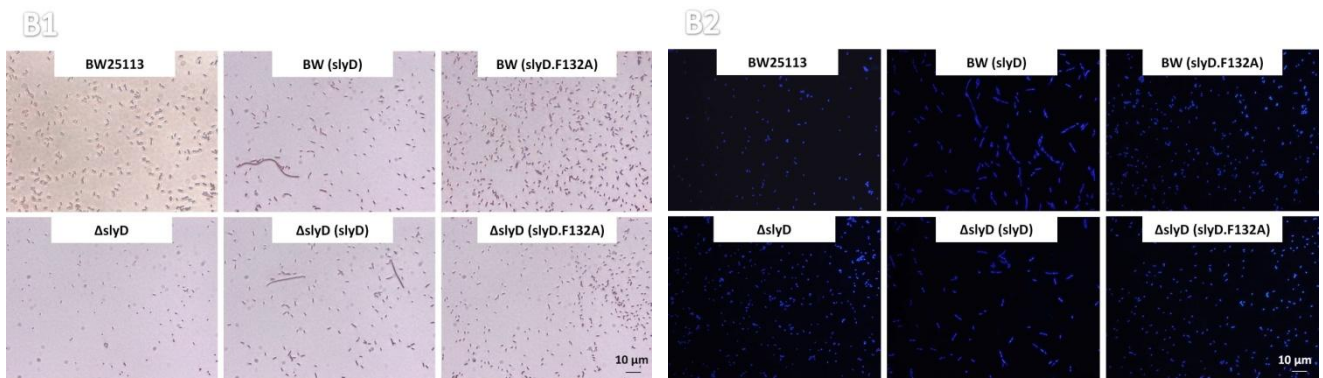
Από την εικόνα Γ.2.40 φαίνεται ότι η έκφραση των δύο γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> μειώνει ισόβαθμα την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>), αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα και το γεγονός ότι η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> στα στελέχη BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>) έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli* συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της *EcslyD* πιθανότατα δεν συμμετέχει στον μηχανισμό σχηματισμού βιοϋμενίου.

#### Γ.2.4.5.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και Δ*slyD* τα οποία υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο *EcslyD* είτε το *EcslyD*<sub>F132A</sub>

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113 και Δ*slyD* καθώς και των στελεχών BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>), Δ*slyD*(*slyD*) και Δ*slyD*(*slyD*<sub>F132A</sub>), με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *EcslyD*.H.pPROEX.HTa και *EcslyD*<sub>F132A</sub>.H.pPROEX.HTa πραγματοποιήθηκε με προσθήκη IPTG συγκέντρωσης 0.25 mM.

Στην εικόνα Γ.2.41 ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, Δ*slyD*, BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>), Δ*slyD*(*slyD*) και Δ*slyD*(*slyD*<sub>F132A</sub>), έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub> από 0.25mM του IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.





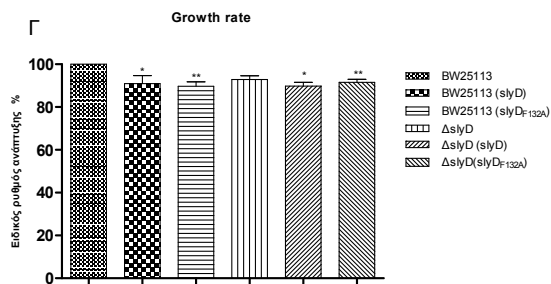
**Εικόνα Γ.2.41.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta slyD$ , BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>) κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram (A1) και DAPI (A2) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram (B1) και DAPI (B2) έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

Στην εικόνα Γ.2.41A1 και Γ.2.41A2 όπου απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta slyD$ , BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>) κατά την ομαδική κίνηση, με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η απουσία του γονιδίου *EcslyD* (στέλεχος  $\Delta slyD$ ) καθιστά τα κύτταρα ελαφρώς διαφοροποιημένα από του αγρίου τύπου. Δηλαδή το στέλεχος  $\Delta slyD$  παρουσιάζει κύτταρα μικρότερου μήκους και πλάτους. Αντίθετα η υπερέκφραση του γονιδίου *EcslyD* στα στελέχη BW25113(*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*) μεταβάλλει την κυτταρική μορφολογία και προκαλεί επιμηκυμένα κύτταρα (Εικόνα Γ.2.41A1) τα οποία σχηματίζουν πολλαπλά πυρηνοειδή (Εικόνα Γ.2.41A2), φαινόμενο το οποίο έχει παρατηρηθεί ξανά στο παρελθόν κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *EcslyD* σε *E. coli* κύτταρα (Roof et al., 1997). Ο φαινότυπος αυτός της υπερέκφρασης του γονιδίου *EcslyD* ανατρέπεται από την υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD*<sub>F132A</sub>. Απ'ότι παρατηρείται στην εικόνα Γ.2.41A1 και Γ.2.41A2 τα κύτταρα των στελεχών BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>) στο σύνολό τους δεν είναι επιμηκυμένα ενώ παράλληλα υιοθετούν την μορφολογία του στελέχους  $\Delta slyD$ . Συνεπώς η παρατηρούμενη επιμήκυνση οφείλεται στην έκφραση του γονιδίου *EcslyD* και κατά συνέπεια στην παρουσία της πρωτεΐνης *EcslyD*, ενώ παράλληλα, υπεύθυνη για αυτήν την κυτταρική διαφοροποίηση φαίνεται να είναι η ενεργότητα ΡΡΙάσης, αφού η παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης *EcslyD*<sub>F132A</sub> ανατρέπει αυτό το φαινόμενο.

Στην εικόνα Γ.2.41B1 και Γ.2.41B2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta slyD$ , BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>) κατά την κολυμβητική κίνηση, με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα. Αντίθετα με την ομαδική κίνηση, ο κυτταρικός φαινότυπος της υπερέκφρασης του γονιδίου *EcslyD* κατά την κολυμβητική κίνηση δεν είναι έντονος. Παραμένει ωστόσο μια σχετική αναλογία των φαινοτύπων της ομαδικής και της κολυμβητικής κίνησης. Δηλαδή, τα κύτταρα του στελέχους  $\Delta slyD$  αποκτούν μια μικρότερου μεγέθους μορφολογία από τα κύτταρα του αγρίου τύπου. Επίσης, ορισμένα από τα κύτταρα των στελεχών BW25113(*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*) είναι επιμηκυμένα. Αντίθετα, δεν παρατηρείται επιμήκυνση των κυττάρων των στελεχών BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>), αλλά παρατηρείται ομοιότητα με τα κύτταρα του στελέχους  $\Delta slyD$ . Ομοίως με τα προηγούμενα αποτελέσματα, συμπεραίνεται ότι η παρουσία της πρωτεΐνης *EcslyD* και συγκεκριμένα η ενεργότητα ΡΡΙάσης που φέρει, είναι ο λόγος για την παρατηρούμενη επιμήκυνση.

#### Γ.2.4.5.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης *EcslyD* και της *EcslyD*<sub>F132A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*

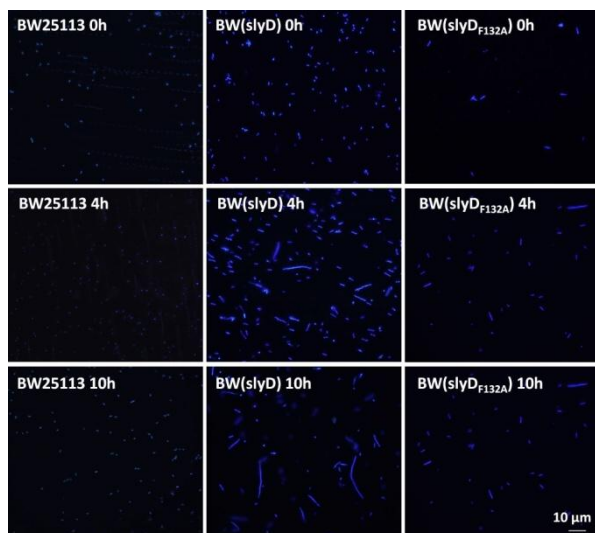
Μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου *EcslyD* καθώς και του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD*<sub>F132A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (BW25113). Για τον σκοπό αυτό μετασχηματίστηκαν ανεξάρτητα τα στελέχη BW25113 και  $\Delta slyD$  με τα πλασμίδια *EcslyD*.H.pPROEX.HTa και *EcslyD*<sub>F132A</sub>.H.pPROEX.HTa, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>), τα οποία έπειτα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε θερμοκρασία 30°C και η ανάπτυξή τους καταγράφηκε φωτομετρικά, σε διάστημα 10 ωρών, ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων για κάθε τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>). Ενδεικτικά παρατίθεται ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξής τους των στελεχών BW25113, BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ ,  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>), παρουσία 0.25mM IPTG, ο οποίος προκύπτει από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται λαμβάνοντας τον ειδικό ρυθμό αύξησης του στελέχους αγρίου τύπου ως 100% (Εικόνα. Γ.2.42).



**Εικόνα Γ.2.42.** Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των στελεχών BW25113, BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ ,  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>) σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.25mM IPTG.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό αύξησης των στελεχών BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>),  $\Delta slyD$ (*slyD*) και  $\Delta slyD$ (*slyD*<sub>F132A</sub>), τα οποία υπερεκφράζουν τα γονίδια *EcslyD* και *EcslyD*<sub>F132A</sub>, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113. Η παρατηρούμενη ελαφρά μείωση του ρυθμού αύξησης των στελεχών αυτών, είναι συνήθης και τυπική της υπερέκφρασης γονιδίων.

Στην εικόνα Γ.2.43 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*slyD*), BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>) με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Διακρίνεται μια ελαφρά κυτταρική επιμήκυνση του στελέχους BW25113(*slyD*), γεγονός που οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου *EcslyD* και συνεπώς στην ενεργότητα ΡΡ1άσης, σε αντίθεση με το φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο του στελέχους BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>) το οποίο υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο *EcslyD*<sub>F132A</sub>.



**Εικόνα Γ.2.43.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD*<sub>F132A</sub>), σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG, με χρώση DAPI, στις 0, 4 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB.

## Γ.2.4.6 Η πρωτεΐνη *Ectig*

### Γ.2.4.6.1 Ενζυμική ενεργότητα της *Ectig*

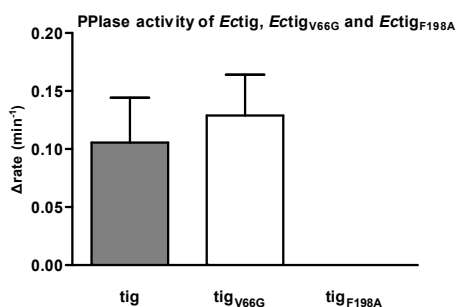
Με στόχο τον *in vitro* προσδιορισμό της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ectig* και των μεταλλαγμένων *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> (Εικόνα Γ.2.44), πραγματοποιήθηκε η υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig*, *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> με την χρήση των φορέων έκφρασης *Ectig*.H.pCDFDuet-1, *Ectig*<sub>V66G</sub>.H.pCDFDuet-1 και *Ectig*<sub>F198A</sub>.H.pCDFDuet-1 με την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της ΡΡιάσης των *Ectig*, *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA . (Πίνακας Γ.2.5).

**Πίνακας Γ.2.5.** Οι σταθερές εξειδίκευσης των ανασυνδυασμένων *Ectig*, *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> έναντι συνθετικών τετραπεπτιδίων.

Substrate (-Xaa-)	<i>Ectig</i>	<i>Ectig</i> <sub>V66G</sub>	<i>Ectig</i> <sub>F198A</sub>
	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
-Leu-	0.34 ± 1.22	0.4953 ± 0.00007	nd

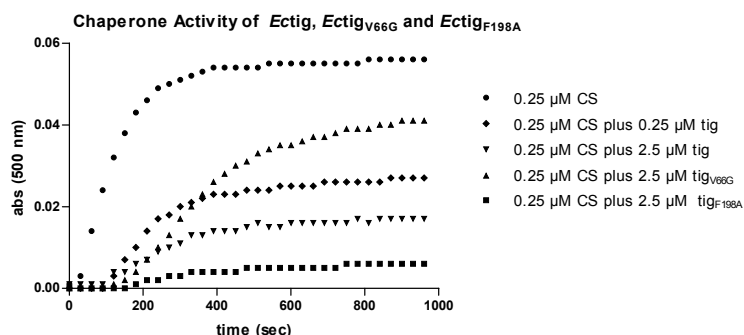
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη *Ectig*<sub>V66G</sub> δεν εμφανίζει μειωμένη ενεργότητα ΡΡιάσης, καθώς δεν διαφοροποιείται από την αγρίου τύπου *Ectig*. Αντίθετα, στην μεταλλαγμένη *Ectig*<sub>F198A</sub> δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα ΡΡιάσης συγκριτικά με την την αγρίου τύπου *Ectig* (Εικόνα Γ.2.44).



**Εικόνα Γ.2.44.** Η ενεργότητα ΡΡιάσης (Δrate) των Ectig<sub>V66G</sub> και Ectig<sub>F198A</sub> σε σύγκριση με την αγρίου τύπου Ectig.

Ακολούθως και με στόχο την διερεύνηση του εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της Ectig<sub>F198A</sub> ή η σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή πρόσδεσης του ριβοσώματος της Ectig<sub>V66G</sub> επηρεάζει την παρεμπόδιση της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θερμικής συσσωμάτωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος.

Από την εικόνα Γ.2.45 παρατηρήθηκε ότι η αγρίου τύπου Ectig παρεμποδίζει την συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος, ελαφρώς πιο αποτελεσματικά από την μεταλλαγμένη Ectig<sub>V66G</sub>, ενώ φαίνεται ότι η παρεμπόδιση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της στο διάλυμα της αντίδρασης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε σύγκριση με την Ectig, η Ectig<sub>F198A</sub> παρεμποδίζει πιο αποτελεσματικά την συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Επομένως, η μεγαλύτερη ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS από την Ectig<sub>F198A</sub> σε σύγκριση με την Ectig, αποτελεί ένδειξη ότι η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης της Ectig<sub>F198A</sub> αυξάνει την δραστηριότητά της ως παρεμποδιστή της συσσωμάτωσης της CS και πιθανότατα την λειτουργία της ως τσαπερόνη.



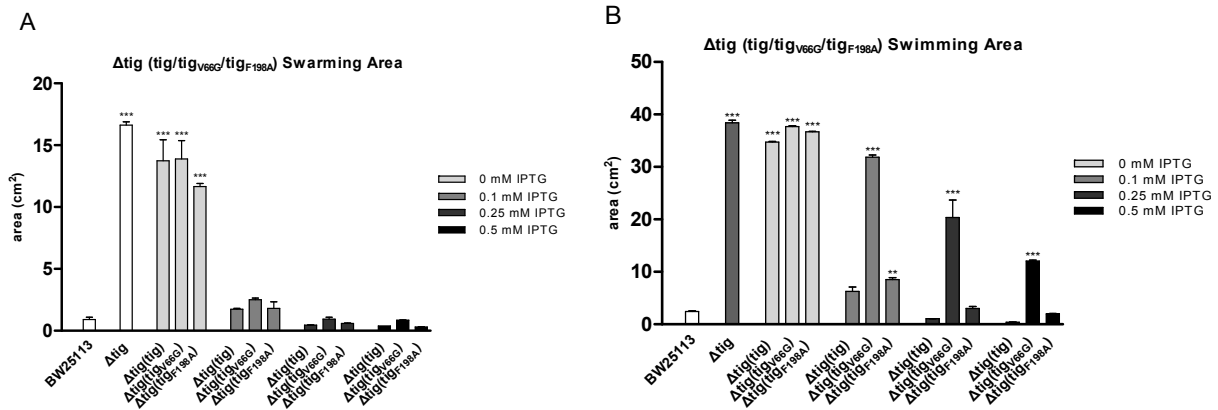
**Εικόνα Γ.2.45.** Η επίδραση των πρωτεϊνών Ectig, Ectig<sub>V66G</sub> και Ectig<sub>F198A</sub> στη θερμική συσσωμάτωση της συνθάσης του κιτρικού οξέος. Η θερμική συσσωμάτωση 0.25 μM συνθάσης του κιτρικού οξέος απουσία πρωτεϊνών (●), παρουσία 0.25 μM της Ectig (◆), 2.5 μM της Ectig (▼), 2.5 μM της Ectig<sub>V66G</sub> (▲) και 2.5 μM της Ectig<sub>F198A</sub> (■).

#### Γ.2.4.6.2 Διερεύνηση του φαινότυπου του στελέχους Δtig στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο Ectig είτε το Ectig<sub>V66G</sub> είτε το Ectig<sub>F198A</sub>

Διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων Ectig, Ectig<sub>V66G</sub> ή Ectig<sub>F198A</sub> στο στέλεχος Δtig επαναφέρει τον φαινότυπο του Δtig στα επίπεδα του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κλυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, ώστε να διαπιστωθεί εάν ο φαινότυπος του στελέχους Δtig ωφείλεται στην απώλεια του tig γονιδίου και επίσης να διερευνηθεί εάν η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης επηρεάζει τον φαινότυπο.

### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.46Α και Β).



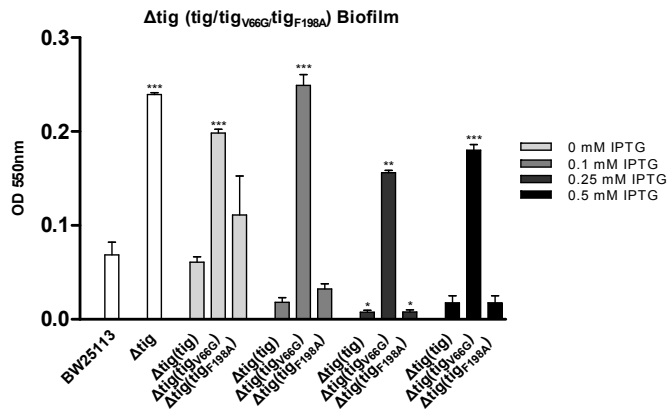
**Εικόνα Γ.2.46.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113 και *Δtig* καθώς και των στελεχών *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι πρωτεΐνες *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* συμβάλλουν στην μείωση της ομαδικής κίνησης και στην επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου, σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG (0.1 έως 0.5 mM). Η απουσία της *Ectig* ευθύνεται για την σημαντική αύξηση της ικανότητας ομαδικής κίνησης αφού παρουσία της επαναφέρεται ο φυσιολογικός φαινότυπος. Επίσης, η *Ectig<sub>V66G</sub>*, η οποία φέρει σημειακή μετάλλαξη στη θέση δέσμευσης στο ριβόσωμα, ενώ παράλληλα, όπως αποδείχθηκε έχει μειωμένη ενεργότητα τσαπερόνης συγκριτικά με την *Ectig*, είναι εξίσου υπεύθυνη για την επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου(Εικόνα Γ.2.46.A ). Συνεπώς, εφόσον η *Ectig<sub>F198A</sub>* η οποία δεν φέρει ενεργότητα ΡΡΙΑσης αλλά είναι υπεύθυνη για την επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου, συμπεραίνεται ότι ο μηχανισμός της ομαδικής κίνησης δεν επηρεάζεται από την ενεργότητα ΡΡΙΑσης ή από την ενεργότητα τσαπερόνης της *Ectig*.

Από την εικόνα Γ.2.46.Β διαπιστώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου αγρίου τύπου *Ectig* στο στέλεχος *Δtig(tig)* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου της κολυμβητικής κίνησης. Επομένως η αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *Δtig* οφείλεται στην απουσία της πρωτεΐνης *Ectig*. Διαπιστώνεται επίσης ότι παρουσία της *Ectig<sub>F198A</sub>* επανέρχεται ο φυσιολογικός φαινότυπος. Ωστόσο, παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ectig<sub>V66G</sub>* δεν ήταν ικανή να προκαλέσει επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Αν και η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* μειώνεται αναλογικά της συγκέντρωσης της μεταλλαγμένης *Ectig<sub>V66G</sub>* παραμένει στατιστικά σημαντική ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του IPTG (0.5 mM).

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Εν συνεχεία, διερευνήθηκε εάν η έκφραση των γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* στο στέλεχος *Δtig* επηρεάζει τα επίπεδα σχηματισμού βιοϋμενίου. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)*, παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates) που περιείχαν 100  $\mu$ l υγρό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h (Εικόνα Γ.2.47).



**Εικόνα Γ.2.47.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *Δtig* καθώς και των στελεχών *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου *Ectig* προκαλεί μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *Δtig(tig)*. Δηλαδή η παρουσία της πρωτεΐνης *Ectig* επαναφέρει τον φυσιολογικό φαινότυπο. Επομένως ο λόγος της υψηλής ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *Δtig* είναι η απουσία του γονιδίου *Ectig*. Επίσης παρατηρείται ότι η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ectig<sub>F198A</sub>* προκαλεί εξίσου επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου. Αντιθέτως, η έκφραση του μεταλλαγμένου *Ectig<sub>V66G</sub>* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου αφού η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *Δtig(tig<sub>V66G</sub>)* παραμένει σε υψηλά και παραπλήσια επίπεδα με το στέλεχος *Δtig* (Εικόνα Γ.2.47.) Άρα, ο σχηματισμός του βιοϋμενίου δεν επηρεάζεται από την ενεργότητα της ΡΡ1άσης της πρωτεΐνης *Ectig* αλλά φαίνεται ότι πιθανότατα σχετίζεται με την χαμηλότερη ενεργότητα τσοπερόνης ή με την ικανότητα πρόσδεσης στο ριβόσωμα.

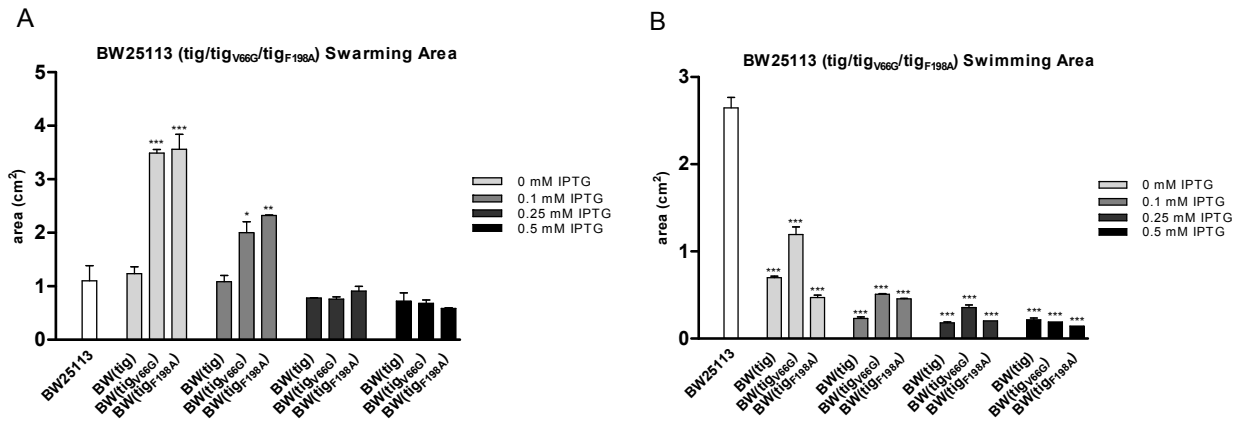
#### Γ.2.4.6.3 Διερεύνηση του φαινοτύπου του στελέχους BW25113 στο οποίο υπερεκφράζεται είτε το γονίδιο *Ectig* είτε το *Ectig<sub>V66G</sub>* είτε το *Ectig<sub>F198A</sub>*

Διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* ή *Ectig<sub>F198A</sub>* στο στέλεχος BW25113 επηρεάζει τον φαινότυπό του κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Τα πλασμίδια *Ectig*.H.pPROEX.HTa, *Ectig<sub>V66G</sub>*.H.pPROEX.HTa και *Ectig<sub>F198A</sub>*.H.pPROEX.HTa χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του στελέχους BW25113 με αποτέλεσμα την κατασκευή των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*).



### Ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης

Η ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), παρατηρήθηκε σε *swarming* και σε *swimming* τρυβλία. Η ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα της αποικίας *swarming* και *swimming* καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.48Α και Β).



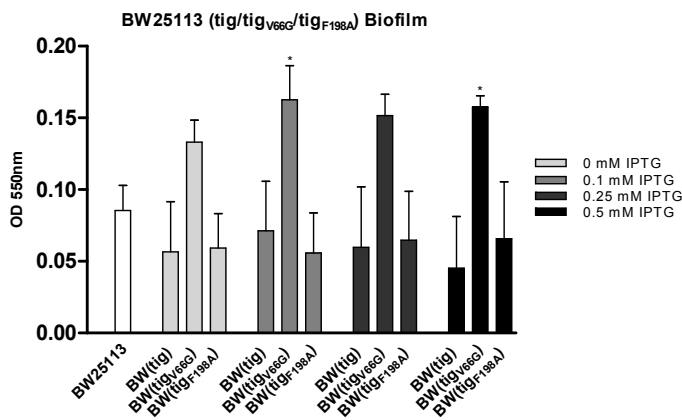
**Εικόνα Γ.2.48.** Η ικανότητα ομαδικής (Α) και κολυμβητικής (Β) κίνησης των στελεχών BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφορές στην ικανότητα ομαδικής κίνησης μεταξύ των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*) (Εικόνα Γ.2.48.Α). Απ' ότι διακρίνεται, η υπερέκφραση και των τριών γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>v66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>*, στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του IPTG, δεν προκαλεί μεταβολές της ικανότητας ομαδικής κίνησης συγκριτικά με τον φαινότυπο του αγρίου τύπου. Ωστόσο, απουσία και παρουσία 0.1 mM IPTG, παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην ομαδική κίνηση των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*). Συγκεκριμένα φαίνεται να αυξάνεται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*) που εκφράζουν τα μεταλλαγμένα γονίδια *Ectig<sub>v66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>*. Αυτό ερμηνεύεται ως εξής: τα χαμηλά επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *Ectig<sub>v66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* επηρεάζουν τον φαινότυπο της ομαδικής κίνησης, γεγονός το οποίο ενδεχομένως να οφείλεται στην μειωμένη ενεργότητα ΡΡ1άσης της *Ectig<sub>F198A</sub>* ή στην μειωμένη ενεργότητα τσαπερόνης της *Ectig<sub>v66G</sub>*.

Από την εικόνα Γ.2.48Β διαπιστώνεται ότι τα στελέχη BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>v66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*) εμφανίζουν εξαιρετικά μειωμένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης η οποία είναι στατιστικά σημαντική, συγκρινόμενη με την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου. Παρατηρείται ωστόσο μια διαφοροποίηση στην ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των παραπάνω στελεχών απουσία του IPTG. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η έκφραση και των τριών γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>v66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* στο στέλεχος BW25113 προκαλεί σημαντική μείωση της ικανότητας ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης του βακτηρίου *E. coli* ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία υψηλής ενεργότητας ΡΡ1άσης της *Ectig*.

### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*) (Εικόνα Γ.2.49).



**Εικόνα Γ.2.49.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

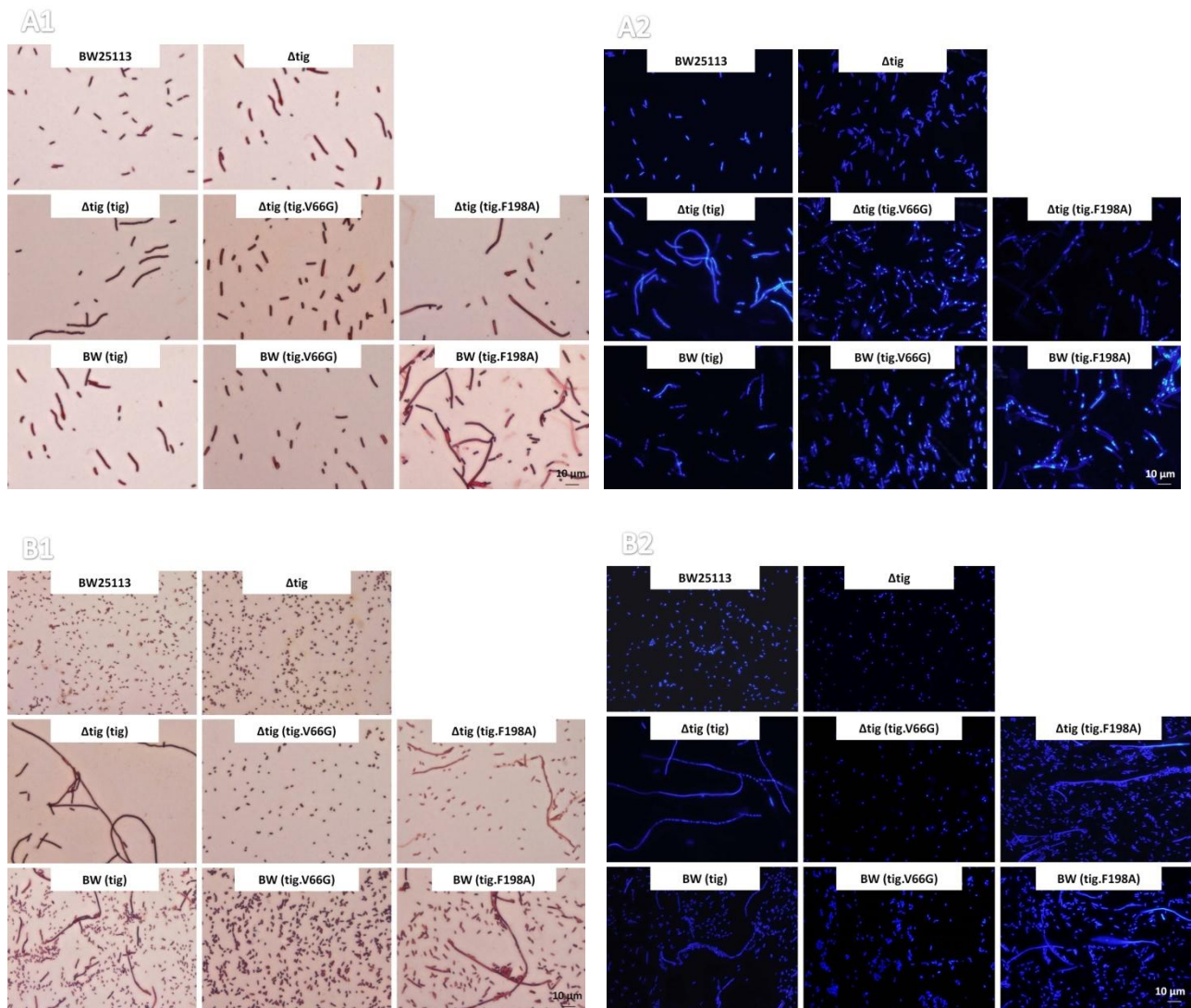
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig* και *Ectig<sub>F198A</sub>* δεν επιφέρει μεταβολή της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Αντίθετα η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ectig<sub>V66G</sub>* στο στέλεχος BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*) επιφέρει αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.49). Επομένως συνάγεται ότι η ενεργότητα ΡΡΙΑσης δεν επιδρά στον μηχανισμό σχηματισμού βιοϋμενίου ωστόσο ο ρόλος της ενεργότητας τσαπερόνης ή της ικανότητας πρόσδεσης στο ριβόσωμα της πρωτεΐνης *Ectig* σε αυτόν τον μηχανισμό παραμένει αινιγματικός και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

#### Γ.2.4.6.4 Διερεύνηση της κυτταρικής μορφολογίας των στελεχών BW25113 και $\Delta$ *tig* τα οποία

**υπερεκφράζουν είτε το γονίδιο *Ectig* είτε το *Ectig<sub>V66G</sub>* είτε το *Ectig<sub>F198A</sub>***

Ακολούθως, εξετάστηκε η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113 και  $\Delta$ *tig* καθώς και των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*),  $\Delta$ *tig*(*tig*),  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>V66G</sub>*) και  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>F198A</sub>*), με χρώση Gram και DAPI, κατά την ομαδική κίνηση και κολυμβητική κίνηση. Η έκφραση των πλασμιδίων *Ectig*.H.pPROEX.HTa, *Ectig<sub>V66G</sub>*.H.pPROEX.HTa και *Ectig<sub>F198A</sub>*.H.pPROEX.HTa πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 0.25 mM IPTG .

Η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών BW25113,  $\Delta$ *tig*, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*),  $\Delta$ *tig*(*tig*),  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>V66G</sub>*) και  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>F198A</sub>*) πραγματοποιήθηκε έπειτα από χρώση κατά Gram, και από χρώση DAPI, σε μικροσκόπιο ορατού και φθορισμού, αντίστοιχα. Στην εικόνα Γ.2.50 ενδεικτικά παρουσιάζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta$ *tig*, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*),  $\Delta$ *tig*(*tig*),  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>V66G</sub>*) και  $\Delta$ *tig*(*tig<sub>F198A</sub>*), έπειτα από την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* από 0.25mM του IPTG, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram και DAPI.



**Εικόνα Γ.2.50.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta tig$ , BW25113(*tig*), BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>),  $\Delta tig(tig)$ ,  $\Delta tig(tig$ <sub>V66G</sub>) και  $\Delta tig(tig$ <sub>F198A</sub>) κατά την ομαδική κίνηση με χρώση Gram (A1) και DAPI (A2) και κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση Gram (B1) και DAPI (B2) έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h, σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG.

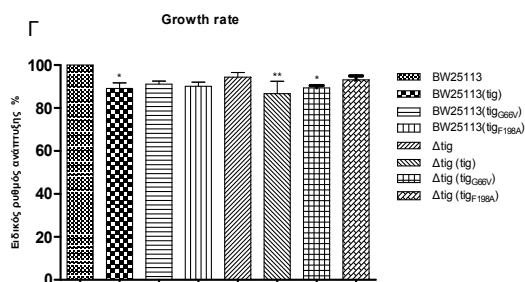
Στην εικόνα Γ.2.50A1 και Γ.2.50A2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113,  $\Delta tig$ , BW25113(*tig*), BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>),  $\Delta tig(tig)$ ,  $\Delta tig(tig$ <sub>V66G</sub>) και  $\Delta tig(tig$ <sub>F198A</sub>) κατά την ομαδική κίνηση με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα. Αρχικά παρατηρείται μια σημαντική κυτταρική επιμήκυνση στα στελέχη  $\Delta tig$ ,  $\Delta tig(tig)$  και BW25113(*tig*) (Εικ. Γ.2.50A1), η οποία χαρακτηρίζεται από ανώμαλη κατανομή του γενετικού υλικού (Εικ. Γ.2.50A2). Δηλαδή, το DNA φαίνεται ότι δεν διαιρείται φυσιολογικά εντός του επιμηκυμένου κυττάρου γεγονός που υποδηλώνει μια ελλiptή κυτταρική διαίρεση παρουσία πολλών μορίων ή απουσία της πρωτεΐνης *Ectig*, γεγονός το οποίο έχει παρατηρηθεί από τους Guthrie και Wickner οι οποίοι απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στην συμμετοχή της τσαπερόνης *Ectig* στην αναδίπλωση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση (Guthrie and Wickner, 1990). Η παρουσία της μεταλλαγμένης *Ectig*<sub>F198A</sub> στα στελέχη  $\Delta tig(tig$ <sub>F198A</sub>) και BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>) δεν αντέστρεψε τον επιμηκυμένο κυτταρικό φαινότυπο απ'ότι παρατηρείται στην εικόνα Γ.2.50A1.. Η κυτταρική επιμήκυνση ανατρέπεται μερικώς, μόνο κατά την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ectig*<sub>V66G</sub>. Τα στελέχη  $\Delta tig(tig$ <sub>V66G</sub>) και BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), αν και

παραμένει σε αυτά μια σχετική επιμήκυνση (Εικ. Γ.2.50Α1), ωστόσο εμφανίζονται πιο φυσιολογικά ενώ η κατανομή και ο διαχωρισμός του γενετικού υλικού μοιάζει να είναι πιο ομαλός (Εικόνα Γ.2.50Α2).

Στην εικόνα εικόνα Γ.2.50Β1 και Γ.2.50Β2 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, *Δtig*, BW25113(*tig*), BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>), *Δtig(tig)*, *Δtig(tig*<sub>V66G</sub>) και *Δtig(tig*<sub>F198A</sub>) κατά την κολυμβητική κίνηση με χρώση κατά Gram και χρώση DAPI, αντίστοιχα. Αντίθετα με την ομαδική κίνηση, εδώ δεν παρατηρείται καμία κυτταρική διαφοροποίηση στο στέλεχος *Δtig* το οποίο ομοιάζει με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ωστόσο, κατά την υπερέκφραση του γονιδίου *Ectig* ειδικότερα στο στέλεχος *Δtig(tig)* και λιγότερο στο στέλεχος BW25113(*tig*), παρατηρείται μια έντονη κυτταρική επιμήκυνση (Εικ. Γ.2.50Β1). Το στέλεχος *Δtig(tig)* σχηματίζει νημάτια τα οποία ξεπερνούν 100 φορές το μήκος ενός φυσιολογικού *E. coli* κυττάρου. Το στέλεχος BW25113(*tig*), αν και σχηματίζει νηματοειδή κύτταρα εμφανίζει επίσης και φυσιολογικού μεγέθους κύτταρα. Η διαίρεση του γενετικού υλικού στο στέλεχος *Δtig(tig)* φαίνεται να είναι ελλειπής ενώ στο στέλεχος BW25113(*tig*) φαίνεται να είναι πιο ομαλή (Εικόνα Γ.2.50Β2). Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *Ectig*<sub>V66G</sub> φαίνεται ότι επαναφέρει τον φυσιολογικό φαινότυπο. Απ'ότι διακρίνεται από τις εικόνες Γ.2.50Β1 και Γ.2.50Β2 τα κύτταρα των στελεχών *Δtig(tig*<sub>V66G</sub>) και BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>) εμφανίζονται ως φυσιολογικά ραβδοειδή κύτταρα, με φυσιολογική κατανομή του γενετικού υλικού. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη *Ectig* πιθανότατα συμμετέχει στον μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης με έναν τρόπο που ακόμα δεν είναι γνωστός. Όμως, ο κυτταρικός φαινότυπος των παραπάνω στελεχών υποδηλώνει ότι η *Ectig* συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση, όχι τόσο με την ιδιότητα της ΡΡ1άσης, αλλά πιθανότατα όσο με την ιδιότητα της τσαπερόνης.

#### **Γ.2.4.6.5 Διερεύνηση της υπερέκφρασης των γονιδίων *Ectig*, *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli***

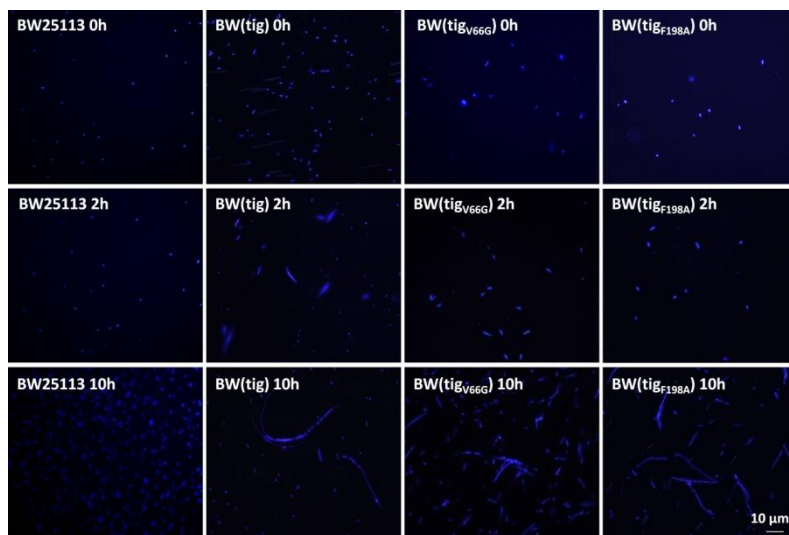
Μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του γονιδίου αγρίου τύπου *Ectig* καθώς και των μεταλλαγμένων γονιδίων *Ectig*<sub>V66G</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> στην ανάπτυξη του βακτηρίου *E. coli*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (BW25113). Για τον σκοπό αυτό μετασχηματίστηκαν ανεξάρτητα τα στελέχη BW25113 και *Δtig* με τα πλασμίδια *Ectig*.H.pPROEX.HTa, *Ectig*<sub>V66G</sub>.H.pPROEX.HTa και *Ectig*<sub>F198A</sub>.H.pPROEX.HTa, με αποτέλεσμα να προκύψουν τα στελέχη BW25113(*tig*), BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>), *Δtig(tig)*, *Δtig(tig*<sub>V66G</sub>) και *Δtig(tig*<sub>F198A</sub>), τα οποία έπειτα αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, παρουσία 0 έως 0.5 mM IPTG, σε θερμοκρασία 30°C και η ανάπτυξή τους καταγράφηκε φωτομετρικά, σε διάστημα 10 ωρών, ενώ παράλληλα καταμετρήθηκε ο αριθμός κυττάρων για κάθε τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>). Ενδεικτικά παρατίθεται ο ειδικός ρυθμός αύξησης τους επί τοις % των BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig*<sub>V66G</sub>), BW25113(*tig*<sub>F198A</sub>), *Δtig*, *Δtig(tig)*, *Δtig(tig*<sub>V66G</sub>) και *Δtig(tig*<sub>F198A</sub>), παρουσία 0.25mM IPTG, ο οποίος προκύπτει από τις τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD<sub>600nm</sub>) κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται λαμβάνοντας τον ειδικό ρυθμό αύξησης του στελέχους αγρίου τύπου ως 100% (Εικόνα. Γ.2.51).



**Εικόνα Γ.2.51.** Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των στελεχών BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), Δ*tig*, Δ*tig*(*tig*), Δ*tig*(*tig<sub>V66G</sub>*) και Δ*tig*(*tig<sub>F198A</sub>*) σε υγρό θρεπτικό υλικό LB παρουσία 0.25mM IPTG.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της εικόνας Γ.2.51 φάνηκε ότι δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στον ρυθμό ανάπτυξης των στελεχών BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), Δ*tig*, Δ*tig*(*tig*), Δ*tig*(*tig<sub>V66G</sub>*) και Δ*tig*(*tig<sub>F198A</sub>*), τα οποία υπερεκφράζουν τα γονίδια *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>*, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 (Εικόνα Γ.2.51.). Η παρατηρούμενη ελαφρά μείωση του ρυθμού αύξησης των στελεχών BW25113(*tig*), Δ*tig*(*tig*) και Δ*tig*(*tig<sub>V66G</sub>*), είναι τυπική της υπερέκφρασης γονιδίων.

Στην εικόνα Γ.2.52. απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*) με χρώση DAPI, στις 0, 2 και 10 ώρες επώασης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB. Διακρίνεται μια κυτταρική επιμήκυνση, η οποία είναι πιο έντονη στα στελέχη BW25113(*tig*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), γεγονός που οφείλεται στην υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig* και *Ectig<sub>F198A</sub>*, σε αντίθεση με το φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο του στελέχους BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*) το οποίο υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο γονίδιο *Ectig<sub>V66G</sub>*.



**Εικόνα Γ.2.52.** Κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*tig*), BW25113(*tig<sub>V66G</sub>*), BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*), σε συγκέντρωση 0.25 mM IPTG, με χρώση DAPI, στις 0, 2 και 10 ώρες ανάπτυξης σε υγρό θρεπτικό μέσο LB.

## Γ.2.5 Λειτουργική υποκατάσταση των FKBP πρωτεϊνών από τις ΡΡ1άσες

Λειτουργική υποκατάσταση ονομάζεται η κατάσταση κατά την οποία μια πρωτεΐνη μπορεί να υποκαταστήσει ολικώς ή μερικώς την απώλεια μιας άλλης (Hartman et al., 2001; Wagner, 2005a). Ένα

παράδειγμα λειτουργικής υποκατάστασης σε βιολογικά συστήματα αποτελεί η περίπτωση των ισοενζύμων, τα οποία είναι λειτουργικά ισοδύναμες μορφές ενζύμων καθώς επιτελούν την ίδια λειτουργία, ωστόσο κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Gu et al. 2003; Conant and Wagner, 2004; DeLuna et al., 2008). Τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών αποτελούν πρωτεΐνες με συγκλίνουσα εξέλιξη και ενώ καταλύουν την ίδια αντίδραση εντός του κυττάρου ωστόσο δεν σχετίζονται δομικά και δεν εντοπίζεται ομολογία στην ακολουθία τους (Fanghänel and Fischer, 2004).

Η λειτουργική υποκατάσταση μεταξύ των μελών της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς, αν και έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *EcrpiD* στο στέλεχος *DsurA* του *E.coli* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου (ευαισθησία σε αντιβιοτικά όπως το νονοβιοσίν λόγω της αυξημένης διαπερατότητας της μεμβράνης) (Dartigalongue and Satish, 1998). Επίσης η υπερέκφραση της κυκλοφιλίνης A, *Sccpr1*, αποκαθιστά τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο μεταλλαγμένων στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* στα οποία το γονίδιο που κωδικοποιεί για την παρβουλίνη *Scess1* έχει απενεργοποιηθεί υποδηλώνοντας ότι η κυκλοφιλίνη A υποκαθιστά λειτουργικά την παρβουλίνη *Scess1* (Mendu et al., 2010). Ως εκ τούτου ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η λειτουργία της κάθε *EcfkpB* υποκαθίσταται από πρωτεΐνες οι οποίες ανήκουν και στις τρεις οικογένειες των ΡΡΙΑσών, χρησιμοποιώντας τους φαινοτύπους της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*.

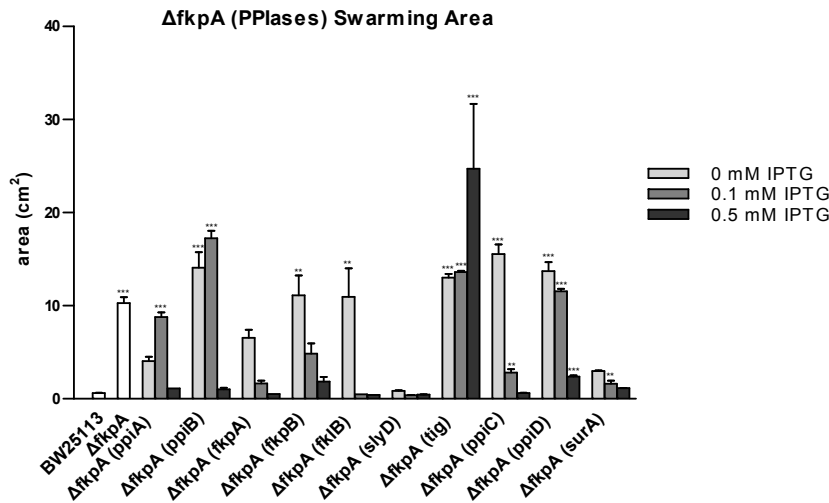
Για το σκοπό αυτό, αποκτήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pCA24N στους οποίους έχει κλωνοποιηθεί το κάθε γονίδιο που κωδικοποιεί για κάθε μέλος της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών (*EcrpiA*, *EcrpiB*, *EcfkrA*, *EcfkrB*, *EcfklB*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcrpiC*, *EcrpiD* και *EcsurA*). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια *ppiA.pCA24N*, *ppiB.pCA24N*, *fkrA.pCA24N*, *fklB.pCA24N*, *fkrB.pCA24N*, *slyD.pCA24N*, *tig.pCA24N*, *ppiC.pCA24N*, *ppiD.pCA24N* και *surA.pCA24N* εισήχθησαν ανεξάρτητα σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη των FKBP πρωτεϊνών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*. Τα στελέχη που προέκυψαν αξιοποιήθηκαν για την εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου.

### **Γ.2.5.1 Λειτουργική υποκατάσταση της πρωτεΐνης *EcfkrA* από τις ΡΡΙΑσες**

Η δυνατότητα λειτουργικής υποκατάστασης της *EcfkrA* από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών διερευνήθηκε μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας (*EcrpiA*, *EcrpiB*, *EcfkrA*, *EcfkrB*, *EcfklB*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcrpiC*, *EcrpiD* και *EcsurA*) στο στέλεχος *ΔfkrA* εξετάζοντας την δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου. Συνεπώς, αξιοποιήθηκε το γεγονός ότι όλα τα γονίδια του *E. coli* που κωδικοποιούν για τις ΡΡΙΑσες έχουν κλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCA24N. Το στέλεχος *ΔfkrA* μετασχηματίστηκε με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης *EcrpiA.pCA24N*, *EcrpiB.pCA24N*, *EcfkrA.pCA24N*, *EcfkrB.pCA24N*, *EcfklB.pCA24N*, *EcslyD.pCA24N*, *Ectig.pCA24N*, *EcrpiC.pCA24N*, *EcrpiD.pCA24N* και *EcsurA.pCA24N*. Τα στελέχη *ΔfkrA(ppiA)*, *ΔfkrB(ppiB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ppiC)*, *ΔfkrA(ppiD)* και *ΔfkrA(surA)* που προέκυψαν αξιοποιήθηκαν για την εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των στελεχών *ΔfkrA(ρριA)*, *ΔfkrB(ρριB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ρριC)*, *ΔfkrA(ρριD)* και *ΔfkrA(surA)* παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM) και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.53).

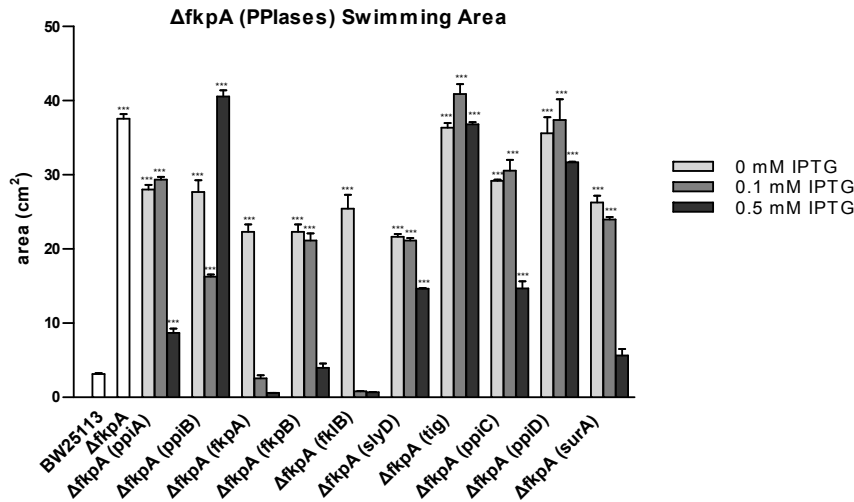


**Εικόνα Γ.2.53.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkrA* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίσται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των στελεχών *ΔfkrA(ρριA)*, *ΔfkrB(ρριB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ρριC)*, *ΔfkrA(ρριD)* και *ΔfkrA(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση 20h, στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔfkrA* επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου από όλες τις PPIάσεις, με εξαίρεση την πρωτεΐνη *Ectig* και την παρβουλίνη *EcrriD*, οι οποίες φαίνεται να μην υποκαθιστούν την *EcfkrA*, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης (Εικόνα Γ.2.53) Σημειώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkrA* στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔfkrA* επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου, σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φυσιολογική λειτουργία της *EcfkrA* πρωτεΐνης, κατά την ομαδική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από τις *EcrriA*, *EcrriB*, *EcfkrB*, *EcfklB*, *EcslyD*, *EcrriC* και *EcsurA*.

### Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η ανάπτυξη των στελεχών *ΔfkrA(ρριA)*, *ΔfkrB(ρριB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ρριC)*, *ΔfkrA(ρριD)* και *ΔfkrA(surA)* παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM) και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.54).



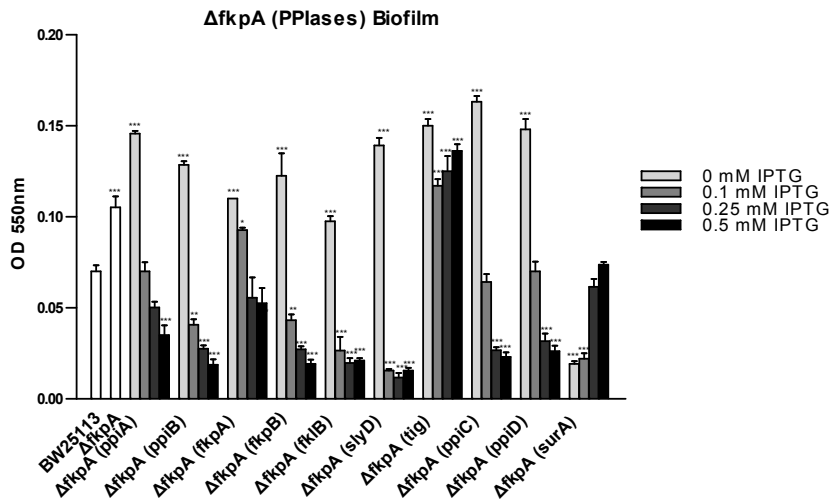
**Εικόνα Γ.2.55.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkrA* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Αναπαρίσταται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των στελεχών *ΔfkrA(ρpiA)*, *ΔfkrB(ρpiB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ρpiC)*, *ΔfkrA(ρpiD)*, και *ΔfkrA(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Το εμβαδόν που καταλαμβάνει η αναπτυσσόμενη αποικία μετρήθηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA μέσω του Tukey's Multiple Comparison Test (P<0.0001).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φυσιολογική λειτουργία της *EcfkrA* πρωτεΐνης υποκαταστάθηκε αποτελεσματικά μόνο από τις *EcfkrB* και *EcfklB*, της οικογένειας των FKBP πρωτεϊνών. Τα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών δεν υποκατέστησαν την *EcfkrA*, όπως επίσης και τα μέλη της οικογένειας των παρβουλινών με μοναδική εξαίρεση την περιπλαστική *EcsurA* (Εικόνα Γ.2.55.). Σημειώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkrA* στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔfkrA* επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου. Συμπερασματικά θα λέγαμε ότι η φυσιολογική λειτουργία της *EcfkrA* πρωτεΐνης, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από τις *EcfkrB*, *EcfklB* και *EcsurA*.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkrA(ρpiA)*, *ΔfkrB(ρpiB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(ρpiC)*, *ΔfkrA(ρpiD)* και *ΔfkrA(surA)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου οπτικοποιήθηκε με τη χρήση της χρωστικής Crystal Violet ενώ η βιομάζα του βιοϋμενίου ποσοτικοποιήθηκε φωτομετρικά στα 550 nm (Εικόνα Γ.2.56).





**Εικόνα Γ.2.56.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkrA* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Αναπαρίστανται η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των στελεχών *ΔfkrA(ppiA)*, *ΔfkrB(ppiB)*, *ΔfkrA(fkrA)*, *ΔfkrA(fkrB)*, *ΔfkrA(fklB)*, *ΔfkrA(slyD)*, *ΔfkrA(tig)*, *ΔfkrA(pprC)*, *ΔfkrA(pprD)* και *ΔfkrA(surA)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τεσσάρων βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA μέσω του Tukey's Multiple Comparison Test ( $P < 0.0001$ ).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο φαινότυπος αγρίου τύπου του σχηματισμού βιοϋμενίου στο στέλεχος *ΔfkrA* επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από την έκφραση του γονιδίου *EcsurA* και του *EcfkrA*. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων των PPIασών προκαλεί μια καταστολή του σχηματισμού βιοϋμενίου στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του IPTG (0.25 και 0.5 mM) (Εικόνα Γ.2.56). Επομένως συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες *EcrriA*, *EcrriB*, *EcfkrB*, *EcfklB*, *EcslyD*, *EcrriC* και *EcrriD* αποτελούν αρνητικοί ρυθμιστές του σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔfkrA*.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα όπου αναπαρίστανται η λειτουργική υποκατάσταση (+) και μη (-) της πρωτεΐνης *EcfkrA* από τις PPIάσες, θα λέγαμε ότι το σύνολο των FKBP πρωτεϊνών αποκαθιστούν την λειτουργία της ως προς τις τρεις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης. Τα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών φαίνεται ότι αποκαθιστούν τον ρόλο της *EcfkrA* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου αποκλειστικά. Επιπρόσθετα, η περιπλαστική παρβουλίνη *EcsurA* φαίνεται ότι μπορεί να υποκαταστήσει την *EcfkrA* και στις τρεις συνθήκες ανάπτυξης. Τα υπόλοιπα δύο μέλη της οικογένειας των παρβουλινών *EcrriC* και *EcrriD* υποκαθιστούν την *EcfkrA* αποκλειστικά σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου.

**Πίνακας Γ.2.5.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkrA* πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες PPIάσες.

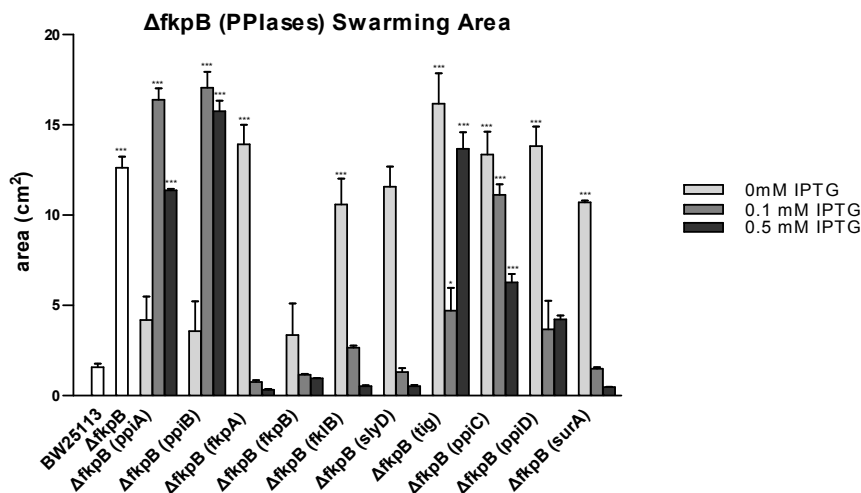
<i>ΔfkrA</i>	Cyps		FKBPs					Pars		
	<i>ppiA</i>	<i>ppiB</i>	<i>fkrA</i>	<i>fkrB</i>	<i>fklB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>ppiC</i>	<i>ppiD</i>	<i>surA</i>
<b>Swarming</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<b>Swimming</b>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>Biofilm</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

### Γ.2.5.2 Λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkρB* από τις PPIάσες

Η δυνατότητα λειτουργικής υποκατάστασης της *EcfkρB* από τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών διερευνήθηκε μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας (*EcrpρiA*, *EcrpρiB*, *EcfkρA*, *EcfkρB*, *EcfkρI*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcrpρiC*, *EcrpρiD* και *EcsurA*) στο στέλεχος *ΔfκρB*. Για τον σκοπό αυτό, τα στελέχη *ΔfκρB(ρpρiA)*, *ΔfκρB(ρpρiB)*, *ΔfκρB(fkρA)*, *ΔfκρB(fkρB)*, *ΔfκρB(fkρI)*, *ΔfκρB(slyD)*, *ΔfκρB(tig)*, *ΔfκρB(ρpρiC)*, *ΔfκρB(ρpρiD)* και *ΔfκρB(surA)* αξιοποιήθηκαν για την εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των *ΔfκρB(ρpρiA)*, *ΔfκρB(ρpρiB)*, *ΔfκρB(fkρA)*, *ΔfκρB(fkρB)*, *ΔfκρB(fkρI)*, *ΔfκρB(slyD)*, *ΔfκρB(tig)*, *ΔfκρB(ρpρiC)*, *ΔfκρB(ρpρiD)* και *ΔfκρB(surA)* παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).



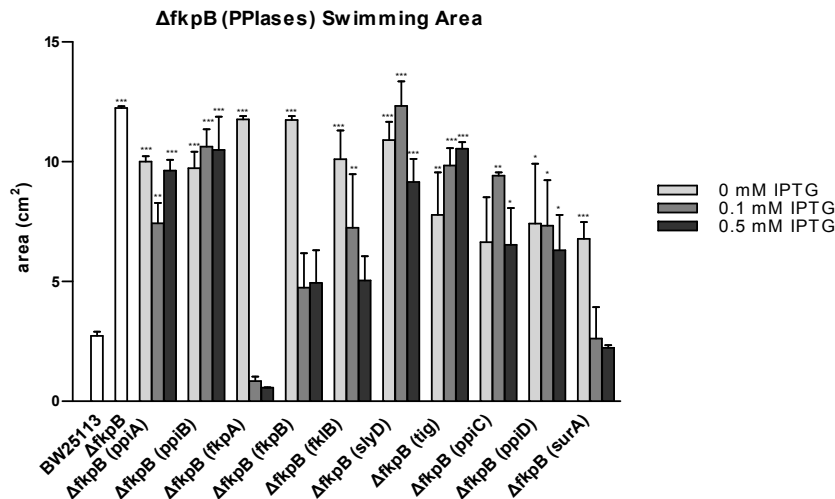
**Εικόνα Γ.2.57.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkρB* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίστανται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔfκρB*, *ΔfκρB(ρpρiA)*, *ΔfκρB(ρpρiB)*, *ΔfκρB(fkρA)*, *ΔfκρB(fkρI)*, *ΔfκρB(fkρB)*, *ΔfκρB(slyD)*, *ΔfκρB(tig)*, *ΔfκρB(ρpρiC)*, *ΔfκρB(ρpρiD)* και *ΔfκρB(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα της έδειξαν ότι η ικανότητα ομαδικής κίνησης του στελέχους *ΔfκρB* επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου έπειτα από την έκφραση του συνόλου των FKBP γονιδίων, με μοναδική εξαίρεση το γονίδιο *Ectig*. Η έκφραση των γονιδίων των κυκλοφιλινών *EcrpρiA* και *EcrpρiB* στο στέλεχος *ΔfκρB* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου σε φυσιολογικά επίπεδα καθώς η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών *ΔfκρB(ρpρiA)* και *ΔfκρB(ρpρiB)* παραμένει σημαντικά υψηλή. Οι παρβουλίνες *EcsurA* και *EcrpρiD* φαίνεται ότι αποκαθιστούν την λειτουργία της *EcfkρB* κατά την ομαδική κίνηση καθώς η έκφραση των γονιδίων που τις κωδικοποιούν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Σημειώνεται ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *EcfkρB* με συγκέντρωση 0.1 mM IPTG, στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔfκρB*, επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου ( Εικόνα Γ.2.57). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φυσιολογική λειτουργία της

*Ecfk*B πρωτεΐνης, κατά την ομαδική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από τις *Ecfk*A, *Ecfk*I*B*, *Ecsly*D, *Escrri*D και *Ecsur*A.

#### Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η ανάπτυξη των στελεχών *ΔfkrB*(*ρριA*), *ΔfkrB*(*ρριB*), *ΔfkrB*(*fkrA*), *ΔfkrB*(*fkrB*), *ΔfkrB*(*fkI*B), *ΔfkrB*(*sly*D), *ΔfkrB*(*tig*), *ΔfkrB*(*ρριC*), *ΔfkrB*(*ρριD*) και *ΔfkrB*(*surA*) παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία.

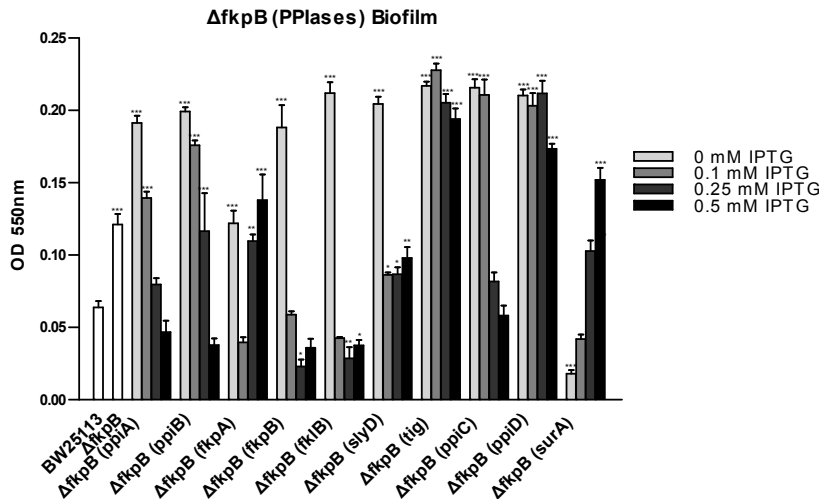


**Εικόνα Γ.2.58.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ecfk*B πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIασών υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Αναπαρίσταται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔfkrB*, *ΔfkrB*(*ρριA*), *ΔfkrB*(*ρριB*), *ΔfkrB*(*fkrA*), *ΔfkrB*(*fkI*B), *ΔfkrB*(*fkrB*), *ΔfkrB*(*sly*D), *ΔfkrB*(*tig*), *ΔfkrB*(*ρριC*), *ΔfkrB*(*ρριD*) και *ΔfkrB*(*surA*) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομαδική κινητικότητα του στελέχους *ΔfkrB* επανέρχεται στα επίπεδα του αγρίου τύπου από τις *Ecfk*A και *Ecfk*I*B* της FKBP οικογένειας και από την παρβουλίνη *Ecsur*A. Η έκφραση των γονιδίων των κυκλοφιλινών *Escrri*A και *Escrri*B στο στέλεχος *ΔfkrB* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Σημειώνεται ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Ecfk*B με συγκέντρωση 0.1 και 0.5 mM IPTG, στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔfkrB*, επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.58). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η φυσιολογική λειτουργία της *Ecfk*B πρωτεΐνης, κατά την κολυμβητική κίνηση, υποκαθίσταται αποτελεσματικά από τις *Ecfk*A, *Ecfk*I*B* και *Ecsur*A.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkrB*(*ρριA*), *ΔfkrB*(*ρριB*), *ΔfkrB*(*fkrA*), *ΔfkrB*(*fkrB*), *ΔfkrB*(*fkI*B), *ΔfkrB*(*sly*D), *ΔfkrB*(*tig*), *ΔfkrB*(*ρριC*), *ΔfkrB*(*ρριD*) και *ΔfkrB*(*surA*) παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h .



**Εικόνα Γ.2.59.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ecfk<sub>B</sub>* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIάσων, υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Αναπαρίσταται η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, *Δfkr<sub>B</sub>*, *Δfkr<sub>B</sub>(ppiA)*, *Δfkr<sub>B</sub>(ppiB)*, *Δfkr<sub>B</sub>(fkpA)*, *Δfkr<sub>B</sub>(fkpB)*, *Δfkr<sub>B</sub>(fklB)*, *Δfkr<sub>B</sub>(slyD)*, *Δfkr<sub>B</sub>(tig)*, *Δfkr<sub>B</sub>(ppiC)*, *Δfkr<sub>B</sub>(ppiD)* και *Δfkr<sub>B</sub>(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από την οικογένεια των FKBP πρωτεϊνών μόνο η πρωτεΐνη *Ecfk<sub>B</sub>* αποκαθιστά τον ρόλο της *Ecfk<sub>B</sub>* στον σχηματισμό βιοϋμενίου. Σημειώνεται ότι η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *Ecfk<sub>B</sub>* με συγκέντρωση 0.1 έως 0.5 mM IPTG, στο μεταλλαγμένο στέλεχος *Δfkr<sub>B</sub>*, επαναφέρει το φαινότυπο αγρίου τύπου. Παρατηρείται επίσης ότι οι κυκλοφιλίνες *EcrriA* και *EcrriB*, καθώς και η παρβουλίνη *EcrriC* αποκαθιστούν την λειτουργία της *Ecfk<sub>B</sub>* κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα στον παρακάτω πίνακα όπου αναπαρίσταται η λειτουργική υποκατάσταση (+) και μη (-) της *Ecfk<sub>B</sub>* από τις PPIάσες, θα λέγαμε ότι το σύνολο των FKBP πρωτεϊνών αποκαθιστούν την λειτουργία της *Ecfk<sub>B</sub>* ως προς τις τρεις προαναφερθείσες συνθήκες ανάπτυξης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της υποκατάστασης της *Ecfk<sub>B</sub>* από τις PPIάσες σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου διαφοροποιούνται από τα αντίστοιχα αποτελέσματα σε συνθήκες ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης, όπου φαίνεται ότι οι κυκλοφιλίνες *EcrriA* και *EcrriB*, η *Ecfk<sub>B</sub>* από τις FKBP και η *EcrriC* από τις παρβουλίνες, αναλαμβάνουν τον ρόλο της *Ecfk<sub>B</sub>*. Συμπεραίνετε άρα ότι σε κάθε συνθήκη επάγονται διαφορετικοί ωστόσο άγνωστοι μηχανισμοί στους οποίους κάθε PPIάση κατέχει έναν διαφορετικό ρόλο.

**Πίνακας Γ.2.6.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ecfk<sub>B</sub>* πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες PPIάσες.

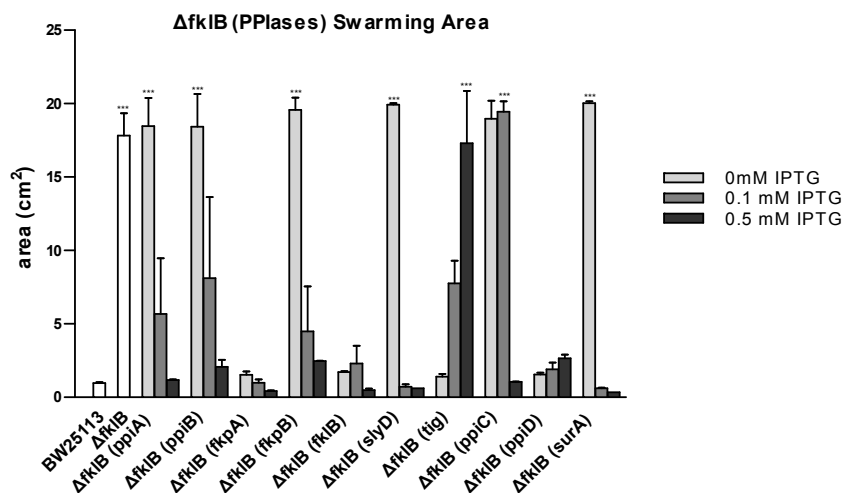
<i>Δfkr<sub>B</sub></i>	Cyps		FKBPs					Pars		
	<i>ppiA</i>	<i>ppiB</i>	<i>fkpA</i>	<i>fkpB</i>	<i>fklB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>ppiC</i>	<i>ppiD</i>	<i>surA</i>
<b>Swarming</b>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>Swimming</b>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
<b>Biofilm</b>	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-

### Γ.2.5.3 Λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkIB* από τις ΡΡΙΑσες

Η δυνατότητα λειτουργικής υποκατάστασης της *EcfkIB* από τα μέλη της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών διερευνήθηκε μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για όλα τα μέλη της υπερικογένειας (*EcrpIA*, *EcrpIB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcrpIC*, *EcrpID* και *EcsurA*) στο στέλεχος *ΔfkIB*. Για τον σκοπό αυτό, τα στελέχη *ΔfkIB(ρpIA)*, *ΔfkIB(ρpIB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρpIC)*, *ΔfkIB(ρpID)* και *ΔfkIB(surA)* αξιοποιήθηκαν για την εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των *ΔfkIB(ρpIA)*, *ΔfkIB(ρpIB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρpIC)*, *ΔfkIB(ρpID)* και *ΔfkIB(surA)* παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).

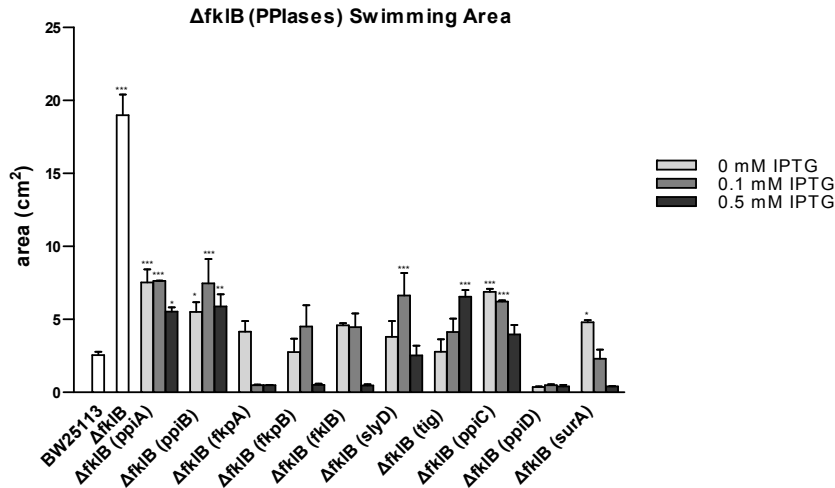


**Εικόνα Γ.2.60.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkIB* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίσταται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔfkIB*, *ΔfkIB(ρpIA)*, *ΔfkIB(ρpIB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρpIC)*, *ΔfkIB(ρpID)* και *ΔfkIB(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ΡΡΙΑσες, εκτός από την πρωτεΐνη *Ectig* αποκαθιστούν την λειτουργία της *EcfkIB* πρωτεΐνης, σε συνθήκες ομαδικής κίνησης, καθώς η έκφραση των γονιδίων *EcrpIA*, *EcrpIB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcslyD*, *EcrpIC*, *EcrpID* και *EcsurA* επαναφέρει τον φαινότυπο αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.60.). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkIB* στο στέλεχος *ΔfkIB(fkIB)* επαναφέρει τον φαινότυπο στα φυσιολογικά επίπεδα.

#### Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η ανάπτυξη των στελεχών *ΔfkIB(ρpIA)*, *ΔfkIB(ρpIB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρpIC)*, *ΔfkIB(ρpID)* και *ΔfkIB(surA)* παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία.

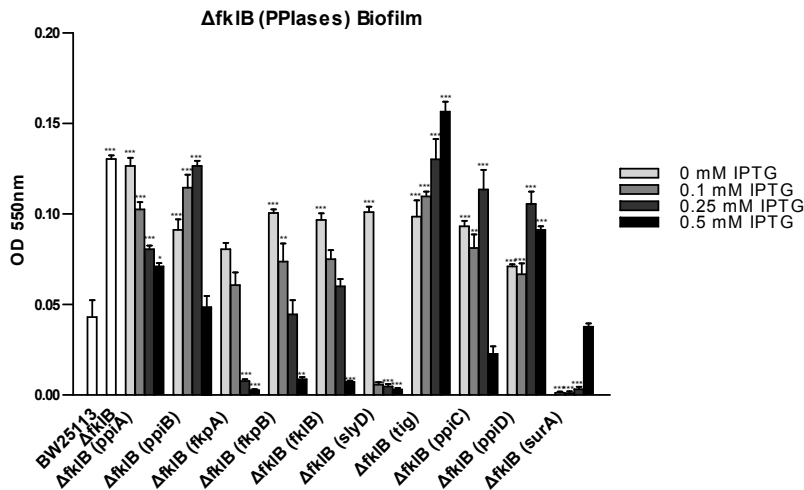


**Εικόνα Γ.2.61.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkIB* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Αναπαρίσταται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔfkIB*, *ΔfkIB(ρriA)*, *ΔfkIB(ρriB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρriC)*, *ΔfkIB(ρriD)* και *ΔfkIB(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Ανάλογα με την προηγούμενη συνθήκη, έτσι και σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης, οι ΡΡΙΑσες σε γενικές γραμμές, αποκαθιστούν την λειτουργία της *EcfkIB* πρωτεΐνης. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων των κυκλοφιλινών αλλά και του γονιδίου *Ectig*, αν και προκαλεί μια μείωση της ικανότητας της κολυμβητικής κίνησης, ωστόσο η διαφορά της ικανότητας της κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *ΔfkIB(ρriA)* και *ΔfkIB(ρriB)* από του αγρίου τύπου, παραμένει στατιστικά σημαντική. Σημειώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *EcfkIB* στο στέλεχος *ΔfkIB(fkIB)* επαναφέρει τον φαινότυπο στα φυσιολογικά επίπεδα. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι η έκφραση του γονιδίου *EcrriD* σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG που χρησιμοποιήθηκαν (0 έως 0.5 mM), προκαλεί καταστολή της κολυμβητικής κίνησης.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkIB(ρriA)*, *ΔfkIB(ρriB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ρriC)*, *ΔfkIB(ρriD)* και *ΔfkIB(surA)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.



**Εικόνα Γ.2.62.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkIB* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Αναπαρίσταται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔfkIB*, *ΔfkIB(ppiA)*, *ΔfkIB(ppiB)*, *ΔfkIB(fkpA)*, *ΔfkIB(fkpB)*, *ΔfkIB(fkIB)*, *ΔfkIB(slyD)*, *ΔfkIB(tig)*, *ΔfkIB(ppiC)*, *ΔfkIB(ppiD)* και *ΔfkIB(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λειτουργία της *EcfkIB* πρωτεΐνης υποκαθίσταται έπειτα από την υπερέκφραση των γονιδίων *EcrppiB*, *EcrppiC* και *EcsurA*. Η έκφραση των γονιδίων *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB* και *EcslyD* προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου του σχηματισμού βιοϋμενίου. Οι *EcrppiA*, *Ectig* και *EcrppiD* δεν επαναφέρουν τον φαινότυπο αγρίου τύπου. Τέλος, η έκφραση του γονιδίου *EcfkIB* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου σε φυσιολογικά επίπεδα (Εικόνα Γ.2.62).

Τα αποτελέσματα της λειτουργικής υποκατάστασης (+) και μη (-) της *EcfkIB* από τις ΡΡΙΑσες συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα. Συμπερασματικά μπορεί να υποθεί ότι σε συνθήκες ομαδικής κίνησης την λειτουργία της *EcfkIB* υποκαθιστούν το σύνολο των ΡΡΙΑσών με μοναδική εξαίρεση την πρωτεΐνη *Ectig*. Όσον αφορά στις συνθήκες κολυμβητικής κίνησης, φαίνεται ότι η λειτουργία της *EcfkIB* υποκαθίσταται από τις *EcfkpA* και την *EcfkpB* και από την παρβουλίνη *EcsurA*.

**Πίνακας Γ.2.7.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcfkIB* πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες ΡΡΙΑσες.

<i>ΔfkIB</i>	Cyps		FKBPs					Pars		
	<i>ppiA</i>	<i>ppiB</i>	<i>fkpA</i>	<i>fkpB</i>	<i>fkIB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>ppiC</i>	<i>ppiD</i>	<i>surA</i>
<b>Swarming</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Swimming</b>	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Biofilm</b>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+

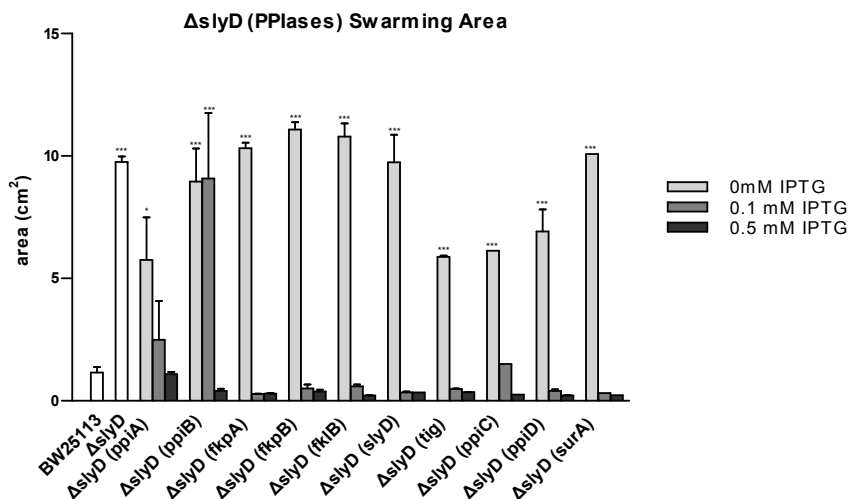
#### Γ.2.5.4 Λειτουργική υποκατάσταση της *EcslyD* από τις ΡΡΙΑσες

Η δυνατότητα λειτουργικής υποκατάστασης της *EcslyD* από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών διερευνήθηκε μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας (*EcrppiA*, *EcrppiB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcrppiC*, *EcrppiD* και *EcsurA*) στο στέλεχος *ΔslyD*. Για το σκοπό αυτό τα στελέχη *ΔslyD(ppiA)*, *ΔslyD(ppiB)*, *ΔslyD(fkpA)*, *ΔslyD(fkpB)*, *ΔslyD(fkIB)*, *ΔslyD(slyD)*, *ΔslyD(tig)*, *ΔslyD(ppiC)*, *ΔslyD(ppiD)* και *ΔslyD(surA)* αξιοποιήθηκαν για την

εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των  $\Delta slyD(ppiA)$ ,  $\Delta slyD(ppiB)$ ,  $\Delta slyD(fkpA)$ ,  $\Delta slyD(fkpB)$ ,  $\Delta slyD(fklB)$ ,  $\Delta slyD(slyD)$ ,  $\Delta slyD(tig)$ ,  $\Delta slyD(ppiC)$ ,  $\Delta slyD(ppiD)$  και  $\Delta slyD(surA)$  παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).



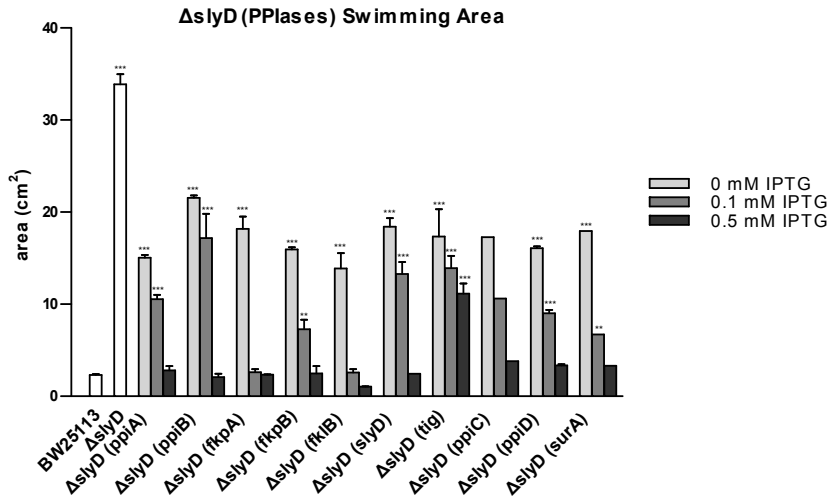
**Εικόνα Γ.2.63.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcslyD* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίστανται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113,  $\Delta slyD$ ,  $\Delta slyD(ppiA)$ ,  $\Delta slyD(ppiB)$ ,  $\Delta slyD(fkpA)$ ,  $\Delta slyD(fkpB)$ ,  $\Delta slyD(fklB)$ ,  $\Delta slyD(slyD)$ ,  $\Delta slyD(tig)$ ,  $\Delta slyD(ppiC)$ ,  $\Delta slyD(ppiD)$  και  $\Delta slyD(surA)$  σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των PPIασών αποκαθιστούν την λειτουργία της πρωτεΐνης *EcslyD* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης. Η έκφραση των *EcrrpIA*, *EcrrpIB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfklB*, *Ectig*, *EcrrpIC*, *EcrrpID* και *EcsurA* συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *EcslyD* στο στέλεχος  $\Delta slyD$  σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG (0.1 έως 0.5 mM) και το γονίδιο *EcrrpIB* (0.5 mM), προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.63.).

#### Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η κολυμβητική κίνηση των  $\Delta slyD(ppiA)$ ,  $\Delta slyD(ppiB)$ ,  $\Delta slyD(fkpA)$ ,  $\Delta slyD(fkpB)$ ,  $\Delta slyD(fklB)$ ,  $\Delta slyD(slyD)$ ,  $\Delta slyD(tig)$ ,  $\Delta slyD(ppiC)$ ,  $\Delta slyD(ppiD)$  και  $\Delta slyD(surA)$  παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).



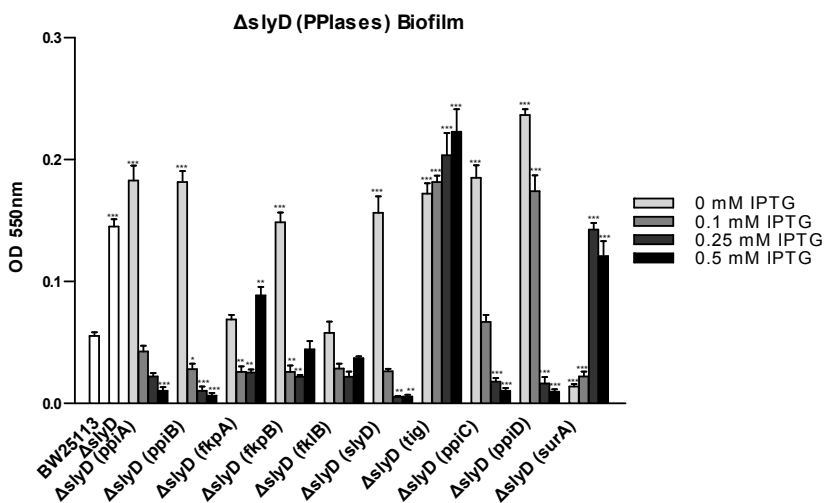


**Εικόνα Γ.2.64.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcslyD* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών, υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης. Αναπαρίσταται η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113, *ΔslyD*, *ΔslyD(ppiA)*, *ΔslyD(ppiB)*, *ΔslyD(fkpA)*, *ΔslyD(fkpB)*, *ΔslyD(fklB)*, *ΔslyD(slyD)*, *ΔslyD(tig)*, *ΔslyD(ppiC)*, *ΔslyD(ppiD)* και *ΔslyD(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Παρατηρήθηκε ότι η ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔslyD* μειώνεται μετά από την έκφραση όλων των γονιδίων της υπεροικογένειας των PPIασών, εκτός από το γονίδιο *Ectig*. Επομένως, η έκφραση των γονιδίων *EcppiA*, *EcppiB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcflB*, *EcppiC*, *EcppiD* και *EcsurA*, συμπεριλαμβανομένου και του γονιδίου *EcslyD* στο στέλεχος *ΔslyD* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔslyD(ppiA)*, *ΔslyD(ppiB)*, *ΔslyD(fkpA)*, *ΔslyD(fkpB)*, *ΔslyD(fklB)*, *ΔslyD(slyD)*, *ΔslyD(tig)*, *ΔslyD(ppiC)*, *ΔslyD(ppiD)*, και *ΔslyD(surA)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.



**Εικόνα Γ.2.65.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcslyD* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Αναπαρίσταται η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, *ΔslyD*, *ΔslyD(ppiA)*, *ΔslyD(ppiB)*, *ΔslyD(fkpA)*, *ΔslyD(fkpB)*, *ΔslyD(fklB)*, *ΔslyD(slyD)*, *ΔslyD(tig)*, *ΔslyD(ppiC)*, *ΔslyD(ppiD)* και *ΔslyD(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Συμπεραίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας των κυκλοφιλινών και των FKBP, εκτός από την πρωτεΐνη *Ectig*, αποκαθιστούν την λειτουργία της *EcslyD* υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Επίσης παρατηρείται ότι η έκφραση των παρβουλινών, εκτός από το γονίδιο της *EcsurA* στο στέλεχος *ΔslyD*, προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Σημειώνεται, ωστόσο, ότι η έκφραση των γονιδίων *EcppiA*, *EcppiB*, *EcslyD*, *EcppiC* και *EcppiD* προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου του σχηματισμού βιοϋμενίου.

Συγκεντρώνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα της λειτουργικής υποκατάστασης (+) και μη (-) της *EcslyD* από τις ΡΡΙΑσες στον πίνακα Γ.2.8 μπορεί να ειπωθεί ότι όλα τα μέλη της οικογένειας των ΡΡΙΑσών αποκαθιστούν την λειτουργία της πρωτεΐνης *EcslyD* σε συνθήκες ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, εκτός από την πρωτεΐνη *Ectig* η οποία υιοθετεί τον ρόλο της *EcslyD* μόνο σε συνθήκες ομαδικής κίνησης και την *EcsurA* η οποία δεν αποκαθιστά την λειτουργία της *EcslyD* σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου.

**Πίνακας Γ.2.8.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *EcslyD* πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες ΡΡΙΑσες.

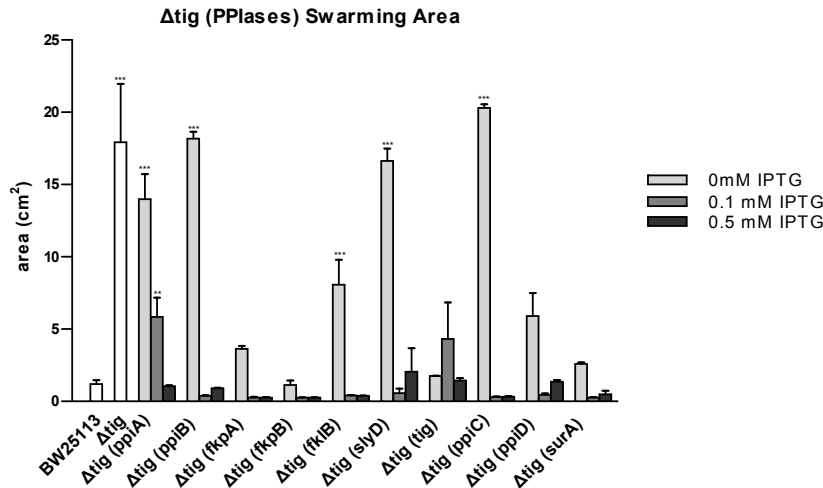
<i>ΔslyD</i>	Cyps		FKBPs					Pars		
	<i>ppiA</i>	<i>ppiB</i>	<i>fkpA</i>	<i>fkpB</i>	<i>fklB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>ppiC</i>	<i>ppiD</i>	<i>surA</i>
<b>Swarming</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Swimming</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<b>Biofilm</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

### Γ.2.5.5 Λειτουργική υποκατάσταση της *Ectig* από τις ΡΡΙΑσες

Η δυνατότητα λειτουργικής υποκατάστασης της *Ectig* από τα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών διερευνήθηκε μέσω της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας (*EcppiA*, *EcppiB*, *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcflB*, *EcslyD*, *Ectig*, *EcppiC*, *EcppiD* και *EcsurA*) στο στέλεχος *Δtig*. Για το σκόπο αυτό τα στελέχη *Δtig(ppiA)*, *Δtig(ppiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fklB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ppiC)*, *Δtig(ppiD)* και *Δtig(surA)* που προέκυψαν αξιοποιήθηκαν για την εξέταση της δυνατότητας επαναφοράς του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

#### Ικανότητα ομαδικής κίνησης

Η ομαδική κίνηση των *Δtig(ppiA)*, *Δtig(ppiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fklB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ppiC)*, *Δtig(ppiD)* και *Δtig(surA)* παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).

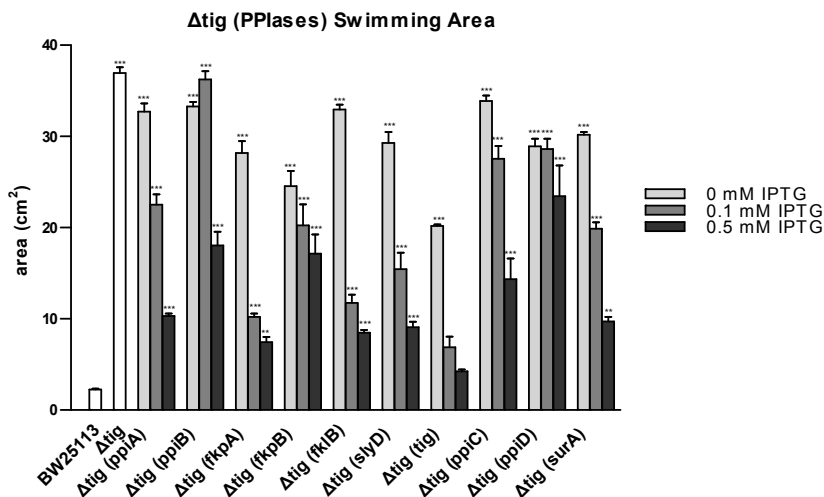


**Εικόνα Γ.2.66.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ectig* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPlασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίσται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113, *Δtig*, *Δtig(ρpiA)*, *Δtig(ρpiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fklB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ρpiC)*, *Δtig(ρpiD)* και *Δtig(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Παρατηρήθηκε ότι το σύνολο των PPlασών, σε όλες τις συγκεντρώσεις του IPTG, αποκαθιστούν την λειτουργία της πρωτεΐνης *Ectig* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης επαναφέροντας τον φαινότυπο αγρίου τύπου.

#### Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης

Η κολυμβητική κίνηση των *Δtig(ρpiA)*, *Δtig(ρpiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fklB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ρpiC)*, *Δtig(ρpiD)* και *Δtig(surA)* παρατηρήθηκε σε *swarming* τρυβλία σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0 έως 0.5 mM).

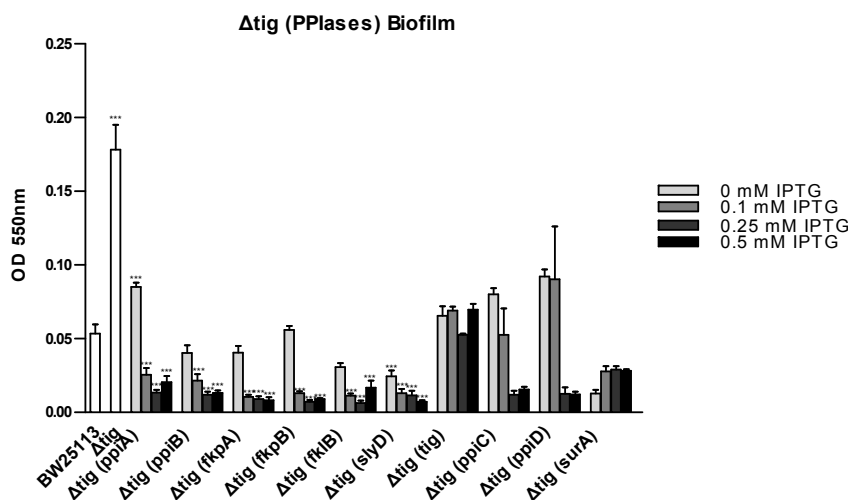


**Εικόνα Γ.2.67.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ectig* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των PPlασών, υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης. Αναπαρίσται η ικανότητα ομαδικής κίνησης των στελεχών BW25113, *Δtig*, *Δtig(ρpiA)*, *Δtig(ρpiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fklB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ρpiC)*, *Δtig(ρpiD)* και *Δtig(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των ΡΡΙΑσών στο στέλεχος *Δtig* δεν προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Ωστόσο, η έκφραση των γονιδίων *EcrrpA*, *EcrrpB*, *EcfkpA*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *EcrrpC* και *EcsurA* φαίνεται ότι προκαλεί μια σχετική μείωση της ικανότητας κολυμβητικής κίνησης συγκριτικά με την ιδιαίτερα αυξημένη ικανότητα κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *Δtig*.

#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *Δtig(ppiA)*, *Δtig(ppiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fkIB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ppiC)*, *Δtig(ppiD)* και *Δtig(surA)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστευρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.



**Εικόνα Γ.2.68.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ectig* πρωτεΐνης από τα μέλη της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών υπό συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου. Αναπαρίσταται η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113, *Δtig*, *Δtig(ppiA)*, *Δtig(ppiB)*, *Δtig(fkpA)*, *Δtig(fkpB)*, *Δtig(fkIB)*, *Δtig(slyD)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(ppiC)*, *Δtig(ppiD)* και *Δtig(surA)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύνολο των ΡΡΙΑσών αποκαθιστούν την λειτουργία της *Ectig* πρωτεΐνης, υπό συνθήκες βιοϋμενίου. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων που ανήκουν στην οικογένεια των κυκλοφιλινών και των FKBP's στο στέλεχος *Δtig* προκαλεί καταστολή του σχηματισμού βιοϋμενίου, σε επίπεδα χαμηλότερα του στελέχους αγρίου τύπου. Ωστόσο, η έκφραση των γονιδίων των παρβουλινών και η έκφραση του γονιδίου *Ectig* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου (Εικόνα Γ.2.68).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα της λειτουργικής υποκατάστασης της λειτουργικής υποκατάστασης (+) και μη (-) της *Ectig* από τις ΡΡΙΑσες θα λέγαμε ότι σε συνθήκες ομαδικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου την λειτουργία της *Ectig* αποκαθιστούν όλα τα μέλη της υπερικογένειας. Αντίθετα, σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης παρατηρήθηκε ότι κανένα μέλος της υπερικογένειας των ΡΡΙΑσών δεν μπορεί να επιτελέσει τον ρόλο της *Ectig*.

**Πίνακας Γ.2.9.** Η λειτουργική υποκατάσταση της *Ectig* πρωτεΐνης από τις υπόλοιπες ΡΡΙΑσες.

<i>Δtig</i>	Cyps		FKBPs					Pars		
	<i>ppiA</i>	<i>ppiB</i>	<i>fkpA</i>	<i>fkpB</i>	<i>fkfB</i>	<i>slyD</i>	<i>tig</i>	<i>ppiC</i>	<i>ppiD</i>	<i>surA</i>
<b>Swarming</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Swimming</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>Biofilm</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### Γ.2.6 Η επίδραση των πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB* στην κινητικότητα και στον σχηματισμό βιοϋμενίου

Τα διάφορα μέλη της υπεροικογένειας των ΡΡΙΑσών του *E.coli* φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με μια πλειάδα πρωτεϊνών (πρωτεΐνες στόχοι), με αποτέλεσμα την αναδίπλωση και ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών στόχων, ώστε αυτές να καταστούν λειτουργικές και να επιτελέσουν το βιολογικό τους ρόλο. Έχει δειχθεί ότι ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος (*ess1<sup>ts</sup>*) της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος οφείλεται στην απαλοιφή του γονιδίου *Scssc1*, καταστέλλεται, δηλαδή η ανάπτυξη της ζύμης επιτρέπεται σε υψηλή θερμοκρασία (37°C), λόγω της υπερέκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, συμπεριλαμβάνεται η πρωτεΐνη *Scsar30* και η παρβουλίνη *Scssc1*. Η *Scsar30* φαίνεται ότι αλληλεπιδρά, τόσο με την παρβουλίνη *Scssc1*, όσο και με την κυκλοφιλίνη A, *Scscr1* (Wu et al., 2000; Arévalo-Rodríguez et al., 2000). Με βάση τις παραπάνω μελέτες, είναι κατανοητό ότι ορισμένες πρωτεΐνες στόχοι, όταν υπερεκφράζονται, επαναφέρουν τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο στα επίπεδα του αγρίου τύπου. Ως εκ τούτου, θεωρήθηκε ότι θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανές πρωτεΐνες στόχους της *EcfkρB*, επιτρέπει την καταστολή του φαινοτύπου της ομαδικής κίνησης, της κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *ΔfkρB* αλλά και των στελεχών *ΔfkρA* και *ΔslyD* και την επαναφορά του στα επίπεδα αγρίου τύπου.

#### Γ.2.6.1 Αναζήτηση των πρωτεϊνών που πιθανά αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB*

Αρχικά αναζητήθηκαν στη βάση δεδομένων IntAct πρωτεΐνες του *E. coli*, οι οποίες πιθανά αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB* (Arifuzzaman et al., 2006). Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίστηκαν μετά από την υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkρB.H* (His-6 επίτοπο) στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων της *EcfkρB.H* με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%, έπειτα απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκλούνται από την στήλη Ni-NTA αγαρόζης, ταυτόχρονα με την *EcfkρB.H*, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους (Arifuzzaman et al., 2006). Παρόμοια μελέτη εντόπισε και άλλες πρωτεΐνες που πιθανώς αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB* (Quistgaard et al., 2012). Σημειώνεται ότι οι ομάδες πρωτεϊνών που προσδιορίστηκαν στις δυο προαναφερθείσες μελέτες είναι διακριτές, δηλαδή κανένα μέλος της μίας ομάδας δεν υπάρχει στην άλλη ομάδα. Η επιλογή των πρωτεϊνών στόχων, από τις δυο παραπάνω ομάδες πρωτεϊνών, είχε ως κριτήριο τη γνώση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης και εάν διαθέτει στην αμινοξική της ακολουθία προλίνες που διατηρούν τη *cis* μορφή τους, επομένως αποτελούν πιθανούς στόχους για την *EcfkρB* και ενδεχομένως για άλλες ΡΡΙΑσες. Ανάμεσά τους είναι και η *EcispH*, η οποία έχει γνωστή κρυσταλλική δομή, φέρει δυο προλίνες που διατηρούν την

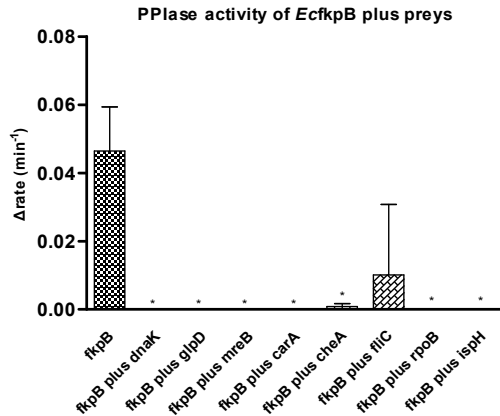
*cis* μορφή τους και το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται σε ένα κοινό οπερόνιο με το γονίδιο *EcfkpB*, η *EcmreB*, η οποία συμμετέχει στη μορφογένεση και στο σχηματισμό του κυττάρου, η *EccheA*, η οποία συμμετέχει στο σύστημα του χημειοτακτισμού και πιθανόν να συμμετέχει στον μηχανισμό της κινητικότητας του βακτηρίου και τέλος η *EcfliC*, η οποία ρυθμίζει την κίνηση του βακτηρίου μέσω των μαστιγίων. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης *EccarA*, της οποίας η ομόλογη στο *A. vinelandii* φαίνεται να σχηματίζει σταθερά συμπλέγματα με την *AnfkbA1* και την *AnfkbA2* (Dimou et al., 2012). Οι πρωτεΐνες, οι οποίες επιλέχθηκαν, θα αναφέρονται ως πρωτεΐνες στόχοι (Πίνακας Γ.2.10).

**Πίνακας Γ.2.10. Η ονομασία, ο βιολογικός ρόλος και η θέση των *cis* προλινών των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB*.**

Πρωτεΐνες στόχοι της <i>EcfkpB</i>	Ονομασία	Βιολογικός ρόλος	<i>cis</i> προλίνες
<b><i>EcdnaK</i></b> (b0014/JW0013)	Chaperone protein DnaK HSP70	Αντιγραφή DNA /Απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης	P419
<b><i>EcgIpD</i></b> (b3426/JW3389)	Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	Καταβολισμός γλυκερόλης και 3-φωσφορικής γλυκερόλης	P378
<b><i>EcmreB</i></b> (b3251/JW3220)	Rod shape-determining protein MreB	Μορφογένεση/σχηματισμός κυττάρου/ρύθμιση χρωμοσωμικού διαχωρισμού	-
<b><i>EccarA</i></b> (b0032/JW0030)	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	Βιοσύνθεση αμινοξέων/αργινίνης/πυριμιδίνης	P358
<b><i>EccheA</i></b> (b1888/JW1877)	Chemotaxis protein CheA	Χημειοτακτισμός /Δυαδικό ρυθμιστικό σύστημα	-
<b><i>EcfliC</i></b> (b1923/JW1908)	Flagellin	Κίνηση μέσω μαστιγίων	-
<b><i>EcrpoB</i></b> (b3987/JW3950)	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	Μεταγραφή/ Δράση RNA πολυμεράσης DNA-directed	P166
<b><i>EcispH</i></b> (b0029/JW0027)	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Βιοσύνθεση ισοπρενοϊδίων	P8, P32

### Γ.2.6.2 Επίδραση των πρωτεϊνών στόχων στην μετρούμενη ενεργότητα ΡΡΐασης της *EcfkpB*

Η πιθανή αλληλεπίδραση της *EcfkpB* με τις πρωτεΐνες στόχους και ειδικότερα η συμμετοχή του ενεργού κέντρου, υποδηλώνει ότι η παρουσία τους μπορεί να επηρεάσει τη μετρούμενη ενεργότητα ΡΡΐασης της *EcfkpB*. Για το σκοπό αυτό, υπερεκφράστηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την *EcfkpB*, με τη χρήση του φορέα έκφρασης pPROEX.HTa καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν για κάθε πρωτεΐνη στόχο, με τη χρήση του φορέα έκφρασης pCA24N, παρουσία 0.25 mM IPTG, σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3. Οι πρωτεΐνες στόχοι, καθώς και η *EcfkpB* φέρουν επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο τους. Η απομόνωση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Ακολούθως, προσδιορίστηκε, *in vitro*, η ενεργότητα της ΡΡΐασης ( $\Delta$ rate) της *EcfkpB* με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Phe-Pro-Leu-pNA, απουσία και παρουσία των πρωτεϊνών στόχων, ισομοριακής συγκέντρωσης με την *EcfkpB*.



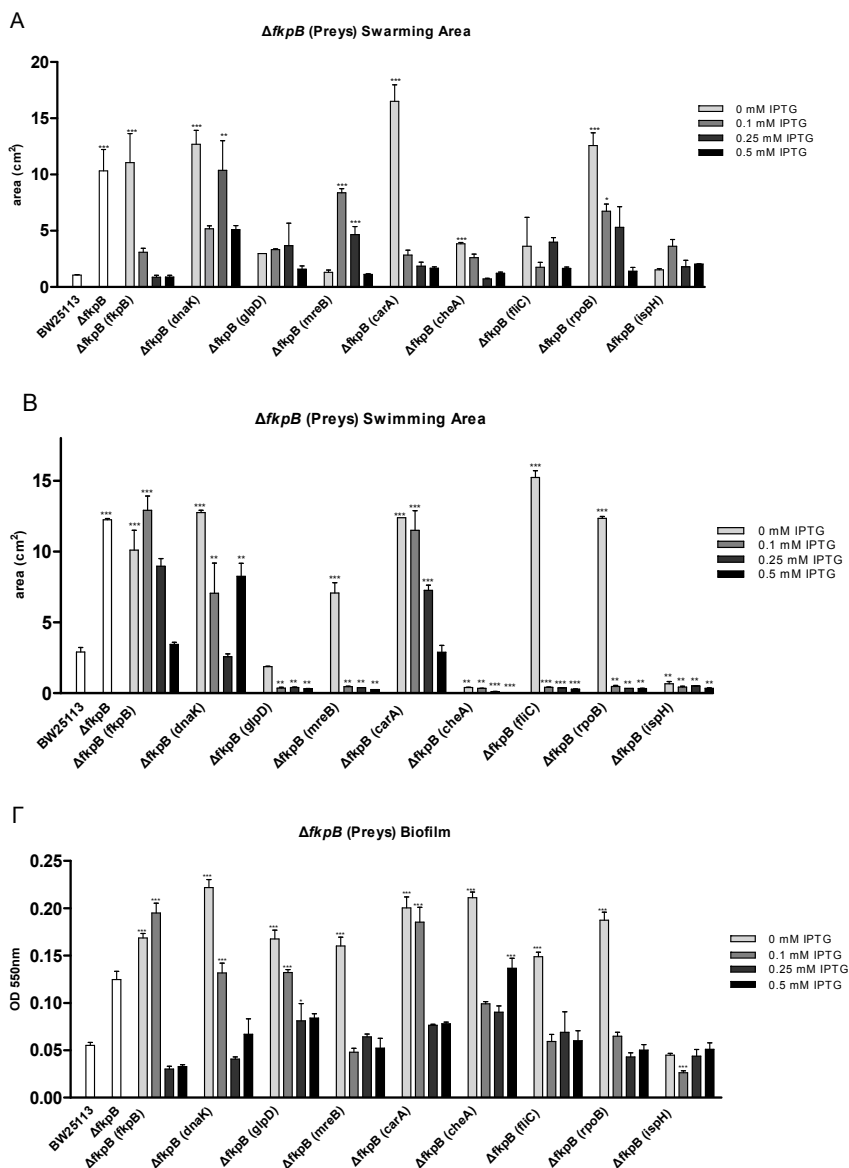
**Εικόνα Γ.2.69.** Η ενεργότητα ΡΡιάσης (Δrate) της *EcfkpB* απουσία και παρουσία των πρωτεϊνών στόχων. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων, ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) ( $P < 0.05$ ).

Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η ενεργότητα της *EcfkpB*, παρουσία ισομοριακών συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών *EcdnaK*, *EcgIpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EcrpoB*, *EcispH* και *EccheA* μειώθηκε κατά 98-99% και κατά 60% έπειτα από την προσθήκη της *EcfliC* (Εικόνα.2.69). Εφόσον παρουσία των πρωτεϊνών *EcdnaK*, *EcgIpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EccheA*, *EcrpoB*, *EcispH* και *EccheA* καταστέλλεται η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkpB*, συνεπώς είναι πιθανή η ενδεχόμενη αλληλεπίδρασή τους με την *EcfkpB*.

### Γ.2.6.3 Διερεύνηση της επαναφοράς του φαινότυπου αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔfkrB* από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων

Αρχικά διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB* στο στέλεχος *ΔfkrB*, επηρεάζει την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Για το σκοπό αυτόν αξιοποιήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες στόχους, τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί στον φορέα έκφρασης pCA24N (*EcdnaK*.H.pCA24N, *EcgIpD*.H.pCA24N, *EcmreB*.H.pCA24N, *EccarA*.H.pCA24N, *EccheA*.H.pCA24N, *EcfliC*.H.pCA24N, *EcrpoB*.H.pCA24N και *EcispH*.H.pCA24N).

Τα στέλεχη *ΔfkrB(dnaK)*, *ΔfkrB(glpD)*, *ΔfkrB(mreB)*, *ΔfkrB(carA)*, *ΔfkrB(cheA)*, *ΔfkrB(fliC)*, *ΔfkrB(rpoB)*, *ΔfkrB(ispH)*, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM) ελέγχθησαν υπό συνθήκες ομαδικής κίνησης, κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, εξετάζοντας εάν η υπερέκφρασή τους επαναφέρει το φαινότυπο του αγρίου τύπου.



**Εικόνα Γ.2.70.** Η ικανότητα ομαδικής κίνησης (Α), κολυμβητικής κίνησης (Β) και σχηματισμού βιοϋμενίου (Γ) των στελεχών BW25113, *ΔfkpB*, *ΔfkpB(fkpB)*, *ΔfkpB(dnaK)*, *ΔfkpB(glpD)*, *ΔfkpB(mreB)*, *ΔfkpB(carA)*, *ΔfkpB(cheA)*, *ΔfkpB(fliC)*, *ΔfkpB(rpoB)* και *ΔfkpB(isrH)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h. Τα δεδομένα αποτελούν το μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερισκοί υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test)  $P < 0.0001$ .

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση κάθε μιας πρωτεΐνης στόχου, επαναφέρει την ικανότητα ομαδικής κίνησης, στα φυσιολογικά επίπεδα του αγρίου τύπου. Απουσία IPTG, ο φαινότυπος των στελεχών *ΔfkpB(dnaK)*, *ΔfkpB(mreB)*, *ΔfkpB(carA)*, και *ΔfkpB(rpoB)* παραμένει υψηλός και παρόμοιος με το φαινότυπο του στελέχους *ΔfkpB* (Εικόνα Γ.2.70Α)

Από την εικόνα Γ.2.70Β, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της πλειοψηφίας των πρωτεϊνών στόχων, επαναφέρει τον φαινότυπο του αγρίου τύπου. Ωστόσο η υπερέκφραση των *EcdnaK* και *EccarA* στο στέλεχος *ΔfkpB*, επαναφέρει το φαινότυπο του αγρίου τύπου, σε υψηλές συγκεντρώσεις του IPTG 0.25 και 0.5 mM, αντίστοιχα. Απουσία IPTG, ο φαινότυπος των στελεχών *ΔfkpB(dnaK)*, *ΔfkpB(mreB)*,



*ΔfkpB(carA)*, *ΔfkpB (fliC)* και *ΔfkpB(rpoB)* παραμένει υψηλός και παρόμοιος με το φαινότυπο του στελέχους *ΔfkpB*. Η υπερέκφραση των *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflnC*, *EscrpB* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔfkpB* (σε υψηλές συγκεντρώσεις του IPTG), προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου της κολυμβητικής κίνησης.

Τέλος, όπως παρατηρήθηκε από την εικόνα Γ.2.70Γ, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, επαναφέρει τον φαινότυπο αγρίου τύπου. Απουσία IPTG, ο φαινότυπος όλων των στελεχών, με εξαίρεση τον φαινότυπο του στελέχους *ΔfkpB(ispH)*, δεν φαίνεται να επηρεάζει την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, αφού παραμένει όμοιος με αυτόν του *ΔfkpB*.

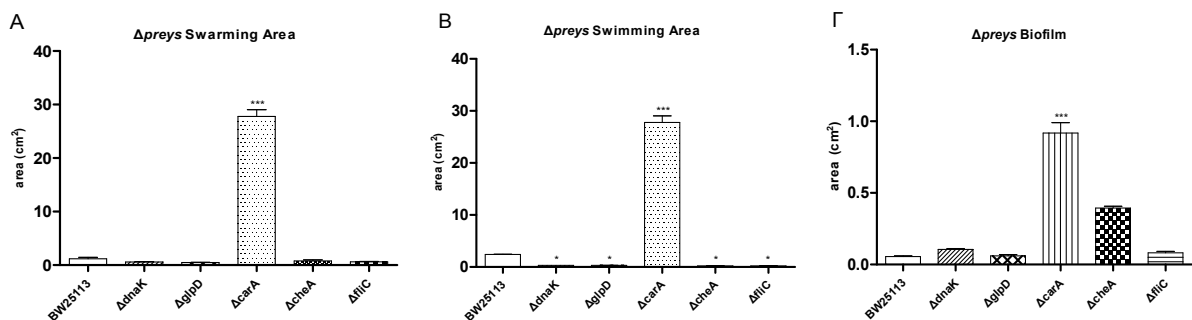
Τα αποτελέσματα της επαναφοράς (+) και μη (-) του φαινοτύπου του αγρίου τύπου, από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcflkB*, συγκεντρώνονται στον παρακάτω πίνακα. Παρατηρείται ότι η υπερέκφραση του συνόλου των πρωτεϊνών στόχων στο στέλεχος *ΔfkpB*, προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Η υπερέκφραση των *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflnC*, *EscrpB* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔfkpB*, προκαλεί καταστολή της κολυμβητικής κίνησης.

**Πίνακας Γ.2.11.** Η επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcflkB* πρωτεΐνης. Ο γκρι χρωματισμός αντιπροσωπεύει την καταστολή του φαινοτύπου.

<i>ΔfkpB</i>	<i>fkpB</i>	<i>dnaK</i>	<i>glpD</i>	<i>mreB</i>	<i>carA</i>	<i>cheA</i>	<i>fliC</i>	<i>rpoB</i>	<i>ispH</i>
<b>Swarming</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Swimming</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Biofilm</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

#### Γ.2.6.4 Διερεύνηση της κινητικότητας και του σχηματισμού βιοϋμενίου των *ΔdnaK*, *ΔglpD*, *ΔcarA*, *ΔcheA*, *ΔfliC*

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν υπάρχει άμεση συσχέτιση της απαλοιφής του κάθε γονιδίου το οποίο κωδικοποιεί για πρωτεΐνες στόχους με την ομαδική και κολυμβητική κίνηση καθώς και τον σχηματισμό βιοϋμενίου, μελετήθηκε η ομαδική κίνηση, η κολυμβητική κίνηση και ο σχηματισμός βιοϋμενίου στελεχών τα οποία φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *EcdnaK*, *EcglpD*, *EccarA*, *EccheA* και *EcflnC* (*ΔdnaK*, *ΔglpD*, *ΔcarA*, *ΔcheA*, *ΔfliC*), συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου. Σημειώνεται ότι, τα στελέχη *E. coli* που φέρουν απαλοιφή του κάθε γονιδίου *EcmreB*, *EscrpB* και *EcispH* (*ΔmreB*, *ΔrpoB*, *ΔispH*) δεν επιβιώνουν.



**Εικόνα Γ.2.71.** Η ικανότητα ομαδικής κίνησης (A), κολυμβητικής κίνησης (B) και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Γ) των στελεχών *ΔdnaK*, *ΔgIpD*, *ΔcarA*, *ΔcheA* και *ΔfliC*, έπειτα από ανάπτυξη σε 30°C για 20h, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113. Τα δεδομένα αποτελούν τον μέσο όρο τριών βιολογικών επαναλήψεων ενώ οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν την στατιστικά σημαντική διαφορά. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism v5.0 και της ANOVA (Tukey's Multiple Comparison Test) (P<0.0001).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απαλοιφή των γονιδίων *EcdnaK*, *EcglpD*, *EccheA* και *EcflcC* δεν προκαλεί μεταβολή της ομαδικής κίνησης, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου ενώ η απαλοιφή του γονιδίου *EccarA*, προκαλεί σχεδόν 30-πλάσια αύξηση της ομαδικής κίνησης (Εικόνα Γ.2.71.A).

Από την εικόνα Γ.2.71B, παρατηρήθηκε ότι η απαλοιφή των γονιδίων *EcdnaK*, *EcglpD*, *EccheA* και *EcflcC*, προκαλεί μείωση της κολυμβητικής ικανότητας, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου, η οποία είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test) του προγράμματος GraphPad prism v5.0. Αντίθετα, το στέλεχος *ΔcarA* εμφανίζει σχεδόν 30-πλάσια ικανότητα κολυμβητικής κίνησης συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου.

Από την εικόνα Γ.2.71Γ, παρατηρήθηκε καταρχήν ότι η απαλοιφή των γονιδίων *EcdnaK*, *EcglpD* και *EcflcC*, δεν προκαλεί μεταβολή της ικανότητας σχηματισμού του βιοϋμενίου, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, ωστόσο η απαλοιφή του γονιδίου *EccheA*, προκαλεί μικρή αύξηση στον σχηματισμό του βιοϋμενίου, δίχως όμως να είναι στατιστικά σημαντική σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση ANOVA (Dunnett's Multiple Comparison Test), του προγράμματος GraphPad prism v5.0. Αντίθετα, το στέλεχος *ΔcarA* εμφανίζει αυξημένη και στατιστικά σημαντική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου.

Σημειώνεται ότι μόνο το στέλεχος *ΔcarA* εμφανίζει αυξημένη ομαδική και κολυμβητική ικανότητα καθώς και ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου.

#### **Γ.2.6.5 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της *EcflcB* με τις πρωτεΐνες στόχους**

Η αναστολή της μετρούμενης ενεργότητας ΡΡ1άσης της *EcflcB* λόγω της παρουσίας των πρωτεϊνών στόχων, αποτελεί ένδειξη ότι κάποιου είδους αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ της *EcflcB* και της κάθε πρωτεΐνης στόχου. Προκειμένου να εξακριβωθεί η φύση της αλληλεπίδρασης, διερευνήθηκε εάν σχηματίζονται σταθερά συμπλέγματα, *in vivo*, μεταξύ της *EcflcB* και της κάθε πρωτεΐνης στόχου, όταν και οι δύο πρωτεΐνες συνεκφράζονται στο *E. coli*.

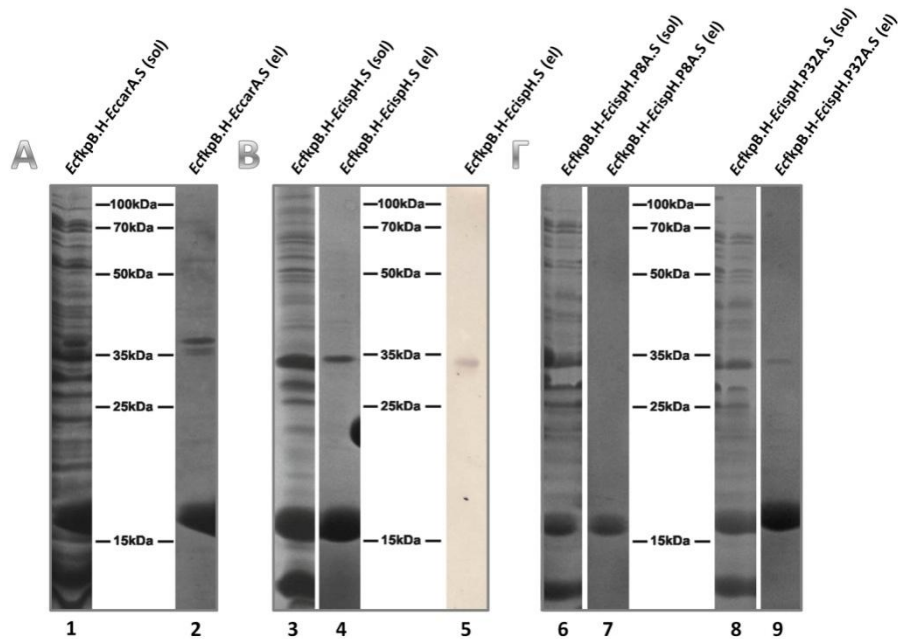
Συνεπώς, πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνέκφραση του *EcflcB* με τα *EcdnaK*, *EcglpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EcprpB* και *EcispH*, με χρήση του φορέα έκφρασης pCDFDuet-1. Οι *EcdnaK*, *EcglpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EcprpB* και *EcispH* φέρουν το S επίτοπο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (C-terminal) ενώ η *EcflcB* φέρει επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της (N-terminal). Τα σταθερά συμπλέγματα της *EcflcB* και των πρωτεϊνών στόχων που σχηματίστηκαν, *in vivo*, απομονώθηκαν με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας και αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το σύμπλεγμα της *EcflcB* με την *EccarA* φαίνεται να είναι σταθερό (Εικόνα Γ.2.72).

Ακολούθως, διερευνήθηκε εάν είναι δυνατόν να σταθεροποιηθούν τα πιθανά συμπλέγματα που σχηματίζονται, *in vivo*, μεταξύ της *EcfkpB* και των πρωτεϊνών στόχων *EcdnaK*, *EcgIpD*, *EcmreB*, *EcrpoB* και *EcispH* με την χρησιμοποίηση του διασυνδετή (cross-linker) DTBP (dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidate). Το DTBP έχει την ικανότητα να διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη του *E. coli* και οι δυο ενεργές του ομάδες σχηματίζουν ιμιδοεστερικούς δεσμούς με τις αμινομάδες πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται κοντά ή μια στην άλλη. Ο βραχίονας του διασυνδετή έχει μήκος 11 Å. Τα συμπλέγματα των πρωτεϊνών είναι σταθερά αλλά μπορούν να αποδιαταχθούν παρουσία 1 M Tris pH 7.6, στους 37°C για 30 min. Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της *EcfkpB* με τις πρωτεΐνες στόχους *EcdnaK*, *EcgIpD*, *EcmreB*, *EcrpoB* και *EcispH*, έγινε έπειτα από την, *in vivo*, διασύνδεσή τους, όπου οι καλλιέργειες του στελέχους *E. coli* BL21 DE3 υποβλήθηκαν σε διασύνδεση (crosslink) 45 λεπτών, με τη χρήση του διασυνδετή DTBP. Τα σταθερά συμπλέγματα της *EcfkpB* και των πρωτεϊνών στόχων που σχηματίστηκαν, *in vivo*, απομονώθηκαν με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το σύμπλεγμα της *EcfkpB* με την *EcispH* φαίνεται να σταθεροποιείται (Εικόνα Γ.2.72). Η αλληλεπίδραση της *EcfkpB* με τη *EcispH* επιβεβαιώθηκε με αποτύπωση κατά Western, με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του S-επίτοπου (S-tag) (Εικ. Γ.2.72). Επιβεβαιώθηκε επίσης, ότι ο S επίτοπος των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών δεν δεσμεύεται από τα Ni-NTA σφαιρίδια της αгарόζης.

Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η αλληλεπίδραση της *EcfkpB* με την *EcispH* οφείλεται στην παρουσία των δυο προλινών σε μορφή *cis* της *EcispH*, πραγματοποιήθηκε η ανεξάρτητη αντικατάσταση των προλινών που εδράζονται στο 8<sup>ο</sup> και στο 32<sup>ο</sup> αμινοξύ της πρωτεΐνης *EcispH* σε αλανίνη, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και ποια προλίνη αποτελεί σημείο πρόσδεσης της *EcfkpB*. Η ανεξάρτητη αντικατάσταση των αμινοξέων πραγματοποιήθηκε με πρόκληση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο *EcispH* με την μέθοδο SOE. Τα μεταλλαγμένα γονίδια *EcispH<sub>P8A</sub>* και *EcispH<sub>P32A</sub>* που προέκυψαν, εισήχθησαν ανεξάρτητα στον pCDFDuet-1 και φέρουν τον S επίτοπο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (C-terminal) ενώ η *EcfkpB* φέρει επίτοπο έξι ιστιδινών (His-6) στο αμινοτελικό άκρο της (N-terminal). Η έκφραση των ανασυνδυασμένων φορέων *EcfkpB.H-EcispH<sub>P8A</sub>.S.pCDFDuet-1* και *EcfkpB.H-EcispH<sub>P32A</sub>.S.pCDFDuet-1* πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3, με την προσθήκη 0.25 mM IPTG, αφού προσδιορίστηκαν οι αλληλουχίες τους, ώστε να πιστοποιηθεί η επιτυχής μετάλλαξη των γονιδίων *EcispH<sub>P8A</sub>* και *EcispH<sub>P32A</sub>*.

Τα σταθερά συμπλέγματα της *EcfkpB* με την *EcispH<sub>P8A</sub>* και της *EcfkpB*, με την *EcispH<sub>P32A</sub>* που σχηματίστηκαν, *in vivo*, απομονώθηκαν με την μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας και αναλύθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συμπλέγματα σχηματίζονται μόνο μεταξύ της *EcfkpB* και της *EcispH<sub>P32A</sub>*. Η απουσία συμπλέγματος μεταξύ της *EcfkpB* και της *EcispH<sub>P8A</sub>*, υποδηλώνει ότι η προλίνη στην θέση 8 πιθανότατα εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της *EcfkpB* και της *EcispH*.

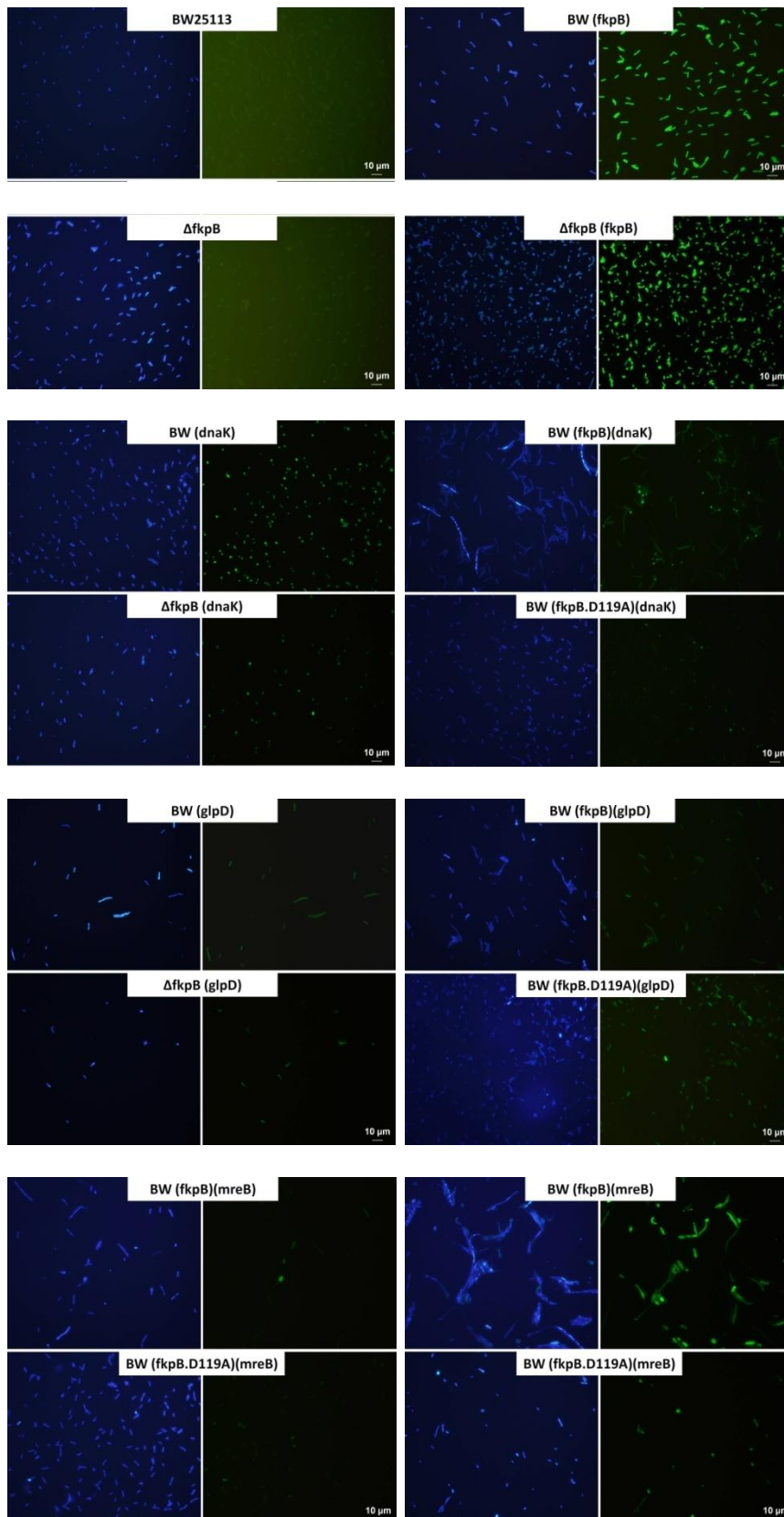


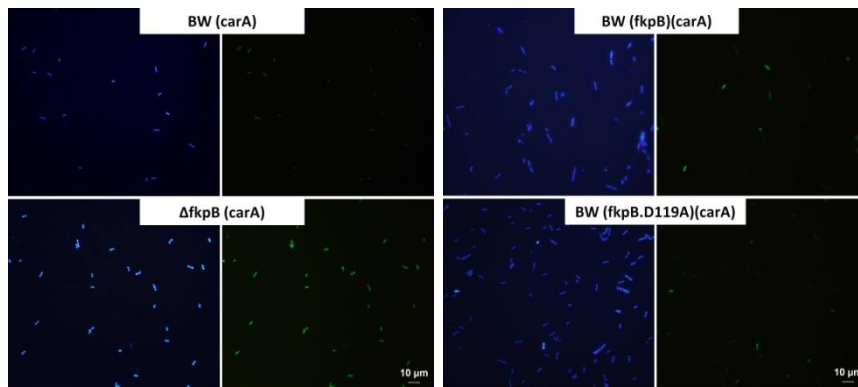
**Εικόνα Γ.2.72.** Αλληλεπίδραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *EccarA*, *EcispH*, *EcispH<sub>p8A</sub>* και *EcispH<sub>p32A</sub>* με την *Ecfkpb*. (Α) Έκφραση του *Ecfkpb.H-EccarA.S.pCDFDuet-1* σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3 (1-2). Η ανάλυση του διαλυτού κλάσματος (1) και του κλάσματος έκλυσης (2) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. (Β) Έκφραση του *Ecfkpb.H-EcispH.S.pCDFDuet-1* σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3 (3-4). Η ανάλυση του διαλυτού κλάσματος (1) και του κλάσματος έκλυσης (2) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Αποτύπωση κατά Western με τη χρήση αντισωμάτων έναντι του S επίτοπου μετά την Ni-NTA απομόνωση του *Ecfkpb.H-EcispH.S* (5). (Γ) Έκφραση των *Ecfkpb.H-EcispH<sub>p8A</sub>.S.pCDFDuet-1* και *Ecfkpb.H-EcispH<sub>p32A</sub>.S.pCDFDuet-1* σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3 (6-9). Η ανάλυση των διαλυτών κλασμάτων (6 και 7) και των κλασμάτων έκλυσης (7 και 9) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη 0.25 mM IPTG και επώαση στους 30°C.

### Γ.2.6.5 Ο ρόλος της *Ecfkpb* πρωτεΐνης στην ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών στόχων

Με σκοπό να διερευνηθεί η ενδοκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών στόχων είτε απουσία της *Ecfkpb*, είτε παρουσία της *Ecfkpb* ή της μεταλλαγμένης *Ecfkpb<sub>D119A</sub>*, ώστε να ανιχνευθεί η όποια μεταβολή στην τοποθέτησή τους παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα στελέχη που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες στόχους.

Συγκεκριμένα, τα στελέχη BW25113, *ΔfkrB*, το στέλεχος αγρίου τύπου που υπερεκφράζει το *Ecfkpb* γονίδιο (BW25113(*fkrB.H.pPROEX.HTa*)) και τέλος, το στέλεχος αγρίου τύπου που υπερεκφράζει το μεταλλαγμένο *Ecfkpb<sub>D119A</sub>* γονίδιο (BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.HTa*)) μετασηματίστηκαν εκ νέου με τους ανασυνδυασμένους φορείς έκφρασης που φέρουν επίτοπο της GFP φθορίζουσας πρωτεΐνης *EcdnaK.H.GFP.pCA24N*, *EcglpD.H.GFP.pCA24N*, *EcmreB.H.GFP.pCA24N*, *EccarA.H.GFP.pCA24N*. Η υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων φορέων έκφρασης, έγινε παρουσία IPTG συγκέντρωσης 0.1 mM. Η αύξηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο LB, σε θερμοκρασία 30°C και η μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών διεξήχθη κατά την εκθετική φάση αύξησης (Εικόνα Γ.2.73).





**Εικόνα Γ.2.73.** Κυτταρικός φαινότυπος των στελεχών BW25113, BW25113(*fkpB*.GFP), *ΔfkpB*, *ΔfkpB*(*fkpB*.GFP), BW25113(*dnaK*.GFP), *ΔfkpB*(*dnaK*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*dnaK*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*dnaK*.GFP), BW25113(*glpD*.GFP), *ΔfkpB*(*glpD*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*glpD*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*glpD*.GFP), BW25113(*mreB*.GFP), *ΔfkpB*(*mreB*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*mreB*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*mreB*.GFP), BW25113(*carA*.GFP), *ΔfkpB*(*carA*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*carA*.GFP) και BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*carA*.GFP) κατά την εκθετική φάση αύξησης στους 30°C, με χρώση DAPI και με φθορισμό της GFP πρωτεΐνης, σε συγκέντρωση 0.1 mM IPTG.

Στην εικόνα Γ.2.73 απεικονίζεται η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113, BW25113(*fkpB*.GFP), *ΔfkpB*, *ΔfkpB*(*fkpB*.GFP), BW25113(*dnaK*.GFP), *ΔfkpB*(*dnaK*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*dnaK*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*dnaK*.GFP), BW25113(*glpD*.GFP), *ΔfkpB*(*glpD*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*glpD*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*glpD*.GFP), BW25113(*mreB*.GFP), *ΔfkpB*(*mreB*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*mreB*.GFP), BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*mreB*.GFP), BW25113(*carA*.GFP), *ΔfkpB*(*carA*.GFP), BW25113(*fkpB*)(*carA*.GFP) και BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*carA*.GFP), κατά την εκθετική φάση αύξησης στους 30°C. Τα στελέχη παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού της GFP πρωτεΐνης και έπειτα από χρώση του DNA με DAPI.

Η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*fkpB*.GFP), *ΔfkpB* και *ΔfkpB*(*fkpB*.GFP) φαίνεται να είναι φυσιολογική, καθώς δεν διαφοροποιείται από εκείνη του στελέχους αγρίου τύπου. Η *EcfkpB*, η οποία φέρει την GFP φθορίζουσα πρωτεΐνη, ενδοκυτταρικά τοποθετείται κατά μήκος των κυττάρων των στελεχών BW25113(*fkpB*.GFP) και *ΔfkpB*(*fkpB*.GFP).

Η κυτταρική μορφολογία των στελεχών BW25113(*dnaK*.GFP) και *ΔfkpB*(*dnaK*.GFP), εμφανίζεται φυσιολογική και όμοια με το φαινότυπο του στελέχους αγρίου τύπου. Η *EcdnaK* ενδοκυτταρικά εντοπίζεται κυρίως στους πόλους των διαιρούμενων κυττάρων. Τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkpB*)(*dnaK*.GFP) είναι επιμηκυμένα, η κατανομή του DNA στα περισσότερα από αυτά είναι άνιση και η *EcdnaK* εμφανίζεται συσσωρευμένη στον ένα πόλο των κυττάρων. Ωστόσο, τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*dnaK*.GFP) εμφανίζονται να είναι φυσιολογικού μήκους με φυσιολογική κατανομή του γενετικού υλικού. Η *EcdnaK* σε αυτά εντοπίζεται στους πόλους των διαιρούμενων κυττάρων.

Τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*glpD*.GFP) είναι ελαφρώς επιμηκυμένα, ωστόσο το DNA φαίνεται να είναι διάχυτο. Αντίθετα, τα κύτταρα του στελέχους *ΔfkpB*(*glpD*.GFP) είναι μικρότερα από του φυσιολογικού μήκους, ενώ σε αυτά η *EcglpD* εντοπίζεται συχνότερα στον ένα πόλο των διαιρούμενων κυττάρων. Τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkpB*)(*glpD*.GFP) είναι εμφανώς επιμηκυμένα αντίθετα με τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkpB*<sub>D119A</sub>)(*glpD*.GFP). Και στις δύο περιπτώσεις η *EcglpD* βρίσκεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα.

Η υπερέκφραση του γονιδίου *EcmreB* στο στέλεχος BW25113(*mreB.GFP*), έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική διαφοροποίηση, καθώς τα κύτταρα έχουν χάσει την φυσιολογική ραβδοειδή μορφολογία και εμφανίζονται ως σφαιροειδή. Ωστόσο, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcmreB* στο στέλεχος *ΔfkrB(mreB.GFP)*, έχει ως συνέπεια την κυτταρική επιμήκυνση των κυττάρων, στα οποία η *EcmreB* εμφανίζεται συσσωρευμένη σε ένα σημείο των κυττάρων. Τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkrB*)(*mreB.GFP*), εμφανίζονται επιμηκυμένα, με ως επί το πλείστον ανώμαλη κατανομή του DNA, ενώ σε αυτά η *EcmreB* εντοπίζεται διάστικτη στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*)(*mreB.GFP*), εμφανίζονται ετερογενή ως προς την μορφολογία τους. Στην εικόνα Γ.2.73, διακρίνονται επιμηκυμένα και σφαιροειδή κύτταρα, ωστόσο η *EcmreB* εντοπίζεται μόνο στα σφαιροειδή.

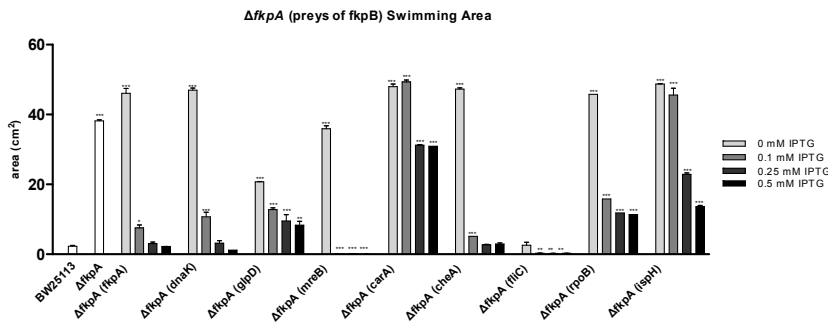
Τα στελέχη BW25113(*carA.GFP*) και *ΔfkrB(carA.GFP)*, εμφανίζουν φυσιολογικό κυτταρικό φαινότυπο καθώς και ομαλή κατανομή του γενετικού υλικού και της πρωτεΐνης *EccarA*. Τα κύτταρα του στελέχους BW25113(*fkrB*)(*carA.GFP*) αλλά και του BW25113(*fkrB<sub>D119A</sub>*)(*carA.GFP*), φαίνεται να είναι ελαφρώς επιμηκυμένα, ωστόσο η *EccarA* εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων.

#### **Γ.2.6.6 Διερεύνηση της επαναφοράς του φαινοτύπου αγρίου τύπου στα στελέχη *ΔfkrA* και *ΔslyD* από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkrB***

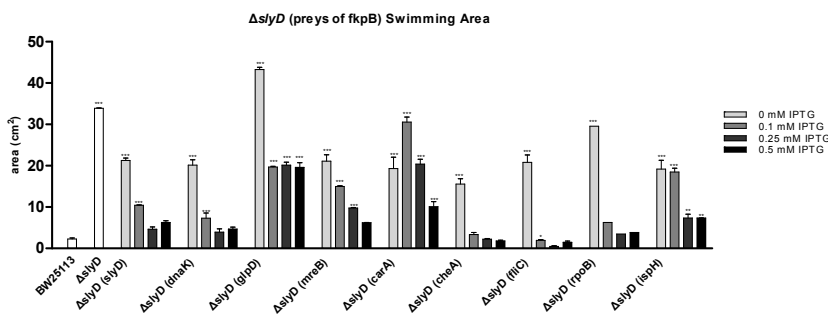
Με σκοπό να διερευνηθεί, εάν τα μέλη των FKBP's έχουν κοινά βιολογικά υποστρώματα, εξετάστηκε, εάν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkrB* σε στελέχη του *E. coli*, στα οποία έχει απενεργοποιηθεί το γονίδιο *EcfkrA* ή το γονίδιο *EcslyD* (δηλαδή τα *ΔfkrA* και *ΔslyD*) που κωδικοποιούν δύο διαφορετικά μέλη της οικογένειας, επαναφέρει τον φαινότυπο αγρίου τύπου σε συνθήκες κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου. Για τον σκοπό αυτόν, τα στελέχη *ΔfkrA* και *ΔslyD* μετασχηματίστηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης *EcdnaK.H.pCA24N*, *EcgIpD.H.pCA24N*, *EcmreB.H.pCA24N*, *EccarA.H.pCA24N*, *EccheA.H.pCA24N*, *EcfliC.H.pCA24N*, *EcrpOB.H.pCA24N* και *EcispH.H.pCA24N*. Τα στελέχη *ΔfkrA(dnaK)*, *ΔfkrA(glpD)*, *ΔfkrA(mreB)*, *ΔfkrA(carA)*, *ΔfkrA(cheA)*, *ΔfkrA(fliC)*, *ΔfkrA(rpoB)*, *ΔfkrA(ispH)*, και *ΔslyD(dnaK)*, *ΔslyD(glpD)*, *ΔslyD(mreB)*, *ΔslyD(carA)*, *ΔslyD(cheA)*, *ΔslyD(fliC)*, *ΔslyD(rpoB)*, *ΔslyD(ispH)*, που προέκυψαν, ελέγχθηκαν, υπό συνθήκες κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), εξετάζοντας, εάν η υπερέκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων, επιτρέπει την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου.

##### *Ικανότητα κολυμβητικής κίνησης*

Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών *ΔfkrA(dnaK)*, *ΔfkrA(glpD)*, *ΔfkrA(mreB)*, *ΔfkrA(carA)*, *ΔfkrA(cheA)*, *ΔfkrA(fliC)*, *ΔfkrA(rpoB)*, *ΔfkrA(ispH)*, *ΔslyD(dnaK)*, *ΔslyD(glpD)*, *ΔslyD(mreB)*, *ΔslyD(carA)*, *ΔslyD(cheA)*, *ΔslyD(fliC)*, *ΔslyD(rpoB)* και *ΔslyD(ispH)* παρατηρήθηκε σε *swimming* τρυβλία και καταγράφηκε σε τετραγωνικά εκατοστά (cm<sup>2</sup>) μέσω του προγράμματος ImageJ 1.46r (Εικόνα Γ.2.74).



**Εικόνα Γ.2.74.** Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των *ΔfkrA(dnaK)*, *ΔfkrA(glpD)*, *ΔfkrA(mreB)*, *ΔfkrA(carA)*, *ΔfkrA(cheA)*, *ΔfkrA(fliC)*, *ΔfkrA(rpoB)*, *ΔfkrA(ispH)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h.



**Εικόνα Γ.2.75.** Η ικανότητα κολυμβητικής κίνησης των στελεχών BW25113 και *ΔslyD* καθώς και των *ΔslyD(dnaK)*, *ΔslyD(glpD)*, *ΔslyD(mreB)*, *ΔslyD(carA)*, *ΔslyD(cheA)*, *ΔslyD(fliC)*, *ΔslyD(rpoB)*, *ΔslyD(ispH)* σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG, έπειτα από επώαση στους 30° για 20h

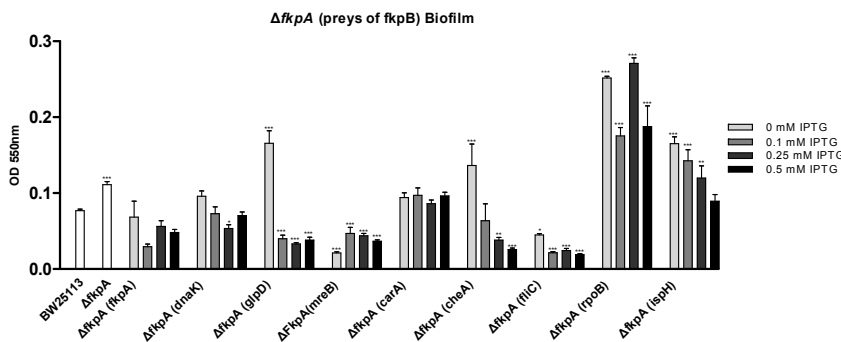
Από την εικόνα Γ.2.74 συμπεραίνεται ότι ο φαινότυπος αγρίου τύπου, στο στέλεχος *ΔfkrA*, επαναφέρεται μόνο μετά από την έκφραση των γονιδίων *EcdnaK* και *EccheA*. Αντίθετα, η έκφραση των *EcglpD*, *EccarA*, *EcrpoB* και *EcispH*, αν και προκαλεί μείωση της κολυμβητικής ικανότητας του στελέχους *ΔfkrA*, ωστόσο δεν είναι αρκετή, ώστε να επανέλθουν τα φυσιολογικά επίπεδα του αγρίου τύπου. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η έκφραση των γονιδίων *EcmreB* και *EcfliC*, προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου της κολυμβητικής κίνησης.

Από την εικόνα Γ.2.75, συμπεραίνεται ότι ο φαινότυπος αγρίου τύπου επαναφέρεται μετά από την έκφραση των γονιδίων *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcfliC* και *EcrpoB*. Αντίθετα, η έκφραση των *EcglpD*, *EccarA* και *EcispH*, αν και οδηγεί σε μείωση της κολυμβητικής ικανότητας του στελέχους *ΔslyD*, ωστόσο η μείωση αυτή δεν είναι αρκετή ώστε να επανέλθουν τα φυσιολογικά επίπεδα του αγρίου τύπου.

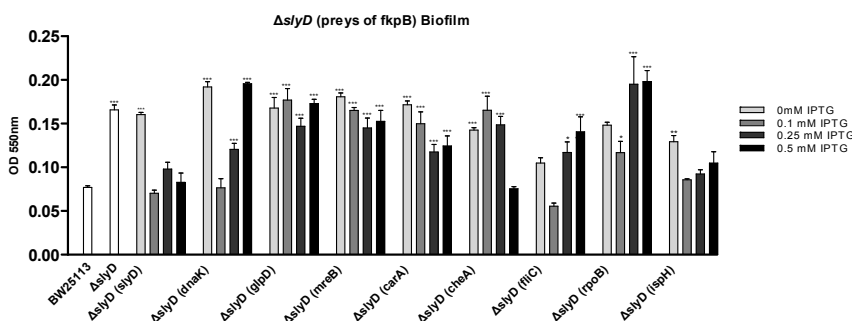
#### Ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkrA(dnaK)*, *ΔfkrA(glpD)*, *ΔfkrA(mreB)*, *ΔfkrA(carA)*, *ΔfkrA(cheA)*, *ΔfkrA(fliC)*, *ΔfkrA(rpoB)*, *ΔfkrA(ispH)*, *ΔslyD(dnaK)*, *ΔslyD(glpD)*, *ΔslyD(mreB)*, *ΔslyD(carA)*, *ΔslyD(cheA)*, *ΔslyD(fliC)*, *ΔslyD(rpoB)* και *ΔslyD(ispH)* παρατηρήθηκε σε θήκες πολυστυρενίου (96-well plates), παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων IPTG (0 έως 0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h (Εικόνα Γ.2.76 και 77).





**Εικόνα Γ.2.76.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔfkrA* καθώς και των *ΔfkrA(dnaK)*, *ΔfkrA(glpD)*, *ΔfkrA(mreB)*, *ΔfkrA(carA)*, *ΔfkrA(cheA)*, *ΔfkrA(fliC)*, *ΔfkrA(rpoB)*, *ΔfkrA(ispH)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.



**Εικόνα Γ.2.77.** Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών BW25113 και *ΔslyD* καθώς και των *ΔslyD(dnaK)*, *ΔslyD(glpD)*, *ΔslyD(mreB)*, *ΔslyD(carA)*, *ΔslyD(cheA)*, *ΔslyD(fliC)*, *ΔslyD(rpoB)*, *ΔslyD(ispH)*, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις IPTG (0-0.5 mM), έπειτα από επώαση στους 30°C για 20h.

Από την εικόνα Γ.2.76, συμπεραίνεται ότι τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *EcdnaK* και *EccarA* (0 έως 0.5 mM) και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *EcispH* (0.5 mM IPTG), προκαλούν την επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου. Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η υπερέκφραση των *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA* και *EcflIC*, προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου του σχηματισμού βιοϋμενίου ενώ η υπερέκφραση του *EcrpoB* στο στέλεχος *ΔfkrA* οδηγεί σε αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

Από την εικόνα Γ.2.77, συμπεραίνεται ότι τα αυξανόμενα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *EcglpD*, *EcmreB* και *EccarA* στο στέλεχος *ΔslyD*, δε μεταβάλλουν το φαινότυπο σχηματισμού βιοϋμενίου, αντίθετα με τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *EccheA* (0.5 mM IPTG) και τα αυξανόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *EcispH* (0.1 έως 0.5 mM IPTG) στο στέλεχος *ΔslyD*, τα οποία προκαλούν επαναφορά του φαινοτύπου στα φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των *EcdnaK* και *EcflIC* (0.25 και 0.5 mM IPTG), προκαλεί αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου.

Τα αποτελέσματα της επαναφοράς (+) και μη (-) του φαινοτύπου του αγρίου τύπου από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcFkpB* στα στελέχη *ΔfkrA* και *ΔslyD*, συγκεντρώνονται στους πίνακες Γ.2.12 και Γ.2.13.

**Πίνακας Γ.2.12.** Η επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB* πρωτεΐνης στο στέλεχος *ΔfkrA*. Ο γκρι χρωματισμός συμβολίζει την καταστολή του φαινοτύπου.

<b>ΔfkrA</b>	<i>fkpA</i>	<i>dnaK</i>	<i>glpD</i>	<i>mreB</i>	<i>carA</i>	<i>cheA</i>	<i>fliC</i>	<i>rpoB</i>	<i>ispH</i>
<b>Swimming</b>	+	+	-	+	-	+	+	-	-
<b>Biofilm</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Από τον πίνακα Γ.2.12. συμπεραίνεται ότι κατά την κολυμβητική κίνηση, η υπερέκφραση των γονιδίων *EcdnaK* και *EccheA* στο στέλεχος *ΔfkrA*, προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Η υπερέκφραση των *EcmreB* και *EcflnC* στο στέλεχος *ΔfkrA*, προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου της κολυμβητικής κίνησης. Σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου, η υπερέκφραση των *EcdnaK*, *EccarA* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔfkrA*, επαναφέρει τον φαινότυπο στα φυσιολογικά επίπεδα, όμως η υπερέκφραση των *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA* και *EcflnC* στο στέλεχος *ΔfkrA*, προκαλεί καταστολή του σχηματισμού βιοϋμενίου.

**Πίνακας Γ.2.13.** Η επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB* πρωτεΐνης στο στέλεχος *ΔslyD*.

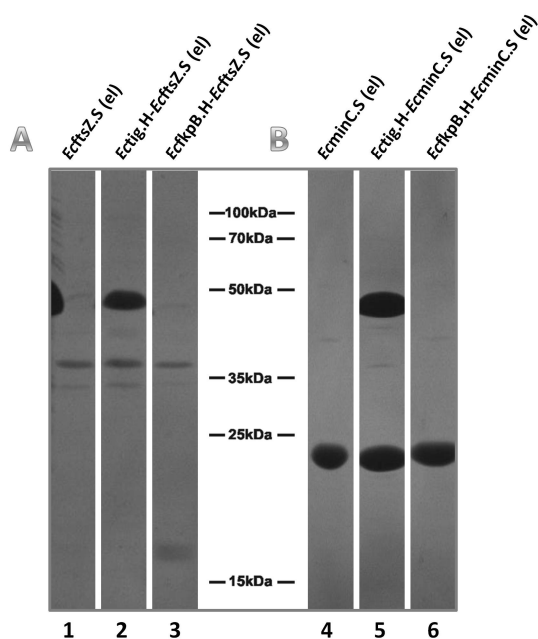
<b>ΔslyD</b>	<i>slyD</i>	<i>dnaK</i>	<i>glpD</i>	<i>mreB</i>	<i>carA</i>	<i>cheA</i>	<i>fliC</i>	<i>rpoB</i>	<i>ispH</i>
<b>Swimming</b>	+	+	-	+	-	+	+	+	-
<b>Biofilm</b>	+	-	-	-	-	+	-	-	+

Από τον πίνακα Γ.2.13, συμπεραίνεται ότι κατά την κολυμβητική κίνηση, η υπερέκφραση των *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflnC* και *EcrpoB* στο στέλεχος *ΔslyD*, προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου, αντίθετα με την έκφραση των *EcglpD*, *EccarA* και *EcispH*, η οποία δεν προκαλεί καμία μεταβολή του φαινοτύπου. Σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου, μόνο η υπερέκφραση των γονιδίων *EccheA* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔslyD*, προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου.

Σημειώνεται ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA* και *EcflnC* προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου (κολυμβητική κίνηση) τόσο στο στέλεχος *ΔslyD* όσο και στο *ΔfkrA*. Επίσης, η υπερέκφραση των γονιδίων *EcispH* και *EcmreB* προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου (σχηματισμός βιοϋμενίου) τόσο στο στέλεχος *ΔslyD* όσο και στο *ΔfkrA*.

#### Γ.2.6.7 Διερεύνηση της αλληλεπίδρασης της *EcfkpB* και της *Ectig* με την *EcftsZ*

Διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της *EcfkpB* και της *Ectig* με την *EcftsZ* και *EcmnC*. Πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνδέκφραση του *EcfkpB* και του *Ectig* με την *EcftsZ* και *EcmnC*, με χρήση του φορέα έκφρασης pCDFDuet-1. Η *EcftsZ* και *EcmnC* φέρει τον S επίτοπο (S-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο τους (C-terminal) ενώ η *EcfkpB* και η *Ectig* φέρουν επίτοπο έξι ισοτιδινών (His-6) στα αμινοτελικά άκρα τους (N-terminal). Η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *EcfkpB* και της *Ectig* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγένειας.



**Εικόνα Γ.2.78.** Διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών *EcftsZ* και *EcminC* με τις *Ectig* και *EcfkpB*. (A) Έκφραση των *EcftsZ.S.pCDFDuet-1*, *Ectig.H.EcftsZ.S.pCDFDuet-1* και *EcfkpB.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1* σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3 (1-3). Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης (1-3) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. (B) Έκφραση των *EcminC.S.pCDFDuet-1*, *Ectig.H.EcminC.S.pCDFDuet-1* και *EcfkpB.H-EcminC.S.pCDFDuet-1* σε κύτταρα *E. coli* BL21 DE3 (4-6). Η ανάλυση των κλασμάτων έκλυσης (4-6) έγινε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) 15%. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν τέσσερις ώρες μετά την προσθήκη 0.25 mM IPTG και επώαση στους 30°C.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρατηρείται αγνώστου αιτίας δέσμευση των πρωτεϊνών *EcftsZ* και *EcminC* από τα Ni-NTA σφαιρίδια της αгарόζης (Εικόνα Γ.2.78., στήλη 1 και 4), με συνέπεια να μην είναι δυνατό κάποιο συμπέρασμα για την αλληλεπίδραση των *Ectig* και *EcfkpB* με την *EcftsZ* και της *Ectig* με την *EcminC*.

## **Δ. Συζήτηση**

## Δ. Συζήτηση

### Δ.1 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των FKBP πρωτεϊνών του *E. coli* και του *A. vinelandii*

Στο μικροοργανισμό *E. coli*, μέσω της αναζήτησης στη βάση δεδομένων του γονιδιώματος του, εντοπίστηκαν πέντε γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP. Πρόκειται για τα γονίδια *EcFkpA*, *EcFkpB*, *EcFkIB*, *EcslyD* και *Ectig* ενώ η ανάλυση του πλήρους αλληλουχημένου γονιδιώματος του μικροοργανισμού *A. vinelandii* (Setubal et al., 2009) αποκάλυψε την παρουσία έξι γονιδίων που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με γονίδια που κωδικοποιούν για τις FKBP.

Όλα τα μέλη της οικογένειας των βακτηριακών FKBP πρωτεϊνών φέρουν τόσο ενεργότητα ΡΡιάσης όσο και ενεργότητα τσαπερόνης (Scholz et al., 1997b; Fischer et al., 1998; Ivery, 2000; Schiene and Fischer, 2000; Ideno et al., 2000; Arie et al., 2001; Pirkl and Buchner, 2001; Kamphausen et al., 2002; Ratajczak et al., 2003). Η διμερής πρωτεΐνη *EcFkpA* με την μορφή V, εμφανίζει ενεργότητα τσαπερόνης, η οποία εδράζεται στο αμινοτελικό της άκρο (Saul et al., 2004; Hu et al., 2006), αλλά και ενεργότητα ΡΡιάσης, η οποία εδράζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο (Saul et al., 2004). Η δομικά παρόμοια πρωτεΐνη *FkIB* (FKBP22) του μικροοργανισμού *Shewanella* sp. SIB1, εμφανίζει επίσης την μορφή V και η ενεργότητα ΡΡιάσης που φέρει εδράζεται στο συντηρημένο καρβοξυτελικό της άκρο (Budiman et al., 2011), το οποίο είναι κατά 49% ομόλογο με την αντίστοιχη περιοχή της *EcFkpA* (Rahfeld et al., 1996) και επιπλέον αποτελεί μια ενεργή τσαπερόνη (Budiman et al., 2012). Οι πρωτεΐνες *EcFkpB* και *EcslyD*, διακρίνονται από τα υπόλοιπα μέλη της FKBP οικογένειας καθώς η ενεργότητα τσαπερόνης, η οποία εδράζεται στην IF περιοχή, αποτελεί υπό-περιοχή της ευρύτερης FKBP περιοχής. (Quistgaard et al., 2012, Zoldák et al., 2009). Η *Ectig* ανακαλύφθηκε από τους Crooke και Wickner, το 1987, ως μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, η οποία είχε την ικανότητα αναδίπλωσης πρωτεϊνών, ως τσαπερόνη, ενώ αργότερα αποδείχθηκε ότι έφερε επιπλέον και ενεργότητα ΡΡιάσης (Crooke and Wickner, 1987; Stoller et al., 1995). Η *Ectig* αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές. Η πρώτη δομική είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στο ριβόσωμα, η δεύτερη δομική περιοχή είναι η FKBP περιοχή και η τρίτη δομική περιοχή παρουσιάζει ενεργότητα τσαπερόνης (Hesterkamp and Bukau, 1996; Hesterkamp et al., 1997; Merz et al., 2006). Από τον *in vitro* προσδιορισμό της ενεργότητας τσαπερόνης των *EcFkpA*, *EcFkpB*, *EcFkIB*, *EcslyD*, *Ectig*, *AnfkbX*, *AnfkbB*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, μέσω της παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS, προέκυψε ότι όλες, εκτός από την *AnfkbA1* και *EcFkpA*, φέρουν ενεργότητα τσαπερόνης. Συγκεκριμένα στην *AnfkbA1* δεν εντοπίστηκε ενεργότητα τσαπερόνης σε καμία από τις συγκεντρώσεις επί της αρχικής ισομοριακής συγκέντρωσης της συνθάσης του κιτρικού οξέος, αν και φέρει μια επιπρόσθετη περιοχή η οποία έχει συσχετιστεί με την ενεργότητα τσαπερόνης της ομόλογης *fkpA* στο *E. coli* (Saul et al., 2004). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι η απώλεια ενεργότητας ΡΡιάσης από την *AnfkbA1* έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ενεργότητα τσαπερόνης. Η απουσία ενεργότητα τσαπερόνης τόσο από την *EcFkpA* και *EcFkpA<sub>V225A</sub>*, υπό τις δικές μας πειραματικές συνθήκες, πιθανώς να οφείλεται σε παράγοντες που άπτονται στη διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της συνθάσης του κιτρικού οξέος.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα ΡΡιασών, οι οποίες φέρουν επιπρόσθετα και ενεργότητα τσαπερόνης σε διαφορετική δομική περιοχή, όπως είναι η ευκαρυωτική *Cyp-40* (Freeman et al., 1996), οι προκαρυωτικές *surA* (Behrens et al., 2001), *slyD* (Weininger et al.,

2009b) και *fkpA* (Ramm and Plückthun, 2000; Saul et al., 2004). Ωστόσο, αναφέρεται η ύπαρξη μιας κυκλοφιλίνης του πρωτόζωου *Leishmania donovani*, η οποία αποτελείται από μια δομική περιοχή αλλά φέρει επιπρόσθετα, εκτός από την ενεργότητα PPIάσης, μια ξεχωριστή ενεργότητα τσαπερόνης (Chakraborty et al., 2002). Η πρωτεΐνη *AnfkbX*, όπως και η *AnfkbB*, δεν φέρει επιπλέον δομικές περιοχές, όμως εμφανίζει ενεργότητα τσαπερόνης.

Όσον αφορά την ενεργότητα PPIάσης, ο *in vitro* προσδιορισμός της ενεργότητας όλων των FKBP που μελετήθηκαν, δηλαδή των *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *Ectig*, *AnfkbX*, *AnfkbB*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, έδειξε ότι πρόκειται για ενεργές PPIάσες. Το γεγονός αυτό έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν για τις *EcfkpA* (Horne and Young, 1995; Missiakas et al., 1996; Arie et al., 2001; Ramm and Pluckthun, 2001) και *EcfkIB*, η οποία αξιολογήθηκε ως μια μέτριας ενεργότητας πρωτεΐνη (Rahfeld et al., 1996; Suzuki et al., 2004). Η κυτταροπλασματική *slyD* παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης με χαμηλή ή μηδενική εξειδίκευση σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες που φέρουν προλίνη, έχει την ικανότητα δέσμευσης σε κατιόντα όπως τα  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  και  $Co^{2+}$  (Wulfiging et al., 1994), ενώ η δέσμευση στο  $Ni^{2+}$  καταστέλλει, αντιστρεπτά, την ενεργότητα PPIάσης (Hottenrott et al., 1997). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η υψηλότερη τιμή  $k_{cat}/K_m$  για τις *EcfkpA*, *EcslyD* και *Ectig* προκύπτει με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA και ανέρχεται στα  $7.19 \pm 0.0038$ ,  $0.431 \pm 0.001$  και  $0.3475 \pm 1.22 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , αντίστοιχα. Με τη χρήση του πεπτιδίου succinyl-Phe-Leu-Pro-Phe-pNA προέκυψε η τιμή  $k_{cat}/K_m$   $0.0303 \pm 0.00003$  και  $1.50 \pm 0.0013 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  για τις *EcfkpB* και *EcfkIB*, αντίστοιχα.

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η ενεργότητα PPIάσης και η ενεργότητα τσαπερόνης εδράζονται στην ίδια περιοχή της πρωτεΐνης και εάν σχετίζονται λειτουργικά, πραγματοποιήθηκε μετάλλαξη σε αμινοξέα που αποτελούν το πιθανό ενεργό κέντρο της ενεργότητας PPIάσης των πρωτεϊνών *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB*, *EcslyD*, *Ectig*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, για την εύρεση του οποίου ευθυγραμμίστηκε η συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία hFKBP12 του ανθρώπου, της οποίας τα αμινοξέα που μετέχουν στο ενεργό κέντρο είναι γνωστά (Ikura and Ito, 2007; Tradler et al., 1997; De Cenzo et al., 1996), με τις αλληλουχίες των πρωτεϊνών αυτών. Η σημειακή μετάλλαξη σε αμινοξέα που πιθανώς να αποτελούν το ενεργό κέντρο της ενεργότητας PPIάσης, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας PPIάσης για την κυκλοφιλίνη *cypA* του ανθρώπου (Zydowsky et al., 1992).

Η ενζυμική ενεργότητα της μεταλλαγμένης *EcfkpA*<sub>Y225A</sub> μειώθηκε κατά 60 έως 65% σε σχέση με την αγρίου τύπου *EcfkpA*. Στις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *EcfkpB*<sub>D119A</sub>, *EcfkIB*<sub>Y181A</sub>, *EcslyD*<sub>F132A</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> δεν ανιχνεύθηκε ενεργότητα PPIάσης. Η απώλεια της ενεργότητας PPIάσης των *EcfkpB*<sub>D119A</sub>, *EcfkIB*<sub>Y181A</sub> και *Ectig*<sub>F198A</sub> βελτίωσε την ικανότητά τους να παρεμποδίζουν την συσσωμάτωση της CS και συνεπώς την λειτουργία τους ως τσαπερόνες, ενώ στη *EcslyD*<sub>F132A</sub> δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της λειτουργίας της ως τσαπερόνη. Η παρατήρηση της αύξησης της δραστηριότητας τσαπερόνης που προέκυψε από την απώλεια της ενεργότητας PPIάσης της *Ectig*<sub>F198A</sub> έχει γίνει και από τους Gupta et al. (2010) οι οποίοι ισχυρίζονται ότι η αφαίρεση της FKBP περιοχής της πρωτεΐνης *Ectig* του *E. coli*, είχε ως αποτέλεσμα την αποτελεσματικότερη αναδίπλωση ανασυνδυασμένων ευκαρυωτικών πρωτεϊνών. Όσον αφορά τη σημειακή μετάλλαξη των αμινοξέων που πιθανώς αποτελούν το ενεργό κέντρο των πρωτεϊνών *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο *AnfkbA1*<sub>Y194A</sub> διατήρησε μόνο το 3% της ενεργότητας PPIάσης ενώ η *AnfkbA2*<sub>Y84A</sub> διατήρησε περίπου το 15% της ενεργότητας PPIάσης.

Οι φυτικής προέλευσης FKBP περιγράφονται ως ενεργά ένζυμα PPIάσων καθώς φέρουν την περιοχή PPIάσης, γνωστή ως FKbd, ωστόσο τα δεδομένα που επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή είναι

ελάχιστα. Η ενεργότητα PPIάσης δεν είναι συντηρημένο γνώρισμα των φυτικών FKBP πρωτεϊνών καθώς 14 από τους 21 ισοτύπους είναι ανενεργές PPIάσες. Ωστόσο, ο *in vitro* προσδιορισμός της ενεργότητας PPIάσης εστιάζει στην ικανότητα του ενζύμου να δεσμεύει πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν κατάλοιπα προλίνης, χωρίς να αποσαφηνίζονται οι λειτουργικές λεπτομέρειες των φυτικών FKBP. Στην πραγματικότητα, η φυσιολογική σημασία της ενεργότητας PPIάσης ευκαρυωτικών FKBP πρωτεϊνών μένει να αποδειχθεί. Παράλληλα, είναι διαθέσιμα ολοένα και περισσότερα δεδομένα τα οποία αφορούν στις αλληλεπιδράσεις των FKBP με πρωτεΐνες στόχους, οι οποίες είναι πιθανό ότι οφείλονται στην FKBPd περιοχή (Gollan et al., 2012).

## **Δ.2 Η σχέση μεταξύ της ενεργότητας PPIάσης και τσαπερόνης των FKPB πρωτεϊνών του *A. vinelandii* και του *E. coli***

Δομική και λειτουργική ανεξαρτησία της ενεργότητας PPIάσης και ενεργότητα τσαπερόνης της FKBP οικογένειας πρωτεϊνών έχουν αναφερθεί για τις FkpA (Saul et al., 2004), trigger factor (Li et al., 2001; Schaffitzel et al., 2001; Genevaux et al., 2004), SlyD (Scholz et al., 2006; Weininger et al., 2009b), FKBP17 (Furutani et al., 2000; Suzuki et al., 2003) και FKBP52 (Pirkl et al., 2001). Μελέτη κατέδειξε ότι η περιοχή του καρβοξυτελικού άκρου των πρωτεϊνών *EcFkpA* και FKBP22, των *E. coli* και *Shewanella* sp. SIB1, αντίστοιχα, παρουσιάζει ενεργότητα PPIάσης, ακόμα και όταν έχει αφαιρεθεί η περιοχή του αμινοτελικού άκρου (Suzuki et al., 2005a). Το ίδιο ισχύει και για την περιοχή του αμινοτελικού άκρου, η οποία διατηρεί την ικανότητα δέσμευσης ενδιάμεσων αναδίπλωσης, ακόμα και όταν έχει αφαιρεθεί το καρβοξυτελικό άκρο (Suzuki et al., 2005a; Budiman et al., 2009). Επιπλέον, η καταστολή της ενεργότητας PPIάσης της FKBP22 δεν επηρέασε σημαντικά την ενεργότητα τσαπερόνης (Budiman et al., 2012). Είναι γενικά αποδεκτό ότι η δέσμευση πρωτεϊνών στην περιοχή τσαπερόνης του ενζύμου δεν είναι εξειδικευμένη, όπως η πρόσδεση στην περιοχή PPIάσης, γεγονός που αποτελεί μια λύση στο πρόβλημα της εκλεκτικότητας υποστρώματος για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Jakob et al., 2009). Ωστόσο, δεν υπάρχουν προς το παρόν δεδομένα που να αφορούν στο εάν η καταστολή της ενεργότητας τσαπερόνης μιας FKPB πρωτεΐνης, επηρεάζει την ενεργότητα PPIάσης της. Παρ' όλα αυτά, έχει επισημανθεί ότι η FKBP22 απαιτεί την παρουσία της περιοχής ενεργότητας τσαπερόνης για την λειτουργία της ως PPIάση (Budiman et al., 2012).

Έχει προταθεί από διάφορους ερευνητές ότι η παρουσία δραστηριότητας τσαπερόνης βελτιώνει την εκδήλωση της ενεργότητας PPIάσης (Jacob et al., 2009; Zoldák and Schmid, 2011; Budiman et al., 2012). Τα υποστρώματα δεσμεύονται μέσω της ενεργότητας τσαπερόνης και μεταφέρονται στη θέση της PPIάσης, όπου οι πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμοί των πρωτεϊνών ισομεριώνονται ταχύτατα. Μόρια πρωτεϊνών, τα οποία εγκατέλειψαν την περιοχή PPIάσης με έναν εσφαλμένο πεπτιδουλ-πρόλυλ δεσμό, επαναδεσμεύονται στην περιοχή τσαπερόνης για να επαναληφθεί η διαδικασία (Zoldák and Schmid, 2011). Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η μικρή δραστηριότητα τσαπερόνης της *AnfkbA1* μπορεί να αντισταθμίζεται από την υψηλή δραστηριότητα PPIάσης και η απώλεια ενεργότητας PPIάσης να επιτρέπει δομικές αλλαγές στην *AnfkbA1* οι οποίες να επιτρέπουν την αύξηση της δραστηριότητας τσαπερόνης.

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της *AnfkbA2*, η οποία δε φαίνεται να φέρει την επιπλέον δομική περιοχή τσαπερόνης, έδειξε ότι διαθέτει τόσο ενεργότητα PPIάσης, όσο και τσαπερόνης. Η μείωση της

ενεργότητας ΡΡιάσης της *AnfkbA2* δεν επηρέασε την ικανότητα παρεμπόδισης της δημιουργίας συσσωματωμάτων της CS, γεγονός το οποίο έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν (Chakraborty et al., 2002; Dimou et al., 2011).

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των *AnfkbX* και *AnfkbB* έδειξε ότι και δυο διαθέτουν επίσης τόσο ενεργότατα ΡΡιάσης όσο και τσαπερόνης. Όπως προαναφέρθηκε οι *AnfkbX* και *AnfkbB* παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τις *EcfkpB* και *EcfkIB*. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι οι *EcfkpB* και *EcfkIB* διαθέτουν τόσο ενεργότητα ΡΡιάσης, όσο και τσαπερόνης. Η απώλεια της ενεργότητας ΡΡιάσης από τις *EcfkpB*, *EcfkIB* και *Ectig* αυξάνει την δραστηριότητα τους ως τσαπερόνες. Η δομική σχέση μεταξύ της ενεργότητας ΡΡιάσης και της ενεργότητας τσαπερόνης των FKPB πρωτεϊνών θα μπορούσε να αποσαφηνιστεί με τυχαία μεταλλαξιγένεση και *in vitro* υπολογισμό των δύο ενεργοτήτων των επιμέρους μεταλλαγμένων πρωτεϊνών που θα προέκυπταν.

### **Δ.3 Ο ρόλος των FKBP πρωτεϊνών στην ανθεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* σε συνθήκες καταπόνησης**

Η διερεύνηση της συμμετοχής των FKBP πρωτεϊνών σε παράγοντες καταπόνησης, στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάπτυξης των στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig* σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (42°C) και υψηλής αλατότητας (2% και 5% NaCl). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο το στέλεχος *ΔfkrB* παρουσίασε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Ως εκ τούτου η πρωτεΐνη *EcfkpB* πιθανώς να συμμετέχει στην απόκριση του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Όσον αφορά στην επιβίωση των μεταλλαγμένων στελεχών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος *ΔfkrB* παρουσίασε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, αντίθετα με το στέλεχος *ΔslyD*, το οποίο παρουσίασε αυξημένη ικανότητα επιβίωσης, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Επομένως φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες *EcfkpB* και *EcslyD* πιθανώς να συμμετέχουν, με διαφορετικό ωστόσο τρόπο, στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *E. coli* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

Η συμμετοχή και των τριών οικογενειών των ΡΡιασών στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε παράγοντες καταπόνησης, έχει αναφερθεί σε πολυάριθμες έρευνες. Αρχικά, η συμμετοχή των ΡΡιασών στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *Shewanella* sp. WP3 σε ωσμωτικό στρες, παρατηρήθηκε μέσω της υπερέκφρασης ενός γονιδίου, που κωδικοποιεί για μια ΡΡιάση, κατά την ανάπτυξη παρουσία NaCl (Li et al., 2006). Επίσης, έχει δειχθεί η συμμετοχή δύο γονιδίων που κωδικοποιούν για ΡΡιάσεις, των *ef0685* και *ef1534*, στην ανθεκτικότητα του *Enterococcus faecalis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες (Reffuveille et al., 2012) καθώς και η συμμετοχή της παρβουλίνης *SurA* στην ανθεκτικότητα του *Yersinia pseudotuberculosis* σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Obi et al., 2011).

Ιδιαίτερα έχει καταδειχθεί ο ρόλος των FKBP πρωτεϊνών στην ανθεκτικότητα και στην παθογένεια των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες MIP, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των FKBP και εμφανίζουν ενεργότητα ΡΡιάσης, συμβάλλουν στην παθογένεια πολλών βακτηρίων όπως τα *Legionella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Trypanosoma*, *Aeromonas* και *Salmonella*. Οι πρωτεΐνες MIP ενισχύουν την επιβίωση αυτών των βακτηρίων, τα οποία δρουν παρασιτικά στο εσωτερικό ευκαρυωτικών κυττάρων ενώ διαπιστώθηκε ότι η ικανότητα αυτή οφείλεται αποκλειστικά στην ενεργότητα ΡΡιάσης (Helbig et al., 2003). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται, επίσης, ότι η



απενεργοποίηση του γονιδίου *fkpA* στο *S. enterica* ορότυπος *Typhimurium* στέλεχος *Copenhagen* είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα επιβίωσης του στελέχους σε μακροφάγα και επιθηλιακά κύτταρα, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου (Horne et al., 1997), αντίθετα με το στέλεχος *S. enterica* ορότυπος *typhimurium*, στο οποίο η απουσία της *fkpA* είχε ελάχιστη επίδραση (Humphreys et al., 2003). Επίσης, δείχθηκε ότι τα γονίδια *surA* και *fkpA* του *S. enterica* ορότυπος *Typhimurium*, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από τον παράγοντα  $\sigma^E$ , είναι σημαντικά σε διαφορετικό βαθμό, για τη μακροπρόθεσμη επιβίωση σε περιβάλλον απουσία πηγής άνθρακα και για την ανθεκτικότητα του κυττάρων αυτών σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, όξινου pH και παρουσία ενός αντιμικροβιακού πεπτιδίου (polymyxin B) (Kenyon et al., 2010). Μια πολύ σημαντική παρατήρηση αφορά στην πρωτεΐνη *slyD* του *E. coli* η σύνθεση της οποίας αυξάνεται δραματικά υπό συνθήκες θερμικού στρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η *slyD* αποτελεί μια πρωτεΐνη θερμικού σοκ, η οποία επάγεται με σκοπό την αποτροπή της συσσωμάτωσης των πρωτεϊνών του *E. coli* (Han et al., 2007).

#### **Δ.4 Ο ρόλος των FKBP πρωτεϊνών στην κινητικότητα του βακτηρίου *E. coli***

Η σημαντικότητα των FKBP πρωτεϊνών υποδηλώνεται από την παρουσία τους σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα σχεδόν όλων των οργανισμών, καθώς αυτές εντοπίζονται διάχυτες στο κυτταρόπλασμα ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στον πυρήνα, στον πυρηνίσκο, στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο περίπλασμα βακτηριακών κυττάρων, αλληλεπιδρώντας με έναν αριθμό πρωτεϊνών-στόχων που ελέγχουν ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών διεργασιών (Galat, 2003). Αν και η δομή όλων των FKBP πρωτεϊνών έχει μελετηθεί εκτενώς οι γνώσεις μας γύρω από τον βιολογικό τους ρόλο παραμένουν περιορισμένες. Ήδη γνωρίζουμε ότι οι FKBP καταλύουν την αναδίπλωση του πεπτιδικού δεσμού που προηγείται της προλίνης σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, καθώς όλες παρουσιάζουν ενεργότητα ΡΡ1άσης, εξακολουθούν ωστόσο να υπάρχουν μεγάλα και αναπάντητα ερωτήματα όσον αφορά στο φυσιολογικό τους ρόλο.

Η αρχική προσέγγιση της μελέτης του φυσιολογικού ρόλου των FKBP πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μέσω της μελέτης της ικανότητας ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkpA*, *ΔfkpB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*, σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου BW25113 και παρατηρήθηκε ότι εμφανίζουν φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης, όμοιο με του στελέχους αγρίου τύπου. Επομένως, η απουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις FKBP πρωτεΐνες δεν φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη του *E. coli*, υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Η παρουσία πέντε FKBP στο μικροοργανισμό *E. coli* αποτελεί ένδειξη ότι κάθε μέλος κατέχει έναν ειδικό ρόλο στην αναδίπλωση πρωτεϊνών-υποστρωμάτων ή ότι έχει συγκεκριμένα υποστρώματα, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται ότι τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας αναγνωρίζουν κοινά υποστρώματα. Εκτιμάται ότι ο πλειοτροπικός φαινότυπος λόγω της απαλοιφής των γονιδίων των FKBP πρωτεϊνών πιθανώς να οφείλεται στην λανθασμένη αναδίπλωση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων-υποστρωμάτων ή στόχων. Για παράδειγμα, η απενεργοποίηση του γονιδίου *fkpA* οδηγεί σε αύξηση της απόκρισης του παράγοντα  $\sigma^E$  (Bothmann and Pluckthun, 2000) ενώ αργότερα βρέθηκε ότι η παρουσία της πρωτεΐνης *fkpA* είναι απαραίτητη για την είσοδο της κολισίνης M στο εσωτερικό ενός *E. coli* κυττάρου, η οποία προκαλεί τη θανάτωσή του (Hullmann et al., 2008). Όσον αφορά την πρωτεΐνη *slyD*, μελέτη κατέδειξε ότι η απαλοιφή του γονιδίου της, στο βακτήριο *E. coli*, έχει ως συνέπεια μειωμένη

ενεργότητα υδρογονάσης (Zhang et al., 2005) ενώ επίσης, βρέθηκε ότι στο *ΔslyD* στέλεχος τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου *nika* (κωδικοποιεί για τον μεταφορέα του Ni) μειώνονται εξαιρετικά με αποτέλεσμα τη μειωμένη συσσώρευση νικελίου (Kaluarachchi et al., 2011). Τέλος, μεταλλαγμένο στέλεχος που προέκυψε από την απαλοιφή του γονιδίου *BPSS1823*, που κωδικοποιεί για μια MIP πρωτεΐνη, του *B. pseudomallei* εμφάνισε μειωμένη ικανότητα επιβίωσης εντός των κυττάρων-ξενιστών, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη *BPSS1823* είναι σημαντική για την παθογένεια του βακτηρίου. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν πλειοτροπικές επιπτώσεις της απαλοιφής του *BPSS1823*, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης ικανότητας ομαδικής κίνησης και της μειωμένης παραγωγής της πρωτεΐνης (Norville et al., 2011). Όσον αφορά στην ικανότητα της ομαδικής κίνησης του βακτηρίου *P. mirabilis*, παρατηρήθηκε αύξηση του επιπέδου των μεταγραφημάτων του γονιδίου που κωδικοποιεί για την FkIB (Pearson et al., 2010) ενώ ένα άλλο παράδειγμα συμμετοχής των FKBP πρωτεϊνών στην κινητικότητα βακτηρίων αποτελεί η πρωτεΐνη *gldI* του μικροοργανισμού *F. johnsoniae*, η οποία είναι μια λιποπρωτεΐνη που εμφανίζει ομολογία με τις FKBP, απαραίτητη για την κινητικότητα *gliding* (McBride and Braun, 2004).

Η μελέτη του ερευνητή Inoue ανέδειξε τη συμμετοχή 216 γονιδίων στην ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου του *E. coli* μέσω του χαρακτηρισμού του φαινοτύπου στελεχών που προέκυψαν από την απενεργοποίηση 3.985 γονιδίων. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά συμπεριλαμβάνονται και τρία μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών. Τα μέλη της υπεροικογένειας αλλά και οι τσαπερόνες, επηρεάζουν τη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών στόχων του βακτηρίου *E. coli* καθώς αναδιπλώνουν ή αποτρέπουν την συσσωμάτωση των πρωτεϊνών που πιθανώς συμμετέχουν έμμεσα ή άμεσα στον μηχανισμό της κινητικότητας (Inoue et al., 2007).

Συγκεκριμένα, η παρατήρηση του ερευνητή Inoue και των συνεργατών του ότι τα στελέχη τα οποία φέρουν απαλοιφή των γονιδίων *EcfkpB*, *EcrrpB* και *EcrrpC* εμφανίζουν διαφορετικό φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας από το στέλεχος αγρίου τύπου, συμπεραίνοντας ότι οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν με άγνωστο, ωστόσο, τρόπο στην ομαδική κίνηση του βακτηρίου *E. coli* (Inoue et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά μας παρακίνησαν να εξετάσουμε την ικανότητα ομαδικής κολυμβητικής κίνησης αλλά και σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*.

Η ομαδική κίνηση σε επιφάνειες (Verstraeten et al., 2008) αποτελεί μια ριζική αλλά αναστρέψιμη, μεταβολή της συμπεριφοράς, σε απόκριση προς το περιβάλλον, της ανάπτυξης των βακτηρίων και οφείλεται σε ερεθίσματα, όπως είναι τα εξωκυτταρικά σήματα, η αίσθηση της κυτταρικής πυκνότητας, τα αμινοξέα, τα πεπτίδια και τα λιπαρά οξέα. Μπορεί να επηρεαστεί από ενδοκυτταρικούς παράγοντες, δηλαδή από έναν, για παράδειγμα, αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης, από τη συγκέντρωση κατιόντων, από το cyclic di-GMP και από την επαφή με την επιφάνεια ή πιθανώς και από διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις (Fraser and Hughes, 1999). Εναλλακτικά της ομαδικής κίνησης, τα βακτήρια διασπείρονται, σε συνθήκες κολυμβητικής κινητικότητας (Baker et al., 2006). Κατά την κολυμβητική κίνηση, μεμονωμένα κύτταρα *E. coli* χρησιμοποιούν τα μαστίγια τους, τα οποία περιστρέφουν για να προωθηθούν. Ένας πρόσθετος και σύνθετος μηχανισμός αποικισμού βιοτικής και μη, επιφάνειας, τον οποίο χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί είναι το βιοϋμένιο, ένα βλενώδες πλέγμα, στο εσωτερικό του οποίου παράγονται και εκκρίνονται πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα, και πολυσακχαρίτες. Το οργανωμένο αυτό σύστημα ζωής είναι το αποτέλεσμα δημιουργίας ενός υδατικού

περιβάλλοντος, το οποίο παρέχει συνεχώς θρεπτικές ουσίες στα κύτταρα του εσωτερικού τμήματός του. Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν σε αυτό το δίκτυο είναι πιο ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις ή στη δράση των αντιβιοτικών, σε σύγκριση με τα πλανκτονικά κύτταρα (Donlan, 2002; Stoodley et al., 2002; Sauer, 2003). Ένα βιοϋμένιο μπορεί να δημιουργηθεί σε συστήματα εδάφους και υδάτων, σε ιατρικές συσκευές και σε ζωντανούς ιστούς όπως το σμάλτο των δοντιών, οι καρδιακές βαλβίδες ή ο πνεύμονας (Donlan, 2001; Rudrappa et al., 2013). Βιοϋμένια σχηματίζονται, επίσης, στις ρίζες και τα φύλλα των φυτών (Rudrappa et al., 2013).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη στα οποία έχει απενεργοποιηθεί κάθε ένα από τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες *EcFkpA*, *EcFkpB*, *EcFklB*, *EcSlyD* και *EcTig*, εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα ομαδικής και κολυμβητικής κινητικότητας αλλά και αυξημένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου, BW25113. Ωστόσο, έντονο φαινότυπο ομαδικής κίνησης, συγκριτικά με το στέλεχος αγρίου τύπου, εμφανίζουν τα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfklB* και *Δtig*, έντονο φαινότυπο κολυμβητικής κίνησης εμφανίζουν τα *ΔfkrA*, *ΔslyD* και *Δtig*, ενώ έντονη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου εμφανίζουν τα *ΔfkrB*, *ΔfklB*, *ΔslyD* και *Δtig*.

Από την παρατήρηση αυτή προέκυψαν έπειτα ορισμένα ερωτήματα τα οποία αφορούν την *EcFkpB* και το στέλεχος *ΔfkrB*, αλλά κατά αναλογία τίθενται για όλες τις FKBP πρωτεΐνες: Εάν η συμμετοχή της *EcFkpB* στο φαινότυπο της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου οφείλεται στην ενεργότητα ΡΡιάσης της. Εάν η έκφραση των γονιδίων *EcFkpB* και *EcFkpB<sub>D119A</sub>* στα στελέχη BW25113 και *ΔfkrB* επηρεάζει την κυτταρική μορφολογία του μικροοργανισμού *E. coli*.

Ο παρατηρούμενος φαινότυπος της αυξημένης κινητικότητας και σχηματισμού βιοϋμενίου των μεταλλαγμένων στελεχών, όντως οφείλεται στην απουσία των FKBP πρωτεϊνών, γεγονός το οποίο επαληθεύτηκε από την επαναφορά του αγρίου τύπου μέσω της έκφρασης του κάθε FKBP γονιδίου, στο αντίστοιχο στέλεχος. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι FKBPs είναι αρνητικοί ρυθμιστές (*negative regulators*) της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης και του σχηματισμού βιοϋμενίου.

Η πρωτεΐνη *EcFkpA*, καθότι φέρει ένα πεπτίδιο οδηγό στο αμινοτελικό της άκρο, εδράζεται εντός του περιπλαστικού χώρου των κυττάρων *E. coli*. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *fkrA*, όπως προαναφέρθηκε, οδηγεί σε αύξηση της απόκρισης του παράγοντα  $\sigma^E$  (Bothmann and Pluckthun, 2000), ο οποίος βρέθηκε, με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA στο *E. coli* K-12, ότι σχετίζεται με τον σχηματισμό βιοϋμενίου, καθώς επάγεται, υπό αυτές τις συνθήκες (Schembri et al., 2003). Εφόσον το στέλεχος *ΔfkrA* παρουσιάζει έντονη κινητικότητα και ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με το στέλεχος BW25113 και εφόσον το στέλεχος *ΔfkrA(fkrA)* εμφάνισε φυσιολογικούς φαινοτύπους, αναρωτηθήκαμε εάν η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcFkpA<sub>Y225A</sub>* στο στέλεχος *ΔfkrA*, θα είχε τα αντιστρεπτά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι η *EcFkpA* φαίνεται να συμμετέχει στην ομαδική, κολυμβητική κινητικότητα και στον σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli*, όχι με την ιδιότητα της ΡΡιάσης, αλλά πιθανότατα με την ιδιότητα της τσαπερόνης. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειώσουμε ότι θα ήταν σκόπιμο να κατασκευαστεί μια μεταλλαγμένη *EcFkpA* η οποία να παρουσιάζει μη ανιχνεύσιμη ενεργότητα ΡΡιάσης πριν καταλήξουμε στο παραπάνω συμπέρασμα.

Η πρωτεΐνη *EcFkpB* εμφανίζει 33.5% ομολογία με την hFKBP12 του ανθρώπου (Hottenrott et al., 1997), διαθέτει το χαμηλότερο αριθμό συντηρημένων αμινοξέων, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των FKBP πρωτεϊνών ενώ παραμένει από τις λιγότερο μελετημένες πρωτεΐνες της

οικογένειας. Η αυξημένη ικανότητα ομαδικής, αλλά και κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔfkrB* επανήλθε στα επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου υπερεκφράζοντας και τα δύο γονίδια *EcfkrB* και *EcfkrB<sub>D119A</sub>*. Επομένως, η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkrB* δεν φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ομαδική και κολυμβητική κίνηση του *E. coli*. Αντίθετα, η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkrB* φαίνεται ότι είναι σημαντική για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του *E. coli*, καθώς η έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcfkrB<sub>D119A</sub>* διατήρησε τον φαινότυπο του στελέχους *ΔfkrB*.

Η *EcfkIB* παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τις πρωτεΐνες MIP των παθογόνων *Legionella*, *Coxiella burnetii*, *Rochalimaea quintana*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Xanthomonas campestris*, *Chlamydia trachomatis* και του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* (Rahfeld et al., 1996). Η υψηλή ικανότητα της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης του στελέχους *ΔfklB* μειώθηκε υπερεκφράζοντας και τα δύο γονίδια *EcfkIB* και *EcfkIB<sub>V181A</sub>* επομένως διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* πρωτεΐνης πιθανότατα δεν ευθύνεται αποκλειστικά για τον παρατηρούμενο φαινότυπο. Ωστόσο, είναι πιθανό η ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB* να είναι σημαντική για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του βακτηρίου *E. coli*. Το ίδιο διαπιστώθηκε από την υπερέκφραση των δύο γονιδίων στο στέλεχος BW25113.

Η ενεργότητα ΡΡιάσης που φέρει η *EcslyD* είναι αναγκαία για την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου, μόνο κατά την ομαδική κίνηση. Αντίθετα, κατά την κολυμβητική κίνηση και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης πιθανώς δεν είναι απαραίτητη για την καταστολή του φαινοτύπου. Επιπρόσθετα, διερευνήθηκε ο φαινότυπος, υπό τις ίδιες συνθήκες, των στελεχών BW25113(*slyD*) και BW25113(*slyD<sub>F132A</sub>*) και διαπιστώθηκε η καταστολή του φαινοτύπου από την υπερέκφραση και των δύο γονιδίων.

Όλες οι πρωτεΐνες *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* συμβάλλουν στην επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου κατά την ομαδική κίνηση. Ωστόσο, η υψηλή ικανότητα κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου του στελέχους *Δtig* επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα μόνο έπειτα από την έκφραση των γονιδίων *Ectig* και *Ectig<sub>F198A</sub>* ενώ η έκφραση του γονιδίου *Ectig<sub>V66G</sub>* δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στο φαινότυπο του στελέχους *Δtig*. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *Ectig* δεν είναι απαραίτητη για το φαινότυπο της ομαδικής κίνησης, ωστόσο συμβαίνει το αντίθετο κατά την κολυμβητική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της *Ectig* είναι απαραίτητη για την ικανότητα της κολυμβητικής κίνησης και το σχηματισμό βιοϋμενίου του *E. coli*. Η υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig*, *Ectig<sub>V66G</sub>* και *Ectig<sub>F198A</sub>* στο στέλεχος BW25113 επηρεάζει τον φαινότυπο της κολυμβητικής κίνησης καταστέλλοντάς τον. Όσον αφορά τον σχηματισμό του βιοϋμενίου παρατηρήθηκε ότι μόνον η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ectig<sub>V66G</sub>* προκαλεί αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου ενώ η υπερέκφραση των γονιδίων *Ectig* και *Ectig<sub>F198A</sub>* δεν επηρεάζει τον φαινότυπο των στελεχών BW25113(*tig*) και BW25113(*tig<sub>F198A</sub>*).

Η σπουδαιότητα της ενεργότητας ΡΡιάσης της *Ectig* στην αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών παραμένει ασαφής. Η χαμηλή εξειδίκευση για πρωτεΐνες στόχους ή υποστρώματα που παρουσιάζει η *Ectig* υποδηλώνει ότι η περιοχή ΡΡιάσης της έχει, *in vivo*, ένα γενικό ρόλο τσαπερόνης (Liu et al., 2013)

Συνολικά συμπεραίνεται ότι η απενεργοποίηση των FKPB γονιδίων προκάλεσε έναν αριθμό φαινοτύπων που σχετίζονται με την κινητικότητα, υποδεικνύοντας ότι οι FKPBs είναι απαραίτητες για

την αναδίπλωση και τη λειτουργία κάποιων πρωτεϊνών στόχων, οι οποίες εμπλέκονται στην ομαδική και κολυμβητική κίνηση, καθώς και στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, απαιτείται η ενεργότητα ΡΡιάσης των FKBP για την επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης είναι απαραίτητη για την αναδίπλωση και τη λειτουργία της πλειονότητας των πρωτεϊνών στόχων.

#### **Δ.5 Η επίδραση των FKBP πρωτεϊνών στην κυτταρική μορφολογία**

Η συμμετοχή των FKBP πρωτεϊνών στην κυτταρική διαίρεση έχει δείχθει κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη AtFKBP72, η οποία δραστηριοποιείται στους διαιρούμενους ιστούς του ακραίου μεριστώματος του φυτού *Arabidopsis thaliana*, οδηγεί στον φαινότυπο PASTICCINO, ο οποίος χαρακτηρίζεται από αποδιοργανωμένο ορμονικό έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης από τις κυτοκίνες και την αυξίνη (Vittorioso et al., 1998). Στο παρελθόν αλλά και προσφάτως, έχει αναφερθεί η συμμετοχή ευκαρυωτικών FKBP στην κυτταρική διαίρεση ή στην διαμόρφωση του κυτταροσκελετού (Faure et al., 1998; Brasseur et al., 2013). Το μήκος ενός βακτηριακού κυττάρου ρυθμίζεται κυρίως από την δραστηριότητα μιας καλά συντονισμένης και συγχρονισμένης ομάδας πρωτεϊνών, η οποία είναι υπεύθυνη για την δημιουργία ενός κυτταρικού διαφράγματος (Young, 2007; Young, 2010). Η απαλοιφή γονιδίων που κωδικοποιούν για τσαπερόνες (π.χ. GroEL) ή η απορρύθμιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τσαπερονών μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία αυτή και να οδηγήσει σε μια αύξηση του μήκους των κυττάρων (Blum et al, 1992; McCarty and Walker, 1994; Sugimoto et al., 2008).

Αρκετοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης, μεταβάλλουν τη μορφολογία τους σε κύτταρα της ομαδικής κίνησης δηλαδή εμφανίζουν μια έντονη κυτταρική επιμήκυνση (Verstraeten et al., 2008). Προκειμένου να διαπιστωθεί η οποιαδήποτε μεταβολή της κυτταρικής μορφολογίας, παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά τα κύτταρα των στελεχών *ΔfkrA* καθώς και των στελεχών *BW25113(fkrA)*, *BW25113(fkrA<sub>Y225A</sub>)*, *ΔfkrA(fkrA)* και *ΔfkrA(fkrA<sub>Y225A</sub>)*, κατά την ομαδική κίνηση και κολυμβητική κίνηση και συγκρίθηκαν με τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Κατά την ομαδική κίνηση, η απουσία ή η παρουσία της *EcFkrA* δεν προκάλεσε μια μορφολογική διαφοροποίηση, αντίθετα με την μεταλλαγμένη *EcFkrA<sub>Y225A</sub>*, η οποία προκάλεσε μια ελαφρά κυτταρική επιμήκυνση. Κατά την κολυμβητική κίνηση, η απουσία της πρωτεΐνης *EcFkrA* ή η παρουσία των πρωτεϊνών *EcFkrA* και *EcFkrA<sub>Y225A</sub>* δεν προκάλεσε μια κυτταρική διαφοροποίηση, επομένως συμπεραίνεται ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης της πρωτεΐνης *EcFkrA* δεν επηρεάζει την κυτταρική μορφολογία. Όσον αφορά στο δεύτερο μέλος της FKBP οικογένειας, παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος *ΔfkrB* εμφανίζει σφαιροειδή κύτταρα γεγονός το οποίο οφείλεται στην απουσία της πρωτεΐνης *EcFkrB*. Αντίθετα, τα στελέχη *BW25113(fkrB)* και *ΔfkrB(fkrB)* εμφανίζονται επιμηκυμένα με πολλαπλά πυρηνοειδή. Η ελλειψή κυτταρική διαίρεση των κυττάρων αυτών πιθανότατα οφείλεται στην υψηλή ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcFkrB* καθώς η υπερέκφραση του γονιδίου *EcFkrB<sub>D119A</sub>* στα στελέχη *BW25113(fkrB<sub>D119A</sub>)* και *ΔfkrB(fkrB<sub>D119A</sub>)* έχει ως αποτέλεσμα την μετάβαση σε μια πιο φυσιολογική αν και ελαφρώς επιμηκυμένη κυτταρική μορφολογία.

Επίσης, διαπιστώθηκε μια σημαντική κυτταρική επιμήκυνση των στελεχών *BW25113(fkIB)* και *ΔfkIB(fkIB)*, η οποία οφείλεται στην υπερέκφραση του γονιδίου *EcFkIB*, επομένως στα υψηλά επίπεδα

της πρωτεΐνης *EcfkIB* και συγκεκριμένα στην ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcfkIB*, υποδηλώνοντας ότι πιθανώς η ενεργότητα τσαπερόνης της *EcfkIB* να είναι επαρκής για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών στόχων. Η έντονη κυτταρική επιμήκυνση των στελεχών *BW25113(slyD)* και *ΔslyD(slyD)* οφείλεται στην ενεργότητα ΡΡιάσης της *EcslyD*, καθώς το φαινόμενο αυτό ανατρέπεται κατά την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD<sub>F132A</sub>*. Ανάλογη παρατήρηση περιγράφεται από τους Roof et al.(1997) σύμφωνα με τους οποίους η κυτταρική επιμήκυνση, δηλαδή η αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης, οφείλεται στη συσσώρευση της πρωτεΐνης *EcslyD*, αντίθετα με τις μεταλλαγμένες *EcslyD<sub>L41R</sub>* και *EcslyD<sub>Q14P</sub>* η έκφραση των οποίων δεν προκαλεί αυτόν τον φαινότυπο.

Εξετάζοντας την κυτταρική μορφολογία των στελεχών *Δtig*, *BW25113(tig)*, *BW25113(tig<sub>G66V</sub>)*, *BW25113(tig<sub>F198A</sub>)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>G66V</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)* κατά την ομαδική κίνηση διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα επιμηκύνονται καθώς αναστέλλεται η κυτταρική διαίρεση ενώ παράλληλα το γενετικό υλικό σε αυτά τα στελέχη βρίσκεται ανισομερώς κατανεμημένο παρουσία περίσσειας ή απουσίας της πρωτεΐνης *Ectig*. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε ξανά στο παρελθόν, ωστόσο σε υγρή καλλιέργεια και αποδόθηκε στην ενεργότητα τσαπερόνης της *Ectig* και συγκεκριμένα στην ιδιότητά της να αναδιπλώνει πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην κυτταρική διαίρεση του *E. coli* (Guthrie and Wickner, 1990). Η κυτταρική μορφολογία των στελεχών *Δtig*, *BW25113(tig)*, *BW25113(tig<sub>G66V</sub>)*, *BW25113(tig<sub>F198A</sub>)*, *Δtig(tig)*, *Δtig(tig<sub>G66V</sub>)* και *Δtig(tig<sub>F198A</sub>)* κατά την κολυμβητική κίνηση διαφοροποιείται ελαφρώς από την ομαδική κίνηση. Στην κολυμβητική κίνηση τα κύτταρα των στελεχών από τα οποία απουσιάζει η πρωτεΐνη *Ectig* δε διαφοροποιούνται από τα κύτταρα του στελέχους αγρίου τύπου. Το στέλεχος *Δtig(tig)* σχηματίζει νημάτια τα οποία ξεπερνούν 100 φορές το μήκος ενός φυσιολογικού *E. coli* κυττάρου, ενώ σε αυτά η διαίρεση του γενετικού υλικού φαίνεται να είναι ελλειπής. Το στέλεχος *BW25113(tig)*, αν και σχηματίζει νηματοειδή κύτταρα εμφανίζει επίσης και φυσιολογικού μεγέθους κύτταρα, ενώ η διαίρεση του γενετικού υλικού φαίνεται να είναι πιο ομαλή. Συνεπώς, η πρωτεΐνη *Ectig* πιθανότατα συμμετέχει στο μηχανισμό της κυτταρικής διαίρεσης περισσότερο με την ιδιότητα της τσαπερόνης και λιγότερο με την ιδιότητα της ΡΡιάσης, πιθανότατα αναδιπλώνοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν άμεσα στην κυτταρική διαίρεση του *E. coli*.

Συνεπώς μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πιθανή αιτία της μεταβολής της μορφολογίας των κυττάρων στα οποία έχουν απαλοιφθεί ή υπερεκφράζονται γονίδια των FKBP's μπορεί να είναι η αλληλεπίδραση αυτών με πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στην κυτταρική διαίρεση, στην ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος ή μήκους ή ακόμα και στην σύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτεΐνες αυτές ενδεχομένως να αποτελούν στόχους των ΡΡιασών και συγκεκριμένα των FKBP's και συνεπώς η λανθασμένη ή μη αναδίπλωσή τους που προκύπτει από την απουσία ή την περίσσεια των FKBP's, να απορρυθμίζει την διαμόρφωσή τους και συνεπώς την λειτουργία τους. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης των FKBP's είναι υπεύθυνη για την παρατηρούμενη μορφολογική αλλοίωση των *E. coli* κυττάρων της ομαδικής και κολυμβητικής κίνησης. Η προσπάθεια μας να μελετήσουμε την πιθανή αλληλεπίδραση της *EcfkRB* και της *Ectig* με κάποιες πρωτεΐνες οι οποίες μετέχουν στην κυτταρική διαίρεση δεν έδωσε σαφές συμπέρασμα και ως εκ τούτου νέες πειραματικές προσεγγίσεις είναι απαραίτητες.

#### Δ.6 Λειτουργική υποκατάσταση των FKBP πρωτεϊνών από τις PPIάσες

Ένας από τους τρόπους ανίχνευσης γενετικών αλληλεπιδράσεων που χρησιμοποιούν οι γενετιστές είναι η μελέτη της επίδρασης της αύξησης των μεταγραφημάτων ενός ή περισσότερων γονιδίων στο φαινότυπο βακτηρίου στο οποίο έχει απενεργοποιηθεί ένα γονίδιο X. Η τεχνική αυτή ονομάζεται επαναφορά φυσιολογικού φαινοτύπου μέσω πολλαπλών μεταγραφημάτων ενός γονιδίου (*multicopy suppression*). Περιλαμβάνει την κατασκευή μιας πλασμιδιακής βιβλιοθήκης γονιδιακής έκφρασης τυχαίων τμημάτων του γονιδιώματος, όλων των γονιδίων ή μέρους των γονιδίων του γονιδιώματος. Η διαθέσιμη συλλογή μεταλλαγμένων στελεχών στα οποία έχει απενεργοποιηθεί ένα επιθυμητό γονίδιο δίνει την δυνατότητα μιας αρχικής προσέγγισης προς την αναζήτηση γονιδίων που επαναφέρουν ένα φαινότυπο. Η βιβλιοθήκη γονιδιακής έκφρασης αξιοποιείται για τον μετασχηματισμό του μεταλλαγμένου στελέχους, εξετάζοντας τον φαινότυπο και συγκρίνοντάς τον με του αγρίου τύπου. Η συλλογή ASKA αποτελείται από σχεδόν όλα τα γονίδια του *E. coli* τα οποία έχουν κλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης (Kitagawa et al., 2005). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, είναι διαθέσιμη μια συλλογή περίπου 4000 μεταλλαγμένων στελεχών στα οποία έχει απενεργοποιηθεί ένα οποιοδήποτε επιθυμητό γονίδιο. Ο συνδυασμός αυτών των δυο γενετικών εργαλείων δίνει τη δυνατότητα μιας αρχικής προσέγγισης προς την αναζήτηση γονιδίων η έκφραση των οποίων οδηγεί σε επαναφορά ενός φαινοτύπου, με τη βασική προϋπόθεση ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος εκδηλώνει κάποιο φαινότυπο.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι φαινότυποι της ομαδικής, κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου με σκοπό να ανιχνευθούν τα γονίδια της υπεροικογένειας των PPIασών τα οποία προκαλούν επαναφορά των φαινοτύπων, στα επίπεδα του αγρίου τύπου. Ο αριθμός των γονιδίων που εντοπίστηκαν με αυτήν την τεχνική ήταν εντυπωσιακός. Για παράδειγμα διαπιστώθηκε ότι οι κυκλοφιλίνες, οι FKBP's εκτός της *Ectig* και οι παρβουλίνες εκτός της *EcrpiD*, έχουν τη δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου του στελέχους *ΔfkrA* κατά την ομαδική κίνηση, ενώ οι *EcfkrB*, *EcfklB* και *EcsurA* έχουν τη δυνατότητα επαναφοράς του φαινοτύπου του στελέχους *ΔfkrA* κατά την κολυμβητική κίνηση. Επίσης βρέθηκε ότι κατά την ομαδική κίνηση, ο ρόλος της *EcfkrB* υποκαθίσταται από τις *EcfkrA*, *EcfklB*, *EcslyD*, *EcrpiD* και *EcsurA*, κατά την κολυμβητική κίνηση από τις *EcfkrA*, *EcfklB* και *EcsurA* ενώ οι κυκλοφιλίνες, η *EcfklB* καθώς και η παρβουλίνη *EcrpiC* υποκαθιστούν την λειτουργία της *EcfkrB* κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι, κατά την ομαδική κίνηση και κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών μπορούν να υποκαταστήσουν τη λειτουργία της *Ectig* ενώ κατά την κολυμβητική κίνηση κανένα μέλος της υπεροικογένειας δε μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως την λειτουργία της *Ectig*. Παρομοίως, διαπιστώθηκε ότι όλα τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών έχουν την δυνατότητα επαναφοράς του φυσιολογικού φαινοτύπου στο στέλεχος *ΔslyD*, κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση ενώ σε συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίου, παρατηρήθηκε ότι σχεδόν το σύνολο των PPIασών με εξαίρεση την *Ectig* και *EcsurA* υποκαθιστά την λειτουργία της *EcslyD*. Εξετάζοντας την λειτουργική υποκατάσταση της *EcfklB* σε συνθήκες ομαδικής κίνησης διαπιστώθηκε ότι οι *EcrpiA*, *EcrpiB*, *EcfkrA*, *EcfkrB*, *EcslyD*, *EcrpiC*, *EcrpiD* και *EcsurA* έχουν την δυνατότητα υποκατάστασης της λειτουργίας της *EcfklB*. Κατά την κολυμβητική κίνηση παρατηρήθηκε, ότι σχεδόν όλα τα μέλη των PPIασών, με εξαίρεση τις *EcrpiA*, *EcrpiB* και *Ectig*, υποκαθιστούν τη λειτουργία της *EcfklB*. Όσον αφορά τον σχηματισμό του βιοϋμενίου παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των γονιδίων

*EcrpiB*, *EcrpiC* και *EcsurA* επιφέρει την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου, ενώ η έκφραση των γονιδίων *EcfkpA*, *EcfkpB*, *EcfkIB* και *EcslyD* προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου του σχηματισμού βιοϋμενίου.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι είναι δυνατή μια λειτουργική υποκατάσταση ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών. Η υπερέκφραση κάποιων πρωτεϊνών από την οικογένεια των FKBP, των κυκλοφιλινών ή των παρβουλινών σε ένα από τα οποιαδήποτε στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfkIB*, *ΔslyD* ή *Δtig*, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα PPIάσης ή/και τσαπερόνης εντός του κυττάρου, η οποία ενδεχομένως μπορεί να υποκαταστήσει την απουσία μιας FKBP πρωτεΐνης και να οδηγήσει σε ένα φυσιολογικό φαινότυπο. Πειραματικά δεδομένα που επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση αφορούν στην υπερέκφραση των γονιδίων *cpr6*, *cpr7* και *cpr1* των κυκλοφιλινών, η οποία μπορεί να υποκαταστήσει την λειτουργία της παρβουλίνης *Ess1* (Arévalo-Rodríguez et al., 2000). Επίσης, η υπερεπάρκεια της *PriD* υποκαθιστά λειτουργικά την *surA* (Dartigalongue and Raina, 1998), ενώ η υπερεπάρκεια της *FkrA* προκάλεσε επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου στο μεταλλαγμένο στέλεχος *ΔsurAΔskp*, υπό συνθήκες θερμικού σοκ (Ge et al., 2014).

Επίσης, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcrpiD* στο στέλεχος *ΔsurA* του *E. coli* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου (ευαισθησία σε αντιβιοτικά όπως το νονοβιοσίν λόγω της αυξημένης διαπερατότητας της μεμβράνης) (Dartigalongue and Satish, 1998). Επίσης η υπερέκφραση του γονιδίου της κυκλοφιλίνης *A*, *Scspr1*, αποκαθιστά τον θερμοευαίσθητο φαινότυπο μεταλλαγμένων στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae*, στα οποία το γονίδιο που κωδικοποιεί για την παρβουλίνη *Scs1* έχει απενεργοποιηθεί υποδηλώνοντας ότι η κυκλοφιλίνη *A* υποκαθιστά λειτουργικά την παρβουλίνη *Scs1* (Mendu et al., 2010). Ένα άλλο παράδειγμα της λειτουργικής υποκατάστασης αποτελεί η αλληλεπίδραση της *EcslyD* με το πεπτιδίο οδηγό *Tat* (*twin-arginine translocation pathway*) ορισμένων πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος του βακτηρίου *E. coli*. Αν και η *EcslyD* αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο οδηγό *Tat* και το αναδιπλώνει ή/και το προστατεύει από πρωτεάσες, επομένως τό καθιστά λειτουργικό, το *ΔslyD* δεν έχει συγκεκριμένο φαινότυπο, όσον αφορά την μεταφορά των πρωτεϊνών στο περιπλασμα του κυττάρου (Graubner et al., 2007). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην λειτουργική συμπληρωματικότητα της *EcslyD* από άλλες πρωτεΐνες της υπεροικογένειας των PPIασών. Δηλαδή, η απουσία της *EcslyD* μπορεί να υποκατασταθεί από την δραστηριότητα των υπολοίπων μελών της υπεροικογένειας τα οποία μπορούν να αποκαταστήσουν την λειτουργία και να επιτελέσουν την αναδίπλωση του πεπτιδίου οδηγού *Tat*. Ακόμα ένα παράδειγμα αποτελεί η πρωτεΐνη *Ectig*, η οποία δεσμεύεται στο πεπτιδίο οδηγό *Tat*, όμως δε φαίνεται να επηρεάζει τη μεταφορά των πρωτεϊνών (Jong et al., 2004).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για κάθε μια PPIάση στα μεταλλαγμένα στελέχη *ΔfkrA*, *ΔfkrB*, *ΔfkIB*, *ΔslyD* και *Δtig* οδήγησε, σε αρκετές περιπτώσεις, σε επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου της ομαδικής και κολυμβητικής κινητικότητας και σχηματισμού βιοϋμενίου. Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι οι διαφορετικές PPIάσες, όταν είναι άφθονες, πιθανώς αναγνωρίζουν μη επιλεκτικά υποστρώματα προς ισομερείωση και πιθανώς αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν ενεργά στα τρία είδη κίνησης. Ο τρόπος με τον οποίον αλληλεπιδρούν με αυτές, δηλαδή μέσω του ενεργού κέντρου μια PPIάσης ή μιας ή περισσοτέρων δομικών μιας τσαπερόνης παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, έχουμε αποτελέσματα στα οποία φαίνεται ότι, για παράδειγμα, η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου *EcslyD<sub>F132A</sub>*, στο



*ΔslyD* στέλεχος, δεν επανέφερε τον φυσιολογικό φαινότυπο της ομαδικής κίνησης, ενώ η υπερέκφραση του αγρίου τύπου γονιδίου *EcslyD*, στο *ΔslyD* στέλεχος είχε ως αποτέλεσμα την επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ενεργότητα PPIασης (ενεργό κέντρο) της *slyD* δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου. Ως εκ τούτου θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί εάν η υπερέκφραση των PPIασών που παρουσιάζουν μη ανιχνεύσιμη PPIάση ενεργότητα υποκαθιστά την αντίστοιχη άγριου τύπου PPIάση.

Η λειτουργική υποκατάσταση ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών έχει παρατηρηθεί και στα φυτά. Στους χλωροπλάστες η απώλεια της κυκλοφιλίνης AtCYP20-2 δε φαίνεται να μείωσε την συνολική δραστηριότητα PPIάσης στους χλωροπλάστες γεγονός που φαίνεται να οφείλεται στην PPIάση δραστηριότητα της AtFKBP13. Σημειώνεται ότι μόνο δυο (AtCYP20-2 και η AtFKBP13) από τις 16 κυκλοφιλίνες και FKPBs που εδράζονται στον χλωροπλάστη φαίνεται να παρουσιάζουν PPIάση δραστηριότητα (Edvardsson et al., 2007). Ωστόσο, οι δυνατότητες υποκατάστασης ενζύμων από άλλα ένζυμα εκτείνεται πέρα από την ομάδα των PPIασών. Έχει εκτιμηθεί ότι το 37% των ενζύμων του *E. coli* αναγνωρίζουν μια ποικιλία υποστρωμάτων και καταλύουν το 65% των αντιδράσεων (Nam et al., 2012). Οι Patrick et al. (2007) εντόπισαν 21 εκ των 104 μεταλλαγμένων στελεχών του *E. coli* στα οποία επανήλθε ο φαινότυπος από την υπερέκφραση ενός ή δύο γονιδίων με τη χρήση της βιβλιοθήκης ASKA. Τα γονίδια αυτά δεν είχαν ουδεμία συγγένεια, είτε μεταξύ τους, είτε με το γονίδιο το οποίο είχε απενεργοποιηθεί. Οι Miller and Raines (2004) βρήκαν ότι η υπερέκφραση τεσσάρων γονιδίων που κωδικοποιούν για πιθανές γλυκοκινάσες, με ελάχιστη ωστόσο ενεργότητα γλυκοκινάσης, επανέφερε το φαινότυπο του μεταλλαγμένου στελέχους στο οποίο είχε απενεργοποιηθεί μια γλυκοκινάση. Τέλος, οι Kim et al. (2010) έδειξαν ότι η σύνθεση μιας PLP (φωσφορικής πυριδοξάλης) στο στέλεχος *ΔrdxB* (η πρωτεΐνη PdxB καταλύει το δεύτερο στάδιο του μονοπατιού της σύνθεσης των PLP) πραγματοποιείται, όταν υπερεκφράζεται οποιοδήποτε από τα επτά διαφορετικά μη-συγγενή γονίδια.

#### **Δ.7 Ο ρόλος των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB* στην κινητικότητα και σχηματισμό βιοϋμενίου των στελεχών *ΔfkrB*, *ΔfkrA* και *ΔslyD***

Τα μέλη της υπεροικογένειας των PPIασών του *E.coli* στοχεύουν στην αναδίπλωση ορισμένων πρωτεϊνών στόχων με στόχο την ενεργοποίησή τους ώστε είτε να τις καταστήσουν λειτουργικές είτε να λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες με αποτέλεσμα αυτές να επιτελέσουν το βιολογικό τους ρόλο. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ορισμένα παραδείγματα στα οποία επισημαίνεται ότι η υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στόχους μιας PPIάσης, επιτρέπει την καταστολή ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου, δηλαδή την επαναφορά του φαινοτύπου στα επίπεδα του αγρίου τύπου. Έχει δειχθεί ότι ο θερμοευαίσθητος φαινότυπος (*ess1<sup>ts</sup>*) της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, ο οποίος οφείλεται στην απαλοιφή του γονιδίου *Scss1*, καταστέλλεται, δηλαδή η ανάπτυξη της ζύμης επιτρέπεται σε υψηλή θερμοκρασία (37°C), λόγω της υπερέκφρασης διαφόρων πρωτεϊνών. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών συμπεριλαμβάνεται η πρωτεΐνη *Scsar30* και η παρβουλίνη *Scss1*. Η *Scsar30* φαίνεται ότι αλληλεπιδρά τόσο με την παρβουλίνη *Scss1* όσο και με την κυκλοφιλίνη *A Scpr1* (Wu et al., 2000; Arévalo-Rodríguez et al., 2000). Με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkpB* στην ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα καθώς και στον σχηματισμό βιοϋμενίου, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *ΔfkrB*, στο οποίο υπερεκφράστηκαν ορισμένα γονίδια, τα οποία

κωδικοποιούν για τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους. Επίσης, υπό τις ίδιες συνθήκες ελέγχθηκαν και τα στελέχη *ΔfkrA* και *ΔslyD* στα οποία υπερέκφράστηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες στόχους της *EcfkρB*, ώστε να διερευνηθεί εάν και ποιές από τις πρωτεΐνες στόχους της *EcfkρB* είναι κοινές και για τα δύο άλλα μέλη της FKBP οικογένειας, *EcfkrA* και *EcslyD*.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkρB*, μέσω της βάσης δεδομένων IntAct. Η βάση δεδομένων περιλαμβάνει πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίστηκαν μετά από την υπερέκφραση του γονιδίου *EcfkρB.H* (His-6 επίτοπο) στο *E. coli* και την απομόνωση των σταθερών συμπλεγμάτων της *EcfkρB.H* με αυτές, μέσω της Ni-NTA χρωματογραφίας συγγενείας. Τα συμπλέγματα αναλύθηκαν, απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες οι οποίες συνεκλούνται από την στήλη Ni-NTA αγαρόζης ταυτόχρονα με την *EcfkρB.H* και έπειτα προσδιορίστηκε μερικώς η αλληλουχία των αμινοξέων τους (Arifuzzaman et al., 2006). Παρόμοια μελέτη εντόπισε και άλλες πρωτεΐνες που πιθανώς αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB* (Quistgaard et al., 2012). Ωστόσο, οι ομάδες πρωτεϊνών που προσδιορίστηκαν στις δυο προαναφερθείσες μελέτες είναι διακριτές δηλαδή κανένα μέλος της μίας ομάδας δεν υπάρχει στην άλλη ομάδα. Το κριτήριο της επιλογής των πρωτεϊνών στόχων από τις δυο παραπάνω ομάδες πρωτεϊνών ήταν η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης και οι *cis* προλίνες που διαθέτει, γεγονός το οποίο θα αύξανε τις πιθανότητες να αποτελεί πιθανό στόχο της *EcfkρB*. Ορισμένες από τις πρωτεΐνες στόχους της *EcfkρB* οι οποίες επιλέχθηκαν για την μελέτη είναι η *EcdnaK*, η οποία αποτελεί μια τσαπερόνη και φέρει μια προλίνη σε *cis* μορφή, η *EcgIpD*, η οποία επιτελεί τον καταβολισμό της γλυκερόλης και της 3-φωσφορικής γλυκερόλης και φέρει επίσης μια προλίνη σε *cis* μορφή, η *EcmreB*, η οποία συμμετέχει στη μορφογένεση και στο σχηματισμό του κυττάρου, η *EcispH*, η οποία έχει γνωστή κρυσταλλική δομή, φέρει δυο προλίνες που διατηρούν τη *cis* μορφή τους και το γονίδιο που την κωδικοποιεί εδράζεται σε ένα κοινό οπερόνιο με το γονίδιο *EcfkρB*, η *EccheA*, η οποία συμμετέχει στο σύστημα του χημειοτακτισμού και πιθανόν να συμμετέχει στο μηχανισμό της κινητικότητας του *E. coli* και η *EcfliC*, η οποία ρυθμίζει την κίνηση του βακτηρίου μέσω των μαστιγίων. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της πρωτεΐνης *EccarA*, της οποίας η ομόλογη στο *A. vinelandii* φαίνεται να σχηματίζει σταθερά συμπλέγματα με την *AnfkbA1* και την *AnfkbA2* (Dimou et al., 2012).

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε εάν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkρB* στο στέλεχος *ΔfkrB*, επηρεάζει την ομαδική κίνηση, την κολυμβητική κίνηση και το σχηματισμό βιοϋμενίου. Διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση κάθε μιας πρωτεΐνης στόχου στο στέλεχος *ΔfkrB*, επαναφέρει την ικανότητα ομαδικής, κολυμβητικής κίνησης και σχηματισμού βιοϋμενίου στα φυσιολογικά επίπεδα του στελέχους αγρίου τύπου. Ωστόσο κατά την κολυμβητική κίνηση, η υπερέκφραση των *EcgIpD*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcfliC*, *EcrpB* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔfkrB*, προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου, δηλαδή εμφανίζεται περισσότερο μειωμένη από την αντίστοιχη του στελέχους αγρίου τύπου.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν οι PPIάσες (π.χ. *EcfkrA* και *EcslyD*) που συμπληρώνουν λειτουργικά την *EcfkρB* έχουν κοινούς στόχους με την *EcfkρB*. Για αυτό τον σκοπό εξετάστηκε εάν η υπερέκφραση των πρωτεϊνών στόχων της *EcfkρB* στα στελέχη *ΔfkrA* και *ΔslyD* προκαλεί επαναφορά του φαινοτύπου του αγρίου τύπου κατά την ομαδική και κολυμβητική κίνηση και κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου. Διαπιστώθηκε ότι κατά την κολυμβητική κίνηση, ο φαινότυπος αγρίου τύπου στο στέλεχος *ΔfkrA* επαναφέρεται μόνο μετά από την έκφραση των γονιδίων *EcdnaK* και *EccheA* γεγονός που υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες *EcdnaK* και *EccheA* πιθανώς να αποτελούν κοινούς στόχους των *EcfkρB* και *EcfkrA*. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η έκφραση των *EcgIpD*, *EccarA*, *EcrpB* και *EcispH* προκαλεί μια

σχετική μείωση της κολυμβητικής κίνησης χωρίς ωστόσο να επανέρχεται ο φυσιολογικός φαινότυπος, ενώ η έκφραση των γονιδίων *EcmreB* και *EcflnC* προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου της κολυμβητικής κίνησης.

Όσον αφορά το στέλεχος *ΔslyD* διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflnC* και *EcrpOB* προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου αγρίου τύπου, ενώ η έκφραση των *EcglpD*, *EccarA* και *EcispH* αν και προκαλεί μια σχετική μείωση της κολυμβητικής ικανότητας του στελέχους *ΔslyD*, ωστόσο δεν επανέρχονται τα επίπεδα του αγρίου τύπου. Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες *EcdnaK*, *EcmreB*, *EccheA*, *EcflnC* και *EcrpOB* πιθανώς να αποτελούν κοινούς στόχους των *EcfkpB* και *EcslyD*.

Όσον αφορά την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *EcdnaK*, *EccarA* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔfkrA* προκαλεί την επαναφορά του φαινοτύπου του στελέχους αγρίου τύπου, ενώ η υπερέκφραση των γονιδίων *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA* και *EcflnC* προκαλεί καταστολή του φαινοτύπου. Αντίθετα με τα παραπάνω, η υπερέκφραση του γονιδίου *EcrpOB* στο στέλεχος *ΔfkrA* επιφέρει σημαντική αύξηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες *EcdnaK*, *EccarA* και *EcispH* και ενδεχομένως και οι *EcglpD*, *EcmreB*, *EccheA* και *EcflnC* πιθανώς να αποτελούν κοινούς στόχους των *EcfkpB* και *EcfkpA*.

Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση των γονιδίων *EccheA* και *EcispH* στο στέλεχος *ΔslyD* προκαλεί την επαναφορά του φυσιολογικού φαινοτύπου αντίθετα με την υπερέκφραση των γονιδίων *EcglpD*, *EcmreB* και *EccarA* η οποία δεν είχε επίπτωση στον φαινότυπο σχηματισμού βιοϋμενίου των στελεχών και την υπερέκφραση των *EcdnaK* και *EcflnC* η οποία προκαλεί την αύξηση του σχηματισμού βιοϋμενίου. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι πρωτεΐνες *EccheA* και *EcispH* πιθανώς να αποτελούν κοινούς στόχους των *EcfkpB* και *EcslyD*.

#### **Δ.8 Ο βιολογικός ρόλος των FKPB πρωτεϊνών του *E. coli* και του *A. vinelandii***

Η πιθανή αλληλεπίδραση μιας ΡΡΙΑσης με πρωτεΐνες στόχους της, υποδηλώνει ότι η παρουσία τους ενδεχομένως να επηρεάσει την μετρούμενη ενεργότητα ΡΡΙΑσης. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται η περίπτωση κατά την οποία η *in vitro* μετρούμενη ενεργότητα ΡΡΙΑσης της κυκλοφιλίνης *Cscyr* της πορτοκαλιάς *Citrus sinensis* μειώνεται παρουσία της PthA2 του φυτοπαθογόνου μικροοργανισμού *Xanthomonas citri*, με την οποία έχει διαπιστωθεί ότι αλληλεπιδρά (Domingues et al., 2012). Ένα δεύτερο παράδειγμα αποτελεί η παρεμπόδιση της *in vitro* μετρούμενης ενεργότητας ΡΡΙΑσης της *EcslyD*, παρουσία ενός συνθετικού πεπτιδίου, του Eper, το οποίο περιλαμβάνει τα 1-37 κατάλοιπα αμινοξέων της, αλληλεπιδρώντας με την *EcslyD*, πρωτεΐνης E του βακτηριοφάγου φΧ174 (Mendel et al., 2006).

Με στόχο την αρχική προσέγγιση της ανίχνευσης μιας πιθανής αλληλεπίδρασης της *EcfkpB* με τις πρωτεΐνες στόχους της, υπολογίστηκε η *in vitro* ενεργότητα ΡΡΙΑσης της, απουσία και παρουσία αυτών των πρωτεϊνών. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα της *EcfkpB*, παρουσία ισομοριακών συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών *EcdnaK*, *EcglpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EcrpOB* και *EcispH* μειώθηκε δραστικά σε βαθμό που δεν ήταν ανιχνεύσιμη, ενώ μειώθηκε κατά 98%, έπειτα από την προσθήκη της *EccheA* και κατά 60%, έπειτα από την προσθήκη της *EcflnC*. Εφόσον παρουσία των πρωτεϊνών *EcdnaK*, *EcglpD*, *EcmreB*, *EccarA*, *EccheA*, *EcrpOB* και *EcispH* καταστέλλεται η ενεργότητα ΡΡΙΑσης της *EcfkpB*, επομένως

είναι πιθανότερο το ενδεχόμενο να δεσμεύονται ή να αλληλεπιδρούν με την *EcfkρB* με τρόπο που να επηρεάζει το ενεργό κέντρο. Το ίδιο διερευνήθηκε για τις πρωτεΐνες *AnfkbA1* και *AnfkbA2* του *A. vinelandii*, παρουσία της πιθανής πρωτεΐνης στόχου, *AncaρA*. Η *AncaρA* εντοπίστηκε στην βάση δεδομένων IntAct, η οποία περιλαμβάνει υποψήφιες πρωτεΐνες που ενδεχομένως αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *EcfkρA* από το *E. coli* (Arifuzzaman et al., 2006; Butland et al., 2005) και αποτελεί τη μικρή υπομονάδα της συνθετάσης του καρβάμυλο-φωσφορικού οξέος. Η επιλογή της *AncaρA* έγινε με κριτήριο την παρουσία *cis* προλίνης, επομένως αποτελεί πιθανό στόχο των ΡΡΙΑσών, στη θέση 358 στην αμινοξική της ακολουθία. Η συνθετάση του καρβαμυλο-φωσφορικού οξέος καταλύει το σχηματισμό του καρβαμυλο-φωσφορικού από ένα μόριο διττανθρακικού, δύο μόρια  $Mg^{2+}ATP$  και από ένα μόριο γλουταμίνης ή αμμωνίας ως πηγής αζώτου (Anderson, 1995).

Η παρουσία της *AncaρA* προκάλεσε μείωση της ενεργότητας ΡΡΙΑσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, κατά 67% και 37%, αντίστοιχα. Ο πιθανός ανταγωνισμός της *AncaρA* με το υπόστρωμα της αντίδρασης για το ενεργό κέντρο ΡΡΙΑσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* υποδηλώνει ότι το ενεργό κέντρο αποτελεί την περιοχή στην οποία πραγματοποιείται η δέσμευση της κάθε πρωτεΐνης στόχου.

Το επόμενο βήμα της ανίχνευσης μιας πιθανής αλληλεπίδρασης των FKBP πρωτεϊνών με τις πιθανές πρωτεΐνες στόχους ήταν να διερευνηθεί η φύση της αλληλεπίδρασης και συγκεκριμένα ο σχηματισμός των σταθερών συμπλεγμάτων *in vivo* μεταξύ της *EcfkρB* και της κάθε πρωτεΐνης στόχου ή μεταξύ των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* και της *AncaρA*.

Η αλληλεπίδραση των FKBP με πρωτεΐνες στόχους φαίνεται να είναι παροδική (Ingelfinger et al., 2003; Ansari et al., 2002; Jacob et al., 2009). Εξάιρεση αποτελεί η ανακοίνωση κατά την οποία η FKBP12 σχηματίζει σταθερά συμπλέγματα με την πρωτεΐνη Ras, μια GTPάση, καθώς ισομεριώνει την προλίνη 175 του (Liu et al., 2011). Μια άλλη περίπτωση αποτελεί η σταθερή αλληλεπίδραση της παρβουλίνης Pin1 με πρωτεΐνες στόχους (Finn and Lu, 2008), ωστόσο η σταθερότητα των συμπλεγμάτων που σχηματίζει οφείλεται στην επιπρόσθετη WW περιοχή που φέρει στην οποία προσδένονται, αν όχι όλες, οι περισσότερες πρωτεΐνες στόχοι (Liu et al., 2011).

Κατά την ετερόλογη συνέκφραση όλων των πιθανών ζευγών πρωτεϊνών, διαπιστώθηκε ότι μόνο το σύμπλεγμα της *EcfkρB* με την *EccaρA* φαίνεται να είναι σταθερό, ενώ το σύμπλεγμα της *EcfkρB* με την *EcisρH* σταθεροποιήθηκε με τη χρήση του διασυνδετή DTBP. Μολονότι οι πρωτεΐνες *AnfkbA1* και *AnfkbA2* παρουσιάζουν διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά, διαπιστώθηκε ότι και οι δύο αλληλεπιδρούν με την *AncaρA*.

Το ερώτημα που τέθηκε από την ανίχνευση αυτών των αλληλεπιδράσεων ήταν το εξής: η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα στην FKBP περιοχή; Δηλαδή αποδίδεται στην ιδιότητα ΡΡΙΑσης των *EcfkρB*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2* ή στην ενεργότητα τσαπερόνης; Οι γνώσεις μας γύρω από την αλληλεπίδραση μιας ΡΡΙΑσης με μια πρωτεΐνη αφορούν, εκτός από την αναδίπλωση με την ιδιότητα τσαπερόνης, στην κατάλυση της *cis/trans* ισομερίωσης ενός πεπτιδικού δεσμού που προηγείται μιας προλίνης (Schmid, 1993). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται το παράδειγμα της πρωτεΐνης *fkrA*, η οποία παρουσιάζει ενεργότητα ΡΡΙΑσης και τσαπερόνης (Horne and Young, 1995) και η οποία αλληλεπιδρά με την τοξίνη κολισίνη, καθώς αυτή εισέρχεται στο κύτταρο, αναδιπλώνοντάς της και επιτρέποντας την τοξική της δράση στο *E. coli* με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Η κολισίνη M καθώς διαθέτει 15 προλίνες στην αμινοξική της ακολουθία, αποτελεί εξαιρετικά πιθανή πρωτεΐνη στόχος για την ΡΡΙΑση *fkrA*, όπου ενδεχομένως μία ή όλες οι προλίνες να αποτελούν σημεία πρόσδεσης για την *cis/trans*

ισομερίωση. Κατά τη διερεύνηση της πιθανότητας η κολισίνη Μ να αποτελεί υπόστρωμα της *fkrA*, κατασκευάστηκαν 15 μεταλλαγμένα στελέχη, με το κάθε στέλεχος να φέρει αντικατάσταση της προλίνης με αλανίνη και διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση οφείλεται στην *cis/trans* ισομερίωση της προλίνης 176 (Helbig et al., 2011). Ένα δεύτερο παράδειγμα αποτελεί η FKBP πρωτεΐνη *tig* του *S. pyogenes*, η οποία στοχεύει στη μοναδική προλίνη της πρωτεΐνης της κυστεΐνης για να την αναδιπλώσει και να την καταστήσει λειτουργική (Lyon and Caragon, 2003).

Με σκοπό να διερευνηθεί εάν οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρήσαμε αποδίδονται στην ιδιότητα της ΡΡιάσης των *EcfkρB*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2*, μελετήθηκε ο σχηματισμός των σταθερών συμπλεγμάτων *in vivo* μεταξύ της *EcfkρB* και των *EcispH<sub>P8A</sub>*, *EcispH<sub>P32</sub>*, δύο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στις οποίες έχουν αντικατασταθεί οι προλίνες 8 και 32 της πρωτεΐνης *EcispH* σε αλανίνη, καθώς και των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* με την *AncaρA<sub>P358A</sub>* στην οποία έχει αντικατασταθεί η προλίνη 358 με αλανίνη. Πράγματι, αποδείχτηκε, σχηματίζονται συμπλέγματα μόνο μεταξύ της *EcfkρB* και της *EcispH<sub>P32</sub>* και όχι μεταξύ της *EcfkρB* και της *EcispH<sub>P8A</sub>*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η προλίνη στην θέση 8 αποτελεί, πιθανότατα, τον λόγο της αλληλεπίδρασης της *EcispH* και της *EcfkρB* με την ιδιότητα της ΡΡιάσης και ότι αυτή η αλληλεπίδραση μοιάζει να είναι εξειδικευμένη. Όπως προαναφέρθηκε για την *EcfkρB*, η πρόσδεση πρωτεϊνών με *cis* προλίνη είναι ενζυμικά εξειδικευμένη και πραγματοποιείται εντός μιας μικρής υδρόφοβης κοιλότητας, που βρίσκεται εσωτερικά της FKBP περιοχής της (Quistgaard et al., 2012). Ωστόσο, δεν ισχύει το ίδιο για την πρωτεΐνη *Ectig* και για την *EcsurA*, για τις οποίες έχει δειχθεί ότι αναγνωρίζουν ή στοχεύουν πρωτεΐνες ανεξαρτήτως εάν περιέχουν προλίνη στην αμινοξική τους ακολουθία (Scholz et al., 1998; Webb et al., 2001). Για την *AncaρA<sub>P358A</sub>* διαπιστώθηκε ότι η προλίνη 358 αποτελεί σημείο πρόσδεσης μόνο της *AnfkbA1* και όχι της *AnfkbA2* καθώς η αλληλεπίδραση της *AncaρA<sub>P358A</sub>* με την *AnfkbA2* παρέμεινε. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι δύο πρωτεΐνες *AnfkbA1* και *AnfkbA2* δεσμεύουν την *AncaρA* σε δύο διαφορετικά σημεία, με το σημείο πρόσδεσης της *AncaρA* στην *AnfkbA2* να παραμένει άγνωστο.

Με στόχο να διαπιστωθεί εάν η ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* είναι πράγματι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με την *AncaρA*, πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη συνέκφραση της *AncaρA* με τις μεταλλαγμένες *AnfkbA1<sub>Y194A</sub>* και *AnfkbA2<sub>Y84A</sub>*. Διαπιστώθηκε ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης δεν ευθύνεται για την αλληλεπίδραση της *AncaρA* με τις *AnfkbA1<sub>Y194A</sub>* και *AnfkbA2<sub>Y84A</sub>* καθώς η αλληλεπίδραση παρέμεινε. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1* και *AnfkbA2* δεν είναι απαραίτητη για την δημιουργία σταθερών συμπλεγμάτων με την *AncaρA*, ωστόσο υπάρχει η πιθανότητα η εναπομείνασα ενεργότητα ΡΡιάσης των *AnfkbA1<sub>Y194A</sub>* και *AnfkbA2<sub>Y84A</sub>* να ευθύνεται για αυτήν την αλληλεπίδραση. Εναλλακτικά, η αλληλεπίδραση μπορεί να οφείλεται στην ενεργότητα τσαπερόνης.

Γενικά είναι αποδεκτό ότι πρωτεΐνες, που πιθανώς αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, συνεκφράζονται υπό τις ίδιες περιβαλλοντικές συνθήκες. Διαπιστώθηκε ότι όλα τα γονίδια *AnfkbX*, *AnfkbB*, *AnfkbA1* και *AnfkbA2* συνεκφράζονται σε υψηλά επίπεδα κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο στο οποίο δεν έχει προστεθεί πηγή αζώτου (βιολογική αζωτοδέσμευση του ατμοσφαιρικού) ενώ τα επίπεδα έκφρασής τους μειώνονται όταν στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης έχει προστεθεί άζωτο με τη μορφή αμμωνιακών. Φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου *AncaρA* είναι καθοριστικής σημασίας όταν η γλουταμίνη συντίθεται από την αμμωνία, η οποία παράγεται από το ατμοσφαιρικό άζωτο και όχι όταν αυτό προστίθεται εξωγενώς. Είναι, επίσης, πιθανό τα υπόλοιπα

βιολογικά υποστρώματα των δυο FKBP's να εμπλέκονται στην βιολογική δέσμευση του αζώτου. Ο ρόλος των ΡΡΙΑσών στην αζωτοδεσμευτική ικανότητα του *A. vinelandii* φαίνεται να είναι σημαντικός. Η απενεργοποίηση του γονιδίου *nifM*, το οποίο κωδικοποιεί για μια ΡΡΙΑση, της οικογένειας των παρβουλινών είχε ως αποτέλεσμα το μεταλλαγμένο στέλεχος *A. vinelandii* BG98, να επιδεικνύει τον NiF<sup>-</sup> φαινότυπο. Η ερευνητική ομάδα του Gavini έδειξε ότι η υπερέκφραση του γονιδίου *nifM* στο στέλεχος BG98 αποκατέστησε την ικανότητά του να αζωτοδεσμεύει σε θρεπτικό μέσο, απουσία αμμωνιακών. Επιπλέον έδειξαν ότι η *nifM* δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με το διμερές της νιτρογενάσης *nifH* (Gavini et al., 2006).

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της *EcFkbB* αλλά και των υπολοίπων ΡΡΙΑσών με τις πρωτεΐνες στόχους μπορεί να επεκταθεί και να συμπεριλάβει νέες *in vitro*, *in vitro* και *in silico* πειραματικές προσεγγίσεις (Milroy et al., 2014; Rao et al., 2014).

## E. Βιβλιογραφία

1. Agnoli K., Carolyn A. Lowe C.A, Farmer K.L, Husnain S.I. and Mark S. T. (2006): **The Ornibactin biosynthesis and transport genes of *Burkholderia cenocepacia* are regulated by an extracytoplasmic function  $\sigma$  Factor which is a part of the Fur regulon.** J. Bacteriol. 188: 3631–3644.
2. Alberti L. and Harshey R.M. (1990): **Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells.** J. Bacteriol. 172: 4322-4328.
3. Allison C. and Hughes C. (1991): **Closely linked genetic loci required for swarm cell differentiation and multicellular migration by *Proteus mirabilis*.** Mol. Microbiol. 8: 1975–1982.
4. Ansari H., Greco G. and Luban J. (2002): **Cyclophilin A Peptidyl-Prolyl Isomerase Activity Promotes Zpr1 Nuclear Export.** Mol. Cell Biol. 22: 6993–7003.
5. Antoniani D., Bocci P., Maciag A., Raffaelli N. and Landini P. (2009): **Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 85: 1095–1104.
6. Arévalo-Rodríguez M., Cardenas M.E., Wu X., Hanes S.D. and Heitman J. (2000): **Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3–Rpd3 histone deacetylase.** EMBO J. 19: 3739-3749.
7. Arévalo-Rodríguez M., Wu X., Hanes S.D., Heitman J. (2004): **Prolyl isomerase in yeast.** Front. Biosci. 9: 2420-2446.
8. Arie J.P., Sassoon N. and Betton J.M. (2001): **Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of Escherichia coli.** Mol. Microbiol. 39: 199–210.
9. Arnold F.H. (1991): **Metal-Affinity Separations: A New Dimension in Protein Processing.** Bio/Technology. 9: 151-156.
10. Atencio D., Barnes C., Duncan T.M, Willis I.M., Hanes S.D. (2014): **The Yeast Ess1 Prolyl Isomerase Controls Swi6 and Whi5 Nuclear Localization.** G3 (Bethesda). 4: 523-537.
11. Aviezer-Hagai K., Skovorodnikova J., Galigniana M., Farchi-Pisanty O., Maayan E., Bocovza S., Efrat Y., von Koskull-Döring P., Ohad N. and Breiman A. (2007): **Arabidopsis immunophilins ROF1 (AtFKBP62) and ROF2 (AtFKBP65) exhibit tissue specificity, are heat-stress induced, and bind Hsp90.** Plant Mol. Biol. 63: 237-255.
12. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L. and Mori H. (2006): **Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.** Mol. Syst. Biol. 2:2006.0008.
13. Baker M.D., Wolanin P.M. and Stock J.B. (2006): **Systems biology of bacterial chemotaxis.** Curr. Opin. Microbiol. 9: 187-192.
14. Bao L., Kimzey A., Sauter G., Sowadski J.M., Lu K.P. and Wang D.G. (2004): **Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers.** Am. J. Pathol. 164: 1727-37.
15. Barik S. (2006): **Immunophilins: for the love of proteins.** Cell. Mol. Life Sci. 63: 2889-2900.
16. Bees M.A., Andresen P., Mosekilde E. and Givskov M. (2002): **Quantitative effects of medium hardness and nutrient availability on the swarming motility of Serratia liquefaciens.** Bull. Math. Biol. 64: 565-587.

17. Behrens S., Maier R., de Cock H., Schmid F.X. and Gross C.A. (2001): **The SurA periplasmic PPIase lacking its parvulin domains functions in vivo and has chaperone activity.** EMBO J. 20: 285-294.
18. Belas R., Erskine D. and Flaherty D. (1991): **Proteus mirabilis mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behaviour.** J. Bacteriol. 19: 6279-6288.
19. Beloin C., Valle J., Latour-Lambert P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J.A., Molin S., Prensier G., Arbeille B. and Ghigo J.M. (2004): **Global impact of mature biofilm lifestyle on Escherichia coli K-12 gene expression.** Mol. Microbiol. 51: 659-674.
20. Bernhardt T.G., Roof W.D. and Young R. (2002): **The Escherichia coli FKBP-type PPIase SlyD is required for the stabilization of the E lysis protein of bacteriophage-X174.** Mol. Microbiol. 45: 99-108.
21. Bissoli G., Ninoles R., Fresquet S., Palombieri S., Bueso E., Rubio L., Garcia-Sanchez M., Fernandez J.A., Mulet J.M. and Serrano R. (2012): **Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in Arabidopsis.** Plant J. 70: 704-716.
22. Bitto E. and McKay D.B. (2002): **Crystallographic structure of SurA, a molecular chaperone that facilitates folding of outer membrane porins.** Structure. 10: 1489-1498.
23. Blum P., Ory J., Bauernfeind J. and Krska J. (1992): **Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in Escherichia coli.** J. Bacteriol. 174: 7436-7444.
24. Boles B.R. and McCarter L.L. (2002): **Vibrio parahaemolyticus scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation.** J. Bacteriol. 184: 5946-5954.
25. Boles B.R., Thoendel M. and Singh P.K. (2005): **Rhamnolipids mediate detachment of Pseudomonas aeruginosa from biofilms.** Mol. Microbiol. 57: 1210-1223.
26. Bordo D. and Bork P. (2002): **The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations.** EMBO Rep. 3: 741-746.
27. Bothmann H. and Pluckthun A. (2000): **The periplasmic Escherichia coli peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines.** J. Biol. Chem. 275: 17100-17105.
28. Branden C. and Tooze J. **Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών** (1999), 2η έκδοση.
29. Brasseur A., Rotureau B., Vermeersch M., Blisnick T., Salmon D., Bastin P., Pays E., Vanhamme L. and Pérez-Morga D. (2013): **Trypanosoma brucei FKBP12 differentially controls motility and cytokinesis in procyclic and bloodstream forms.** Eukaryotic Cell. 12: 168-181.
30. Broccoli, S., P. Phoenix, and M. Drolet. 2000. **Isolation of the topB gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of topA null mutations in Escherichia coli.** Mol. Microbiol. 35: 58-68.
31. Buchner J., Grallert H., and Jakob U. (1998): **Analysis of chaperone function using citrate synthase as a nonnative substrate.** Methods Enzymol. 290: 323-338.
32. Budiman C., Angkawidjaja C., Motoike H., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2011): **Crystal structure of N-domain of FKBP22 from Shewanella sp. SIB1: dimer dissociation by disruption of Val-Leu knot.** Protein Sci. 20: 1755-1764.
33. Budiman C., Bando K., Angkawidjaja C., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2009): **Engineering of monomeric FK506-binding protein 22 with peptidyl prolyl cis-trans isomerase. Importance of a V-shaped dimeric structure for binding to protein substrate.** FEBS J. 276: 4091-4101.



34. Budiman C., Tadokoro T., Angkawidjaja C., Koga Y. and Kanaya S. (2012): **Role of polar and nonpolar residues at the active site for PPIase activity of FKBP22 from *Shewanella* sp. SIB1.** FEBS J. 279: 976-986.
35. Burkart M., Toguchi A. and Harshey R.M. (1998): **The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 2568-2573.
36. Butland G., Peregrin-Alvarez JM., Li J., Yang W., Yang X., Canadien V., Starostine A., Richards D., Beattie B., Krogan N., Davey M., Parkinson J., Greenblatt J. and Emili A. (2005): **Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*.** Nature. 433: 531-537.
37. Caiazza N.C., Shanks R.M. and O'Toole G.A. (2005): **Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*.** J. Bacteriol. 187: 7351-7361.
38. Callebaut I. and Mornon J.P. (1995): **Trigger Factor, One of the *Escherichia coli* Chaperone Proteins, Is an Original Member of the FKBP Family.** FEBS Lett. 374: 211-215.
39. Cameron A.M., Steiner J.P., Roskams A.J., Ali S.M., Ronnett G.V. and Snyder S.H. (1995): **Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca<sup>2+</sup> flux.** Cell. 83: 463-472.
40. Chakraborty A., Das I., Datta R., Sen B., Bhattacharyya D., Mandal C. and Datta AK. (2002): **A single-domain cyclophilin from *Leishmania donovani* reactivates soluble aggregates of adenosine kinase by isomerase-independent chaperone function.** J. Biol. Chem. 277: 47451-47460.
41. Cheng T., Li H., Xia W. and Sun H. (2012): **Multifaceted SlyD from *Helicobacter pylori*: implication in [NiFe] hydrogenase maturation.** J. Biol. Inorg. Chem. 17: 331-343.
42. Cheng T., Li H., Yang X., Xia W. and Sun H. (2013): **Interaction of SlyD with HypB of *Helicobacter pylori* facilitates nickel trafficking.** Metallomics. 5(7): 804-807.
43. Chilcott G.S. and Hughes K.T. (2000): **Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enteric serovar typhimurium* and *Escherichia coli*.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 694-708.
44. Clubb R.T., Ferguson S.B., Walsh C.T. and Wagner G. (1994): **Three-dimensional solution structure of *Escherichia coli* periplasmic cyclophilin.** Biochemistry. 33: 2761-2772.
45. Compton L.A., Davis J.M., Macdonald J.R. and Bächinger H.P. (1992): **Structural and functional characterization of *Escherichia coli* peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases.** Eur. J. Biochem. 206: 927-934.
46. Conant G.C. and Wagner A. (2004): **Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*.** Proc. Biol. Sci. 271: 89-96.
47. Copeland M.F. and Weibel D.B. (2009): **Bacterial Swarming: A Model System for Studying Dynamic Self-assembly.** Soft Matter. 5: 1174-1187.
48. Cosmina P., Rodriguez F., de Ferra F., Grandi G., Perego M., Venema G. and van Sinderen D. (1993): **Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*.** Mol. Microbiol. 8: 821-831.
49. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott H.M. (1995): **Microbial biofilms.** Annu. Rev. Microbiol. 49, 711-745.

50. Crooke E. and Wickner W. (1987): **Trigger factor: a soluble protein that folds pro-OmpA into a membrane-assembly-competent form.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 84: 5216-5220.
51. Da Re S., Valle J., Charbonnel N., Beloin C., Latour-Lambert P., Faure P., Turlin E., Le Bouguéne C., Renaud-Mongénie G., Forestier C. and Ghigo J. (2013): **Identification of Commensal *Escherichia coli* Genes Involved in Biofilm Resistance to Pathogen Colonization.** PLoS ONE 8(5): e61628.
52. Danese P. N. and Silhavy T. J. (1998): **Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*.** Annu. Rev. Genet. 32: 59 – 94.
53. Darnton N.C., Turner L., Rojevsky S., and Berg. H.C. (2010): **Dynamics of bacterial swarming.** Biophys. J. 98: 2082-2090.
54. Dartigalongue C. and Raina S. (1998): **A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*.** EMBO J. 17: 3968-3980.
55. Davey M.E. and O’Toole G.A. (2000): **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847–867.
56. Davis T.L., Walker J.R., Campagna-Slater V., Finerty P.J., Paramanathan R., Bernstein G., MacKenzie F., Tempel W., Ouyang H., Lee W.H., Eisenmesser E.Z. and Dhe-Paganon S. (2010): **Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases.** PLoS Biol. 8(7): e1000439.
57. De Cenzo M.T., Park S.T., Jarrett B.P., Aldape R.A., Futer O., Murcko M.A. and Livingston D.J. (1996): **FK506-binding protein mutational analysis: defining the active-site residue contributions to catalysis and the stability of ligand complexes.** Protein Engin. 9:173-180.
58. DeLuna A., Vetsigian K., Shores N., Hegreness M., Colón-González M., Chao S. and Kishony R. (2008): **Exposing the fitness contribution of duplicated genes.** Nat Genet. 40: 676–681.
59. Deuerling E., Schulze-Specking A., Tomoyasu T., Mogk A. and Bukau B. (2003): **Trigger factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities.** Mol. Microbiol. 47: 1317–1328.
60. Díaz-Barrera A. and Soto E. (2010): **Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state limits and prospects.** African J. Biotechnol. 9: 5240-5250.
61. Dimou M., Venieraki A., Liakopoulos G., Kouri E.D., Tampakaki A. and Katinakis P. (2011): **Gene expression and biochemical characterization of *Azotobacter vinelandii* cyclophilins and Protein Interaction Studies of the cytoplasmic isoform with dnaK and lpxH.** J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 20: 176-190.
62. Dixon R. and Kahn D. (2004): **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** Nat. Rev. Microbiol. 2: 621-631.
63. Dolinski K.J. and Heitman J. (1999): **Hmo1p, a high mobility group 1/2 homolog, genetically and physically interacts with the yeast FKBP12 prolyl isomerase.** Genetics. 151: 935-944.
64. Domingues M.N., Campos B.M., de Oliveira M.L.P., de Mello U.Q. and Benedetti C.E. (2012): **TAL effectors target the c-terminal domain of RNA polymerase II (CTD) by inhibiting the prolyl-isomerase activity of a CTD-associated cyclophilin.** PLoS ONE. 7(7): e41553.

65. Dominguez-Solis J.R., He Z., Lima A., Ting J., Buchanan B.B. and Luan S. (2008): **A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 16386-16391.
66. Domka J., Lee J., Bansal T. and Wood T.K. (2007): **Temporal gene expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms.** Environ. Microbiol. 9: 332–346.
67. Donlan R.M. (2001): **Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process.** Clin. Infect. Dis. 33:1387-1392.
68. Donlan R.M. (2002): **Biofilms: microbial life on surfaces.** Emerg. Infect. Dis. 8: 881–890.
69. Dorel C., Vidal O., Prigent-Combaret C., Vallet I. and Lejeune P. (1999): **Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation.** FEMS Microbiol Lett. 178: 169–175.
70. Dunne W.M. Jr (2002): **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** Clin. Microbiol. Rev. 15, 155-166.
71. Edvardsson A., Shapiguzov A., Petersson U.A., Wolfgang P., Schröder W.P. and Alexander V. Vener (2007): **Immunophilin AtFKBP13 Sustains All Peptidyl–Prolyl Isomerase Activity in the Thylakoid Lumen from *Arabidopsis thaliana* Deficient in AtCYP20-2.** Biochemistry. 46:9432-9433.
72. Epstein C.J., Golberger R.F. and Anfinsen C.B. (1963): **The genetic control of tertiary protein structure: Studies with model systems.** Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 439–449.
73. Faure J.D., Gingerich D. and Howell S.H. (1998): **An Arabidopsis immunophilin, AtFKBP12, binds to AtFIP37 (FKBP interacting protein) in an interaction that is disrupted by FK506.** Plant J. 15: 783-789.
74. Faure J.D., Vittorioso P., Santoni V., Fraissier V., Prinsen E., Barlier I., Van Onckelen H., Caboche M. and Bellini C. (1998): **The PASTICCINO genes of *Arabidopsis thaliana* are involved in the control of cell division and differentiation.** Development. 125: 909-918.
75. Ferbitz L., Maier T., Patzelt H., Bukau B., Deuerling E. and Ban N. (2004): **Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins.** Nature. 431: 590-596.
76. Finn G. and Lu K.P. (2008): **Phosphorylation-specific prolyl isomerase Pin1 as a new diagnostic and therapeutic target for cancer.** Curr. Cancer Drug Targets. 8: 223-229.
77. Fischer G., Bang H., Ludwig B., Mann K. and Hacker J. (1992): **Mip protein of *Legionella pneumophila* exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity.** Mol. Microbiol. 6: 175– 183.
78. Fischer G., Gallay P. and Hopkins S. (2010): **Cyclophilin inhibitors for the treatment of HCV infection.** Curr. Opin. Investig. Drugs. 11: 911-918.
79. Fischer G., Tradler T. and Zarnt T. (1998): **The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases in vivo: binding vs catalysis.** FEBS Lett 426: 17–20.
80. Fraser G.M. and Hughes C. (1999): **Swarming motility.** Curr Opin. Microbiol. 2(6): 630-635.
81. Freeman B.C., Toft D.O. and Morimoto R.I. (1996): **Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin CyP40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23.** Science 274: 1718–1720.
82. Friedman J. and Weissman I. (1991): **Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA.** Cell. 66: 799-806.

83. Fu A., He Z., Lima A., Buchanan B.B. and Luan S. (2007): **A chloroplast cyclophilin functions in the assembly and maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 15947-15952.
84. Fujiyama S., Yanagida M., Hayano T., Miura Y., Isobe T., Fujimori F., Uchida T. and Takahashi N. (2002): **Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes**. J. Biol. Chem. 277: 23773-23780.
85. Furutani M., Ideno A., Iida T. and Maruyama T. (2000): **FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*, has chaperone-like activity in vitro**. Biochemistry. 39: 453-462.
86. Gaestel M. (2006): **Molecular Chaperones in Health and Disease**. Springer.
87. Galat A. (1993): **Peptidyl proline *cis/trans* isomerases: immunophilins**. Eur. J. Biochem. 216: 689-707.
88. Galat A. (2003): **Peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions**. Curr. Top. Med. Chem. 3: 1315-1347.
89. Galat A. and Bua J. (2010): **Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands**. Cell. Mol. Life Sci. 67: 3467-3488.
90. Galat A (2013). **Functional diversity and pharmacological profiles of the FKBP and their complexes with small natural ligands**. Cell. Mol. Life Sci. : 70:3243-3275.
91. Galperin M.Y. (2004): **Bacterial signal transduction network in a genomic perspective**. Environ. Microbiol. 6: 552-567.
92. Galperin M.Y. (2010): **Diversity of structure and function of response regulator output domains**. Curr. Opin. Microbiol. 13: 150-159.
93. Gasser C.S., Gunning D.A., Budelier K.A. and Brown S.M. (1990): **Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 9519-9523.
94. Gavini N., Tungtur S. and Pulacat L. (2006): **Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase-Independent Functional NifH Mutant of *Azotobacter vinelandii***. J. Bacteriol. 188: 6020-6025.
95. Ge R.G., Wang D.X., Hao M.C. and Sun X.S. (2013): **Nickel trafficking system responsible for urease maturation in *Helicobacter pylori***. World J. Gastroenterol. 19: 8211-8218.
96. Ge X., Lyu Z.X., Liu Y., Wang R., Zhao X.S., Fu X. and Chang Z. (2014): **Identification of FkpA as a key quality control factor for the biogenesis of outer membrane proteins under heat shock conditions**. J Bacteriol. 196: 672-680.
97. Geisler M. and Bailly A. (2007): **Tête-à-tête: the function of FKBP in plant development**. Trends Plant Sci. 12: 465-473.
98. Genevaux P., Keppel F., Schwager F., Langendijk-Genevaux P.S., Hartl F.U. and Georgopoulos C. (2004): **In vivo analysis of the overlapping functions of DnaK and trigger factor**. EMBO Rep. 5(2): 195-200.
99. Gething M.J. and Sambrook J. (1992): **Protein folding in the cell**. Nature 355: 33-45.
100. Ghannoum M.A. and O'Toole G.A. (2004): **Microbial Biofilms**. ASM Press.
101. Ghigo J.M. (2004): **Preparation of ready-to-use lambda-red electrocompetent cells**. Institut Pasteur.

102. Giavalisco P., Kapitza K., Kolasa A., Buhtz A. and Kehr J. (2006): **Towards the proteome of Brassica napus phloem sap**. Proteomics 6: 896-909.
103. Gollan P.J. and Bhawe M. (2010): **Genome-wide analysis of genes encoding FK506-binding proteins in rice**. Plant Mol. Biol. 72:1-16.
104. Gollan P.J., Bhawe M. and Aro E.M. (2012): **The FKBP families of higher plants: Exploring the structures and functions of protein interaction specialists**. FEBS Lett. 586: 3539-3547.
105. Gong Y.H., Chen M., Xu Y., Dong N., Sang Z., Liu J. and Yuan Y. (2011): **Subtractive hybridization analysis of gastric diseases-associated *Helicobacter pylori* identifies peptidyl-prolyl isomerase as a potential marker for gastric cancer**. FEMS Microbiol. Lett. 320: 103-109.
106. Gonzalez Barrios A.F., Zuo R., Hashimoto Y., Yang L., Bentley W.E. and Wood T.K. (2006): **Autoinducer 2 controls biofilm formation in *E. coli* through a novel motility quorum sensing regulator (MqsR, B3022)**. J. Bacteriol. 188: 305–316.
107. Göthel S.F. and Marahiel M.A. (1999): **Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts**. Cell. Mol. Life Sci. 55(3): 423-436.
108. Gottesman S., Trisler P. and Torres-Cabassa A. (1985): **Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes**. J. Bacteriol. 162: 1111–1119.
109. Gottschalk M., Dolgener E., Xoconostle-Cázares B., Lucas W.J., Komor E. and Schobert C. (2008): **Ricinus communis cyclophilin: functional characterization of a sieve tube protein involved in protein folding**. Planta. 228: 687-700.
110. Graubner W., Schierhorn A. and Brüser T. (2007): **DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone**. J. Biol. Chem. 282: 7116-7124.
111. Gu Z., Steinmetz L.M., Gu X., Scharfe C., Davis R.W. and Li W.H. (2003): **Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations**. Nature. 421: 63–66.
112. Guard-Petter J. (1998): **Variants of smooth *Salmonella enteric* Serovar enteritidis that grow to higher cell density than the wild type are more virulent**. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2166-2172.
113. Gullerova M., Barta A. and Lorkovic Z.J. (2006): **AtCyp59 is a multidomain cyclophilin from Arabidopsis thaliana that interacts with SR proteins and the C-terminal domain of the RNA polymerase II**. RNA 12: 631-643.
114. Gupta R., Lakshminpathy S.K., Chang H.C., Etchells S.A. and Hartl F.U. (2010): **Trigger factor lacking the PPIase domain can enhance the folding of eukaryotic multi-domain proteins in *Escherichia coli***. FEBS Lett. 584: 3620-3624.
115. Guthrie B. and Wickner W. (1990): **Trigger factor depletion or overproduction causes defective cell division but does not block protein export**. J Bacteriol. 172: 5555-5562.
116. Gygi D., Rahman M.M., Lai H.C., Carlson J.R., Guard-Petter J. and Hughes C. (1995): **A cell surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis***. Mol. Microbiol. 17: 1167– 1175.
117. Han K.Y., Song J.A., Ahn K.Y., Park J.S., Seo H.S. and Lee J. (2007): **Solubilization of aggregation-prone heterologous proteins by covalent fusion of stress-responsive *Escherichia coli* protein, SlyD**. Protein Eng. Des. Sel. 20: 543-549.

118. Han X., Bai H., Liu L., Dong H., Liu R., Song J., Ding C., Qi K., Liu H. and Yu S. (2013): **The luxS gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli***. *Microb. Pathog.* 55: 21–27.
119. Hancock V. and Klemm P. (2007): **Global gene expression profiling of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* during biofilm growth in human urine**. *Infect. Immun.* 75: 966–976.
120. Harding M.W., Galat A., Uehling D.E. and Schreiber S.L. (1989): **A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase**. *Nature.* 341:758-760.
121. Harrar Y., Bellini C. and Faure J.D. (2001): **FKBPs: at the crossroads of folding and transduction**. *Trends Plant Sci.* 6: 426-431.
122. Harremoës (1977): **Half-order reactions in biofilm and filter kinetics**. *Vatten* 33: 122-143.
123. Harshey R.M. (1994): **Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria**. *Molecular Microbiology* 13: 389-394.
124. Harshey R.M. (2003): **Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal**. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 249–273.
125. Harshey R.M. and Matsuyama T. (1994): **Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8631-8335.
126. Hartl F.U. and Hayer-Hartl M. (2002): **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein**. *Science.* 295: 1852-1858.
127. Hartman J.L., Garvik B. and Hartwell L. (2001): **Principles for the buffering of genetic variation**. *Science.* 291: 1001–1004.
128. Hazelbauer G.L., Falke J.J., Parkinson J.S. (2008): **Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays**. *Trends Biochem. Sci.* 33: 9-19.
129. He Z., Li L. and Luan S. (2004): **Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis**. *Plant Physiol.* 134: 1248-1267.
130. Helbig J.H., König B., Knosp H., Bubert B., Yu C., Luck C.P., Riboldi-Tunncliffe A., Hilgenfeld R., Jacobs E., Hacker J. and Fischer G. (2003): **The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells**. *Biol. Chem.* 384(1): 125-137.
131. Helbig S., Patzer S.I., Schiene-Fischer C., Zeth K. and Braun V. (2011): **Activation of colicin M by the FkpA prolyl cis-trans isomerase/chaperone**. *J. Biol. Chem.* 286: 6280-6290.
132. Hennig L., Christner C., Kipping M., Schelbert B., Rücknagel K.P., Grabley S., Küllertz G. and Fischer G. (1998): **Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl cis/trans isomerases by juglone**. *Biochemistry.* 37: 5953-5960.
133. Hesterkamp T. and Bukau B. (1996): **Identification of the prolyl isomerase domain of *Escherichia coli* trigger factor**. *FEBS Lett.* 385: 67-71.
134. Hesterkamp T., Deuerling E. and Bukau B. (1997): **The amino-terminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes**. *J. Biol. Chem.* 272: 21865-21871.
135. Hoffmann A., Bukau B. and Kramer G. (2010): **Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor**. *Biochim. Biophys. Acta.* 1803: 650-661.
136. Hooper L.V. and Gordon J.I. (2001): **Commensal host-bacterial relationships in the gut**. *Science.* 292: 1115-1158.

137. Horne S.M. and Young K.D. (1995): ***Escherichia coli* and other species of the Enterobacteriaceae encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins.** Arch. Microbiol. 163: 357-365.
138. Horne S.M., Kottom T.J., Nolan L.K., and Young K.D. (1997): **Decreased intracellular survival of an fkpA mutant of *Salmonella typhimurium Copenhagen*.** Infect. Immun. 65:806-810.
139. Hottenrott S., Schumann T., Pluckthun A., Fischer G. and Rahfeld J.U. (1997): **The *Escherichia coli* SlyD is a metal ion regulated peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase.** J. Biol. Chem. 272: 15697-15701.
140. Houry W.A., Frishman D., Eckerskorn C., Lottspeich F. and Hartl F.U. (1999): **Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL.** Nature. 402: 147-154.
141. Hu K., Galius V., and Pervushin K. (2006): **Structural plasticity of peptidyl-prolyl isomerase sFkpA is a key to its chaperone function as revealed by solution NMR.** Biochemistry 45: 11983-11991.
142. Hullmann J., Patzer S.I., Römer C., Hantke K. and Braun V. (2008): **Periplasmic chaperone FkpA is essential for imported colicin M toxicity.** Mol Microbiol. 69: 926-937.
143. Humphreys S., Rowley G., Stevenson A., Kenyon W. J., Spector M. P., and Roberts M. (2003): **Role of periplasmic peptidylprolyl isomerases in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* virulence.** Infect. Immun. 71: 5386-5388.
144. Hung D.L., Raivio T.L., Jones C.H., Silhavy T.J. and Hultgren S.J. (2001): **Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili.** EMBO J20: 1508–1518.
145. Hunter T. (1998): Prolyl isomerases and nuclear function. Cell. 92: 141-143.
146. Ideno A., Yoshida T., Furutani M. and Maruyama T. (2000): **The 28.3 kDa FK506 binding protein from a thermophilic archaeum, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, protects the denaturation of proteins *in vitro*.** Eur. J. Biochem. 267: 3139–3148.
147. Igo M.M., Slauch J.M. and Silhavy T.J. (1990): **Signal transduction in bacteria: kinases that control gene expression.** New Biol. 2: 5–9.
148. Ikura T. and Ito N. (2007): Requirements for peptidyl-prolyl isomerization activity: **A comprehensive mutational analysis of the substrate-binding cavity of FK506-binding protein 12.** Protein Sci. 16: 2618–2625.
149. Ingelfinger D., Göthel S.F., Marahiel M.A., Reidt U., Ficner R., Lührmann R. and Achsel T. (2003): **Two protein-protein interaction sites on the spliceosome-associated human cyclophilin CypH.** Nucleic Acids Res. 31: 4791-6.
150. Inoue K., Alsina J., Chen J. and Inouye M. (2003): **Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. 48: 1005–1016.
151. Inoue T., Shingaki R., Hirose S., Waki K., Mori H. and Fukui K. (2007): **Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12.** J. Bacteriol. 189: 950-957.
152. Isaki L., Beers R. and Wu H.C. (1990): **Nucleotide Sequence of the *Pseudomonas fluorescens* Signal Peptidase II Gene (*Isp*) and Flanking Genes.** J Bacteriol. 172: 6512-6517.
153. Ivery M.T.G. (2000): **Immunophilins: switched on protein binding domains?** Med. Res. Rev. 20: 452–484.
154. Jahn C.E., Charkowski A.O. and Willis D.K. (2008): **Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation.** J. Microbiol. Methods. 75: 318-324.

155. Jakob R.P., Zoldák G., Aumüller T. and Schmid FX. (2009): **Chaperone domains convert prolyl isomerases into generic catalysts of protein folding.** Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 20282-20287.
156. Jiang Z-Y., Rushing B.G., Bai .Y, Gest H. and Bauer C.E. (1998): **Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis.** J Bacteriol. 180: 1248-1255.
157. Jong W.S., ten Hagen-Jongman C.M., Genevaux P., Brunner J., Oudega B. and Luirink J. (2004): **Trigger factor interacts with the signal peptide of nascent Tat substrates but does not play a critical role in Tat-mediated export.** Eur. J. Biochem. 271: 4779-4787.
158. Kaluarachchi H., Siebel J.F., Kaluarachchi-Duffy S., Krecisz S., Sutherland D.E., Stillman M.J. and Zamble D.B. (2011): **Metal selectivity of the *Escherichia coli* nickel metallochaperone, SlyD.** Biochemistry. 50: 10666-10677.
159. Kamphausen T., Fanghanel J., Neumann D., Schulz B. and Rahfeld J.U. (2002): **Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90.** Plant J. 32: 263–276.
160. Kamphausen T., Fanghänel J., Neumann D., Schulz B. and Rahfeld J.U. (2002): **Characterization of *Arabidopsis thaliana* AtFKBP42 that is membrane-bound and interacts with Hsp90.** Plant J. 32: 263-276.
161. Kandror O. and Goldberg A.L. (1997): **Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94(10): 4978-4981.
162. Kandror O., Sherman M., Moerschell R. and Goldberg A.L. (1997): **Trigger factor associates with GroEL in vivo and promotes its binding to certain polypeptides.** J. Biol. Chem. 272: 1730-1734.
163. Kang C.B., Hong Y., Dhe-Paganon S. and Yoon H.S. (2008): **FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions.** Neurosignals. 16: 318-325.
164. Kaper J.B., Nataro J.P. and Mobley H.L. (2004): **Pathogenic *Escherichia coli*.** Nat. Rev. Microbiol. 2: 123-140.
165. Kearns D.B. (2010): **A field guide to bacterial swarming motility.** Nat Rev Microbiol. 8: 634–644.
166. Kearns D.B. and Losick R. (2003): **Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*.** Mol. Microbiol. 49: 581-590.
167. Kenyon W.J., Humphreys S., Roberts M. and Spector M.P. (2010): **Periplasmic peptidyl-prolyl isomerases SurA and FkpA play an important role in the starvation-stress response (SSR) of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.** Anton. Van Leeuwen. 98: 51-63.
168. Kessler D., Papatheodorou P., Stratmann T., Dian E.A., Hartmann-Fatu C., Rassow J., Bayer P. and Mueller J.W. (2007): **The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae.** BMC Biol. 5: 37.
169. Kim J., Kershner J.P., Novikov Y., Shoemaker R.K. and Copley S.D. (2010): **Three serendipitous pathways in *E. coli* can bypass a block in pyridoxal 5'-phosphate synthesis.** Mol Sys Biol 6: 436.
170. Kim W., Killam T., Sood V. and Surette M.G. (2003): **Swarm-cell differentiation in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* results in elevated resistance to multiple antibiotics.** J. Bacteriol. 185: 3111–3117.



171. Kitagawa M., Ara T., Arifuzzaman M., Ioka-Nakamichi T., Inamoto E., Toyonaga H. and Mori H. (2005): **Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research.** DNA Res. 12: 291-299.
172. Klappa P., Ruddock L.W., Darby N.J. and Freedman R.B. (1998): **The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins.** EMBO J. 17: 927-935.
173. Kleerebezem M., Heutink M. and Tommassen J. (1995): **Characterization of an *Escherichia coli* rotA mutant, affected in periplasmic peptidyl-prolyl cis/trans isomerase.** Mol. Microbiol. 18: 313-320.
174. Kofron J.L., Kuzmic P., Kishore V., Colón-Bonilla E. and Rich D.H. (1991): **Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay.** Biochemistry. 30: 6127-6134.
175. Köhler R., Fanghänel J., König B., Lüneberg E., Frosch M., Rahfeld J.U., Hilgenfeld R., Fischer G., Hacker J. and Steinert M. (2003): **Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidyl prolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*.** Infect. Immun. 71: 4389-4397.
176. Koletsky A.J., Harding M.W. and Handschumacher R.E. (1986): **Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues.** J. Immunol. 137: 1054-1059.
177. Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., Clardy J., Kolter R. and Losick R. (2010): **d-amino acids trigger biofilm disassembly.** Science. 328: 627-629.
178. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Pinkner J.S. and Hultgren S.J. (2009): **QseC-mediated dephosphorylation of QseB is required for expression of genes associated with virulence in uropathogenic *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. 73: 1020-1031.
179. Kouri E.D., Labrou N.E., Garbis S.D., Kalliampakou K.I., Stedel C., Dimou M., Udvardi M.K., Katinakis P. and Flemetakis E. (2009): **Molecular and Biochemical Characterization of the Parvulin-Type PPlases in *Lotus japonicus*.** Plant Physiol. 150: 1160-1173.
180. Kramer G., Patzelt H., Rauch T., Kurz T.A., Vorderwülbecke S., Bukau B. and Deuerling E. (2004): **Trigger factor peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity is not essential for the folding of cytosolic proteins in *Escherichia coli*.** J. Biol. Chem. 279: 14165-14170.
181. Kurek I., Aviezer K., Erel N., Herman E. and Breiman A. (1999): **The wheat peptidyl prolyl cis trans-isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated.** Plant Physiol. 119: 693-704.
182. Lazar S.W. and Kolter R. (1996): **SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins.** J. Bacteriol. 178: 1770-1773.
183. Lazar S.W., Almirón M., Tormo A. and Kolter R. (1998): **Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival.** J. Bacteriol. 180: 5704-5711.
184. Leach M.R., Zhang J.W. and Zamble D.B. (2007): **The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD.** J Biol Chem. 282(22): 16177-16186.
185. Lee J., Jayaraman A. and Wood T.K. (2007): **Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA.** BMC Microbiol. 7: 42.

186. Levy R., Ahluwalia K., Bohmann D.J., Giang H.M., Schwimmer L.J., Issafras H., Reddy N.B., Chan C., Horwitz A.H. and Takeuchi T. (2013): **Enhancement of antibody fragment secretion into the *Escherichia coli* periplasm by co-expression with the peptidyl prolyl isomerase, FkpA, in the cytoplasm.** J. Immun. Meth. 30:10-21.
187. Lewis K. (2001): **Riddle of Biofilm Resistance.** Antimicrob Agents Chemother. 45(4): 999–1007.
188. Li H. and Luan S. (2010): **AtFKBP53 is a histone chaperone required for repression of ribosomal RNA gene expression in *Arabidopsis*.** Cell Res. 20: 357-366.
189. Li H., He Z., Lu G., Lee S.C., Alonso J., Ecker J.R., Luan S. (2007): **A WD40 domain cyclophilin interacts with histone H3 and functions in gene repression and organogenesis in *Arabidopsis*.** Plant Cell. 19: 2403-2416.
190. Li S., Xiao X., Li J., Luo J. and Wang F. (2006): **Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR.** Extremophiles. 10:97–104.
191. Li Z.Y., Liu C.P., Zhu L.Q., Jing G.Z., Zhou J.M. (2001): **The chaperone activity of trigger factor is distinct from its isomerase activity during co-expression with adenylate kinase in *Escherichia coli*.** FEBS Lett. 506: 108-112.
192. Lima A., Lima S., Wong J.H., Phillips R.S., Buchanan B.B. and Luan S. (2006): **A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in *Arabidopsis thaliana*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 103: 12631-12636.
193. Lindow S.E. and Brandl M.T. (2003): **Microbiology of the phyllosphere.** Appl. Environ. Microbiol. 69: 1875–1883.
194. Lindsay D., Brozel V.S., Mostert J.F. and von Holy A. (2002): **Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate.** J. Appl. Microbiol. 92: 352–361.
195. Lindum P.W., Anthoni U., Christophersen C., Eberl L., Molin S. and Givskov M. (1998): **N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1.** J. Bacteriol. 180: 6384-6388.
196. Liu C.P., Perrett S., and Zhou J.M. (2005a): **Dimeric trigger factor stably binds folding-competent intermediates and cooperates with the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system to allow refolding.** J. Biol. Chem. 280: 13315–13320.
197. Liu J. and Walsh C.T. (1990): **Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase from *Escherichia coli*: a periplasmic homolog of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87: 4028-4032.
198. Liu J., Farmer J.D. Jr, Lane W.S., Friedman J., Weissman I. and Schreiber S.L. (1991): **Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes.** Cell. 66: 807-815.
199. Liu J.O., Titov D.V., Dang Y. and He Q. (2011): **Regulator of Ras Depalmitoylation and Retrograde Trafficking: A New Hat for FKBP.** Mol. Cell. 41: 131–133.
200. Liu C.P., Zhou Q.M., Fan D.J. and Zhou J.M. (2010). **PPIase domain of trigger factor acts as auxiliary chaperone site to assist the folding of protein substrates bound to the crevice of trigger factor.** Inter. J. Biochem. Cell Biol. 42:890-901.

201. Lu K.P., Finn G., Lee T.H. and Nicholson L.K. (2007): **Prolyl *cis-trans* isomerization as a molecular timer.** Nat. Chem. Biol. 3: 619-629.
202. Lundemose A.G., Rouch D.A., Penn C.W. and Pearce J.H. (1993): **The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein.** J Bacteriol. 175: 3669–3671.
203. Lyon W.R. and Caparon M.G. (2003): **Trigger factor-mediated prolyl isomerization influences maturation of the *Streptococcus pyogenes* cysteine protease.** J Bacteriol. 185(12): 3661-3667.
204. Malesević M., Poehlmann A., Hernandez Alvarez B., Diessner A., Träger M., Rahfeld J.U., Jahreis G., Liebscher S., Bordusa F., Fischer G., Lücke C. (2010): **The protein-free IANUS peptide array uncovers interaction sites between *Escherichia coli* parvulin 10 and alkyl hydroperoxide reductase.** Biochemistry. 49: 8626-8635.
205. Manson M.D., Armitage J.P., Hoch J.A. and Macnab R.M. (1998): **Bacterial locomotion and signal transduction.** J. Bacteriol. 180: 1009–1022.
206. Mariconda S., Wang Q. and Harshey R.M. (2006): **A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility.** Mol. Microbiol. 60: 1590–1602.
207. Marks A.R. (1996): **Cellular functions of immunophilins.** Physiol. Rev. (76): 631-649.
208. Marsh J.A., Kalton H.M. and Gaber R.F. (1998): **Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in *cpr7Δ* cells.** Mol. Cell Biol. 18 (12): 7353–7359.
209. Martino P.D., Fursy R., Bret L., Sundararaju B. and Phillips R.S. (2003): **Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria.** Can. J. Microbiol. 49: 443-9.
210. Matern Y., Barion B. and Behrens-Kneip S. (2010): **PpiD is a player in the network of periplasmic chaperones in *Escherichia coli*.** BMC Microbiol. 10: 251.
211. McBride M. and Braun T.F. (2004): **GldI is a lipoprotein that is required for *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility and chitin utilization.** J. Bacteriol. 186(8): 2295–2302.
212. McCarter L.L. (1998): **OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*.** J. Bacteriol. 180: 3166-3173.
213. McCarty J.S. and Walker G.C. (1994): **DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins results in filamentation.** J. Bacteriol. 176: 764–780.
214. Meccas J., Rouviere P. E., Erickson J. W., Donohue T.I. and Gross C.A. (1993): **The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins.** Genes Dev. 12B: 2618-2628.
215. Meiri D., and Breiman A. (2009): **Arabidopsis ROF1 (FKBP62) modulates thermotolerance by interacting with HSP90.1 and affecting the accumulation of HsfA2-regulated sHSPs.** Plant J. 59: 387–399.
216. Meiri D., Tazat K., Cohen-Peer R., Farchi-Pisanty O., Aviezer-Hagai K., Avni A. and Breiman A. (2010): **Involvement of Arabidopsis ROF2 (FKBP65) in thermotolerance.** Plant Mol. Biol. 72: 191-203.

217. Mendel S., Holbourn J.M., Schouten J.A., Bugg T.D.H. (2006): **Interaction of the transmembrane domain of lysis protein E from bacteriophage wX174 with bacterial translocase MraY and peptidyl-prolyl isomerase SlyD.** *Microbiology*. 152: 2959–2967.
218. Méndez-Ortiz M.M., Hyodo M., Hayakawa Y. and Membrillo-Hernández J. (2006): **Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3', 5'-cyclic diguanylic acid.** *J. Biol. Chem.* 281: 8090-8099.
219. Mendu V., Chiu M., Barajas D., Li Z. and Nagy P.D. (2010): **Cpr1 cyclophilin and Ess1 parvulin prolyl isomerases interact with the tombusvirus replication protein and inhibit viral replication in yeast model host.** *Virology*. 406: 342-351.
220. 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.
221. Metzner M., Stoller G., Rücknagel K.P., Lu K.P., Fischer G., Luckner M. and Küllertz G. (2001): **Functional replacement of the essential ESS1 in yeast by the plant parvulin DPar13.** *J. Biol. Chem.* 276: 13524-13529.
222. Miles B.W., Banzon J.A. and Raushel F.M. (1998): **Regulatory control of the amidotransferase domain of carbamoyl phosphate synthetase.** *Biochemistry* 37: 16773–16779.
223. Miller B.G. and Raines R.T. (2004): **Identifying latent enzyme activities: substrate ambiguity within modern bacterial sugar kinases.** *Biochemistry*. 43: 6387-6392.
224. Milroy L.G., Grossmann T.N., Hennig S, Brunsveld L. and Ottmann C. (2014): **Modulators of Protein–Protein Interactions.** *Chem. Rev.* 114 : 4695–4748.
225. Mireles J.R., Toguchi A. and Harshey R.M. (2001): ***Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation.** *J. Bacteriol.* 183: 5848–5854.
226. Missiakas D. and Raina S. (1997): **Protein folding in the bacterial periplasm.** *J. Bacteriol.* 179: 2465– 2471.
227. Missiakas D., Betton J.M. and Raina S. (1996): **New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH.** *Mol. Microbiol.* 21: 871–884.
228. Moro A., Ruizcabello F., Fernandezcano A., Stock R.P. and Gonzalez A. (1995): **Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection.** *EMBO J.* 14: 2483–2490.
229. Nagradova N.K. (2008): **Foldase enzymes catalyzing protein folding.** Nova Science Publishers (New York).
230. Nakano M.M., Corbell N., Besson J. and Zuber P. (1992): **Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*.** *Mol. Gen. Genet.* 232: 313-321.
231. Nam H., Lewis N.E., Lerman J.A., Lee D.H., Chang R.L., Kim D. and Palsson B.O. (2012): **Network context and selection in the evolution to enzyme specificity.** *Science* 337: 1101-1104.
232. Narayanan N. and Chou C.P. (2008): **Physiological improvement to enhance *Escherichia coli* cell-surface display via reducing extracytoplasmic stress.** *Biotechnol. Prog.* 24: 293-301.

233. Nelson C.J., Santos-Rosa H., Kouzarides T. (2006): **Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression.** *Cell* 126: 905–916.
234. Nemoto K., Hirota K., Murakami K., Taniguti K., Murata H., Viducic D. and Miyake Y. (2003): **Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*.** *Chemotherapy*. 49: 121-125.
235. Niba E.T.E., Naka Y., Nagase M., Mori H. and Kitakawa M. (2007): **A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*.** *DNA Res.* 14(6): 237–246.
236. Nigro P, G Pompilio G and Capogrossi M.C.(2013): **Cyclophilin A: a key player for human disease.** *Cell Death and Disease* 4, e888
237. Nørregaard-Madsen M., Mygind B., Pedersen R., Valentin-Hansen P. and Sjøgaard-Andersen L. (1994): **The gene encoding the periplasmic cyclophilin homologue, PPlase A, in *Escherichia coli*, is expressed from four promoters, three of which are activated by the cAMP-CRP complex and negatively regulated by the CytR repressor.** *Mol. Microbiol.* 14: 989-997.
238. Norville I.H., Harmer N.J., Harding S.V., Fischer G., Keith K.E., Brown K.A., Sarkar-Tyson M. and Titball R.W. (2011): **A *Burkholderia pseudomallei* macrophage infectivity potentiator-like protein has rapamycin-inhibitable peptidylprolyl isomerase activity and pleiotropic effects on virulence.** *Infect. Immun.* 79: 4299-4307.
239. Novaka G., Blankschien M., Herman C., Gross C.A. and Rhodius V.A. (2006): **Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor 32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress.** *Genes Dev.* 20: 1776-1789.
240. O'Rear J., Alberti L. and Harshey R.M. (1992): **Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function.** *J. Bacteriol.* 174: 6125–6137.
241. Obi I.R., Nordfelth R. and Francis M.S. (2011): **Varying dependency of periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerases in promoting *Yersinia pseudotuberculosis* stress tolerance and pathogenicity.** *Biochem. J.* 439: 321–332.
242. Ogasawara H., Shinohara S., Yamamoto K. and Ishihama A. (2012): **Novel regulation targets of the metal-response BasS-BasR two-component system of *Escherichia coli*.** *Microbiology* 158: 1482–1492.
243. Oh K.C., Ivanchenko M.G., White T.J. and Lomax T.L. (2006): **The diageotropica gene of tomato encodes a cyclophilin: a novel player in auxin signaling.** *Planta* 224: 133-144.
244. O'Reilly A.O., Cole A.R., Lopes J.L.S., Lampert A., Wallace B.A. (2013): **Chaperone-mediated native folding of a  $\beta$ -scorpion toxin in the periplasm of *Escherichia coli*.** *Bioch. Bioph. Acta* 1840: 10–15.
245. O'Toole G.A. and Kolter R. (1998): **Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.** *Mol. Microbiol.* 30: 295-304.
246. Otto K., Norbeck J., Larsson T., Karlsson K.-A. and Hermansson M. (2001): **Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins.** *J. Bacteriol.* 183: 2445–2453.
247. Overhage J., Lewenza S., Marr A.K. and Hancock R.E.W. (2007): **Identification of Genes Involved in Swarming Motility Using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Mini-Tn5-lux Mutant Library.** *J. Bacteriol.* 189: 2164-2169.

248. Pahl A., Brune K. and Bang H. (1997): **Fit for life? Evolution of chaperones and folding catalysts parallels the development of complex organisms.** Cell Stress Chaper. 2: 78-86.
249. Park S.K. Xiao H. and Lei M. (2014): **Nuclear FKBP5, Fpr3 and Fpr4 affect genome-wide genes transcription.** Mol. Genet. Genomics 289: 125–136.
250. Partridge J.D. and Harshey R.M. (2013): **Swarming: Flexible Roaming Plans.** Bacteriol. 195: 909-918.
251. Patrick W.M., Qu E.M., Swartzl D.B. and Matsumura I. (2007): **Multicopy suppression underpins metabolic evolvability.** Mol. Biol. Evol. 24: 2716-2722.
252. Patzelt H., Kramer G., Rauch T., Schönfeld H.J., Bukau B. and Deuerling E. (2002): **Three-state equilibrium of *Escherichia coli* trigger factor.** Biol. Chem. 383: 1611-1619.
253. Pearson M.M., Rasko D.A., Smith S.N., Mobley H.L. (2010): **Transcriptome of Swarming *Proteus mirabilis*.** Infect. Immun. 78: 2834-2845.
254. Peattie D.A., Harding M.W., Fleming M.A., DeCenzo M.T., Lippke J.A., Livingston D.J. and Benasutti M. (1992): **Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89: 10974-10978.
255. Pehl M.J., Jamieson W.D., Karen K., Forbester J.L.; Fredendall R.J., Gregory G.A.; McFarland J.E., Healy J.M., Orwin P.M. (2012): **Genes That Influence Swarming Motility and Biofilm Formation in *Variovorax paradoxus* EPS.** PLoS ONE. 7(2): e31832.
256. Pereira P.J.B., Vega M.C., Gonzalez-Rey E., Fernandez-Carazo R., Macedo-Ribeiro S., Gomis-Ruth F.X., Gonzalez A. and Coll M. (2002): **Trypanosoma cruzi macrophage infectivity potentiator has a rotamase core and a highly exposed alpha-helix.** EMBO Rep. 3: 88–94
257. Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl. Acids Res. 29:e45.
258. Pirkel F. and Buchner J. (2001): **Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40.** J. Mol. Biol. 308: 795–806.
259. Pirkel F., Fischer E., Modrow S. and Buchner J. (2001): **Localization of the chaperone domain of FKBP52.** J Biol. Chem. 276: 37034-37041.
260. Pogliano J., Lynch A.S., Belin D., Lin E.C. and Beckwith J. (1997): **Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system.** Genes Dev. 11: 1169-1182.
261. Porath J. (1988): **IMAC: Immobilized Metal-Ion Affinity Based Chromatography, TrAC.** Trends Anal. Chem. 7: 254-259.
262. Post E., Kleiner D. and Oelze J. (1983): **Whole cell respiration and nitrogenase activities in *Azotobacter vinelandii* growing in oxygen controlled continuous culture.** Arch. Microbiol. 134: 68-72.
263. Pratt L.A. and Kolter R. (1998): **Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.** Mol. Microbiol. 30: 285-293.
264. Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P. and Dorel C. (2001): **Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the csgD gene.** J. Bacteriol. 183: 7213-7223.

265. Prüß B.M., Besemann C., Denton A. and Wolfe A.J. (2006): **A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli***. J. Bacteriol. 188: 3731–3739.
266. Quistgaard E.M., Nordlund P. and Löw C. (2012): **High-resolution insights into binding of unfolded polypeptides by the PPIase chaperone SlpA**. FASEB J. 26: 4003-4013.
267. Rahfeld J.U., Rücknagel K.P., Stoller G., Horne S.M., Schierhorn A., Young K.D. and Fischer G. (1996): **Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of *Escherichia coli*. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria**. J. Biol. Chem. 271: 22130-8.
268. Raivio T. L. and Silhavy T. J. (1999): **The  $\sigma^E$  and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses**. Curr. Opin. Microbiol. 2: 159– 165.
269. Ramm K. and Pluckthun A. (2001): **High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA**. J. Mol. Biol. 310: 485-498.
270. Ranganathan R., Lu K.P., Hunter T. and Noel J.P. (1997): **Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent**. Cell. 89: 875-86.
271. Rao V.S., Srinivas K., Sujini G.N., and Kumar G.N.S. (2014): **Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis**. Inter. J. Proteom. Article ID 147648.
272. Rasko D.A., Moreira C.G., Li de R., Reading N.C., Ritchie J.M., Waldor M.K., Williams N., Taussig R., Wei S., Roth M., Hughes D.T., Huntley J.F., Fina M.W., Falck J.R. and Sperandio V. (2008): **Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development**. Science. 321: 1078–1080.
273. Ratajczak T., Ward B.K. and Minchin R.F. (2003): **Immunophilin chaperones in steroid receptor signalling**. Curr. Top. Med. Chem. 3: 1348–1357.
274. Rather P.N. (2005): **Swarm cell differentiation in *Proteus mirabilis***. Environ. Microbiol. 7: 1065–1073.
275. Rauprich O., Matsushita M., Weijer C.J., Siegert F., Esipov S.E. and Shapiro J.A. (1996): **Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development**. J. Bacteriol. 178: 6525-6538.
276. Reffuveille F., Connil N., Sanguinetti M., Posteraro B., Chevalier S., Auffray Y. and Rince A. (2012): **Involvement of peptidyl prolyl cis/trans isomerases in *Enterococcus faecalis***. Virul. Infect. Immun. 1728–1735.
277. Reimer T., Weiwad M., Schierhorn A., Ruecknagel P.K., Rahfeld J.U., Bayer P. and Fischer G. (2003): **Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14**. J Mol. Biol. 330: 955–966.
278. Reisner A., Haagensen J.A., Schembri M.A., Zechner E.L. and Molin S. (2003): **Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms**. Mol. Microbiol. 48: 933-46.
279. Ren P., Rossetini A., Chaturvedi V. and Hanes S.D. (2005): **The Ess1 prolyl isomerase is dispensable for growth but required for virulence in *Cryptococcus neoformans***. Microbiology. 151: 1593-605.
280. Rennie R.J. (1981): **A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils**. Can. J. Microbiol. 27: 8-14.

281. Riboldi-Tunncliffe A., König B., Jessen S., Weiss M.S., Rahfeld J., Hacker J., Fischer G. and Hilgenfeld R. (2001): **Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from Legionella pneumophila.** Nat. Struct. Biol. 8: 779–783.
282. Rines D.R., Thomann D., Dorn J.F., Goodwin P. and Sorger P.K. (2011): **Live cell imaging of yeast.** Cold Spring Harb. Protoc. 2011 (9).
283. Ron E.Z. and Rosenberg E. (2001): **Natural roles of biosurfactants.** Environ. Microbiol. 3: 229–236.
284. Roof W.D., and Young R. (1995):  **$\phi$ X174 Lysis Requires SlyD, a Host Gene Which Is Related to the FKBP Family of PeptidylProlyl Cis/Trans Isomerases.** FEMS Microbiol. Rev.17: 213-218.
285. Roof W.D., Fang H.Q., Young K.D., Sun J.L. and Young R. (1997): **Mutational analysis of slyD, an Escherichia coli gene encoding a protein of the FKBP immunophilin family.** Mol. Microbiol. 25: 1031-1046.
286. Roof W.D., Fang H.Q., Young K.D., Sun J.L. and Young R. (1997): **Mutational analysis of slyD, an Escherichia coli gene encoding a protein of the FKBP immunophilin family.** Mol. Microbiol. 25: 1031-1046.
287. Roset M.S., García Fernández L., DelVecchio V.G. and Briones G. (2013): **Intracellularly induced cyclophilins play an important role in stress adaptation and virulence of Brucella abortus.** Infect. Immun. 81: 521-530.
288. Roudier F., Gissot L., Beaudoin F., Haslam R., Michaelson L., Marion J., Molino D., Lima A., Bach L., Morin H., Tellier F., Palauqui J.C., Bellec Y., Renne C., Miquel M., Dacosta M., Vignard J., Rochat C., Markham J.E., Moreau P., Napier J. and Faure J.D. (2010): **Very-long-chain fatty acids are involved in polar auxin transport and developmental patterning in Arabidopsis.** Plant Cell. 22: 364-375.
289. Rouviere P.E. and Gross C.A. (1996): **SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins.** Genes Dev 10: 3170–3182.
290. Rudrappa T., Biedrzycki M.L. and Bais H.P. (2008): **Causes and consequences of plant associated biofilms.** FEMS Microbiol Ecol. 64(2): 153-66.
291. Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J. and Moorman A.F. (2009): **Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data.** Nucl. Acids Res. 6:e45.
292. Sadoff H. (1975): **Encystment and germination in Azotobacter vinelandii.** Bacteriol. Rev. 39: 516-539.
293. Sakamoto A., Terui Y., Yamamoto T., Kasahara T., Nakamura M., Tomitori H., Yamamoto K., Ishihama A., Michael A.J., Igarashi K. and Kashiwagi K. (2012): **Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor.** Int. J. Biochem. Cell Biol. 44: 1877–1886.
294. Salvetti S., Faegri K., Ghelardi E., Kolstø A.B. and Senesi S. (2011): **Global gene expression profile for swarming Bacillus cereus bacteria.** Appl. Environ. Microbiol. 77: 5149-5156.
295. Sar N., McCarter L., Simon M. and Silverman M. (1990): **Chemotactic control of the two flagellar systems of Vibrio parahaemolyticus.** J. Bacteriol. 172: 334-341.
296. Sauer F.G., Knight S.D., Waksman G.J. and Hultgren S.J. (2000): **PapD-like chaperones and pilus biogenesis.** Semin. Cell Dev. Biol. 11: 27-34.



297. Sauer K. (2003): **The genomics and proteomics of biofilm formation.** *Genome Biol.* 4: 219.
298. Saul F.A., Arie J.P., Vulliez-le Normand B., Kahn R., Betton J.M. and Bentley G.A. (2004): **Structural and functional studies of FkpA from *Escherichia coli*, a *cis/trans* peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity.** *J. Mol. Biol.* 335: 595–608.
299. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. and Pühler A. (1994): **Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*.** *Gene.* 145: 69-73.
300. Schembri M.A., Kjærsgaard K. and Klemm P. (2003): **Global Gene Expression in *Escherichia coli* Biofilms.** *Mol. Microbiol.* 48: 253–267.
301. Schiene C. and Fischer G. (2000): **Enzymes that catalyse the restructuring of proteins.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 40-45.
302. Schmid F.X. (1993): **Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions.** *Annu Rev Biophys Biomol. Struct.* 22: 123-142.
303. Scholz C., Eckert B., Hagn F., Schaarschmidt P., Balbach J. and Schmid F.X. (2006): **SlyD proteins from different species exhibit high prolyl isomerase and chaperone activities.** *Biochemistry.* 45: 20-33.
304. Scholz C., Mücke M., Rape M., Pecht A., Pahl A., Bang H., Schmid F.X. (1998): **Recognition of protein substrates by the prolyl isomerase trigger factor is independent of proline residues.** *J. Mol. Biol.* 277: 723-732.
305. Scholz C., Rahfeld J., Fischer G. and Schmid F.X. (1997a): **Catalysis of protein folding by parvulin.** *J Mol Biol.* 273: 752-762.
306. Scholz C., Stoller G., Zarnt T., Fischer G. and Schmid F.X. (1997b): **Cooperation of enzymatic and chaperone functions of trigger factor in the catalysis of protein folding.** *EMBO J.* 16(1): 54-58.
307. Schönbrunner E.R. and Schmid F.X. (1992): **Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89: 4510-4518.
308. Setubal J.C., dos Santos P., Goldman B.S., Ertesvåg H., Espin G., Rubio L.M., Valla S., Almeida N.F., Balasubramanian D., Cromes L., Curatti L., Du Z., Godsy E., Goodner B., Hellner-Burriss K., Hernandez JA, Houmiel K., Imperial J., Kennedy C., Larson T.J., Latreille P., Ligon L.S., Lu J., Maerk M, Miller N.M., Norton S., O'Carroll I.P., Paulsen I., Raulfs E.C., Roemer R., Rosser J., Segura D., Slater S, Stricklin SL, Studholme D.J., Sun J., Viana C.J., Wallin E., Wang B., Wheeler C., Zhu H., Dean D.R., Dixon R. and Wood D. (2009): **Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes.** *J Bacteriol.* 191: 4534-4345.
309. Sharma A.D. and Kaur P. (2009): **Combined effect of drought stress and heat shock on cyclophilin protein expression in *Triticum aestivum*.** *Gen. Appl. Plant Physiol.* 35: 88-92.
310. Shimamoto S., Kubota Y., Tokumitsu H. and Kobayashi R. (2010): **S100 proteins regulate the interaction of Hsp90 with Cyclophilin 40 and FKBP52 through their tetratricopeptide repeats.** *FEBS Lett.* 584: 1119-1125.

311. Shou W., Aghdasi B., Armstrong D.L., Guo Q., Bao S., Chang M.J., Mathews L.M., Schneider M.D., Hamilton S.L. and Matzuk M.M. (1998): **Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12.** *Nature.* 391: 489-492.
312. Siekierka J.J., Hung S.H., Poe M., Lin C.S. and Sigal N.H. (1989): **A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin.** *Nature.* 341: 755-757.
313. Sinars C.R., Cheung-Flynn J., Rimerman R.A., Scammell J.G., Smith D.F. and Clardy J. (2003): **Structure of the large FK506-binding protein FKBP51, an Hsp90-binding protein and a component of steroid receptor complexes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 868-873.
314. Singh N., Ma Z., Gemmill T., Wu X., Defiglio H., Rossetini A., Rabeler C., Beane O., Morse R.H., Palumbo M.J., Hanes S.D. (2009): **The Ess1 prolyl isomerase is required for transcription termination of small non coding regulatory RNAs via the Nrd1 pathway.** *Mol. Cell.* 36(2): 255-66.
315. Sivapalasingam S., Friedman C.R., Cohen L. and Tauxe R.V. (2004): **Fresh produce; a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997.** *J. Food Prot.* 67: 2342–2353.
316. Smith J.L., Fratamico P.M. and Novak J.S. (2004): **Quorum sensing: a primer for food microbiologists.** *J. Food Prot.* 67: 1053–1070.
317. Smyth C.J., Marron M.B., Twohig J.M. and Smith S.G. (1996): **Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16: 127-139.
318. Snyder S. H., Lai M. M. and Burnett P. E. (1998): **Immunophilins in the nervous system.** *Neuron.* 21: 283-294.
319. Somarelli J.A. and Herrera R.J. (2007): **Evolution of the 12 kDa FK506-binding protein gene.** *Biol Cell.* 99: 311-321.
320. Sousa C. P. (2006): **The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review.** *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 12: 363-373.
321. Spencer S.C. (1991): **Electroporation technique of DNA transfection.** *Methods Mol Biol.* 7: 45-52.
322. Stahl S.J., Stewart K.R. and Williams F.D. (1983): **Extracellular slime associated with *Proteus mirabilis* during swarming.** *J. Bacteriol.* 154: 930-937.
323. Starkey M., Gray K.A., Chang S.I. and Parsek M.R. (2004): **A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms.** In *Microbial Biofilms*, 174–191. Edited by M. Ghannoum & G. A. O'Toole. Washington, DC: American Society for Microbiology.
324. Stoller G., Rucknagel K. P., Nierhaus K. H., Schmid F. X., Fischer G. and Rahfeld J.-U. (1995): **A ribosome-associated peptidyl-prolyl cis:trans isomerase identified as the trigger factor.** *EMBO J.* 14: 4939 – 4948.
325. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G. and Costerton J.W. (2002): **Biofilms as complex differentiated communities.** *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187–209.
326. Sugimoto S., Saruwatari K., Higashi C. and Sonomoto K. (2008): **The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division.** *Microbiology* 154: 1876 –1885.

327. Suzuki K., Wang X., Weilbacher T., Pernestig A.K., Melefors O., Georgellis D., Babitzke P. and Romeo T. (2002): **Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli***. *J. Bacteriol.* 184: 5130–5140.
328. Suzuki R., Nagata K., Yumoto F., Kawakami M., Nemoto N., Furutani M., Adachi K., Maruyama T. and Tanokura M. (2003): **Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl cis-trans isomerase and chaperone-like activities**. *J. Mol. Biol.* 328: 1149-1160.
329. Suzuki Y., Haruki M., Takano K., Morikawa M. and Kanaya S. (2004): **Possible involvement of an FKBP family member protein from a psychrotrophic bacterium *Shewanella sp. SIB1* in cold adaptation**. *Eur. J. Biochem.* 271: 1372–1381.
330. Suzuki Y., Win O.Y., Koga Y., Takano K. and Kanaya S. (2005): **Binding analysis of a psychrotrophic FKBP22 to a folding intermediate of protein using surface plasmon resonance**. *FEBS Lett.* 579: 5781–5784.
331. Tamayo R., Pratt J.T. and Camilli A. (2007): **Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis**. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 131-48.
332. Teter S.A., Houry W.A., Ang D., Tradler T., Rockabrand D., Fischer G., Blum P., Georgopoulos C. and Hartl F.U. (1999): **Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains**. *Cell.* 97: 755-65.
333. Thoden J.B., Raushel F.M., Benning M.M., Rayment I. and Holden H.M. (1999): **The structure of carbamoyl phosphate synthetase determined to 2.1 Å resolution**. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55(Pt 1): 8-24.
334. Tobe T. (2008): **The roles of two-component systems in virulence of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp.** *Adv. Exp. Med. Biol.* 631: 189–199.
335. Toguchi A., Siano M., Burkart M. and Harshey R.M. (2000): **Genetics of swarming motility in *Salmonella enteric serovar Typhimurium*: critical role for lipopolysaccharide**. *J. Bacteriol.* 182: 6308–6321.
336. Trachoo N. (2003): **Biofilms and the food industry**. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 25: 807– 815.
337. Tradler T., Stoller G., Rucknagel K.P., Schierhorn A., Rahfeld J.U. and Fischer G. (1997). **Comparative mutational analysis of peptidyl prolyl cis/trans isomerases: Active sites of *Escherichia coli* trigger factor and human FKBP12**. *FEBS Lett.* 407: 184–190.
338. Tremblay J. and Déziel E. (2010): **Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility**. *BMC Genomics.* 11: 587.
339. Tremblay J., Richardson A.P., Lépine F. and Déziel E. (2007): **Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour**. *Environ. Microbiol.* 9:2622-2630.
340. Turner L., Zhang R., Darnton N. C., and Berg. H. C. (2010): **Visualization of flagella during bacterial swarming**. *J. Bacteriol.* 192: 3259–3267.
341. Uchida T., Fujimori F., Tradler T., Fischer G. and Rahfeld JU. (1999): **Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase**. *FEBS Lett.* 446: 278-282.

342. Ueda A., Attila C., Whiteley M. and Wood T.K. (2009): **Uracil influences quorum sensing and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and fluorouracil is an antagonist.** *Microb. Biotechnol.* 2: 62–74.
343. Uhlich G.A., Cooke P.H. and Solomon E.B. (2006): **Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents.** *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2564-2572.
344. Van Ditmarsch D. and Xavier J.B. (2011): **High-resolution time series of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression and rhamnolipid secretion through growth curve synchronization.** *BMC Microbiol.* 11:140
345. Vasseur P., Vallet-Gely I., Soscia C., Genin S. and Filloux A. (2005): **The *pel* genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation.** *Microbiology.* 151: 985-997.
346. Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaeer J., Vermant J. and Michiels J. (2008): **Living on a surface: swarming and biofilm formation.** *Trends Microbiol.* 16: 496–506.
347. Vertommen D., Ruiz N., Leverrier P., Silhavy T.J., Collet J.F. (2009): **Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics.** *Proteomics.* 9: 2432-2443.
348. Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M. and Lejeune P. (1998): **Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression.** *J. Bacteriol.* 180: 2442-2449.
349. Vittorioso P., Cowling R., Faure J.D., Caboche M. and Bellini C. (1998): **Mutation in the *Arabidopsis* PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development.** *Mol. Cell Biol.* 18: 3034-3043.
350. Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R. and Kolter R. (2013): **Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way.** *Nature.* 11: 157-168.
351. Wagner A. (2005a): **Distributed robustness versus redundancy as causes of mutational robustness.** *BioEssays.* 27: 176–188.
352. Walters M. and Sperandio V. (2006a): **Autoinducer-3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* 74: 5445–5455.
353. Walters M. and Sperandio V. (2006b): **Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*.** *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 125–131.
354. Wang P. and Heitman J. (2005): **The cyclophilins.** *Gen.Biol.* 6: 226.
355. Wang Q., Frye J.G., McClelland M. and Harshey R.M. (2004): **Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes.** *Mol. Microbiol.* 52: 169–187.
356. Wang Q., Zhao Y., McClelland M. and Harshey R.M. (2007): **The RcsCDB signaling system and swarming motility in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: dual regulation of flagellar and SPI-2 virulence genes.** *J. Bacteriol.* 189: 8447-8457.
357. Wang T., Donahoe P.K. and Zervos A.S. (1994): **Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP12.** *Science.* 265: 674-676.

358. Watnick P. and Kolter R. (2000): **Biofilm, city of microbes.** J. Bacteriol. 182: 2675–2679.
359. Webb H.M., Ruddock L.W., Marchant R.J., Jonas K., Klappa P. (2001): **Interaction of the periplasmic peptidyl prolyl cis-trans isomerase SurA with model peptides. The N-terminal region of SurA is essential and sufficient for peptide binding.** J. Biol. Chem. 276: 45622-45627.
360. Weber H., Pesavento C., Possling A., Tischendorf G. and Hengge R. (2006): **Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*.** Mol Microbiol 62: 1014–1034.
361. Wehrens X.H., Lehnart S.E., Huang F., Vest J.A., Reiken S.R., Mohler P.J., Sun J., Guatimosim S., Song L.S., Rosemblyt N., D'Armiento J.M., Napolitano C., Memmi M., Priori S.G., Lederer W.J. and Marks A.R. (2003): **FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death.** Cell. 113: 829-840.
362. Weininger U., Haupt C., Schweimer K., Graubner W., Kovermann M., Brüser T., Scholz C., Schaarschmidt P., Zoldak G., Schmid F.X. and Balbach J. (2009b): **NMR solution structure of SlyD from *Escherichia coli*: spatial separation of prolyl isomerase and chaperone function.** J. Mol. Biol. 387: 295-305.
363. Weininger U., Jakob R.P., Kovermann M., Balbach J. and Schmid F.X. (2010): **The prolyl isomerase domain of PpiD from *Escherichia coli* shows a parvulin fold but is devoid of catalytic activity.** Protein Sci. 19: 6-18.
364. Weiwad M., Werner A., Rucknagel P., Schierhorn A., Kullertz G. and Fischer G. (2004): **Catalysis of Proline-directed Protein Phosphorylation by Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases.** J. Mol. Biol. 339: 635-646.
365. Wen Z.T., Suntharaligham P., Cvitkovitch D.G. and Burne R.A. (2005): **Trigger Factor in *Streptococcus mutans* is involved in stress tolerance, competence development, and biofilm formation.** Infect. Immun. 73: 219–225.
366. Wilson M. (2001): **Bacterial biofilms and human disease.** Sci. Prog. 84: 235–254.
367. Wu T., Zhao Z., Zhang L., Ma H., Lu K., Ren W., Liu Z., Chang H., Bei W., Qiu Y. and Chen H. (2011): **Trigger factor of *Streptococcus suis* is involved in stress tolerance and virulence.** Microb. Pathog. 51: 69-76.
368. Wulf G., Finn G. Suizu F. and Lu K.P. (2005): **Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme?** Nat. Cell. Biol. 7(5): 435-441.
369. Wulfing C., Lombardero J. and Pluckthun A. (1994): **An *Escherichia coli* Protein Consisting of a Domain Homologous to FK506-Binding Proteins (FKBP) and a New Metal-Binding Motif.** J. Biol. Chem. 269: 2895-2901.
370. Yao J.L., Kops O., Lu P.J. and Lu K.P. (2001): **Functional conservation of phosphorylation-specific prolyl isomerases in plants.** J. Biol. Chem. 276: 13517-13523.
371. Yoon Y. and Sofos J.N. (2008): **Autoinducer-2 activity of gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation.** J. Food Sci. 73: M140–147.
372. Young K.D. (2007): **Bacterial morphology: why have different shapes?** Curr. Opin. Microbiol. 10: 596–600.
373. Young KD. (2010): **Bacterial shape: two-dimensional questions and possibilities.** Annu. Rev. Microbiol. 64: 223–240.

374. Zhang J.W., Butland G., Greenblatt J.F., Emili A. and Zamble D.B. (2005): **A role for SlyD in the *Escherichia coli* hydrogenase biosynthetic pathway.** J. Biol. Chem. 280: 4360-4366.
375. Zhang J.W., Leach M.R. and Zamble D.B. (2007): **The peptidyl-prolyl isomerase activity of SlyD is not required for maturation of *Escherichia coli* hydrogenase.** J Bacteriol. 189: 7942-7944.
376. Zhou L., Lei X.H., Bochner B.R. and Wanner B.L. (2003): **Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems.** J. Bacteriol. 185: 4956–4972.
377. Zoldák G., Carstensen L., Scholz C. and Schmid F.X. (2009): **Consequences of domain insertion on the stability and folding mechanism of a protein.** J. Mol. Biol. 386: 1138-1152.
378. Zoldák G., Schmid F.X. (2011): **Cooperation of the prolyl isomerase and chaperone activities of the protein folding catalyst SlyD.** J. Mol. Biol. 406: 176-194.
379. Zydowsky L.D., Etkorn F.A., Chang H.Y., Ferguson S.B., Stolz L.A., Ho S.I. and Walsh C.T. (1992): **Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition.** Protein Sci. 1: 1092–1099.

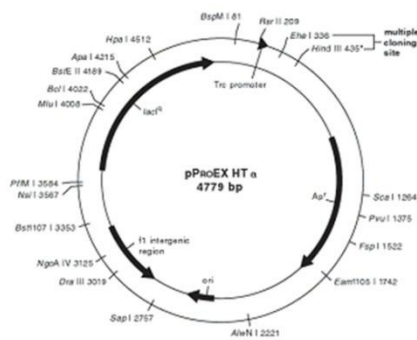
## ΣΤ. Παράρτημα

### ΣΤ.1 Θρεπτικό μέσο Rennie

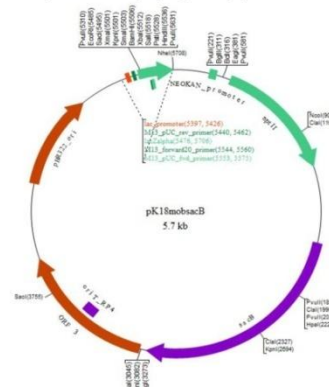
Για την παρασκευή 500 mL θρεπτικού διαλύματος Rennie προστίθενται σε γυάλινη φιάσκα: 0.4 g  $K_2HPO_4$ , 0.1 g  $KH_2PO_4$ , 0.05 g NaCl, 0.014 g  $Na_2FeEDTA$ , 0.0125 g  $Na_2MOO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.05 g yeast extract, 2.5 g μαννιτόλη και 2.5 g σακχαρόζη. Συμπληρώνεται με  $dH_2O$  έως τα 450 mL και αποστειρώνεται. Σε ξεχωριστή γυάλινη φιάσκα προστίθενται: 0.1 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  και 0.03 g  $CaCl_2$ . Συμπληρώνεται με  $dH_2O$  έως τα 50 mL και αποστειρώνεται. Αφού αποστειρωθούν, αναμιγνύονται ενώ για την παρασκευή στερεού θρεπτικού μέσου για τρυβλία στο διάλυμα προστίθεται 1.5% w/v άγαρ. Το θρεπτικό διάλυμα μπορεί να παρασκευαστεί παρουσία αζώτου. Σε αυτήν την περίπτωση στο δεύτερο θρεπτικό προστίθενται 1.155 g  $NH_4OAc \cdot H_2O$ .

### ΣΤ.2 Πλασμιδιακοί φορείς

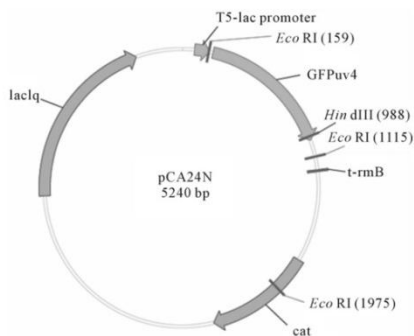
Ο πλασμιδιακός φορέας pPROEX.Hta



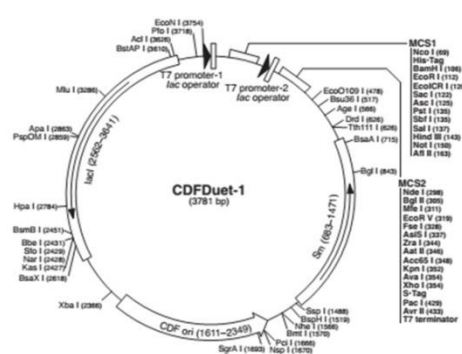
Ο πλασμιδιακός φορέας pK18mobsacB



Ο πλασμιδιακός φορέας pCA24N



Ο πλασμιδιακός φορέας pCDFDuet-1



### ΣΤ.3 Ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς και βακτηριακά στελέχη

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

Πλασμίδια	Αναφορά/Πηγή
<b><i>A. vinelandii</i></b>	
<i>AvfkbX.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbB.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA2.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvcarA.H.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA2.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvcarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1.H-AvcarA<sub>p358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA2.H-AvcarA<sub>p358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvcarA<sub>p358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvribF.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvispH.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvmreB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvminD.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AventE.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvfliC.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbX.H-AvgltB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvribF.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvispH.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvmreB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvminD.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AventE.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfliC.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvgltB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>AvfkbA1.pK18mobsacB</i>	Παρούσα μελέτη



***E. coli***

<i>EcfkpA</i> .H.pCDFDuet-1 (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpA</i> <sub>Y225A</sub> .H.pCDFDuet-1 (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpA</i> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpA</i> <sub>Y225A</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB</i> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB</i> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcfklB</i> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfklB</i> <sub>Y181A</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcfklB</i> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcfklB</i> <sub>Y181A</sub> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcslyD</i> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>EcslyD</i> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pCDFDuet-1	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pPROEX.HTa	Παρούσα μελέτη
<i>EcppiA</i> .H.pCA24N JW3326	NBRP ASKA (-) library
<i>EcppiB</i> .H.pCA24N JW0514	NBRP ASKA (-) library
<i>EcfkpA</i> .H.pCA24N JW3309	NBRP ASKA (-) library
<i>EcfkpB</i> .H.pCA24N JW0026	NBRP ASKA (-) library
<i>EcfklB</i> .H.pCA24N JW5746	NBRP ASKA (-) library
<i>EcslyD</i> .H.pCA24N JW3311	NBRP ASKA (-) library
<i>Ectig</i> .H.pCA24N JW0426	NBRP ASKA (-) library
<i>EcppiC</i> .H.pCA24N JW3748	NBRP ASKA (-) library
<i>EcppiD</i> .H.pCA24N JW0431	NBRP ASKA (-) library
<i>EcsurA</i> .H.pCA24N JW0052	NBRP ASKA (-) library
<i>EcdnaK</i> .H.pCA24N JW0013	NBRP ASKA (-) library
<i>EcglpD</i> .H.pCA24N JW3389	NBRP ASKA (-) library
<i>EcmreB</i> .H.pCA24N JW3220	NBRP ASKA (-) library
<i>EccarA</i> .H.pCA24N JW0030	NBRP ASKA (-) library
<i>EcrpoB</i> .H.pCA24N JW3950	NBRP ASKA (-) library
<i>EccheA</i> .H.pCA24N JW1877	NBRP ASKA (-) library
<i>EcfliC</i> .H.pCA24N JW1908	NBRP ASKA (-) library

<i>EcispH.H.pCA24N JW0027</i>	NBRP ASKA (-) library
<i>EcfkpB.H-EcdnaK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcglpD.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcmreB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EccarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcispH.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcdnaK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcglpD.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcmreB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EccarA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcispH.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcdnaK.H.GFP.pCA24N</i>	NBRP ASKA (+) library
<i>EcglpD.H.GFP.pCA24N</i>	NBRP ASKA (+) library
<i>EcmreB.H.GFP.pCA24N</i>	NBRP ASKA (+) library
<i>EccarA.H.GFP.pCA24N</i>	NBRP ASKA (+) library
<i>EcfkpB.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcfkpB.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>Ectig.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcftsK.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EczipA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcminC.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη
<i>EcsulA.S.pCDFDuet-1</i>	Παρούσα μελέτη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα εξής:

Στελέχη	Αναφορά/Πηγή
<i>A. vinelandii</i>	

BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbB.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbB.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA1.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA2.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA2.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvcarA.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvcarA.H.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA1.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA2.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA2.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1<sub>Y194A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA2<sub>Y84A</sub>.H.AvcarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA1.H.AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1.H.AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbA2.H.AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA2.H.AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvcarA<sub>P358A</sub>.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvribF.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvribF.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvminD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη

XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvminD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AventE.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AventE.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvfliC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvfliC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfkbX.H-AvgltB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbX.H-AvgltB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvribF.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvribF.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvpdxA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvminD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvminD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AventE.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AventE.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvfliC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfliC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>AvgltB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvgltB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>AvfkbA1.pK18mobsacB</i> )	Παρούσα μελέτη
<b><i>E. coli</i></b>	
BW25113	NBRP Keio collection
<i>ΔfkpA</i> JW3309	NBRP Keio collection
<i>ΔfkpB</i> JW0026	NBRP Keio collection
<i>ΔfklB</i> JW5746	NBRP Keio collection
<i>ΔslyD</i> JW3311	NBRP Keio collection
<i>Δtig</i> JW0426	NBRP Keio collection
BL21 DE3 ( <i>EcfkpA.H.pCDFDuet-1</i> ) (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpA.H.pCDFDuet-1</i> ) (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpA<sub>Y225A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> ) (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpA<sub>Y225A</sub>.H.pCDFDuet-1</i> ) (χωρίς πεπτιδίο οδηγό)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcfkpA.H.pPROEX.HTa</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpA.H.pPROEX.HTa</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcfkpA<sub>Y225A</sub>.H.pPROEX.HTa</i> )	Παρούσα μελέτη

BW25113 ( <i>EcfkpA</i> <sub>V225A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcfkpB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB</i> <sub>D119A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkIB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkIB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkIB$ ( <i>EcfkIB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkIB</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkIB</i> <sub>V181A</sub> .pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkIB</i> <sub>V181A</sub> .pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkIB$ ( <i>EcfkIB</i> <sub>V181A</sub> .pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkIB</i> <sub>V181A</sub> .pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcslyD</i> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcslyD</i> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
$\Delta slyD$ ( <i>EcslyD</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcslyD</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
$\Delta slyD$ ( <i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcslyD</i> <sub>F132A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig</i> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig</i> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pCDFDuet-1)	Παρούσα μελέτη
$\Delta tig$ ( <i>Ectig</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>Ectig</i> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta tig$ ( <i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>Ectig</i> <sub>V66G</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta tig$ ( <i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>Ectig</i> <sub>F198A</sub> .H.pPROEX.HTa)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpA$ ( <i>EcppiA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcppiA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
$\Delta fklB$ ( <i>EcppiA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
$\Delta slyD$ ( <i>EcppiA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη

<i>Δtig</i> ( <i>EcppiA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcppiB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcppiB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcppiB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcppiB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcppiB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcfkpA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcfkpA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcfkpA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcfkpA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcfkpA.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcfkpB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcfkpB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcfkpB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcfkpB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcfkpB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcflB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcflB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcflB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcflB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcflB.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcslyD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcslyD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcslyD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcslyD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcslyD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>Ectig.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>Ectig.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>Ectig.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>Ectig.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>Ectig.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcppiC.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcppiC.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcppiC.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcppiC.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcppiC.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcppiD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcppiD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcppiD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcppiD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcppiD.H.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη

<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcsurA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcsurA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfklB</i> ( <i>EcsurA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcsurA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>Δtig</i> ( <i>EcsurA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
AG1 ( <i>EcdnaK</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcglpD</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcmreB</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EccarA</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EccheA</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcfliC</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
AG1 ( <i>EcispH</i> .H.pCA24N)	NBRP ASKA (-) library
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcdnaK</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcglpD</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcmreB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EccarA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EccheA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcfliC</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpB</i> ( <i>EcispH</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcdnaK</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcglpD</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcmreB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EccarA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EccheA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcfliC</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔfkpA</i> ( <i>EcispH</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcdnaK</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcglpD</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcmreB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EccarA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EccheA</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcfliC</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcrpoB</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη
<i>ΔslyD</i> ( <i>EcispH</i> .H.pCA24N)	Παρούσα μελέτη

BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcglpD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcglpD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EccarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EccarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcdnaK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcglpD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcglpD.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcmreB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EccarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EccarA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcrpoB.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcispH.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcdnaK.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcdnaK.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcdnaK.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcdnaK.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcglpD.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcglpD.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcglpD.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcglpD.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcmreB.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EcmreB.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcmreB.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EcmreB.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EccarA.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
$\Delta fkpB$ ( <i>EccarA.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EccarA.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BW25113 ( <i>EcfkpB<sub>D119A</sub>.H.pPROEX.Hta</i> )( <i>EccarA.H.GFP.pCA24N</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη



BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcfkpB.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcfkpB.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>Ectig.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>Ectig.H-EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcftsZ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcftsQ.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcftsK.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EczipA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcminC.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
BL21 DE3 ( <i>EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη
XL-Blue ( <i>EcsulA.S.pCDFDuet-1</i> )	Παρούσα μελέτη

